



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

Dottorato di Ricerca in
“Riproduzione, Sviluppo ed Accrescimento dell’Uomo”
XXV Ciclo

Direttore: Prof. Claudio Pignata

TESI DI DOTTORATO

***“Impatto di nuove variabili ovariche ed endometriali sull’esito
di tecniche di PMA”***

TUTOR

Dott. Carlo Alviggi

CANDIDATO

Dott.ssa Antonella Stile

INDICE

INTRODUZIONE

- La teoria “Two cells - two gonadotropins”: supporto teorico per l’impiego di gonadotropine nei protocolli di stimolazione ovarica controllata pag. 7
 - Impiego delle gonadotropine esogene nella pratica clinica della PMA pag. 10
 - Farmacogenomica una visione di insieme pag. 17
- La paziente *Hypo-responder* pag. 16
- Poliposi e sterilità pag. 23

PRIMA LINEA DI RICERCA: patogenesi genetica della *hypo-responder*

I progetto di ricerca: Ruolo del polimorfismo del r-FSH in pazienti sottoposte a cicli di PMA pag.25

Introduzione

- Recettore dell’FSH pag.25
- Patogenesi farmacogenomica della paziente *hypo-responder* pag. 28

Obiettivo di ricerca pag. 30

Materiali e Metodi pag. 30

Analisi statistica pag. 34

Risultati pag.34

II progetto di ricerca: Ruolo del polimorfismo di ν -LH β in pazienti sottoposte a cicli di PMA

Introduzione

- LH: struttura, sintesi e ruolo in ambito riproduttivo pag.36
- Patogenesi Farmacogenomica delle pazienti *hypo-responders*: basi di partenza scientifica pag.46

Obiettivi di Ricerca	pag. 52
Materiali e Metodi	pag. 53
Analisi statistica	pag. 56
Risultati	pag. 56

SECONDA LINEA DI RICERCA: Impatto degli stati infiammatori sublinici dell'endometrio sull'impianto.

III Progetto di ricerca: Livelli di INF- γ nel siero ed in campioni bioptici di pazienti affette da poliposi endometriale: implicazioni nell' impianto embrionale

Introduzione	pag. 60
- Basi scientifiche	pag. 83
Obiettivo dello studio	pag. 84
Materiali e metodi	pag. 85
- Pazienti e tecnica	pag. 85
- Saggi immunologici	pag. 87
- Analisi statistica	pag. 91
Risultati	pag. 92
Conclusioni I Progetto di Ricerca	pag. 100
Conclusioni II Progetto di Ricerca	pag. 104
Conclusioni III Progetto di Ricerca	pag. 108
Conclusioni Finali	pag. 112
BIBLIOGRAFIA	pag. 115

INTRODUZIONE

L'Unione Mondiale della Sanità [*World Health Organization* (WHO)] definisce la salute riproduttiva come “uno stato di completo benessere fisico, mentale e sociale e non semplicemente l'assenza di malattia o di infermità in tutto ciò che è relativo al sistema riproduttivo e alle sue funzioni e processi”. L'infertilità deve, pertanto, essere considerata un processo patologico degno di indagine e trattamento.

In particolare, si definisce come “sterilità” l'incapacità di concepire entro un anno con rapporti sessuali frequenti e non protetti.

La PMA costituisce un mezzo di comprovata efficacia nella terapia della sterilità di coppia e sottende tutti quei procedimenti che comportano il trattamento di oociti umani, di spermatozoi o embrioni nell'ambito di un progetto finalizzato alla realizzazione di una gravidanza. Queste metodiche sono suddivise in base al diverso grado di invasività, sia tecnica sia psicologica e sono applicate in base al principio della “gradualità”, al fine di evitare il ricorso, qualora non indicato, ad interventi contrassegnati da grado di invasività più gravoso per i destinatari (art. 4, legge 40/2004).

Le tecniche di PMA sono classificate come segue:

Tecniche di I Livello:

(procedure in cui la fecondazione dell'ovocita si verifica *in vivo*, senza il ricorso ad anestesia)

Tecniche di II Livello:

(procedure eseguibili in anestesia locale e/o sedazione profonda)

- fecondazione *in vitro* e trasferimento dell'embrione (FIVET);
- inseminazione sopracervicale in ciclo naturale eseguita utilizzando tecniche di preparazione del liquido seminale;
- induzione dell'ovulazione multipla associata ad inseminazione sopracervicale eseguita utilizzando tecniche di preparazione del liquido seminale;
- eventuale crioconservazione dei gameti maschili.
- iniezione intracitoplasmatica dello spermatozoo (ICSI);
- prelievo testicolare dei gameti (prelievo percutaneo o biopsia testicolare);
- eventuale crioconservazione di gameti maschili e femminili ed embrioni (nei limiti delle normative vigenti);
- trasferimento intratubarico dei gameti maschili e femminili (GIFT), zigoti (ZIFT) o embrioni (TET) per via transvaginale ecoguidata o isteroscopica.
- prelievo microchirurgico di gameti dal testicolo;
- prelievo degli ovociti per via laparoscopica;
- trasferimento intratubarico dei gameti maschili e femminili (GIFT), zigoti (ZIFT) o embrioni (TET) per via laparoscopica.

Tecniche di III Livello:

(procedure che necessitano di anestesia generale con intubazione)

Ad oggi, la FIV-ET e la ICSI costituiscono le tecniche in assoluto più adoperate nella pratica clinica in termini di affidabilità ed efficacia terapeutica.

La FIV-ET si articola in quattro fasi fondamentali: in primo luogo si procede ad una stimolazione farmacologica dell'ovaio, finalizzata ad ottenere una crescita

follicolare multipla. Il secondo momento è rappresentato dal prelievo degli ovociti. La terza fase consiste nella fertilizzazione “in vitro”; infine, si procede al trasferimento in utero degli embrioni. Va sottolineato che, sebbene l’incontro tra la cellula uovo e il gamete maschile avvenga al di fuori delle sedi anatomiche (tratto ampollare delle tube), la fecondazione si verifica in modo pressoché naturale, laddove la selezione del gamete maschile non è operatore-dipendente. La metodica è indicata soprattutto per le donne con alterazioni strutturali o impervietà bilaterale delle salpingi o per le coppie affette da sterilità idiopatica e presuppone l’assenza di fattore maschile severo. Come precedentemente accennato, il recupero ovocitario presuppone una fase definita “stimolazione ovarica controllata” (SOC) che viene attuata tramite vari protocolli farmacologici. In sintesi, tutti gli schemi di SOC più utilizzati prevedono:

- soppressione dell’attività pituitaria ad opera di farmaci che inibiscono l’attività del GnRH (*gonadotrophin releasing hormone*);
- Induzione crescita follicolare multipla con FSH umano ricombinante (r-hFSH) e/o gonadotropine di estrazione urinaria;
- completamento della maturazione ovocitaria con gonadotropina corionica umana esogena (hCG).

La crescita follicolare viene monitorizzata, in corso di SOC, con l’ausilio dell’*imaging* ecografico (ecografia trans-vaginale) e tramite opportuni esami di laboratorio. Per quanto concerne la fase chirurgica, va precisato che il prelievo degli ovociti viene realizzato per via trans-vaginale con guida ecografica.

La teoria “Two cells - two gonadotropins”: supporto teorico per l’impiego di gonadotropine nei protocolli di stimolazione ovarica controllata

Un programma di SOC prevede l’uso di gonadotropine esogene ai fini del superamento dei meccanismi di selezione del follicolo dominante e, quindi, dell’ottenimento di una crescita follicolare multipla. Il presupposto teorico per l’utilizzo di gonadotropine esogene poggia le sue radici nella teoria delle due cellule (Figura V) (Hillier, 2001). Questa identifica, nell’ambito del complesso follicolare, due compartimenti, la granulosa controllata prevalentemente dall’FSH e la teca interna *target* preferenziale dell’LH.

L’FSH agisce precipuamente nelle cellule della granulosa controllando l’attività la proliferazione, nonché la differenziazione cellulare.

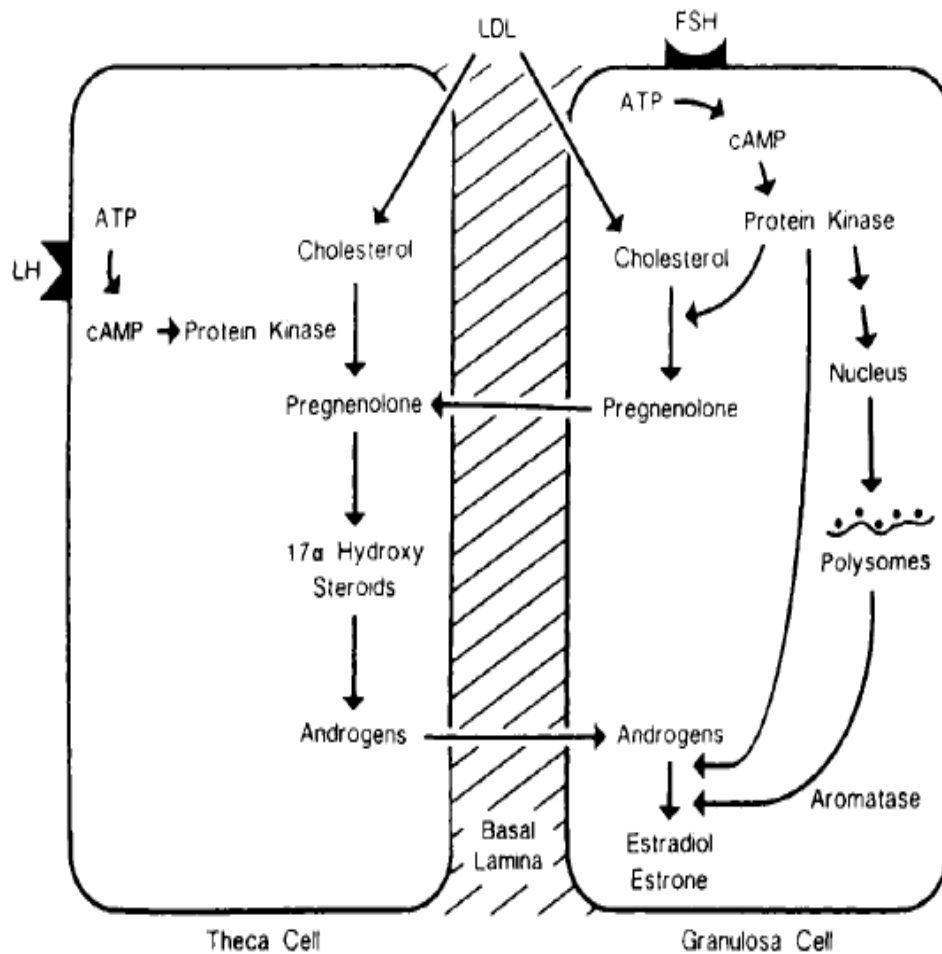
Più specificamente, in questo compartimento l’FSH induce: la proliferazione cellulare; l’ innesco dell’attività aromatasica idonea a convertire il substrato androgenico in estrogeni; l’ incremento dell’espressione del recettore dell’LH. Va inoltre sottolineato come il ruolo dell’FSH a livello della granulosa vada analizzato congiuntamente a quello degli androgeni. E’ stato, infatti, dimostrato che le due componenti cooperano nella la selezione del follicolo dominante; nello specifico, l’espressione dei recettori per gli androgeni condiziona la sensibilità della granulosa all’attività FSH. Oltre a questa funzione gli androgeni sembrano esercitare un ruolo nell’atresia follicolare e quindi nella selezione negativa dei follicoli non destinati alla dominanza. In particolare, è stato osservato che, mentre nei follicoli atresici la quota di recettori androgenici tende ad aumentare, nel follicolo dominante sembra significativamente ridursi (Louvet *et al.*, 1975).

Il gene CYP17, che codifica per l'enzima 17-idrossilasi C17-C20-liasi, cruciale per la sintesi degli androgeni, è espresso selettivamente nelle cellule tecali. La sua attività è regolata dall'LH, il quale innesca così la cascata enzimatica per la produzione di ormoni sessuali maschili. Questi ultimi, in virtù delle loro proprietà idrofobiche migrano nel compartimento della granulosa dove l'aromatasi provvede a convertirli in E₂.

Il ruolo dell'LH non si limita solo al supporto della produzione androgenica ma sembrerebbe anche importante nelle funzioni biologiche svolte dalla granulosa. Alcuni dati dimostrano come in tarda fase proliferativa l'LH sia in grado di incrementare la quota di cAMP in questo compartimento. Di qui l'ipotesi di un'espressione dei recettori dell'LH nella granulosa (Yong *et al.*, 1992). E' doveroso evidenziare che l'LH e l'FSH non sono gli unici protagonisti nell'ambito della crescita follicolare. Infatti è ormai nota in letteratura, la presenza di un "sistema paracrino" molto complesso, dove vari modulatori e fattori di crescita partecipano ai normali processi di sviluppo e involuzione follicolare. I più caratterizzati e studiati sono: *insulin growth factor type I-II* (IGF-I, IGF-II); i membri della superfamiglia del β *transforming growth factor* (TGF- β) come l'inibina,

Figura V. Teoria due cellule due gonadotropine.,L'immagine seguente mostra l'azione dell'ormone dell'LH e dell'FSH rispettivamente a livello delle cellule teicali e della granulosa

Milton T. et al., 2000. *J. Mol. Recognit.*; 13: 223–278



l'attivina e il *growth differentiation factor type 9* (GDF-9). A questi ultimi si sono aggiunti anche altri fattori, ed il loro numero è in costante crescita. Tra questi ricordiamo: *epidermal growth factor* (EGF); α -*transforming growth factor* (TGF- α); *fibroblast growth factors* (FGFs); *platelet-derived growth factor* (PDGF) (Hiller et al., 2001). In particolare, il PDGF costituisce un'importante fattore di

crescita ad azione mitogenica sulle cellule di origine mesenchimale e sembra produrre lo stesso effetto anche nelle cellule tecali, allorquando potenziato da altri fattori di crescita come EGF (May *et al.*, 1992). La struttura tridimensionale del PDGF mostra molte analogie con quella dell'LH. Entrambe le molecole, infatti, appartengono ad un'ampia famiglia di proteine chiamata *Cystine Knot Family of Growth Factors* (Laphorn *et al.*, 1994) (Figura VI).

Impiego delle gonadotropine esogene nella pratica clinica delle PMA

Abbiamo già accennato come la SOC miri al recupero del maggior numero di follicoli maturi ad ogni ciclo di stimolazione, al contrario di ciò che avviene fisiologicamente dove solo un unico follicolo, detto appunto dominante, andrà incontro a completa maturazione. Tale risultato si ottiene con la somministrazione di dosi terapeutiche di FSH esogeno, il quale favorisce appunto uno sviluppo anche di quella parte di follicoli che andrebbe normalmente incontro a processi di atresia. Sono disponibili in commercio preparati ottenuti con l'ingegneria genetica a base di r-hFSH. Tali tipi di preparati vengono oggi utilizzati nella maggior parte dei protocolli farmacologici di PMA.

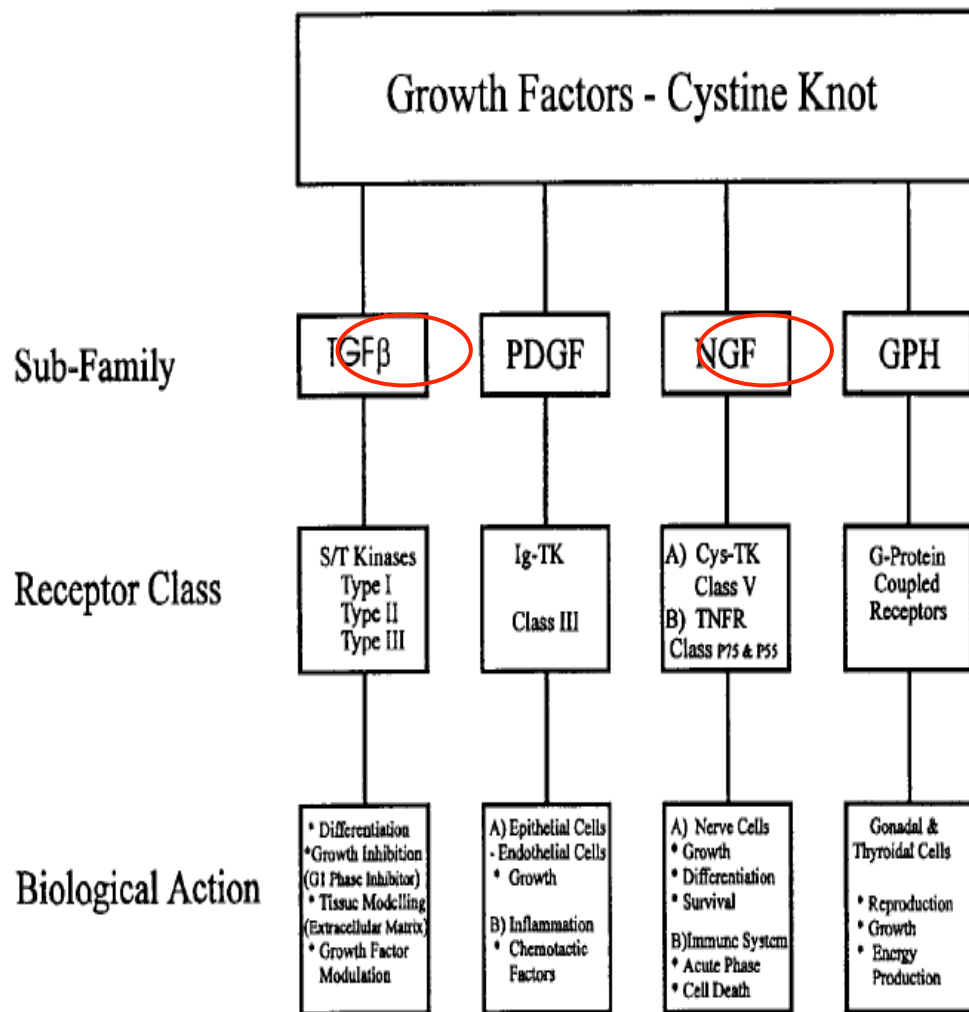
Nella pratica clinica non è previsto il supporto farmacologico con LH.

La presenza di eccessive concentrazioni di quest'ultimo, in particolare durante la fase proliferativa, è stata associata, infatti, ad una riduzione della qualità ovocitaria (Polan, 1986). Un simile fenomeno si manifesta, inoltre, nelle pazienti affette da sindrome dell'ovaio policistico: livelli eccessivi di LH avrebbero un effetto,

androgeno-mediato, inibente nei confronti dell'attività aromatasica delle cellule della granulosa, con il risultato di una riduzione della quota estrogenica e di un blocco dei processi di maturazione e selezione follicolare. Infine è stato dimostrato che livelli elevati di LH comprometterebbero i meccanismi di maturazione meiotica ovocitaria. Infine, una eccessiva potrebbe essere responsabile della riduzione della fertilità e dell'incremento dei tassi di aborto riscontrati nelle pazienti affette da PCOS (Shoham *et al.*, 1993).

L'r-hFSH al contrario dei farmaci estrattivi di prima generazione, è totalmente privo di LH e si è rivelato, nella maggior parte delle pazienti, adeguato, anche in monoterapia, ai fini della induzione della crescita

Figura VI. *Superfamiglia dei fattori crescita cystine knot.*
Milton T. *et al.*, 2000. *J. Mol. Recognit.*; 13: 223–278



follicolare multipla. Se è pur vero che elevati livelli di LH possono risultare dannosi, un minimo quantitativo risulta comunque necessario per il supporto della crescita follicolare. Citiamo a tal proposito un caso pubblicato nel 2001 da Shimon *et al.*, relativo ad una paziente con adenoma pituitario FSH secernente. La paziente, oggetto dello studio, presentava livelli quasi azzerati di LH e altrettanto basse concentrazioni di E₂. La crescita follicolare risultava quindi totalmente compromessa a conferma di quanto sostenuto dalla “teoria delle due cellule due gonadotropine” in merito al fondamentale ruolo svolto dall’LH per il supporto e lo sviluppo follicolare (Shimon *et al.*, 2001).

Anche durante i comuni protocolli di stimolazione si riproducono condizioni simili a quelle della paziente citata. Infatti, l'attività esercitata dai GnRH-a riduce in maniera notevole i livelli di LH circolanti. Ciononostante, è stato dimostrato come, almeno in queste condizioni, l'LH endogeno sia in grado, in presenza di FSH, di elicitarne una biosintesi androgenica massimale anche se legato soltanto ad una quantità inferiore all'1% dei propri recettori espressi dalle cellule della teca (*spare receptor hypothesis*) (Chappel *et al.*, 1991). Le concentrazioni endogene di LH in corso di ciclo spontaneo e finanche i livelli circolanti di ormoni residui alla soppressione dell'asse ipotalamo-ipofisi-ovaio con analoghi del GnRH sembrerebbero essere sufficienti, nella maggior parte dei casi, ad occupare tale quota recettoriale e, quindi, a sostenere l'attività dell'FSH esogeno.

Nonostante questo, non è possibile escludere che l'aggiunta di minime quantità di LH in corso di stimolazione possa ottimizzare la crescita follicolare e la steroidogenesi. Sulla base di questa ipotesi è stato, di recente, sviluppato un filone di ricerca atto a valutare l'efficacia dell'LH esogeno in corso di stimolazione ovarica per PMA. I risultati conseguiti hanno permesso l'identificazione di determinate categorie di pazienti in cui effettivamente l'utilizzo dell'LH esogeno si riflette in apprezzabili miglioramenti della risposta ovarica. Ad esempio, si è osservato che circa il 10 - 12% delle donne giovani e normogonadotrope sottoposte a cicli di stimolazione con GnRH-a e r-hFSH presenta un profilo di risposta non ottimale. In questo specifico *subset* di pazienti la somministrazione di LH a partire dal giorno 8 di stimolazione incrementa il numero di ovociti recuperati, se comparato con il solo incremento del dosaggio di FSH. Un altro gruppo che potrebbe beneficiare dell'LH è rappresentato dalle donne a rischio di

“*poor response*” trattate con antagonisti del GnRH (GnRH-ant). In queste pazienti, l’associazione di un protocollo flessibile di GnRH-ant con un’opportuna supplementazione con LH sembra riflettersi risultati migliori rispetto al GnRH-*flare-up protocol* standard. Inoltre l’LH potrebbe risultare utile nelle pazienti sopra i 35 anni di età (Alviggi *et al.*, 2006).

L’obiettivo principale di tutti i protocolli di stimolazione ovarica è quello di ottenere il massimo risultato terapeutico minimizzando, nello stesso tempo, il rischio di potenziali effetti collaterali, tra i quali la sindrome da iperstimolazione ovarica (OHSS) e il rischio di gravidanze multiple (Fauser *et al.* 2008). La quantità ideale di gonadotropine da somministrare nelle pazienti varia da soggetto e soggetto; normalmente il dosaggio di partenza oscilla da un minimo di 150 UI ad un massimo di 300 UI di r-hFSH. Tale dosaggio può essere opportunamente modificato in corso di stimolazione in base alla risposta ovarica individuale. Solitamente, dosaggi più elevati di FSH esogeno sono richiesti in donne che presentano una ridotta riserva follicolare. È interessante osservare come in queste pazienti anche la qualità ovocitaria risulti compromessa, come dimostra l’aumentato tasso di abortività (Levi *et al.*, 2001). Dati emersi di recente mostrano, infine, come in queste pazienti vi sia un basso contenuto di DNA mitocondriale nel patrimonio ovocitario (May-Panloup *et al.*, 2005).

La scelta del protocollo ideale per le pazienti rappresenta un traguardo ancora difficile da raggiungere. Nella pratica clinica, al fine di predire il tipo di risposta alla SOC, si è soliti considerare diversi parametri, quali il *body mass index* (BMI), il valore dell’FSH basale, l’età, il quadro ecografico ovarico ed infine la risposta a precedenti protocolli di stimolazione.

Dall'analisi di questi ultimi le donne vengono classificate come:

- “*high-responders*” (pazienti con valori di FSH basale <9 mUI/ml, età <37 anni, affette da policistosi ovarica e/o che abbiano mostrato in precedenti stimolazioni un'eccessiva risposta ovarica, con conseguente cancellazione del ciclo);
- “*poor-responders*” (pazienti in età riproduttiva avanzata, con FSH basale ≥ 9 mUI/ml e/o che abbiano mostrato in precedenti stimolazioni una risposta ovarica insoddisfacente, ovvero il recupero di <5 ovociti);
- “*normal-responders*” (pazienti con età inferiore ai 37 anni, con valori di FSH basale inferiori ai 9 mUI/ml ed un BMI nella norma).

E' bene precisare che tali criteri non sono universalmente accettati in tutti i paesi.

In questo contesto, va sottolineato come spesso si trascurino alcune variabili di rilievo come ad esempio il dosaggio cumulativo di r-hFSH somministrato o la durata complessiva della stimolazione. Un'ulteriore complicazione deriva dal fatto che donne con scarsa stimolazione ovarica manifestata al primo ciclo, potrebbero non avere la stessa risposta terapeutica nei cicli successivi (Klinkert *et al.*, 2004).

In sintesi, quindi, alla luce delle scoperte attuali non è ancora possibile poter stratificare le pazienti in base alla risposta alla SOC con dei criteri semplici, riproducibili e che abbiano un reale impatto in ambito clinico.

In futuro probabilmente anche *markers* di natura genetica potranno essere indici predittivi nell'ambito dei programmi di PMA (Fauser *et al.*, 2008).

La Paziente “*hypo-responder*”

Oltre l'80% delle pazienti sottoposte a stimolazione ovarica controllata (SOC) per cicli FIVET/ICSI con ormone FSH esogeno, in assenza di LH, risponde in maniera adeguata in termini di sviluppo follicolare e sintesi di steroidi. Tuttavia, circa il 10% delle pazienti richiede una dose maggiore di FSH ricombinante (r-hFSH) per ottenere una risposta ottimale. Questo sottogruppo di donne è stato recentemente classificato come pazienti “*hypo-responders*” (De Placido *et al.*, 2001, 2004, 2005; Ferraretti *et al.*, 2004; Mochtar *et al.*, 2007).

In contrasto con le pazienti classiche “*poor-responders*”, queste donne presentano una normale riserva ovarica e un adeguato profilo di reclutamento follicolare; tuttavia, esse mostrano una ipo-sensibilità alla gonadotropina esogena che, di fatto, si traduce in un maggiore consumo di farmaco.

Due sono le ipotesi patogenetiche su cui abbiamo voluto soffermarci per spiegare l' iporisposta ovarica in corso di PMA:

- patogenesi genetica (approccio farmacogenomico)
- patogenesi ambientale

Farmacogenomica: una visione d'insieme

Dopo la codificazione dell'intero genoma umano, la ricerca ha compiuto notevoli sforzi per capire come le informazioni contenute nel DNA possano avere un effetto sulla vita dell'individuo. La risposta terapeutica ai farmaci rappresenta uno degli aspetti più rilevanti in tale ambito, dato il crescente utilizzo e la loro diffusa commercializzazione.

Attualmente si ritiene che la risposta individuale abbia una componente genetica che in alcune circostanze giustifica anche il 95% della variabilità nelle risposte cliniche ad un dato farmaco.

La farmacogenomica è un ramo della biologia molecolare il cui fine è quello d'indagare sugli effetti dei farmaci in base al genotipo del singolo individuo. Essa studia i meccanismi con i quali l'assetto genetico influenza l'azione dei farmaci al fine di predire il comportamento che il composto assumerà a contatto con il singolo paziente. In un recente documento, l'*European Medicine Agency* (EMA), massimo organismo europeo di valutazione dei farmaci per l'uso nell'uomo, ha sottolineato l'importanza di mantenere distinti i due termini di farmacogenetica e farmacogenomica (EMA, 2002). Nel suddetto documento, infatti, per farmacogenetica si intende, più precisamente, "lo studio delle variazioni interindividuali nella sequenza del DNA in relazione alla risposta ai farmaci" mentre alla farmacogenomica viene riconosciuto un significato più ampio, applicabile alla scoperta di nuovi farmaci e al loro sviluppo clinico.

Circa l'80% dei geni nell'uomo contiene variazioni di sequenza tra individui che, quindi, sono presenti sotto forma di varianti alleliche diverse. Quando la

variazione della sequenza del corredo genetico è presente in almeno l'1% della popolazione si parla di *polimorfismo*; al contrario, se la stessa si manifesta solo nell'1% si parla di *mutazione*. Tra i polimorfismi, i più frequenti, sono quelli in cui un singolo nucleotide risulta alterato; si parla, in tal caso di *single nucleotide polymorphisms* (SNPs). Si stima che esistano nel nostro genoma circa dieci milioni di SNPs di cui circa 4 milioni sono già stati catalogati (Gabriel *et al.*, 2002).

In ogni gene, schematicamente è possibile riconoscere una regione regolatoria ed il corrispondente sito di trascrizione ad essa associato. La regione regolatoria comprende il promotore e l'*enhancer*, che hanno il compito di garantire il corretto posizionamento della polimerasi e di modulare la quantità di RNA che deve essere prodotta. Parlando della sintesi dell'LH, abbiamo accennato come il sito di trascrizione comprenda sia introni sia gli esoni.

Gli SNPs sono classificati proprio in base alla posizione che assumono nel contesto dei geni. Tale posizione, a propria volta, determinerà gli effetti molecolari che investiranno il prodotto proteico.

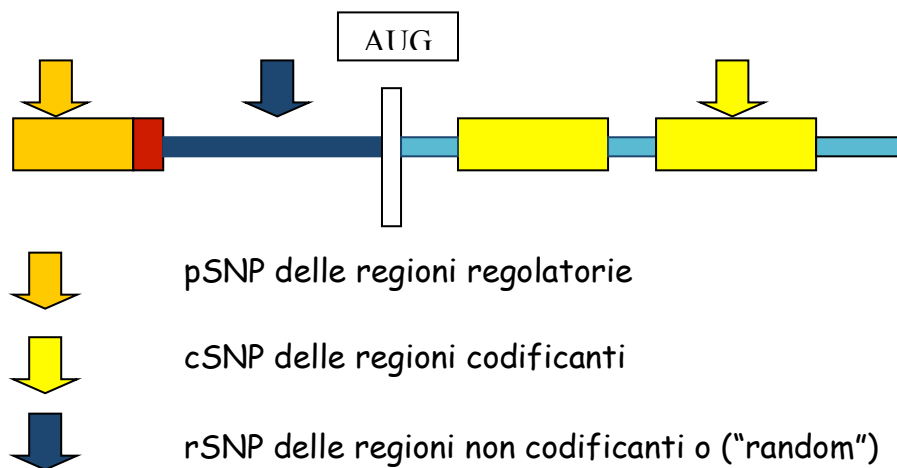
Possiamo, così, riconoscere vari tipi di SNPs:

- polimorfismi perigenetici (pSNPs) localizzati al livello dei siti regolatori o nelle sequenze introniche, capaci di influenzare rispettivamente la quantità del trascritto e la sequenza della proteina stessa;
- polimorfismi situati nelle regioni codificanti gli esoni (cSNPs), in grado di mutare la sequenza aminoacidica;
- polimorfismi delle regioni intrageniche, detti anche SNPs *random*; si tratta di polimorfismi che investono quelle porzioni del nostro genoma che non contengono

geni (circa il 98% del nostro DNA) ma che possono assumere una valenza diagnostica nella scoperta di nuovi geni coinvolti in patologie o in determinate espressioni fenotipiche farmaco genetiche.

La cinetica e la dinamica di un qualsiasi xenobiota, dai farmaci agli inquinanti ambientali, sono influenzate da moltissime variabili geneticamente determinate. Gli studi di farmacogenomica sono finalizzati all'identificazione delle variabili realmente contrassegnate da un'espressione fenotipica, in grado di condizionare la risposta dell'organismo ad ogni specifico xenobiota. L'obiettivo ultimo resta quello di acquisire informazioni utili nello sviluppo farmacologico.

Figura VII. *Illustrazione raffigurante le Localizzazioni dei polimorfismi all'interno di un gene.*



L'approccio farmacogenomico è reso ancor più complesso dal fatto che, il più delle volte, non è il singolo fattore polimorfico ad agire, ma un complesso di fattori che operano in maniera più o meno sinergica. Esistono due modelli, che non

si escludono reciprocamente e che spiegano la complessità di queste situazioni: il modello “poligenico” e quello “epistatico”. Secondo il modello poligenico il tratto farmacogenomico dipende da numerosi geni le cui varianti sono additive nel determinare un certo fenotipo ma se prese singolarmente il loro impatto quantitativo risulta modesto; il modello “epistatico”, invece, afferma che l’espressione di un dato fenotipo richiede la contemporanea presenza di tutte le varianti alleliche dei geni coinvolti. Quale che sia l’interpretazione più corretta, la conclusione comune delle due teorie è che l’effetto di un singolo gene sul profilo farmacogenetico è modesto e il rischio genotipico relativo basso e difficile da misurare.

Ogni sostanza estranea che entra in contatto con l’organismo subisce una serie di trasformazioni enzimatiche atte a facilitarne l’espulsione con la bile o con le urine. Com’è noto il processo di metabolizzazione è suddiviso in due fondamentali tappe enzimatiche:

- gli enzimi di fase I agiscono prevalentemente, ma non solo a livello epatico rendendo il composto più reattivo per favorire le reazioni della fase II;
- gli enzimi della fase II sono responsabili prevalentemente di reazioni di coniugazione con lo scopo fondamentale di rendere il catabolita più idrosolubile.

Polimorfismi genetici sono stati riscontrati in numerosi geni codificanti per gli enzimi operanti in ciascuna delle fasi di metabolizzazione dei farmaci con effetti diversi a carico del prodotto genico. Infine, la presenza dei polimorfismi è stata registrata anche nei bersagli molecolari dell’azione dei farmaci come recettori, canali ionici, enzimi, con un enorme impatto sulla risposta individuale al trattamento. Nella tabella II sono illustrate alcune delle varianti polimorfiche

riconosciute di cui si è dimostrata una valenza in ambito clinico terapeutico. I polimorfismi in questione abbracciano tutte le tappe cinetico-dinamiche, descritte in precedenza.

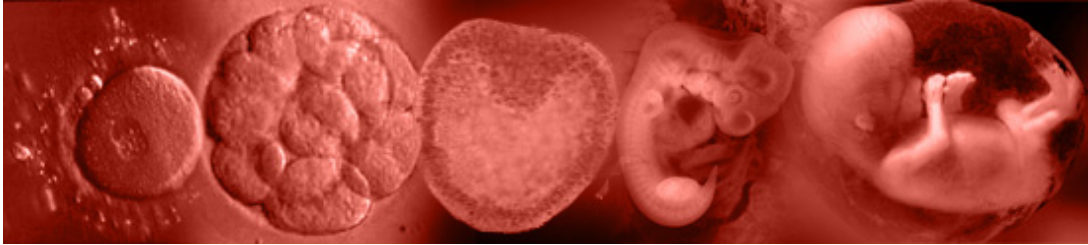
In prospettiva gli obiettivi che la farmacogenomica si predilige sono:

- determinare un'associazione tra un profilo genetico e un fenotipo rappresentato dalla risposta ad un farmaco;
- possibilità di effettuare una terapia mirata individuando il dosaggio più appropriato, riducendo il rischio di effetti collaterali o di mancanza di effetto;
- abbattimento dei costi legati al fallimento terapeutico e agli effetti collaterali.

Tabella II. *Sunto dei polimorfismi attualmente conosciuti ed del loro impatto clinico. Il bersaglio primario coinvolge rispettivamente in blu gli enzimi della prima fase metabolica dei farmaci, in arancione gli enzimi della seconda fase metabolica e in rosso i bersagli molecolari.*

Bersaglio primario	Farmaco	Effetto fenotipico
CYP2C9	warfarin fenitoina tolbutamide	Sanguinamento Ipoglicemia Mancata risposta
CYP2C19	omeprazolo	Risposta clinica più efficace
CYP2D6	Antidepressivi Oppioidi orali	Discinesia tardiva da antipsicotici Mancata analgesia
Deidropirimidina deidrogenasi	5- Fluorouracile	Neurotossicità
NAT2	Isoniazide idralazina procainamide	Neurotossicità
Glucuronosiltransferasi (UGT1A1)	iridotecano	Diarrea mielosoppressione
Recettore serotoninergico 5-HT 2C	clozapina	Risposta alla schizofrenia
Recettori dopaminergici D1 e D3	Antipsicotici	Insorgenza di discinesia tardiva
Recettore α per gli estrogeni	Estrogeni, SERM	Mineralizzazione ossea nella donna in post menopausa

Poliposi e sterilità



Ancora poco è conosciuto circa l'associazione tra poliposi uterina e fertilità. Molto riduttiva è la teoria secondo la quale la riduzione del potenziale riproduttivo in presenza di polipi endometriali possa essere legata ad una interferenza meccanica con il trasporto dello sperma e/o con l'impianto embrionale, mentre più verosimile è l'ipotesi che, in alcuni casi, l'alterazione di determinati fattori di crescita e/o citochine possa correlarsi alla presenza di polipi endometriali o addirittura causarne lo sviluppo.

La poliposi endometriale è identificata tramite isteroscopia in una percentuale che varia dal 16,5% al 26,5% delle donne con una non altrimenti spiegata sterilità. Inoltre alcuni studi hanno valutato le relazioni tra suddetta patologia e pregnancy rate.

Uno studio randomizzato ha esaminato gli effetti della polipectomia sulla pregnancy rate dopo IUI dimostrando un miglioramento statisticamente significativo della stessa comparando donne che eseguivano un intervento di polipectomia isteroscopica rispetto a donne che no lo eseguivano

Tre studi non randomizzati hanno inoltre trovato un'associazione tra polipectomia e miglioramento della pregnancy rate spontanea. Varasteh *et al.* hanno valutato la

sterilità in donne con e senza poliposi endometriale ed hanno trovato una pregnancy rate di circa il 78,3% dopo polipectomia rispetto al 42,1% in donne con cavità uterina regolare. Spiewankiewicz *et al.* riportarono una pregnancy rate del 76% in donne sterili dopo polipectomia, così come Shokeir *et al.* riportarono una pregnancy rate del 50% dopo polipectomia nelle stessi pazienti. Questi studi suggeriscono che le donne con poliposi uterina e senza altre cause di sterilità accertate possono beneficiare della polipectomia.

Gli effetti della poliposi endometriale sulla IVF rimangono non chiari.

Nel primo studio che ne esaminava gli effetti, 83 donne con polipi endometriali, ecograficamente individuati di dimensioni inferiori ai 2 cm, furono divise in due gruppi prima del prelievo oocitario durante un ciclo di IVF. Quaranta nove donne completarono un trattamento standard di IVF-ET e trenta quattro donne andarono incontro ad un intervento di polipectomia isteroscopica immediatamente dopo il prelievo oocitario. In quest'ultimo gruppo, gli embrioni furono criopreservati e trasferiti in un ciclo successivo. Non furono osservate differenze statisticamente significative nella pregnancy rate tra i due gruppi. Essi conclusero che i polipi endometriali inferiori ai 2 cm non hanno effetti deleteri sul concepimento dopo un trattamento di IVF. Se un polipo endometriale viene diagnosticato durante un ciclo di IVF le opzioni nel management della paziente possono essere:

- annullamento del ciclo stesso,
- criopreservazione embrionale,
- oppure l'effettuazione di un intervento di polipectomia per via isteroscopica con successivo proseguimento del ciclo di IVF.

Quest'ultima possibilità in particolare è stata esaminata in una serie di pazienti che sono andate incontro ad una polipectomia per via isteroscopica con ansa a freddo senza uso della corrente durante un ciclo di IVF. E' stata riscontrata una pregnancy rate del 50% suggerendo quindi inoltre che l'intervento di polipectomia non risulterebbe dannoso per il risultato del ciclo di IVF. Per quanto riguarda la metodica di intervento, l'intervento più utilizzato ed affidabile è rappresentato dalla polipectomia per via isteroscopica tramite ansa bipolare, in particolare per ridurre i danni al sottostante endometrio e per assicurare che il polipo sia rimosso totalmente.

I LINEA DI RICERCA: Patogenesi genetica delle hypo-responder

I PROGETTO DI RICERCA: Ruolo del polimorfismo del r-FSR in pazienti sottoposte a cicli di PMA

Introduzione

Recettore dell'FSH

L'FSH è il principale ormone della riproduzione necessario per lo sviluppo e la maturazione delle gonadi nella pubertà e per la produzione di gameti durante le fasi fertili della vita. L'FSH lega un suo recettore (FSHR) specifico localizzato esclusivamente nelle gonadi. Il L'FSHR mappa sul braccio corto del cromosoma 2 (2p21) e appartiene alla famiglia dei recettori accoppiati a proteine G, costituite da sette domini transmembrana. Tali domini ad α elica, essendo idrofobici ed attraversando il doppio strato lipidico cellulare, sono in grado di formare una tasca in cui va a posizionarsi il ligando; il dominio extracellulare, di dimensione variabile, è la sede di legame dell'ormone. Tale interazione porta alla modificazione conformazionale dei domini transmembrana a cui segue la cascata degli eventi intracellulari che porta alla trasmissione del segnale; una serie di complessi proteici intracellulari svolge questa funzione grazie al legame con le proteine G stesse. Tali proteine, in grado di legare nucleotidi guanidici (GTP e GDP), sono complessi eterodimerici formati da tre subunità α , β e γ . La prima subunità contiene il sito di legame per il nucleotide guanidico e idrolizza il GTP in GDP; le subunità β e γ , tra loro strettamente legate, modulano l'attività della

subunità α e interagiscono con le vie di trascrizione del segnale intracellulare. Il legame dell'ormone con il recettore consente il legame della subunità α al GTP, che può così dissociarsi dal complesso $\beta\gamma$ ed, attivandosi, interagire con l'adenilato ciclasi; quest'ultima, a propria volta, provoca un'aumentata concentrazione di cAMP che si riflette nella trasduzione del segnale a livello intracellulare. La idrolisi del GTP in GDP inattiva la sequenza e rende il recettore disponibile ad un nuovo legame (fig.2). Per polimorfismo si intende una considerevole variabilità genetica, che si riflette in uno o più livelli fenotipici all'interno delle popolazioni, tra le popolazioni o in entrambi i casi. Più precisamente, se tale variabilità è inferiore all'1%, si parla di *mutazione*, se invece è maggiore, allora si può parlare di *polimorfismo*.

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

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

I suddetti polimorfismi sono tra di loro in *linkage disequilibrium*, cioè a Ser680 è associata anche 307Ala, rendendo molto frequenti due combinazioni alleliche delle quattro possibili: Thr307-Asn680 e Ala307-Ser680. La frequenza della

distribuzione delle suddette isoforme del FSHR è tale che, nella popolazione generale, l'omozigosi Asn/Asn si riscontra nel 45% dei casi, laddove lo stato di eterozigosi (Asn/Ser) è presente nel 29%. Nel rimanente 26% si osserva omozigosi Ser/Ser. (Perez-Mayorga *et al.*, JCEM 2000).

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

Patogenesi Farmacogenomica delle pazienti hypo-responders: basi di partenza scientifica

Recenti studi clinici hanno sottolineato la necessità di rivisitare i criteri classici di classificazione della risposta ovarica alle gonadotropine esogene nell'ambito dei programmi di PMA. Più specificamente, maggiore attenzione è stata rivolta a specifici sottogruppi di pazienti che, pur presentando profili di risposta apparentemente normali (recupero di almeno 5 ovociti con livelli sierici di $E_2 > 1000$ pg/ml), richiedono dosaggi di FSH esogeno più elevati di quelli attesi sulla base dei fattori prognostici delle variabili demografiche ed antropometriche. Tali profili di risposta sono stati recentemente identificati come *hypo-response*. I meccanismi patogenetici che sono alla base della resistenza ovarica all'FSH esogeno tipica di questo sottogruppo di donne sono in grossa misura sconosciuti. Recenti dati prodotti presso il nostro Dipartimento hanno evidenziato come tali pazienti presentino, rispetto alla popolazione generale, un incremento statisticamente significativo di una variante allelica dell'LH ($v\text{-}\beta\text{LH}$). Si tratta di un comune polimorfismo contrassegnato da una ridotta attività biologica "*in vivo*" rispetto alla molecola nativa. Questa osservazione è compatibile con i risultati di *trials* clinici che hanno dimostrato un incremento statisticamente significativo della risposta ovarica all'FSH nelle *hypo-responders* trattate con un'associazione di rFSH e rLH, rispetto a quelle sottoposte a monoterapia con rFSH. Tuttavia, la presenza della variante dell'LH è riscontrabile soltanto nel 32% delle pazienti con *hypo-response*. Di riflesso, in circa i 2/3 delle donne con tale profilo di risposta, i meccanismi patogenetici restano da definire.

Un ulteriore filone di ricerca è stato finalizzato, negli ultimi anni, a definire l'attività biologica di due distinte varianti del recettore dell'FSH, Thr307/Asn680 e Ala307/Ser680. E' stato dimostrato che le pazienti portatrici della variante Ser680 in omozigosi presentano segni compatibili con una maggiore "resistenza" del recettore alla gonadotropina endogena (Greb *et al.*, 2005). Sulla base di queste osservazioni, sono stati eseguiti studi atti a valutare la risposta ovarica all'FSH esogeno in *carriers* della variante Ser680, in omozigosi, in corso di protocolli di ICFM per tecniche di PMA. Perez-Mayorga *et al.* nel 2000 hanno, per la prima volta, confrontato i profili di risposta ovarica alle gonadotropine esogene in pazienti stratificate in base al genotipo dell'FSHR. Più specificamente sono state analizzate pazienti di età inferiore ai 40 anni, di cui 43 Ser/Ser, 72 Asn/Ser e 46 Asn/Asn. Lo studio ha evidenziato un numero medio di ovociti recuperati e livelli medi di E₂ al picco sovrapponibili nei tre gruppi. Tuttavia, le donne con genotipo Ser/Ser hanno richiesto una dose cumulativa di FSH esogeno significativamente più elevata rispetto agli altri due sottogruppi. Osservazioni analoghe sono state riportate da De Castro *et al.*, nel 2003. Lo studio era stato condotto in donne normogonadotrope sottoposte a classici GnRH-a *long protocol*. Le pazienti erano state suddivise in "normal" e "poor" responders sulla base del numero di follicoli reclutati; più specificamente, erano state identificate quali "poor responders" le donne in cui erano stati ottenuti <3 follicoli. I risultati hanno evidenziato un incremento statisticamente significativo dell'incidenza di *poor response* nelle pazienti portatrici della variante Ser680 in omozigosi rispetto alla popolazione di controllo, costituita dalle donne con genotipo Asn /Ser e Asn/Asn.

Mancano tuttora studi che abbiano valutato l'incidenza delle due varianti alleliche dell'FSHR in pazienti con *hypo response* all'associazione GnRH-a *long protocol* e rFSH.

Obiettivo di Ricerca

L'obiettivo del presente studio è stato quello di verificare una possibile relazione tra varianti alleliche dell'FSHR *hypo-response* in pazienti normogonadotrope sottoposte a GnRH-a *long protocol* con rFSH per PMA.

Materiale e metodi

Nel presente studio, la distribuzione dei differenti polimorfismi dell' FSHR relativi all'aminoacido in posizione 680 è stata valutata in 42 pazienti, giovani e normogonadotrope sottoposte ad un ciclo di riproduzione assistita [fecondazione *in vitro* standard (FIVET) o iniezione intracitoplasmatica dello spermatozoo (ICSI)] presso il centro di Riproduzione Assistita dell'AOUP "Federico II" di Napoli tra il 2010 ed il 2012.

I dati ottenuti sono stati rapportati alle caratteristiche della risposta ovarica. Sono state incluse donne di età inferiore a 37 anni che avevano presentato, nei 6 mesi antecedenti l'effettuazione della PMA, cicli mestruali della durata di 24-35 giorni (con variabilità intra-individuale ± 3 giorni) e livelli ematici di gonadotropine e prolattina (misurati dal 2° al 4° giorno di ciclo mestruale spontaneo), nei limiti sottoindicati:

- FSH <11 UI/L
- LH <8 UI/L
- PRL <30 ng/mL

In tutte le pazienti erano stati recuperati almeno 5 ovociti. Sono state escluse dallo studio tutte le pazienti che presentassero una delle seguenti caratteristiche:

- età ≥ 37 anni;
- evidenza biochimica e/o ultrasonografica di PCOS;
- endometriosi stadio III-IV (classificazione *revised-American Fertility Society*, 1985);
- disordini autoimmuni conosciuti;
- anomalie cromosomiche.

Tutte le pazienti erano state sottoposte a GnRH-a *long protocol*: la desensibilizzazione ipofisaria era stata ottenuta con somministrazione di una singola dose di formulazione *Depot* di triptorelina (Decapeptyl 3,75 mg i.m., Ipsen S.p.A., Milano, Italia), effettuata al primo giorno di ciclo mestruale spontaneo.

Dopo 15 giorni dalla somministrazione, il grado di soppressione era stato stimato con la misurazione dei livelli sierici di E₂ e la valutazione ecografica trans-

vaginale (USG-TV) dello stato dell'endometrio. L'ICFM era stata intrapresa solo in presenza dei seguenti riscontri:

- livelli sierici di $E_2 \leq 40$ pg/mL;
- rima endometriale ≤ 5 mm;
- assenza di follicoli ovarici > 5 mm.

La successiva stimolazione ovarica era stata effettuata con rFSH (Gonal F, MerckSerono, Roma, Italia). Una dose iniziale di 225UI/die s.c. era stata somministrata per i primi quattro giorni di stimolazione. Tale dose era stata ridotta a 150 UI/die nelle pazienti che avevano presentato, al 5° giorno di stimolazione, livelli sierici di $E_2 > 160$ pg/ml. Nei rimanenti casi, la dose giornaliera non era stata modificata o era stata incrementata di 150 UI. In tutte le pazienti la dose ovulatoria di 10.000 UI i.m. di hCG era stata somministrata in presenza di almeno un follicolo > 17 mm di diametro medio. In tutte le pazienti era stata praticata una supplementazione della fase luteale con una dose giornaliera di progesterone i.m. di 50 mg, dal giorno del prelievo degli ovociti (Prontogest, AMSA SRL, Roma, Italia). Le pazienti gravide avevano continuato tale terapia fino al riscontro USG di uno o più sacchi gestazionali intrauterini e del battito cardiaco fetale (ecografia al 34°-36° giorno dopo hCG).

In base al consumo di rFSH totale la popolazione di studio è stata stratificata in 2 gruppi: 17 donne che avevano richiesto una dose cumulativa di rFSH > 2500 UI hanno costituito il gruppo A (*hypo-responders*); 25 pazienti in cui era stata somministrata una dose cumulativa ≤ 2500 UI state selezionate come controllo (gruppo B).

E' stato raccolto un campione ematico e la presenza dei polimorfismi è stata valutata con tecniche di biologia molecolare [*polymerase chain reaction* (PCR)]: il

DNA genomico è stato estratto da leucociti di sangue periferico con *Cell Culture DNA kit* (QIAGEN, Dusseldorf, Germany) rispettando le istruzioni del produttore. Un frammento dell'esone10 del gene FSHR, da 10D a 10G, è stato amplificato dal DNA genomico tramite *polymerase chain reaction* (PCR) e analizzata tramite elettroforesi su gel di agarosio 2%. Dopo l'analisi il segmento è stato sottoposto a estrazione con fenocloroformio. Il frammento purificato è stato digerito da BsrI1 (Biolabs, Schwabach, Germany) e i frammenti sono stati analizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio 2.5%. Il frammento non purificato, indicante omozigosi per Asn, ha una lunghezza di 755 bp; mentre il frammento purificato indicante omozigosi Ser, da origine a frammenti di 612 e 143bp. La presenza di tutti e tre i frammenti indica lo stato di omozigosi.

Le concentrazioni sieriche di E₂ ed LH sono state misurate utilizzando una tecnica di *enzyme-linked assay* a fluorescenza (Vidas oestradiol II e Vidas LH rispettivamente; Bio Mérieux SA, Lione, Francia). La sensibilità del metodo, definita come la concentrazione più bassa che sia significativamente diversa da zero con una probabilità del 95%, era pari a 0,03 pg/mL per l'E₂ e a 0,1 UI/L per l'LH. I coefficienti di variabilità (CV) *intra-* ed *interassay* erano <8% sia per l'E₂ sia per l'LH. I livelli sierici di FSH sono stati determinati attraverso un *immunoassay* basato sulla luminescenza (Amerlite FSH assay; Amersham International PLC, Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK). Il *detection limit* è stato di 0,5 UI/L. I CV *intra-* ed *interassay* erano <7%.

Analisi statistica

I risultati sono riportati in termini di deviazioni standard (\pm SD). I dati sono stati analizzati con il programma SPSS, versione 12,0 (SPSS Inc., USA). Un'ANOVA *one way* è stata utilizzata per determinare gli effetti dei protocolli di stimolazione sulle variabili continue. Il test Mann-Whitney *U* è stato applicato allo scopo di valutare le differenze tra i gruppi in riferimento a variabili continue con distribuzione non parametrica. Il test χ^2 è stato usato per comparare i dati discontinui. Un valore di $p < 0,05$ è stato considerato statisticamente significativo.

Risultati

Sono stati analizzati retrospettivamente 42 cicli di fecondazione *in vitro*. Le caratteristiche demografiche, antropometriche, ormonali e la durata media dell'infertilità sono risultate sovrapponibili nei due gruppi in esame. Analogamente, si è evidenziata una omogenea distribuzione delle indicazioni alle tecniche di riproduzione assistita (tabella 1).

L'*outcome* ovarico e delle procedure di PMA nei due gruppi è riportato in tabella 2. Il numero medio di fiale di rFSH ed il numero medio di giorni di stimolazione sono risultati significativamente inferiori nel gruppo B [$36,3 \pm 7,5$ *versus* $28,6 \pm 4,5$ ($p = 0,0001$) e $12,7 \pm 2,4$ giorni *versus* $10,8 \pm 2,8$ giorni ($p = 0,03$), rispettivamente]. Il numero medio di ovociti recuperati nel gruppo A ($7,1 \pm 1,5$) è stato significativamente inferiore rispetto a quello osservato nel gruppo B [$9,6 \pm 2,4$ ($p = 0,0003$)] (fig.3). Il numero medio di embrioni trasferiti è risultato significativamente più elevato nel gruppo B [$2,7 \pm 0,4$ ($p = 0,001$)] rispetto al gruppo A ($2,1 \pm 0,7$).

Non sono state rilevate differenze statisticamente significative in termini di tassi cumulativi di gravidanza, tassi di abortività e tassi di *ongoing pregnancy*.

I livelli sierici di E₂, valutati al giorno della somministrazione di hCG, sono risultati significativamente più bassi ($p = 0,0001$) nel gruppo A ($997,8 \pm 384,9$ pg/ml) rispetto al gruppo B ($1749,1 \pm 644,4$ pg/ml) (fig.4).

Nella popolazione di studio, il genotipo Ser/Ser è stato identificato in 15 pazienti (35,7%); l'eterozigosi Asn/Ser stata evidenziata in 19 donne (45,2%); il genotipo Asn/Asn è stato osservato nelle rimanenti 8 (19,0%). Nel gruppo A l'omozigosi Ser/Ser è stata evidenziata in 10/17 pazienti (58,8%): delle rimante sette, 4 presentavano un genotipo Asn/Ser (23,5%) e 3 un'omozigosi Asn/Asn (17,6%). Nel gruppo B il genotipo Ser/Ser è stato riscontrato in 5 donne (20%); lo stato di eterozigoti Asn/Ser in 15 donne (60%); l'omozigosi Asn/Asn nei rimanenti casi (20%). La distribuzione dei diversi genotipi e la valutazione delle differenze tra i gruppi sono riportati in tabella 3.

I LINEA DI RICERCA: Patogenesi genetica delle hypo-responder

II PROGETTO DI RICERCA: Ruolo del polimorfismo di v-LH β in pazienti sottoposte a cicli di PMA

Introduzione

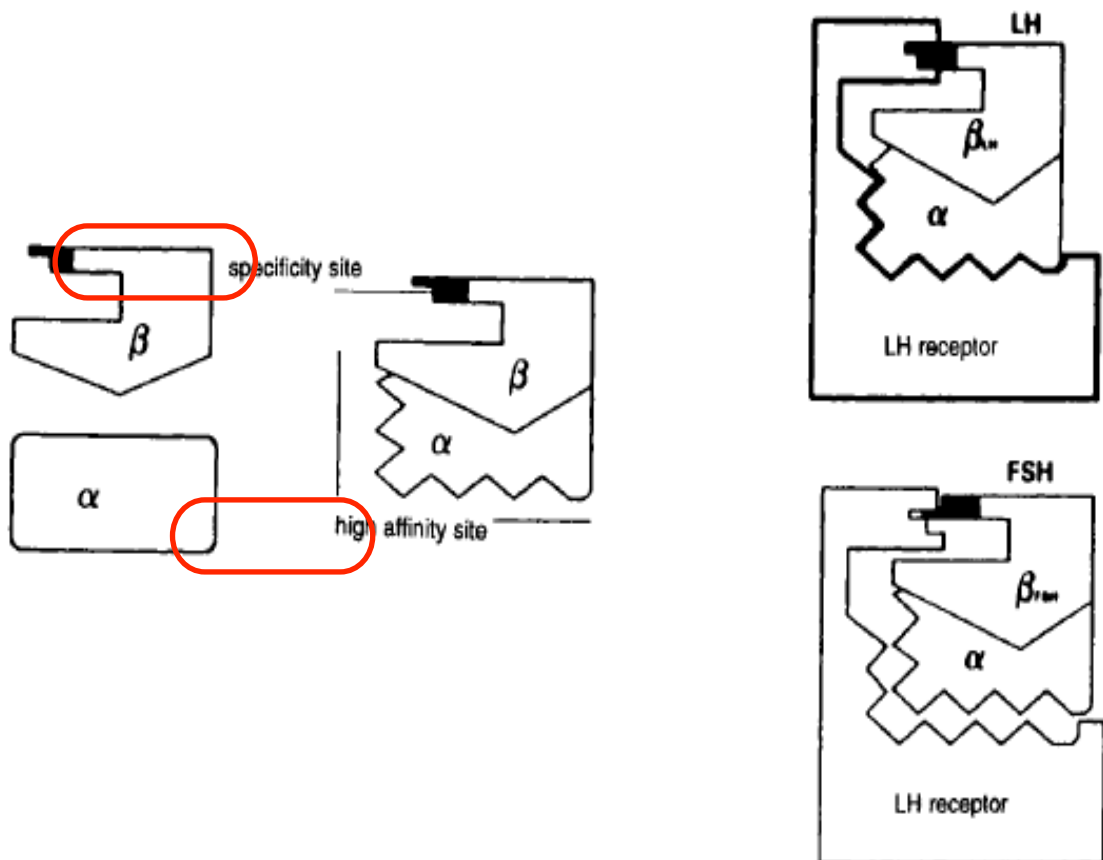
LH: struttura, sintesi e ruolo in ambito riproduttivo

L'ormone luteinizzante (LH), con peso molecolare di 28000 dalton, è un ormone glicoproteico costruito da due catene (α e β) legate tra loro da un legame non covalente ad elevata affinità. Esso fa parte della famiglia degli ormoni a matrice glicoproteica insieme ad altre molecole, tra cui ricordiamo, il *follicle stimulating hormone* (FSH), il *thyroid stimulating hormone* (TSH), e infine la *human chorionic gonadotropin* (hCG). Questi sono costituiti da 2 subunità denominate α e β , di cui una comune (α) e l'altra specifica (β) per ciascun ormone.

La specificità d'azione è conferita dalla catena β , seppure la catena α risulti fondamentale nell'estrinsecazione dell'effetto endocrino. Inoltre, quest'ultima, rende possibile quelle modificazioni conformazionali che la catena β compie per il un ottimale riconoscimento del sito di legame (Figura II). Le tappe della sintesi peptidica sono simili a quella delle altre proteine. Il gene codificante l' α -subunit, comune a quella delle altri ormoni glicoproteici, è localizzato nel cromosoma 6p12.21 ed è costituito

Figura II. Rappresentazione schematica dell'interazione ligando (LH)-recettore(LH/hCG recettore)della famiglia degli ormoni glicoproteici. Si mostra come la specificità d'azione sia conferita dalla subunità β mentre, l'affinità di legame, sia modulata dalla catena α .

Milton *et al.*, 2000. J Mol Recognit; 13: 223-278

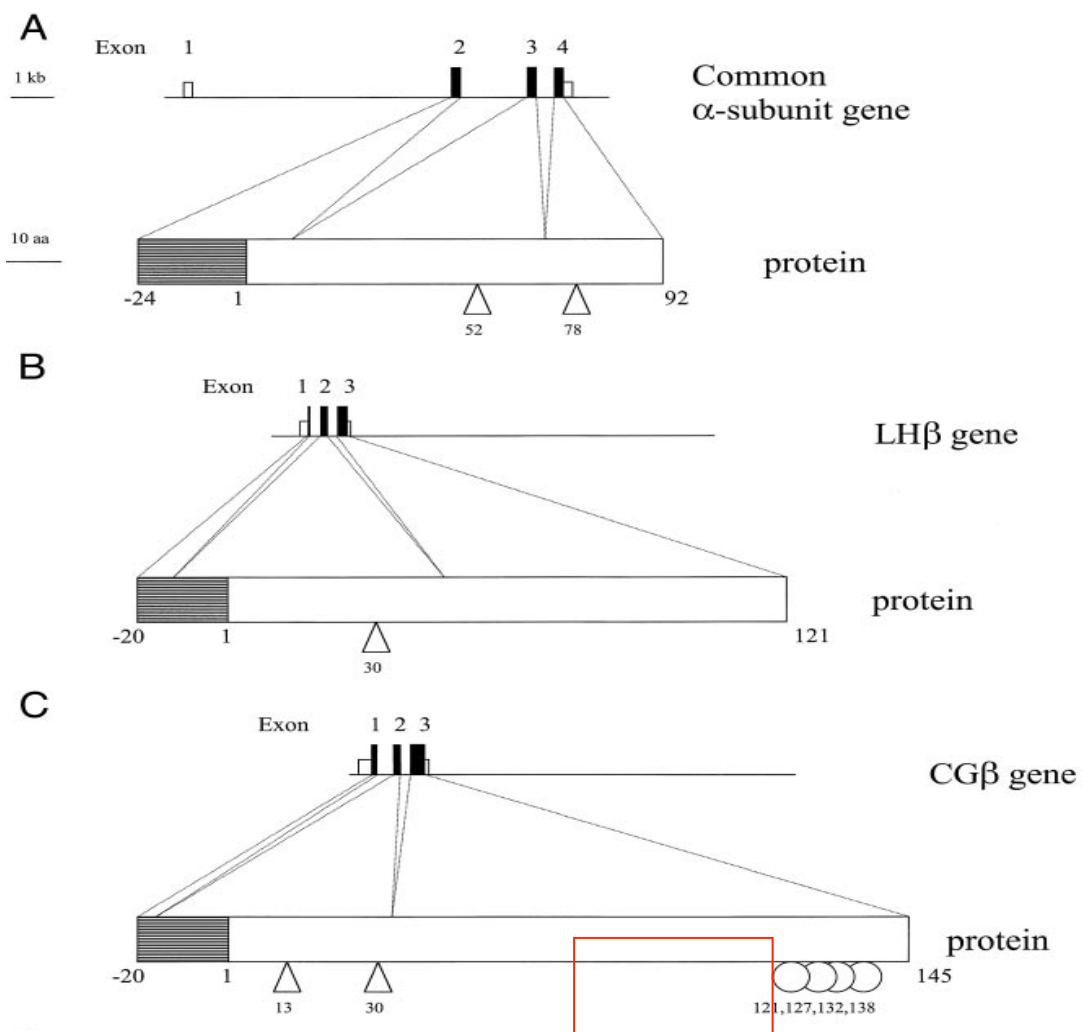


da un singolo gene a 4 esoni. La subunità α contiene 10 cisteine che partecipano alla formazione di *disulfide linkages* intracatena e da due siti di glicosilazione *N-linked*. Il *cluster* genetico della β -subunit, sia dell'LH sia dell'hCG, si trova sul braccio lungo del cromosoma 19 (19q13.32) ed è costituito da un gene LH β e da ben 6, tra geni e pseudo geni, codificanti β hCG (Figura III). La differenza strutturale tra le due catene è legata ad una mutazione dell'ultimo esone che provoca un'estensione del *reading frame* (Fiddes *et al.*, 1980). Di conseguenza, la β hCG possiede nel tratto C-terminale 29 aminoacidi in più con 4 siti aggiuntivi di glicosilazione ossigeno dipendenti. Queste differenze strutturali spiegano il perché l'emivita e l'affinità di legame siano più spiccate nell'hCG.

L'espressione genetica delle due rispettive catene è modulata prevalentemente da regioni regolatrici poste generalmente a monte della sequenza. Queste contengono determinate sequenze nucleotidiche riconosciute da specifici complessi proteici. La sequenza e la proteina legante costituiscono insieme le componenti principali di questi "interruttori" genetici. La modulazione della quantità di trascritto, sia in termini di aumento sia in termini di riduzione, avviene mediante il controllo di queste regioni.

Figura III. Rappresentazione schematica dei geni codificanti le gonadotropine. Si noti la differenza tra l'LH β -subunit e l'hCG β -subunit, nell'ultimo tratto della sequenza genica.

Themmen *et al.*, 2000. *Endocr Rev*; 21(5): 551-583



Brevemente, la produzione di LH risulta controllata a monte dai livelli di estradiolo (E_2) e dalla peculiare secrezione pulsatile del GnRH. Tuttavia, è opportuno ricordare come esistono anche molti altri attori che prendono parte al controllo della secrezione del LH. Questi, tramite diversi meccanismi di comunicazione cellulare, agiscono nei siti di regolazione genica e modulano la sintesi delle componenti proteiche dell'LH.

Le sequenze geniche sono dapprima tradotte in RNA messaggero, includendo introni ed esoni, dando luogo alla formazione del *trascritto primario*. Successivamente il trascritto va incontro ad un fenomeno di maturazione che prende il nome di *splicing* (“ricucitura”), che comporta l’eliminazione degli introni e il riassetto degli esoni. Variazioni di questo processo possono portare alla formazione di mRNA differenti con sintesi di diverse unità proteiche.

L’LH viene poi nuovamente sottoposto a modificazioni denominate post-traduzionali. In particolare l’organello del Golgi è deputato alla glicosilazione del composto ormonale. Nello specifico le componenti glucidiche del LH ammontano a circa il 15-20% del peso e contengono, oligosaccaridi composti da mannitolo, fucosio, galattosammina e acido sialico. I gruppi glucidici sembrano avere un ruolo nel legame recettoriale, mentre il residuo di acido sialico protegge l’ormone dalla rapida degradazione. Dunque, la formazione dell’LH inizia prima con la sintesi delle subunità protidiche per poi concludersi con l’assemblamento nella struttura glicoproteica definitiva.

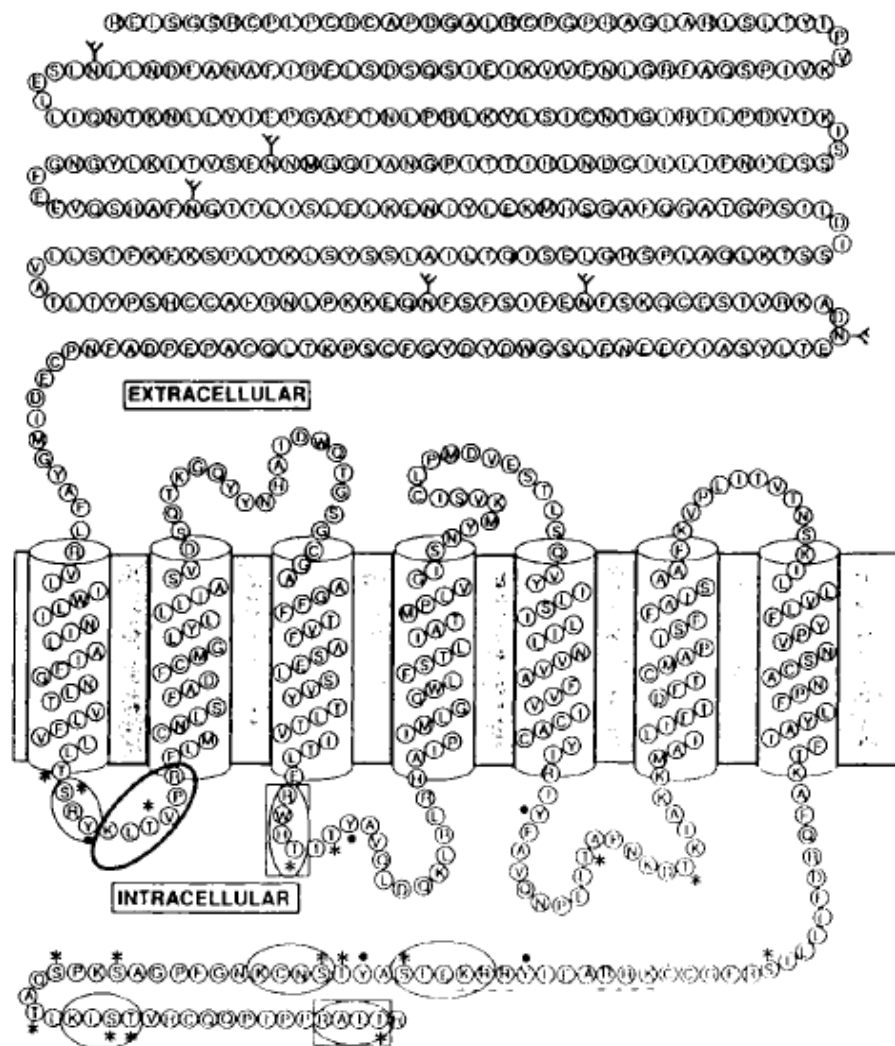
Una volta sintetizzato l’LH può agire mediante l’interazione con il proprio recettore, comune anche alla hCG. L’LH/hCG *receptor* appartiene alla famiglia delle proteine G a sette domini trans-membrana. Esso è formato da 675

aminoacidi, con un domino extracellulare di 340 aminoacidi contenenti la tasca per il ligando, una componente transmembranaria costituita da sette domini ed infine un breve tratto C-terminale intracellulare (Figura IV). La palmitoilazione dei residui C terminali garantisce non solo l'ancoraggio del recettore alla membrana plasmatica, ma si ritiene che possa partecipare ai meccanismi di traduzione del segnale (Qanbar *et al.*, 2003).

Una volta stabilitosi il legame ligando-recettore scatta la trasduzione del segnale cellulare tramite le proteine G legate al dominio intracellulare del recettore. Le proteine G sono così nominate per la loro capacità di legare nucleotidi guanidici (GDP- GTP) e costituiscono complessi eterodimerici formati da tre subunità α , β e γ . La prima, al momento dell'interazione

Figura IV. *Caratteristiche strutturali e sequenza aminoacidica del recettore LH/hCG.*

Milton *et al.*, 2000. *J Mol Recognit*; 13 :223-278



ligando-recettore, idrolizza il GTP in GDP; le subunità β e γ , strettamente legate tra di loro interagiscono con le vie di trasmissione del segnale e modulano l'attività di α . Una volta innescato il segnale, le proteine G interagiscono con l'enzima adenilato ciclasi il quale, incrementa le concentrazioni intracellulari di cAMP, fondamentale secondo messaggero nel *pathway* dell'ormone luteinizzante. Inoltre, sono stati scoperti anche altri fattori intracellulari innescati dall'attivazione del recettore LH/hCG. L'LH, infatti, è in grado di aumentare i livelli di IP_3 e di Diacilglicerolo (DAG) (Salvador *et al.*, 2002). Il primo mobilizza i livelli di calcio intracellulari, il secondo partecipa all'innescamento dell'enzima PKC. Anche l'attivazione della *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) sembrerebbe influenzata dall'ormone luteinizzante. Alcune ricerche, inoltre, suggeriscono come tale effetto sia responsabile della desensibilizzazione all'ormone stesso indotta dal recettore LH/hCG a livello delle cellule della granulosa (Amsterdam *et al.*, 2002). L'espressione del recettore dell'LH è stata individuata anche in altri compartimenti tissutali, a testimonianza di come probabilmente il suo effetto si estenda oltre la funzione riproduttiva: tessuto nervoso, linee cellulari neoplastiche delle ghiandole mammarie, tiroide e cellule adrenocorticali (Tabella I).

Tabella I. Espressione del recettore del LH/hCG in altre localizzazioni tissutali.
Ziecik et al., 2007. Mol Cell Endocrinol;269: 51–60

Tissue	Human
Myometrium	(+) Reshef et al. (1990)
Endometrium	(+) Reshef et al. (1990)
Oviduct	(+) Lei et al. (1993c)
Broad ligament	(?)
Uterine vessels	(+) Toth et al. (1994)
Cervix	(+) Lin et al. (2003)
Mammary gland	(+) Lojun et al. (1997)
Placenta	(+) Reshef et al. (1990)
Umbilical cord	(+) Rao et al. (1993)
Brain	(+) Lei et al. (1993a)
Adrenals	(+) Pabon et al. (1996b)
Skin	(+) Pabon et al. (1996a)
Lymphocytes	(+) Lin et al. (1995)
Epididymis	(+) Rao (2001)
Prostate	(+) Dirnhofer et al. (1998)

L'increzione dell'LH nelle donne avviene ad "ondate" caratterizzate da un fase ascendente, che dura circa 15 minuti ed una discendente di circa 60 minuti. I picchi dei livelli plasmatici si raggiungono ogni 1-7 ore in relazione alla fase del ciclo mestruale. L'ampiezza dell' onda risulta in gran parte dei casi pari al 100% della variazione ormonale, tranne durante l'ovulazione, in cui è di gran lunga maggiore. Questo peculiare iter secretivo è intimamente legato al GnRH a sua volta rilasciato in modo pulsatile dal nucleo arcuato.

L' LH agisce prevalentemente a livello delle cellule tecali e, nel corso della maturazione follicolare, induce la sintesi di androgeni e contribuisce anche all' incremento del flusso vascolare ovarico. Quando il follicolo ha raggiunto la completa maturazione, l'improvviso picco dei valori di LH induce un'inibizione della steroidogenesi, con notevole decremento di androgeni e E_2 . A livello della granulosa il meccanismo d'azione si esplica soltanto a metà della fase follicolare del ciclo ovarico al momento dell'aumento delle concentrazioni ematiche di LH ed in corrispondenza della comparsa di recettori specifici. LH provoca un arresto della proliferazione della granulosa, una diminuzione del numero dei recettori per l'FSH e l'inizio della secrezione intrafollicolare di Progesterone. Questi fenomeni contrassegnano l'inizio della luteinizzazione. Il picco preovulatorio di LH è essenziale per l'ovulazione, nonché per la maturazione dell'ovocita, con conseguente ripristino della divisione meiotica interrottasi durante la vita fetale. Nella seconda fase del ciclo mestruale l'LH svolge la funzione di supporto trofico del corpo luteo e quindi sostiene la produzione progestinica fondamentale per la maturazione delle cellule endometriali destinate ad accogliere l'unità embrionica eventualmente prodotta. L' azione esercitata dall' LH influenza non sono la

componente corticale ma anche quella componente stromale dell'ovaio, grazie al quale la capacità steroidogenetica risulta notevolmente potenziata.

Patogenesi Farmacogenomica delle pazienti hypo-responders: basi di partenza scientifica

Sebbene la patogenesi della ipo-risposta non sia stata ancora identificata, dati recenti suggeriscono un possibile ruolo dell'LH.

In primo luogo, è stato dimostrato che la supplementazione con LH esogeno potrebbe essere una strategia utile per migliorare la risposta ovarica in questo tipo di pazienti. Nello specifico, in caso di profilo iniziale di crescita follicolare suggestivo di ipo-risposta all'FSH, l'aggiunta di LH ricombinante (r-hLH) durante la stimolazione normalizza la risposta ovarica stessa, diminuisce il consumo cumulativo di r-hFSH e migliora significativamente l'*outcome* della PMA (De Placido *et al.*, 2004; 2005; Alviggi *et al.*, 2006). Per comprendere come l'attività dell'LH possa migliorare la risposta all'FSH, bisogna considerare il ruolo degli androgeni nel controllo della recettività del follicolo all'FSH. In breve, la quota androgenica indotta dall'LH, sarebbe in grado di favorire l'espressione del recettore dell'FSH (FSH-R). Ciò giustificherebbe fisiopatologicamente come l'LH possa indirettamente influenzare l'attività farmacodinamica del r-hFSH ([Durnerin et al., 2008](#)).

È interessante notare come le pazienti ipo-risponditrici al'FSH che traggono vantaggio dalla supplementazione con LH esogeno mostrino livelli basali di LH endogeno assolutamente nella norma e non differenti da quelli di donne *normal-*

responders; di qui l'ipotesi che le pazienti "*hypo-responders*" potessero essere portatrici di un LH biologicamente meno attivo.

Nel 2009, Alviggi *et al.* hanno dimostrato come il 30% circa delle pazienti normogonadotrope con caratteristiche sovrapponibili alle *hypo-responders* (elevato consumo di r-hFSH in corso di SOC) presentasse la variante polimorfica dell'LH nota come v-βLH.

In realtà, sono quattro le varianti genetiche conosciute della subunità β di LH (Tabella III). La prima è stata scoperta nel 1992, quando Weiss *et al.* riportarono il caso di un giovane affetto da ritardo puberale. Il livello basale di LH in questo paziente era il doppio rispetto alla normalità, laddove l'ormone presentava scarsa attività biologica. L'analisi della molecola evidenziò come la mutazione responsabile fosse di tipo *missense* con sostituzione di una glicina con una arginina in posizione 54. Si sono susseguiti da allora molti studi al fine di individuare altre mutazioni o varianti polimorfiche responsabili di determinati quadri patologici. La maggior parte delle anomalie sembra concentrarsi a livello dell'esone 3.

Durante uno studio in cui venivano testati nuovi anticorpi monoclonali per la misurazione dell'LH, è stata scoperta un'altra forma anomala di LH (Pettersson *et al.*, 1992). Un particolare anticorpo monoclonale, capace di legarsi ad un epitopo presente solo nella conformazione dimerica dell'LH, non era in grado di dosare l'ormone. Successivamente emerse come ciò fosse provocato da un subunità β anomala (Figura VIII). Grazie al sequenziamento del gene si scoprì la presenza di due sostituzioni nucleotidiche *missense* che interessavano l'esone 2: Trp⁸Arg (TGG → CGG) e Ile¹⁵Thr (ATC → ACC). Le stesse mutazioni furono poi

riscontrate in gruppi di donne giapponesi con diagnosi di sterilità (Furui *et al.*, 1994; Okuda *et al.*, 1994).

La sostituzione Ile¹⁵Thr, in particolare, genera un addizionale sito di glicosilazione (Asn-X-Thr) a livello della catena β . Questo impedirebbe la formazione di legami *disulfide-linked* e l'omodimerizzazione che, normalmente, contraddistinguono la forma *wild-type* LH (Suzuki *et al.*, 2000). L'alterata immuno-reattività sarebbe attribuibile, invece, alla sostituzione Trp⁸Arg (Saganuma *et al.*, 1996).

Questa variante (v- β LH) sembra essere significativamente diffusa in diversi gruppi etnici (Tabella 1). La frequenza dei portatori in Finlandia si attesta a circa il 41,9%, mentre una più bassa incidenza è stata rilevata negli abitanti di Bengali (circa 2,56%). In Italia, la frequenza dei portatori di questa variante polimorfica è di circa il 13.9%.

A differenza delle altre varianti proteiche, quindi, la frequenza di v- β LH risulta universalmente più significativa. Alcuni in letteratura sospettano che questo tipo di distribuzione possa essere stato favorito da condizioni ambientali particolarmente avverse, caratteristiche di alcune popolazioni (Nilsson *et al.*, 1998; Huhtaniemi *et al.*, 2000). La prova di tale affermazione risiede nel fatto che proprio nelle popolazioni nomadi, con sfavorevoli condizioni ambientali, come per esempio i Lapponi o gli australiani Aborigeni, la condizione di portatore è molto alta.

Figura VIII. Schema raffigurante la struttura tridimensionale della variante e le mutazioni genetiche associate.

K. Pettersson and I. Huhtaniemi, 1998

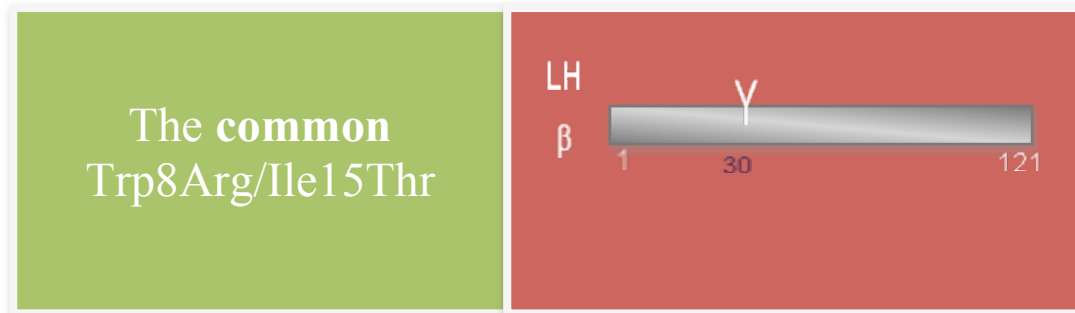


Tabella III. *Elenco delle mutazioni e dei polimorfismi attualmente conosciuti a carico della catena β del LH*

Lamminen *et al.*, 2001. Eur J Pharmacol; 414: 1–7

Locus	Type	Nucleotide change	Amino acid change	Male phenotype	Female phenotype	Alteration in:		Reference
						Bioactivity	Immunoreactivity	
Exon 3	missense	CA ²²¹ G → CGG	Gln ⁵⁴ → Arg	absence of spontaneous puberty		absent	normal	Weiss <i>et al.</i> (1992)
Exon 2	missense	T ⁸² GG → CGG AT ¹⁰⁴ C → ACC	Trp ⁸ → Arg Ile ¹³ → Thr	delayed tempo of pubertal progression	slightly suppressed fertility	increased in vitro decreased $T_{1/2}$ in circulation	poorly detected by α/β specific antibodies	Pettersson <i>et al.</i> (1994); Furui <i>et al.</i> (1994); Rajkhowa <i>et al.</i> (1995); Haavisto <i>et al.</i> (1995); Raivio <i>et al.</i> (1996); Takahashi <i>et al.</i> (1998, 1999)
Exon 3	missense	G ³⁶⁴ GT → AGT	Gly ¹⁰² → Ser	infertility	menstrual disorders, infertility	decreased in vitro	normal	Liao <i>et al.</i> (1998); Ramanujam <i>et al.</i> (1999, 2000)
Exon 3	missense	G ³² CA → ACA	Ala ⁻³ → Thr			normal	normal	Jiang <i>et al.</i> (submitted)

È importante sottolineare che ci sono differenze significative tra il *wild-type* e la variante comune v- β LH. Infatti, v- β LH ha un'elevata attività in vitro, ma una emivita significativamente ridotta (26 min.) in circolazione rispetto all'LH *wild type* (Haavisto *et al.*, 1995). La breve emivita sembra

essere compensata da un incremento dell'attività del *promoter*.

Specificamente sembra che il *promoter* v-βLH abbia otto frammenti nucleotidici aggiuntivi e, rispetto alla forma *wild-type*, sia più attivo di circa il 40% (Jiang *et al.*, 1999).

Si sono susseguite nel tempo una serie di ricerche per chiarire gli aspetti clinici e patologici ad essa associati.

Le prime scoperte furono effettuate in Giappone, dove, Okuda *et al.* nel 1994, individuarono una sua correlazione con il fenomeno dell'abortività ricorrente. Parallelamente, altri ricercatori dello stesso paese dimostrarono che le donne con v-βLH presentavano una maggiore incidenza di infertilità e irregolarità mestruali (Furui *et al.*, 1994). In seguito nel 1998 Takahashi *et al.* provarono come fenomeni patologici, quali iperprolattinemia, deficit della fase luteale, menopausa precoce e disturbi mestruali fossero nettamente più frequenti nella popolazione con tale variante. Solo un recente studio, pubblicato da Liu *et al.*, sembra contraddire le ipotesi precedenti, affermando che i risultati emersi nel suo paese fossero influenzati da fenomeni ambientali e razziali (Liu *et al.*, 2005).

Le donne in eterozigosi per v-βLH presentano concentrazioni più elevate di Testosterone, E² e *Sex-Hormon-Binding-Globulin* (Rajkhowa *et al.*, 1995). Inoltre sembrerebbe che pazienti obese con v-βLH, presentino una più bassa incidenza della sindrome dell'ovaio policistico (PCOS) rispetto alle portatrici della forma *wild-type*. Quest'osservazione pone l'accento sul ruolo dell'LH *wild-type* nella patogenesi di suddetta sindrome (Tapanainen *et al.*, 1999).

Altri dati sono emersi in pazienti affette da cancro della mammella. In queste donne la variante polimorfica, avendo una minore capacità di stimolare la

produzione ormonale ovarica, proteggerebbe dall'insorgenza di tumore mammario (Lamminen *et al.*, 2001).

Anche nella popolazione maschile sono stati riscontrati alcuni effetti fenotipici. Infatti, la variante LH si associa ad un ritardo dei processi di maturazione puberale (Ranvio *et al.*, 1996). Nei maschi in età avanzata, inoltre, si evidenzia un aumento significativo dei livelli di LH, ma allo stesso tempo ridotte concentrazioni di Testosterone (Vermeulen, 2000).

Da quanto è emerso, sembrerebbe che la variante dell'LH abbia una minore efficienza metabolico-endocrinologica e che ciò si rifletta anche nella pratica clinica.

Lo scopo del presente studio è stato quello di confermare precedenti risultati della presenza della variante v-βLH in una popolazione IVF più ampia, e di esplorarne la frequenza in una popolazione danese femminile.

Più specificatamente sono stati identificati i seguenti obiettivi:

Obiettivi di Ricerca

- Verificare se esiste una correlazione statisticamente significativa v-βLH e una resistenza alla terapia con r-hFSH
- Individuare tramite un criterio semplice, riproducibile e applicabile alla pratica clinica quali pazienti potrebbero essere sottoposte a indagine per il polimorfismo v-βLH

- Ottenere informazioni indirette circa il ruolo dell'LH nell'ambito della maturazione follicolare, con particolare riferimento alla cooperazione ed al sostegno dell'attività FSH.

Materiali e Metodi

I campioni di siero esaminati in questo studio derivano da uno studio precedentemente pubblicato (Humaidan *et al.*, 2002), focalizzato sulla risposta ovarica in relazione ai livelli sierici di LH della metà fase follicolare. Un totale di 220 donne danesi sottoposte a trattamenti di IVF o ICSI sono state arruolate prospetticamente. I criteri di esclusione sono stati: età >40 anni e FSH basale >10 UI/L, qualsiasi disturbo endocrino, genetico, immunologico - infiammatorio sistemico, sindrome dell'ovaio policistico, endometriosi e presenza di un solo ovaio. Un campione di siero congelato di tutti i pazienti è stato scongelato ed utilizzato per valutare la presenza di $v\text{-}\beta\text{LH}$.

Non è stata richiesta una approvazione dell' **Institutional Review Board** per il presente studio, poiché i campioni di siero congelati sono stati ottenuti da uno studio precedente, già approvato dal Comitato Etico della contea di Viborg, durante il quale ogni paziente aveva dato il suo consenso scritto (Humaidan *et al.*, 2002). Inoltre, i dati sono stati gestiti in modo da escludere l'identificazione dei soggetti.

Stimolazione ovarica

Tutte le pazienti sono state sottoposte a cicli di stimolazione ovarica a GnRH-a *long protocol* come precedentemente descritto (Humaidan *et al.*, 2002). In breve, la desensibilizzazione ipofisaria è stata indotta dalla somministrazione di 0,8 mg s.c. di GnRH-a (Suprefact, Hoechst, Horsholm, Danimarca) tutti i giorni a partire dalla metà fase luteale per 12-20 giorni, seguita da una riduzione di GnRH-a a 0,4 mg s.c. al giorno. La stimolazione ovarica è stata eseguita con r-hFSH (Gonal F; Serono Nordic, Copenhagen, Danimarca o Puregon, MSD, Ballerup, Danimarca), utilizzando un dosaggio personalizzato tra le 100 UI e 375 UI s.c. al giorno in base a conteggio dei follicoli antrali, FSH basale, indice di massa corporea (BMI) ed età. La risposta ovarica è stata monitorata mediante ecografia a partire dal giorno 8 della stimolazione e la dose di r-hFSH è stata regolata secondo necessità. La dose ovulatoria di 10.000 UI di *gonadotropina corionica umana* hCG, (Profasi; Serono Nordic, Copenhagen, Danimarca) è stata somministrata quando almeno tre follicoli hanno raggiunto un diametro medio di 17 mm. E' stato dato un supporto alla fase luteale in forma di progesterone micronizzato (Cyclogest, Hoechst, Copenhagen, Danimarca) due volte al giorno o una volta al giorno (Crinone 8%, Serono nordica, Copenhagen, Danimarca), a partire dal giorno seguente il recupero degli ovociti e continuando fino al giorno del test di gravidanza (ovvero giorno 12 dopo il trasferimento di embrioni). Gli oociti sono stati recuperati 35 ore dopo l'iniezione di HCG.

v-βLH Saggio Immunofluorimetrico

Il campione di sangue venoso (10 ml), una volta completata la coagulazione, è stato centrifugato a 400 g per 10 min, successivamente il siero è stato separato e suddiviso in un massimo di quattro aliquote e congelato (Humaidan *et al.*, 2002).

Dopo lo scongelamento, le concentrazioni di LH di tutti i campioni di siero raccolti sono state determinate da due differenti *immunofluorimetric assays* (IFMA) come precedentemente riportato (Pettersson *et al.*, 1990, 1991).

In breve, la concentrazione totale di LH è stata determinata utilizzando il kit LHspec (Wallac Oy, Turku, Finlandia), in grado di riconoscere anche la forma v-βLH (Pettersson *et al.*, 1992). L'altro saggio, I3/A2, riconosce solo la forma wild-type (wt-LH) di LH (Pettersson *et al.*, 1991). Un rapporto tra i due dosaggi ($\text{wt-LH}_{\text{I3/A2}} / \text{total LH}_{\text{LHspec}}$) è stato utilizzato per determinare lo stato di LH questi individui. Studi precedenti hanno dimostrato che eterozigoti per v-βLH hanno rapporto wt/LH totale tra 0,2 e 0,9. Il saggio I3/A2 riconosce solo circa la metà del totale LH immuno-reattivo in siero eterozigote.

A seconda del rapporto individuato è stato possibile stratificare le pazienti per omozigosi di wt-LH, eterozigosi per v-βLH o omozigosi per v-βLH. E' stato, infatti, dimostrato che:

- un rapporto inferiore a 0,2 indica la presenza di omozigosi per vβLH;
- un rapporto tra 0,2 e 0,9 indica la presenza di eterozigosi per vβLH;
- un rapporto superiore a 0,9 indica la presenza di omozigosi per wt-LH.

Analisi statistica

I risultati sono riportati in termini di media \pm deviazioni standard (SD). I dati sono stati analizzati tramite il programma SPSS, versione 12.0 (SPSS Inc., USA). Un modello ANOVA *one-way* è stato utilizzato per confrontare le variabili continue tra i gruppi esaminati; Sono state adoperate statistiche χ^2 per confrontare i dati discontinui. Sono state utilizzate curve *Receiver operating characteristic* (ROC) al fine di trovare la miglior "dose cumulativa" di r-hFSH, predittiva della più alta probabilità di esprimere la variante V- β LH. Un valore di $p < 0.05$ è stato considerato statisticamente significativo.

Risultati

Un totale di 220 cicli di fecondazione in vitro sono stati valutati retrospettivamente. V- β LH è stata osservata nel 10,9% dei pazienti, con una frequenza allelica del 12,2%. Le pazienti sono state suddivise in due gruppi in base al genotipo LH. Nel gruppo A sono state incluse 196 donne wt/wt; nel gruppo B sono state collocate 24 portatrici di v- β LH (21 in eterozigosi e 3 in omozigosi). I due gruppi sono risultati sovrapponibili in termini di età, BMI, causa di infertilità ed indicazione per la IVF. Anche i livelli basali di FSH, LH e E2 sono risultati comparabili (Tabella 2).

L'*outcome* dei due gruppi è riportato in tabella 3. Non è stata osservata nessuna differenza statisticamente significativa nel numero medio di ovociti recuperati tra

i gruppi. Tassi di fecondazione, gravidanza - e tassi di gravidanza per ciclo in corso sono risultati anche comparabili. In contrasto, il numero medio di embrioni trasferiti è risultato significativamente inferiore nel gruppo B rispetto al gruppo A ($1,3 \pm 0,6$ vs $1,6 \pm 0,8$, $p = 0,042$) (Tabella 3). Inoltre, il gruppo B ha ricevuto una dose cumulativa di r-hFSH statisticamente superiore ($1959,8 \pm 736,45$ vs $2435,86 \pm 932,8$ UI, $p = 0,048$) (Tabella 3). Quando è stata applicata l'ANOVA a una via in un *within design*, è stato possibile evidenziare un effetto statisticamente significativo del genotipo LH (*Factor*) sulla dose cumulativa di r-hFSH ($p < 0,01$), che ha mostrato un aumento progressivo del consumo da parte delle donne wt/wt ($1959,8 \pm 736,45$ UI) e delle donne v-βLH etero- ($2267,5 \pm 824,3$) ed omozigoti ($3558,3 \pm 970,9$) (Figura 1). Infine, la concentrazione sierica di androstenedione il giorno dell'induzione della maturazione finale degli oociti è risultata statisticamente differente tra i gruppi A e B ($1,49 \pm 0,76$ vs $2,06 \pm 1,28$, $p = 0,02$) (Tabella 3).

Quando è stata calcolata una curva "Receiver operating characteristic" (ROC) (area del valore sotto la curva, AUC 0,676), una dose cumulativa di r-hFSH di 1862,5 IU è stata identificata come il più predittivo *cut-off* per la presenza della variante di LH (Sensibilità: 0,75 - 1-Specificità: 0,44) (Figura 2). La popolazione di studio è stata, quindi, stratificata in due sottogruppi sulla base di questo valore di *cut-off*. Nel gruppo 1 sono state incluse 115 donne che hanno ricevuto una dose cumulativa di r-hFSH $\leq 1862,5$ UI; il gruppo 2 costituito da 105 pazienti con un consumo di r-hFSH $> 1862,5$ UI. Caratteristiche demografiche, antropometriche e ormonali sono risultate simili tra i due gruppi (dati non riportati).

Quando è stato valutato il genotipo LH, sono stati trovate rispettivamente 6/115 (5,2%) e 18/105 (17,1%) portatrici nei due gruppi, ($p < 0,005$).

II LINEA DI RICERCA:

III PROGETTO DI RICERCA:

Poliposi endometriale

Definizione

I polipi uterini sono neoformazioni della cervice o del corpo dell'utero e si distinguono pertanto in polipi cervicali ed endometriali.

I polipi endometriali si riscontrano per lo più a livello del fondo ed in corrispondenza degli osti tubarici. Unici o multipli essi formano masse che protrudono in cavità uterina. Il loro volume può raggiungere quello di una noce, il colore è rosso scuro.

Dal punto di vista istologico sono descritti due tipi di polipi:

- quelli costituiti da stroma e ghiandole endometriali responsive che si modificano con il ciclo assumendo gli aspetti della mucosa contigua (polipi funzionali);
- quelli che mostrano endometrio iperplastico con aspetti cistici o endometrio atrofico-cistico. I polipi iperplastici possono insorgere in associazione con un'iperplasia endometriale diffusa e rispondono alla stimolazione estrogenica .

Diagnosi

Le metodiche diagnostiche attualmente disponibili per lo studio delle neoformazioni uterine endocavitarie sono l'ecografia trans vaginale, la sonoiteroscopia e l'isteroscopia.

In presenza di un polipo endometriale, già la semplice ecografia trans vaginale evidenzia in molti casi un notevole ispessimento - focale iperecogeno e ben definito - dell'endometrio associato ad aree multiple di ipoecogenicità.

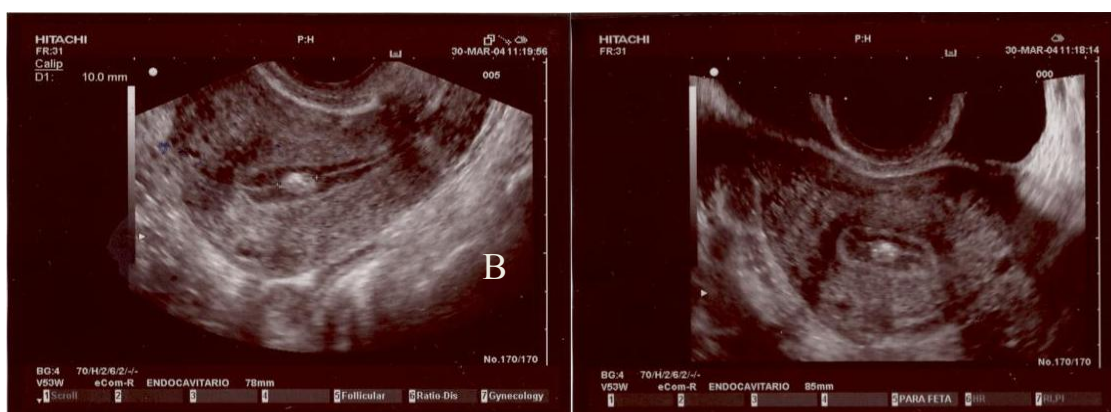


Figura 1: Immagine ecografica longitudinale (A) e trasversale (B) di polipo endometriale

La sonoisterografia, mediante instillazione di un mezzo di contrasto nell'utero, permette una diagnosi ecografica maggiormente accurata, soprattutto per quanto riguarda la sede e le dimensioni della neoformazione.

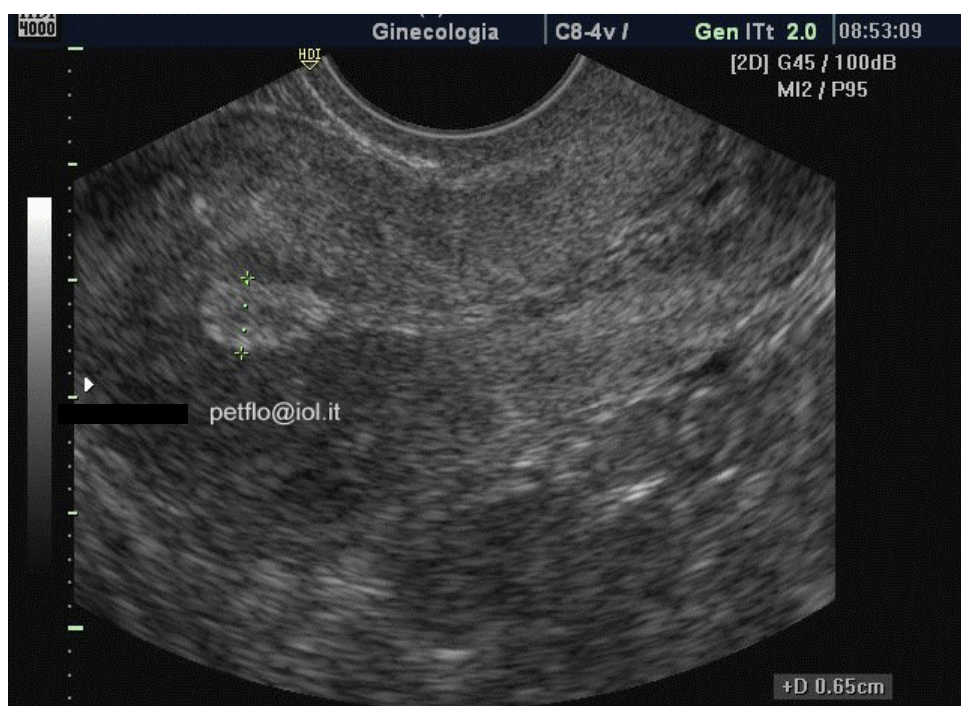


Figura 2: Polipo endometriale visualizzato con sonoisterografia

L'isteroscopia, infine, è ormai imprescindibile ai fini della conferma diagnostica, dal momento che essa permette di fatto non solo di individuarne con precisione sede e dimensioni ma anche di effettuare una biopsia mirata della lesione e quindi di avere una conferma istologica della diagnosi.

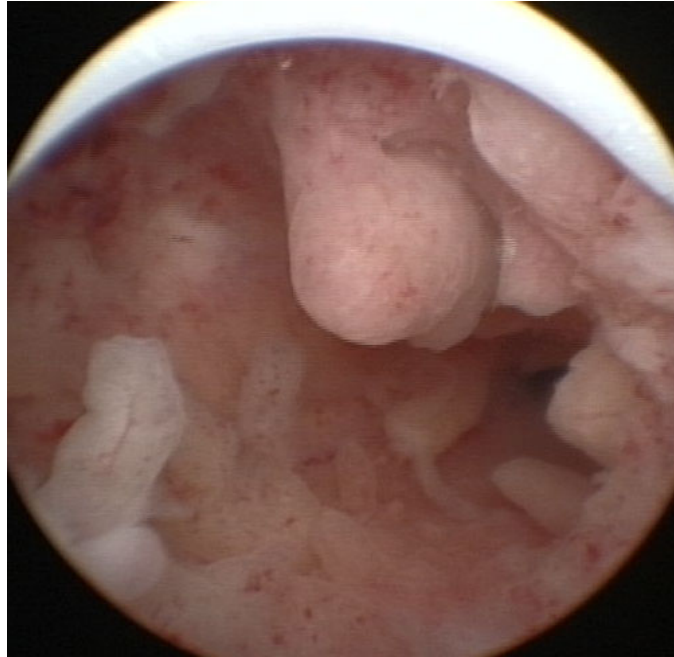


Figura 3: Immagine isteroscopica di una poliposi endometriale diffusa

Eziopatogenesi

L'origine di questa patologia resta per alcuni versi ancora un'incognita, anche se attualmente si propende per una genesi multifattoriale che riconosce di volta in volta cause genetiche, endocrine e iatrogene .

Alcuni interessanti lavori hanno evidenziato come vi siano, nelle cellule stromali, alterazioni cromosomiche (cromosoma 6 e 20) consistenti in traslocazioni tra la banda 21 del braccio corto del cromosoma 6 (p21) e la banda 13 del braccio lungo (q13) del cromosoma 20.

Un'altra importante ipotesi etiologica riguarda le disendocrinie. E' probabile che il punto di partenza sia rappresentato da una focale iperplasia e che

l'iperestrogenismo assoluto o relativo ne possa essere la causa iniziale. L'endometrio, come è noto, risponde agli estrogeni e la sua architettura viene di continuo rimangiata dal progesterone. Ogni condizione di iperestrogenismo assoluto o relativo può quindi essere alla base di una alterazione strutturale dell'endometrio. In particolare un ispessimento dell'endometrio può associarsi ad una condizione di anovulazione cronica, oppure ad un aumento della bioattività degli estrogeni come avviene in caso di aumento della biodisponibilità o del numero di recettori, o, infine, anche ad alterazioni del metabolismo che ne aumentino la concentrazione sierica.

In queste condizioni, in alcune aree e in seguito a fenomeni di neoangiogenesi si creano i presupposti per la formazione dei polipi endometriali, la cui mucosa di rivestimento però, in alcuni casi, risponde diversamente agli stimoli ormonali per una riduzione dei recettori per gli steroidi.

Tra le cause iatrogene la più nota è senza dubbio l'associazione tra tamoxifene e polipo endometriale confermato da molteplici lavori esistenti in letteratura

Impianto

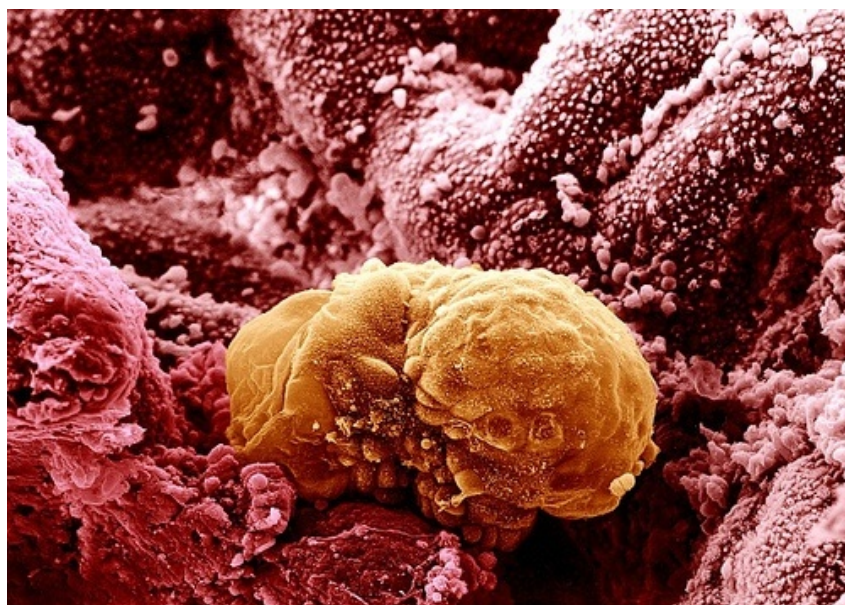


Figura 4: impianto embrionale: immagine in microscopia elettronica

La gravidanza rappresenta un fenomeno fisiologico unico in natura, consistente nella simbiosi tra individui parzialmente diversi o semi-allogeni; il feto infatti porta un corredo genetico per metà di derivazione paterna. Questo tipo di coesistenza richiede una raffinata e complessa regolazione del sistema immunitario, sia materno che fetale, il cui scopo è ad un tempo quello di garantire una efficiente protezione contro eventuali infezioni e di consentire il processo di l'invasione del tessuto embrionale "estraneo" nel contesto di quelli materni evitando che i fisiologici meccanismi di reazione immunitaria, messi in atto dall'organismo della madre, risultino dannosi per l'embrione.

Anni di studi e ricerche hanno solo in parte chiarito le modalità attraverso le quali si realizza questo riassetto immunologico. A tutt'oggi, la tolleranza nei confronti del feto da parte del sistema immunitario materno resta un enigma e, per certi aspetti un vero e proprio paradosso immunologico (5).

Modificazioni del sistema immunitario in gravidanza

Per molti anni il modello unanimemente riconosciuto per spiegare la coabitazione tra madre e feto si è basato sul concetto di “trapianto fetale” proposto da Medawar nel 1953 . I presupposti di questa visione del problema, rivelatasi poi solo parzialmente rispondente alla realtà, si basavano su alcune ipotesi, che di seguito riportiamo : a) la non immunogenicità del feto per immaturità antigenica, b) l'esistenza di uno stato di immunosoppressione materna in virtù del quale il sistema immunitario della madre “ignora” il feto, c) l'utero come sito immunologicamente privilegiato e d) l'esistenza di una barriera immunologica tra madre e feto, elaborata dalla placenta .

Alla luce delle più moderne acquisizioni è stato invece dimostrato che : a) il feto ha proprietà immunogene; b) in gravidanza la risposta immunitaria materna non è depressa; c) l'utero non rappresenta un sito “immuno-privilegiato”, essendo nota la possibilità di gravidanze extra-uterine . Per quanto riguarda l'esistenza di una ‘barriera immunologica’ elaborata dalla placenta all'interfaccia materno - fetale, oggi è acquisito che non si tratta di una ‘separazione’ meramente passiva o, al più

neutra, quanto piuttosto di un sito nel quale operano attivamente fenomeni di tolleranza immunitaria .

In ultima analisi le informazioni che nel tempo si sono via accumulate attestano, contrariamente a quanto originariamente ritenuto, che il sistema immunitario materno è “consapevole” che feto e placenta esistono e che la modulazione della risposta immunitaria della madre in senso tollerogenico nei confronti del concepito è piuttosto il frutto della attivazione di meccanismi immunitari che si realizzano e vengono modulati in modo tale da impedire il rigetto del feto, consentendone lo sviluppo a stretto contatto con i tessuti materni.

Sebbene ogni schematizzazione dei fenomeni biologici che si realizzano durante le prime fasi della gravidanza rischi di essere riduttiva possiamo distinguere i meccanismi di tolleranza che il sistema immunitario materno mette in atto verso il feto e le strategie messe in opera dal feto nei confronti del sistema immunitario materno, in meccanismi locali e sistemici (Tabella I).

Tabella I - Meccanismi di modulazione del sistema immunitario in gravidanza, a livello materno e fetale

Locali (cellulari e umorali)

Modificazioni dell'assetto immunologico all'interfaccia materno - fetale :

- espressione di HLA non classici (G ed E) nel trofoblasto
- rimodulazione delle popolazioni di cellule immunocompetenti a livello deciduale

(M, NK, T)

- modulazione del clima citochinico locale (switch Th1 – Th2 o tipo 1-tipo 2)
- induzione di fenomeni apoptotici nelle cellule immunocompetenti materne
- altri meccanismi (annexina, LIF, IDO, complemento)

Sistemici (cellulari e umorali)

- modificazioni delle popolazioni cellulari immunocompetenti del sangue periferico materno
- Immissione di cellule ed Ag fetali nel circolo materno (microchimerismo)
- Ormoni

LIF : Leucemia inhibitory factor, IDO : indoleamina-de-ossigenasi, M : macrofagi, T : linfociti T, NK: cellule NK

Riassetto delle cellule immunocompetenti a livello deciduale

L'endometrio può essere considerato un organo linfoide terziario la cui composizione cellulare si modifica nelle varie fasi del ciclo mestruale e durante la gravidanza (5). All'inizio della gravidanza l'endometrio subisce un processo di decidualizzazione caratterizzato dalla proliferazione delle cellule stromali che cominciano a produrre prolattina, a modificare la matrice extra-cellulare ed il pattern di espressione di molecole di adesione e sostanze immunomodulatrici. Ne deriva una consistente modificazione del traffico cellulare locale e della

distribuzione delle popolazioni cellulari a livello deciduale con un afflusso di linfociti T, cellule NK e macrofagi che risultano, a questo livello, le popolazioni cellulari predominanti (Tabella II)

Tabella II - Cellule immunocompetenti della mucosa uterina nelle fasi del ciclo mestruale ed in gravidanza

ENDOMETRIO DECIDUA

Cellule Fase proliferativi Fase secretoria Gravidanza
(fasi iniziali)

Linfociti

Cellule uNK + +++ +++++

cellule T + + ++

cellule B -/+ -/+ -/+

Cellule presentanti l'antigene

Macrofagi + ++ +

Cellule dendritiche immature + + +++

Cellule dendritiche mature -/+ + -/+

Granulociti

Polimorfonucleati - -/+ -/+

Mentre nella fase proliferativa e secretoria i leucociti ammontano, rispettivamente, a meno del 10 % ed al 20 % circa, nelle fasi precoci della gravidanza il loro numero aumenta fino ad oltre il 40 %. Questo incremento è soprattutto ascrivibile alle cellule uNK, mentre scarsamente rappresentati sono i linfociti B ed i granulociti (6-7).

Le **cellule uNK** rappresentano un subset cellulare specializzato e specifico dell'utero, costituendo circa il 70 % della popolazione leucocitaria nel primo trimestre di gravidanza; hanno funzioni NK-simili, ma fenotipo differente. Esprimono infatti meno recettori di attivazione (CD69, HLA-DR, LFA-1 e CD45RA) rispetto alle cellule NK del sangue periferico e più recettori inibitori tra i quali KIR2D, KIR2DL4 (Ig-like) e CD94/NKG2A (lectin-like) (8,9) (Tabella III).

Tabella III - Marcatori antigenici di superficie delle cellule NK e uNK

Antigeni NK periferici uNK

CD56dim CD56bright

CD2 (marker T precoce) ++

CD7 (marker T precoce) ++

CD18 (integrina) ++

CD16 (marker NK) + -

CD45 (marker di cellula emopoietica) ++

CD56 (marker NK) ++

CD57 (marker NK) + -
CD62L (molecola di adesione) +/- -
CD69 (marker di attivazione) - +
KIR (marker NK) ++
c-kit (recettore citochinico) - +
IL-2R β (recettore citochinico) ++

Le cellule uNK esprimono selettivamente CD9, galectina-1 e glicodelina, proteine dotate di attività immunomodulatoria (9,10). La **galectina-1** inibisce la proliferazione e la sopravvivenza delle cellule T, riduce la produzione di TNF α , IL-2, IFN γ da parte di cellule T attivate e la produzione di IL-12 da parte dei macrofagi; la **glicodelina** induce una “down regulation” dell’attivazione T cellulare.

Si ritiene, come sopra accennato, che il principale meccanismo che impedisce alle cellule uNK di attaccare il citotrofoblasto non-villoso, sia correlato alla interazione tra i recettori inibitori espressi sulla loro superficie con le molecole HLA-G, HLA-E ed HLA-C presenti sul trofoblasto. A seguito di questa interazione l’attività litica delle cellule uNK viene inibita e la produzione di citochine risulta modulata in senso Th2 (10,11).

In sintesi, sotto il profilo funzionale, le cellule uNK si caratterizzano per una diminuzione dell’attività citolitica ed una aumentata espressione di recettori inibitori che raggiunge il suo massimo entro il 3° mese di gestazione. L’attività e

la produzione citochinica delle cellule uNK è sotto l'influenza regolatoria di fattori ormonali (8).

L'esatta conoscenza delle funzioni delle cellule uNK a livello deciduale è ancora incompleta. Molto probabilmente esse rivestono un ruolo importante nella protezione contro le infezioni e nella modulazione della risposta immunitaria; al tempo stesso intervengono nei complessi meccanismi di regolazione che presiedono alle prime fasi di impianto ed ai fenomeni di placentazione mediante la secrezione di svariate citochine con un profilo diverso rispetto a quello delle cellule NK periferiche. Il pannello di citochine prodotte dalle cellule uNK svolge azioni di 'segno' diverso nei confronti del prodotto del concepimento e l'esito finale della gravidanza dipende, in ultima analisi, da una fine regolazione del 'cocktail' citochinico prodotto da queste cellule.

Mentre infatti G-CSF, GM-CSF, M-CSF e LIF stimolano la crescita del trofoblasto ed il LIF stimola anche i processi di impianto (12,13), il TGF- β inibisce la proliferazione e la differenziazione del trofoblasto ed il TNF- α e l'IFN- γ possono avere effetti negativi sull'impianto e l'invasione del trofoblasto (10).

In definitiva, sebbene i dati in vivo sulle funzioni delle cellule uNK siano assai scarsi le informazioni ottenute in vitro suggeriscono tre principali funzioni di questi elementi : 1) regolazione citochino-mediata della crescita placentare e del trofoblasto; 2) immunomodulazione locale (mediata dall'interazione dei recettori inibitori con molecole HLA di classe I "non-classiche" e da proteine immunomodulatorie quali la galectina-1 e la glicodelina); 3) controllo dell'invasione del trofoblasto mediata da fenomeni di citotossicità.

Un altro subset di cellule immunocompetenti presenti nella decidua materna, con un ruolo rilevante nella risposta immunitaria gravidica, è rappresentato dai linfociti T. Anche questi elementi cellulari sono in stretto contatto con il trofoblasto, ma non riconoscendo come estranee le cellule trofoblastiche MHC-(Ia)-negative, non lo attaccano. Come è noto, esistono 2 subsets principali di linfociti T helper CD4⁺ : Th1 e Th2, caratterizzati da un diverso profilo secretorio di citochine e da diverse funzioni nell'ambito della risposta immunitaria.

Le cellule Th1 secernono IFN- γ , TNF- β , IL-2 e TNF- α (pattern di tipo 1). Le citochine di tipo Th1 attivano i macrofagi e sono implicate nelle reazioni cellulomediata (immunità cellulare), importanti nella resistenza alle infezioni da patogeni intracellulari e nelle reazioni di citotossicità e di ipersensibilità ritardata. Le cellule Th2 secernono IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 (pattern di tipo 2) e sono maggiormente coinvolte nella produzione anticorpale (immunità umorale) e nella resistenza alle infezioni da patogeni extra-cellulari.

Le cellule Th1 e Th2 svolgono attività mutualmente inibitoria. In particolare l'IL-10, prodotta dalle cellule Th2, inibisce lo sviluppo delle cellule Th1 agendo sulle cellule presentanti l'antigene, mentre l'IFN- γ , prodotto dalle cellule Th1, previene l'attivazione delle cellule Th2. Questa polarizzazione della risposta immunitaria rappresenta in realtà una eccessiva semplificazione, dal momento che esistono altri pattern di secrezione citochinica che non rientrano in questa schematizzazione.

A seconda del prevalere dell'uno o dell'altro pattern secretorio (tipo 1 o tipo 2) e della sequenza temporale con cui si realizza questo tipo di polarizzazione, la

risposta immunitaria che ne deriva risulta diversamente modulata. Durante la gravidanza risulta potenziata la risposta umorale (tipo 2) mentre è attenuata quella cellulo-mediata (tipo 1) (14-16).

Diverse evidenze hanno dimostrato che le citochine di tipo Th1 hanno un effetto negativo sulla gravidanza. A livello deciduale esse promuovono l'aborto inibendo l'invasione trofoblastica; in particolare il TNF- α stimola l'apoptosi delle cellule umane trofoblastiche e l'IFN- γ aumenta il killing TNF- α -mediato del trofoblasto. Queste citochine stimolano anche l'attività macrofagica a livello deciduale inducendo la produzione di fattori potenzialmente embriotossici. Il TNF- α e l'IFN- γ sono in grado di influenzare negativamente la crescita fetale anche attraverso l'induzione di fenomeni pro-coagulativi che si traducono nella interruzione del supporto ematico placentare, mediante l'attivazione della protrombinasi, un enzima che converte la protrombina in trombina. Al contrario, le citochine di tipo Th2 stimolano la crescita e l'invasione del trofoblasto favorendo lo sviluppo della gravidanza (18-20).

L'ipotesi attualmente più accreditata, pur con qualche eccezione, si basa sul fatto che sia a livello deciduale che nel sangue periferico, durante la gravidanza, predominino le cellule Th2, come risultato di uno shift Th1-Th2 sotto l'influenza prevalente, ma non esclusiva, di fattori ormonali (21-24).

Ai fini del buon esito della gravidanza, ciò che appare maggiormente rilevante sembra essere il rapporto tra i livelli relativi delle diverse citochine, dei loro recettori ed antagonisti piuttosto che le loro concentrazioni assolute (25-26). La predominanza di un determinato "milieu" citochinico nel microambiente dell'interfaccia materno - fetale, al momento della presentazione dell'antigene al

sistema immunitario materno, è probabilmente il fattore principale in grado di orientare la risposta immunitaria verso un clima cellulare ed umorale prevalentemente Th1 o Th2. Appare pertanto intuibile come l'occorrenza di eventi in grado di modificare questo delicato equilibrio, come ad esempio processi infettivi anche sub-clinici, possano determinare il fallimento della gravidanza (14,27). Una volta indotto, lo shift Th2 si mantiene per tutta la gestazione fino alle fasi finali, allorquando si verificano ulteriori modificazioni in prossimità del parto. Tra i fattori che regolano e mantengono la polarizzazione in senso Th2 un ruolo importante è rivestito da citochine, ormoni ed altre molecole (Tabella IV).

L'IL-10 è probabilmente una delle citochine di maggiore rilevanza, risultando molto espressa a livello del trofoblasto sia murino che umano; per tale motivo è ritenuta di grande importanza nel controbilanciare i potenziali effetti deleteri delle citochine 'pro-infiammatorie' di tipo 1.

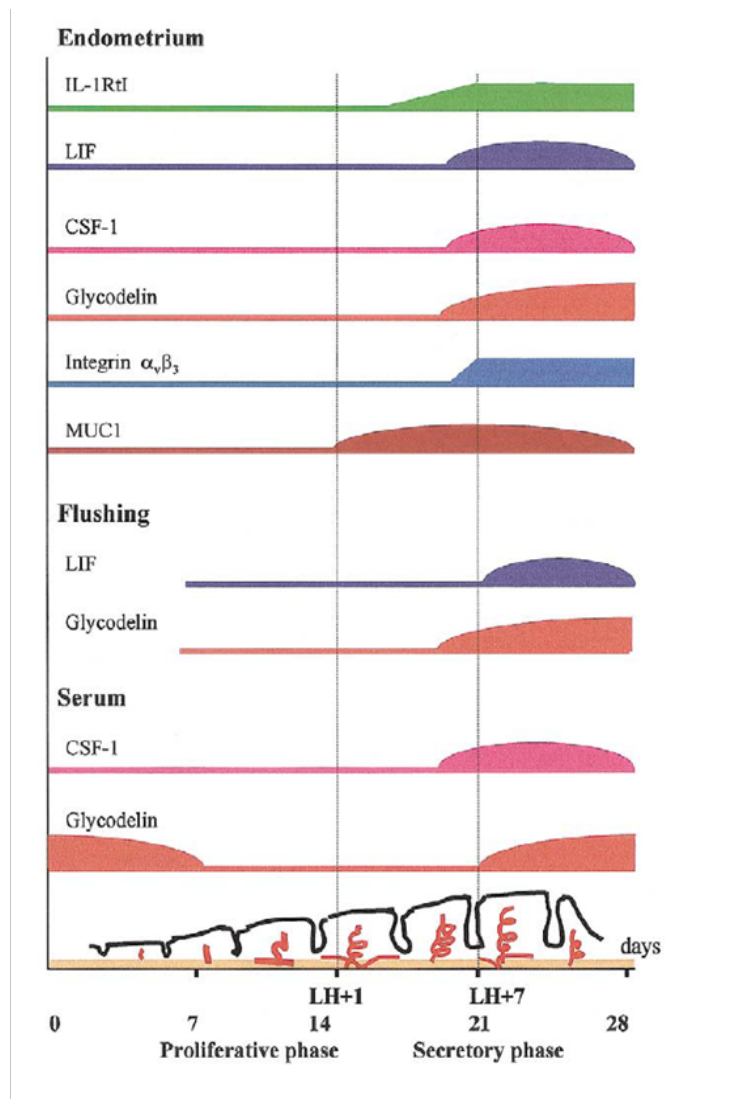


Figura 5: Variazioni del pattern citochinico durante il ciclo mestruale

Tabella IV - Cellule immunocompetenti a livello deciduale

uNK (60-70 %)

- attività citolitica inibita dal legame delle molecole **HLA-G**, E e C ai recettori inibitori KIR e lectin-like
- svolgono una importante azione protettiva contro infezioni fetali
- Svolgono un ruolo citochino-mediato nella placentazione (G-CSF, GM-CSF, N-CSF, LIF, TGF β , TNF α , IFN γ)
- scompaiono al termine della gravidanza
- Azione immunomodulante

T linfociti (1-3 %)

- non attaccano il citotrofoblasto extra-villoso
- predominano T linfociti γ/δ di tipo Th2

Monociti e Macrofagi (20-30 %)

- Svolgono azione difensiva anti-infettiva ed immunoregulatoria
- Sono importanti per la placentazione (TGF β , TNF α , PGE)
- Fagocitano cellule apoptotiche (ruolo scavenger)
- Perdurano per tutta la gravidanza

Cellule dendritiche immature (20 %)

- svolgono un'importante attività di immunomodulazione mediando tra :
difesa contro i patogeni e tolleranza verso il feto

Tra i fattori ormonali il progesterone favorisce lo sviluppo di linfociti T che producono citochine di tipo 2 contribuendo a mantenere la polarizzazione in questa direzione (20). Recentemente è stato dimostrato che in presenza di progesterone i linfociti di donne gravide producono una proteina immunoregolatoria denominata PIBF (progesterone-induced blocking factor) che inibisce diversi tipi di risposta Th1-mediata in vitro e previene l'aborto indotto dal trasferimento di cellule spleniche ad elevata attività NK. Durante la gravidanza il priming e la maturazione delle cellule T avviene in un microambiente progressivamente arricchito di progesterone caratterizzato da bassi livelli di IFN- γ e IL-2 ed elevate concentrazioni di IL-4 e IL-10, realizzandosi in tal modo condizioni favorevoli allo sviluppo degli elementi Th2 (14). La relaxina, prodotta dal corpo luteo come il progesterone, ha effetti contrapposti contribuendo a ristabilire, nelle fasi che precedono il parto, una risposta Th1 orientata (20).

Altri fattori concorrono al mantenimento dello switch Th2 come la PGE che inibisce la produzione di IL-2, inattiva le cellule Th1 e l'attività citotossica delle cellule NK. I glucocorticoidi riducono la IL-2 ed aumentano la IL-4, contribuendo così al mantenimento del clima Th2. Il β -HCG ha funzioni immunoregatorie inducendo apoptosi nelle cellule endometriali mediante l'espressione del FAS ligand, facilitando così l'invasione delle cellule trofoblastiche. Lo switch Th1-Th2 non è prerogativa solo dei linfociti T, ma coinvolge anche, o secondo alcuni prevalentemente, altri subset cellulari come le cellule NK che appartengono all'immunità innata.

Che nella gravidanza le modificazioni della risposta immunitaria in senso tollerogenico nei confronti del feto siano un fenomeno prevalentemente a carico dell'immunità innata è nozione relativamente recente . Assieme alle cellule NK, i macrofagi sono tra i principali elementi cellulari della risposta immunitaria innata e, a livello dell'interfaccia materno-fetale, sono abbondantemente rappresentati (20-30%). In questa sede, sorprendentemente, i macrofagi coabitano in stretta vicinanza con le cellule trofoblastiche, senza attaccarle, lasciando supporre che svolgano importanti funzioni immunoregolatorie associate allo stato gravidico, al di là del loro abituale ruolo "scavenger".

Perché la gravidanza abbia luogo e prosegua, i meccanismi preposti alla regolazione dei fenomeni apoptotici sono di fondamentale importanza. E' grazie all'apoptosi che durante le fasi di impianto avviene il rimodellamento tessutale della decidua materna e l'invasione dei tessuti embrionali. Nel sito di impianto è infatti necessario un costante turnover cellulare per garantire una appropriata crescita e funzione della placenta. Ne deriva che la clearance dei corpi apoptotici rappresenta un passaggio critico nell'omeostasi tessutale all'interfaccia materno-fetale, prevenendo il rilascio di materiale intracellulare e l'insorgere di una reazione infiammatoria potenzialmente in grado di danneggiare il tessuto fetale. A questo compito - secondo una moderna interpretazione - sono preposti i macrofagi

Come è noto i macrofagi producono citochine e fattori di crescita che governano le interazioni cellulari locali e tessutali; essi rispondono a stimoli ormonali che ne regolano le funzioni e la sopravvivenza. Il tipo di citochine prodotte dai macrofagi dipende dal loro stato di attivazione e dalla loro attività fagocitante. Studi recenti hanno dimostrato che il legame e l'ingestione di cellule apoptotiche da parte dei fagociti si traduce in una modulazione in senso immunosoppressivo ed anti-

infiammatorio risultando inibita la produzione di TNF- α ed IFN- γ e stimolato il rilascio di citochine di tipo 2. La quantità di elementi apoptotici da rimuovere rappresenta un altro fattore critico, in grado di modulare in senso pro- o anti-infiammatorio l'attività dei macrofagi.

E' stato dimostrato che nella pre-eclampsia la distribuzione dei macrofagi si modifica. Nella gravidanza normale i macrofagi si localizzano nello stroma circostante le arterie spirali trasformate ed in prossimità del trofoblasto extra-villoso funzionando da cellule di supporto, facilitando così l'invasione trofoblastica attraverso il letto vascolare placentare. Nella pre-eclampsia queste cellule si localizzano invece all'interno ed attorno alle arterie spirali, realizzando una sorta di barriera che separa questi vasi dalle cellule trofoblastiche inducendone l'apoptosi ed ostacolando la trasformazione delle arterie spirali.

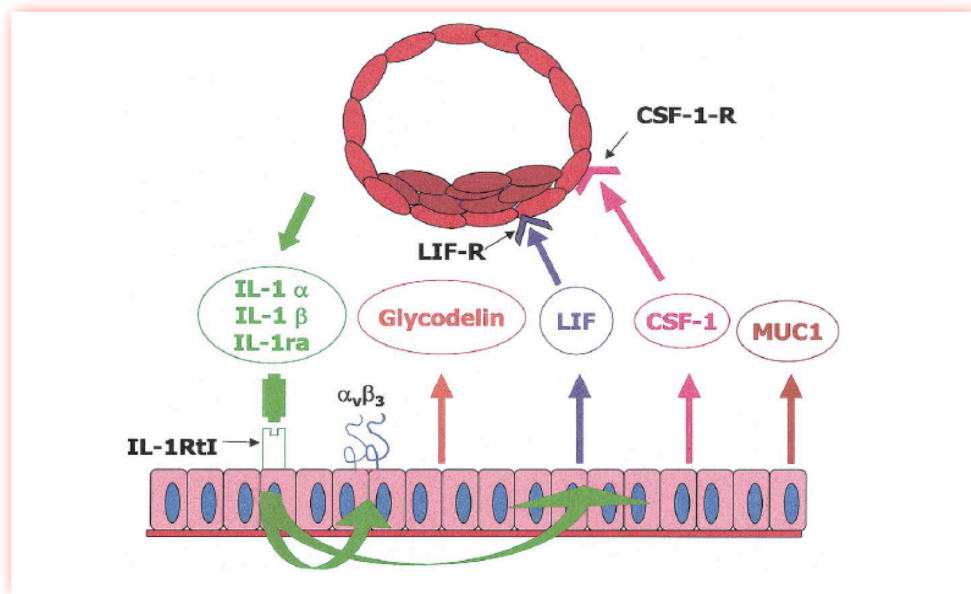


Figura 6: Localizzazione dei fattori molecolari coinvolti nell'interazione tra blastocisti umana ed endometrio prima dell'impianto

Modificazioni della risposta immunitaria a livello periferico

Da quanto fino ad ora detto appare evidente che a livello dell'interfaccia materno-fetale si instaurano complessi meccanismi di modulazione della risposta immunitaria, soprattutto a carico dell'immunità innata rispetto a quella adattativa. Questi processi sono sotto l'influenza ormonale e del clima citochinico locale e, in ultima analisi, inducono uno stato di "tolleranza attiva" della madre nei confronti del feto.

A queste modificazioni locali corrispondono anche modificazioni del sistema immunitario materno a livello periferico.

La rilevanza di tali modificazioni è documentata anche dall'effetto della gravidanza sull'attività di malattia di alcune patologie autoimmuni. I casi più emblematici sono rappresentati dall'artrite reumatoide e dal lupus eritematoso sistemico che rispettivamente, durante la gravidanza, tendono a migliorare e ad aggravarsi (cfr. 28-29).

A livello periferico, il numero totale dei linfociti materni rimane sostanzialmente stabile per tutta la durata della gravidanza sebbene vi sia qualche isolata segnalazione di una riduzione del rapporto CD4/CD8. Analizzando più in dettaglio i vari subsets, il numero dei linfociti T citotossici diminuisce mentre il numero dei linfociti T γ/δ rimane sostanzialmente stabile. Studi condotti su questo particolare subset hanno dimostrato che tali cellule sono in uno stato di attivazione ed esprimono recettori per il progesterone; secernono inoltre IL-10, PIBF e TGF- β che sono in grado di sopprimere l'attività delle cellule NK e la

risposta T cellulo-mediata agli antigeni fetali. I meccanismi attraverso i quali durante la gravidanza si realizza uno stato di tolleranza T cellulare comprendono fenomeni di delezione clonale, di non-responsività clonale, di down regulation del TCR e/o di eventuali co-recettori.

Sebbene lo shift Th1-Th2 sia decisamente più consistente a livello dell'interfaccia materno-fetale, esistono evidenze crescenti che tale polarizzazione caratterizzi anche le cellule del sangue periferico della madre come dimostrano i dati ottenuti in condizioni di poliabortività ove tale shift non si realizza. Per quanto riguarda le cellule B alcuni Autori ne riportano un lieve decremento, mentre secondo altri il loro numero rimane stabile.

In corso di gravidanza normale il numero delle cellule NK nel sangue periferico materno diminuisce (30). Le cellule NK di donne gravide mostrano una ridotta attività citolitica se paragonate a quelle di donne non gravide. L'espressione di recettori inibitori è aumentata raggiungendo un massimo entro il terzo mese di gestazione con un successivo declino fino alla fine della gravidanza. Anche a livello periferico le modificazioni di numero, fenotipo e attività delle cellule NK sono regolate da ormoni (estrogeni, progesterone, prolattina) e citochine (8)

Gli scarsi studi "in vivo" sui monociti-macrofagi e granulociti hanno in genere dimostrato uno stato di attivazione di questi elementi cellulari a livello periferico. Alcune evidenze suggeriscono che la placenta eserciti un ruolo importante nell'attivazione di tali cellule al loro passaggio utero-placentare. Un'altra modalità di attivazione degli elementi fagocitanti del sangue materno è rappresentato dal microchimerismo fetale consistente nella immissione nel circolo materno di cellule fetali di origine trofoblastica e sinciziotrofoblastica che

vengono fagocitate dai monociti e dai granulociti materni con conseguente attivazione di tali elementi cellulari.

Basi Scientifiche

Le evidenze scientifiche sulle quali si basa il nostro studio sono rappresentate da:

1. La presenza di neoformazioni polipoidi all'interno della cavità uterina influenza la pregnancy rate.

Varesh *et Al*, valutarono retrospettivamente 78 con diagnosi di poliposi endometriale, ed evidenziarono un miglioramento della pregnancy rate dopo polipectomia

Silberstein, Oshra Saphier, Bradley J. van Voorhis and Shayne M. Plosker nel 2006 in un studio retrospettivo su pazienti sottoposte a cicli di IVF descrivono un'incidenza di circa il 15% di patologia poliposica in queste pazienti sterili.

Taylor *et al* infine nel 2008 in una review che descrive la relazione tra le varie patologie uterine ed infertilità, rivela un'incidenza di polipi nelle pazienti sterili che va dal 16,5% al 26,5%

2. Le alterazioni del profilo molecolare del pattern di citochine a livello endometriale condizionano l'impianto embrionale.

Wegmann nel 1994, rivela che le citochine Th-2, inibendo la risposta Th-1, migliorano la sopravvivenza fetale.

Johnson *et al.* 1999 evidenzia il ruolo delle citochine Th-1 nell'ambito dell'abortività ricorrente.

Lim *et al.* nel 2001 hanno evidenziato che elevati livelli di alcune citochine quali INF γ , interleuchina-2, interleuchina-12 ed il fattore di necrosi tumorale- β si associano con aborti ricorrenti, mentre elevati livelli di citochine Th-2 quali interleuchina-4-6 10-13 sono più frequentemente correlati ad un normale outcome riproduttivo.

Obiettivo dello studio

Obiettivo del presente studio è stato valutare la presenza di una componente infiammatoria nell'ambito della patologia poliposica uterina e supporre un eventuale ruolo nelle difficoltà d'impianto embrionale. In particolare sono stati valutati i livelli di Inf- γ sia nel siero che in campioni biotici di queste pazienti al fine di trovarne una correlazione statisticamente significativa.

Materiali e Metodi

Pazienti e tecnica

Nel periodo compreso tra Gennaio ed Ottobre 2010 sono state reclutate per lo studio 21 pazienti da sottoporre ad isteroscopia operativa per polipectomia prima di essere sottoposte ad una tecnica di Fecondazione assistita. Come gruppo di controllo sono state reclutate 21 pazienti che presentavano una cavità uterina regolare.

Tutte le pazienti sono state sottoposte, all'interno del work-up diagnostico a:

1. ecografia pelvica trans-vaginale;
2. dosaggio nel corso di un ciclo mestruale spontaneo, dei livelli sierici di: ormone follicolo stimolante (FSH), ormone luteinizzante (LH), prolattina (PRL), estradiolo (E_2) e testosterone (T) al 3° giorno progesterone (P_4) al 21° giorno.

Profilo endocrino metabolico con particolare riferimento alla funzionalità tiroidea;

3. esame colturale del secreto vaginale e ricerca di *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* e *Chlamydia trachomatis* su tampone cervicale;
ricerca di *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* e *Chlamydia trachomatis* su tampone uretrale al partner maschile;
4. Isteroscopia diagnostica.

Sono state incluse nel presente studio donne

1. eumenorroiche (cicli di 28 ± 3 giorni);

2. di età compresa tra i 19 ed i 35 anni;
3. con BMI compreso tra 19 e 27;
4. evidenza ultrasonografica e biochimica di ovulazione in almeno un ciclo spontaneo nei tre mesi antecedenti l'arruolamento.

Abbiamo escluso dallo studio:

1. le pazienti con diagnosi o sospetto di endometriosi;
2. le pazienti affette da anovulazione;
3. le pazienti con patologie endocavitaria differente dalla poliposi ed in particolare tutte le pazienti con sospetto isteroscopico di endometrite.
4. le coppie con patologie endocrino-metaboliche e/o auto-immuni e/o cromosomiche riscontrabili dai dati anamnestici o evidenziate nel corso dell'inquadramento diagnostico posto in essere di routine presso il nostro Dipartimento.

Nel complesso, abbiamo incluso nello studio 42 pazienti sterili da almeno un anno. Ventuno di esse presentavano un poliposi endometriale (Gruppo A) mentre le rimanenti 21 formavano un gruppo di controllo (Gruppo B).

A tutte le pazienti sono stati effettuati:

- I. Un prelievo di sangue periferico di circa 36 cc, tramite tre differenti provette di circa 12 cc, sul quale è stata successivamente effettuata l'operazione di separazione cellulare e valutazione dei livelli di INF- γ .
- II. Una prelievo bioptico su polipo per quanto riguarda le pazienti del Gruppo A e su tessuto endometriale per le pazienti del Gruppo B

Saggi immunologici

Per quanto riguarda la metodica di valutazione dei livelli di interferone su sangue periferico è stata utilizzata la separazione cellulare e valutazione della produzione di interferone tramite ELISPOT.

Separazione cellulare:

La separazione cellulare ed il successivo recupero linfocitario è stato eseguito con la seguente metodica

Materiale necessario :

- Prelievo di sangue periferico (ad es. 8 ml di sangue)
- PBS sterile (ad es. 4 ml)
- Ficoll-Paque Plus endotoxin tested (ad es. 6 ml)
- Terreno RPMI 1640 al 10 % FCS sterile
- Tubi in propilene sterile da 15 ml
- Pipette pasteur sterili
- Cappa sterile a flusso laminare verticale

Procedura :

In una provetta conica per centrifuga da 15 ml vengono aggiunti 3 ml di *ficoll histopaque* e portati a temperatura ambiente.

Il nostro campione di sangue venoso intero viene versato con diluizione 1:3 sulla soluzione histopaque 1077 facendolo scivolare molto lentamente lungo la parete della provetta usando una pipetta sterile.

Si centrifuga a 400 x g ovvero 2500 rpm per 30 minuti a + 18 °C senza freno in una centrifuga a braccio basculante. Durante la centrifugazione il polisaccaride favorisce l'aggregazione degli eritrociti e dei granulociti e la loro successiva sedimentazione rapida. Invece i linfociti e le altre cellule mononucleari sono trattenute nell'interfaccia tra la soluzione histopaque 1077 e il plasma. Al termine della centrifugazione viene utilizzata una pipetta *Pasteur* per aspirare con cautela tutto il siero sovrastante fino all'interfaccia opaca contenente le cellule mononucleari. In seguito si raccoglie con una pipetta l'anello di linfociti prestando attenzione a non aspirare il ficoll sottostante. I linfociti vengono trasferiti in una provetta conica per centrifuga pulita e vengono aggiunti alcuni ml di PBS fino a 10 ml . Si passa nuovamente a centrifugare per 10 minuti a 2000 rpm a 18 °C azionando il freno.

Terminato il 1° lavaggio si aspira il sovrastante ed lo si elimina. Risospendiamo le cellule in 5 ml di PBS . Dopo aver miscelato il pellet usando una *Pasteur*, si aggiunge PBS fino a 10 ml , centrifugando poi per 10 minuti a 2000 rpm a 18 °C con freno.

Terminato anche il 2° lavaggio , si scarta il PBS e aggiungendo poi 5 ml di terreno RPMI sterile contenente 10 % FCS inattivato al calore e 1 % Glutamina (il terreno non deve contenere alcun antibiotico o antimicotico). Infine abbiamo miscelato le cellule del pellet utilizzando una *Pasteur* , ed abbiamo aggiunto

terreno RPMI fino a 15 ml . Centrifugando nuovamente per 10 minuti a 2000 rpm a 18 °C con freno (3° lavaggio).

Concluso anche l'ultimo lavaggio ,si scarta il sovrnatante stabilendo il volume di terreno da aggiungere in base alle dimensioni del pellet cellulare .

Allestimento del test:

Dopo aver separato i linfociti da sangue intero con la metodica suddetta si procede all'esecuzione della metodica del kit come specificato. Di seguito saranno riportati le tappe fondamentali del test.

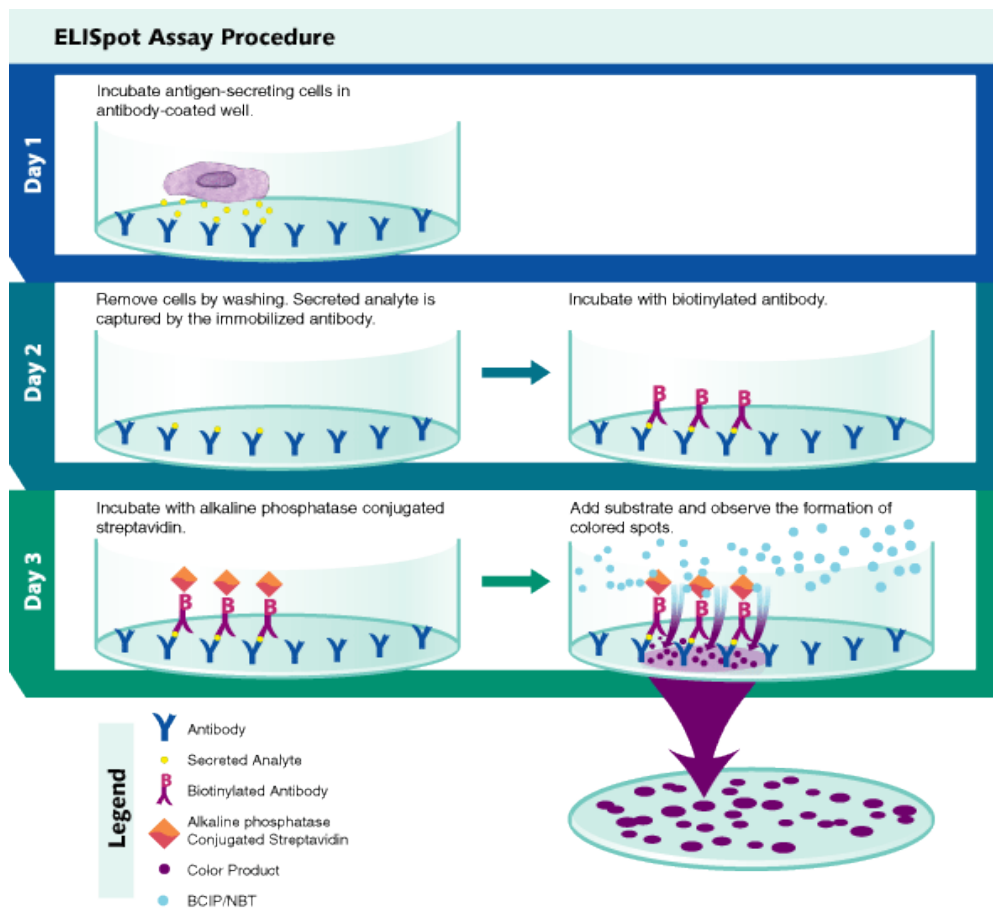
1° giorno: sulla nostra piastra Elispot vengono distribuiti con una pipetta sterile 25 microlitri di etanolo 70% nei pozzetti,dopodiché le celle vengono svuotate manualmente usando un foglio di carta assorbente lavando poi la piastra tre volte con 100 microlitri di PBS . In una provetta sterile si pipettano 10 microlitri dell'anticorpo di cattura in 1 ml di PBS (quantità sufficiente per 10 campioni). Si miscela la soluzione e se ne dispensano 100 microlitri . Dopo ciò la piastra è incubata per una notte a +4°C.

2° giorno: i pozzetti vengono svuotati e la piastra lavata dispensando 100 microlitri di PBS. Vengono dispensati 100 microlitri di dry milk 2% in PBS nelle celle ,incubando la piastra due ore a temperatura ambiente. Le celle vengono svuotate manualmente usando un foglio di carta assorbente e la piastra viene lavata una volta con PBS dispensandone 100 microlitri nelle celle.

Abbiamo aggiunto poi alla sospensione cellulare l'appropriato agente stimolante (nel nostro caso abbiamo utilizzato PMA e Ionomicina). Dispensando altri 100 microlitri di sospensione cellulare (circa 250,000 cellule in 100 microlitri). Incubando poi la piastra a 37°C in CO₂ per 15-20 ore.

3° giorno: le celle vengono svuotate capovolgendo la piastra su carta assorbente. Vengono distribuiti 100 microlitri di PBS 0,1% tween 20 e la piastra incubata a +4°C per 10 minuti. Lavata poi tre volte con PBS 0,1% twenn 20. R. L'anticorpo di detezone viene ricostituito miscelandone 10 microlitri in 1ml di PBS in 1% BSA (quantità sufficiente per 10 campioni). Vengono distribuiti 100 microlitri della miscela nelle cellette. Incubando poi nuovamente la piastra a 37°C per un'ora e trenta minuti. Abbiamo poi svuotato la piastra e lavata tre volte con PBS-0,1% tween 20. Viene diluita la streptavidina-fosfatasi alcalina 1:5000 e distribuiti 100 microlitri nelle celle. La piastra nuovamente a incubare un'ora a 37°C. Le celle vengono svuotate e lavate tre volte con PBS 0,1% tween 20. Distribuendo poi 100 microlitri di buffer BCIP/NBT pronto per l'uso. Viene lasciato che la reazione proceda per 2-10 minuti a temperatura ambiente. Le celle lavate tre volte con acqua distillata. Ed infine si lascia asciugare le celle e si leggono gli spots con microscopio o lettore automatico.

Figura : Fasi della procedura di ELISpot



I risultati sono quindi riportati come numero di spots nella singola piastra.

Analisi statistica

I risultati vengono riportati come medie \pm deviazione standard. Le analisi sono state effettuate con modello di regressione lineare, test t di Student o il test chi-quadro di Fisher quando richiesto. Un valore di p inferiore a 0.05 è stato

considerato statisticamente significativo. I dati sono stati analizzati con il pacchetto Statistica 98 per windows (Kernel release 5.1;Statsoft Inc)

Risultati

L'età media delle pazienti era di 30 ± 3.2 anni nel gruppo con poliposi endometriale e di 30.7 ± 3.7 nel gruppo di controllo. La durata dell'infertilità era di 2.4 ± 0.8 e 2.6 ± 0.7 rispettivamente (Tabella 5). Nel gruppo A sono state incluse 21 pazienti affette da poliposi endometriale, mentre nel gruppo B sono state incluse 21 pazienti che presentavano una cavità uterina regolare per forma e dimensioni.

Tabella 5: Caratteristiche cliniche delle pazienti

	G	G
	ru	ru
	p	p
	p	p
	o	o
	A	B
Pazienti (n)	2	2
	1	1
Età (m \pm DS, anni)	3	3
	0	0.

	±	7
	3.	±
	2	3.
		7
Durata infertilità (m±DS,	2.	2.
anni)	4	6
	±	±
	0.	0.
	8	7

Le ventuno pazienti con poliposi endometriale presentavano un valore medio di INF- γ – inteso come numero di spots - nel siero pari $85,7 \pm 84,14$ mentre le pazienti del secondo gruppo (gruppo B) avevano un numero medio di spots nel siero pari a $36,7 \pm 45,55$ ($p=0.038$). Allo stesso modo, per quanto riguarda il materiale bioptico, nelle pazienti con poliposi, il numero medio di spots è risultato pari a $39,8 \pm 34,15$, mentre nel gruppo B esso è stato di $15,7 \pm 22,34$, con una p al test t di student di 0.013 .

La concentrazione di INF γ nel siero e nei tessuti bioptici risulta quindi in modo statisticamente significativo, più alta nelle pazienti con poliposi endometriale.

Tabella 6: Livelli di Inf- γ nel siero

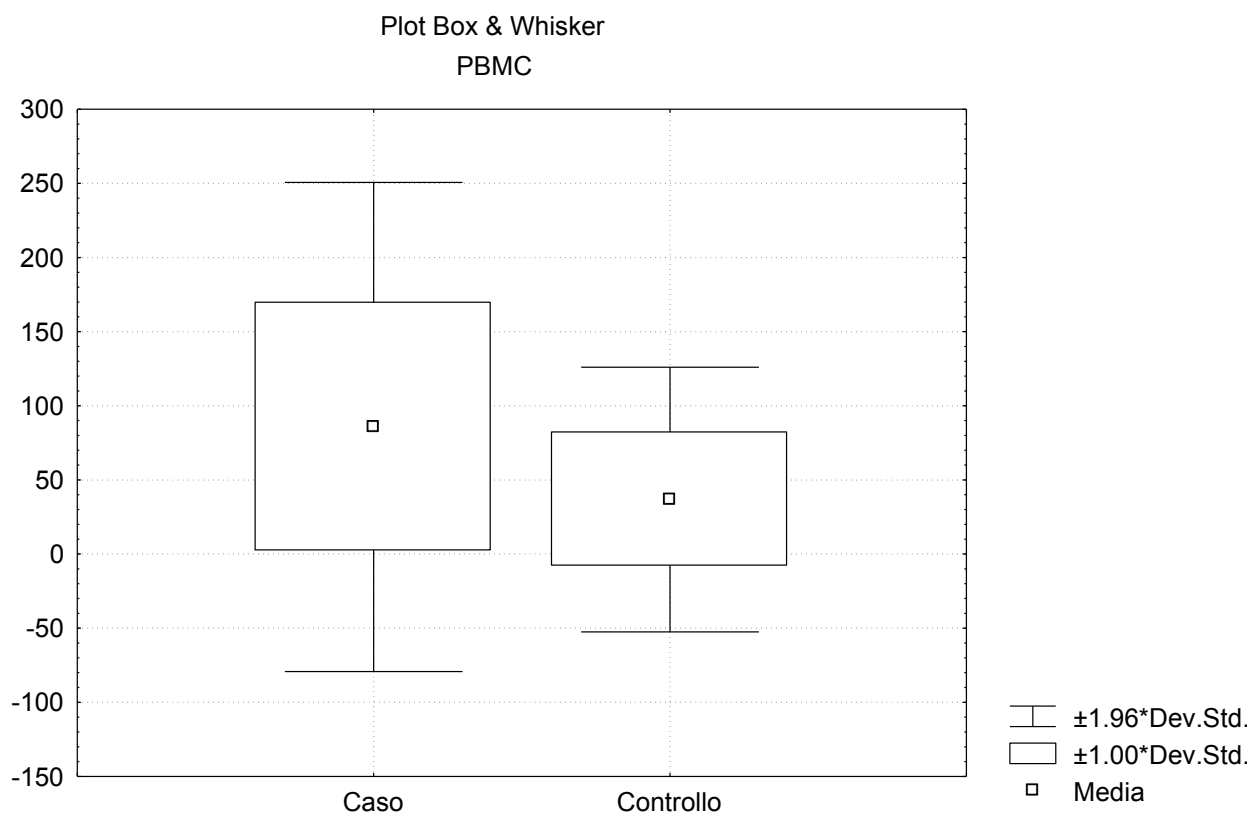
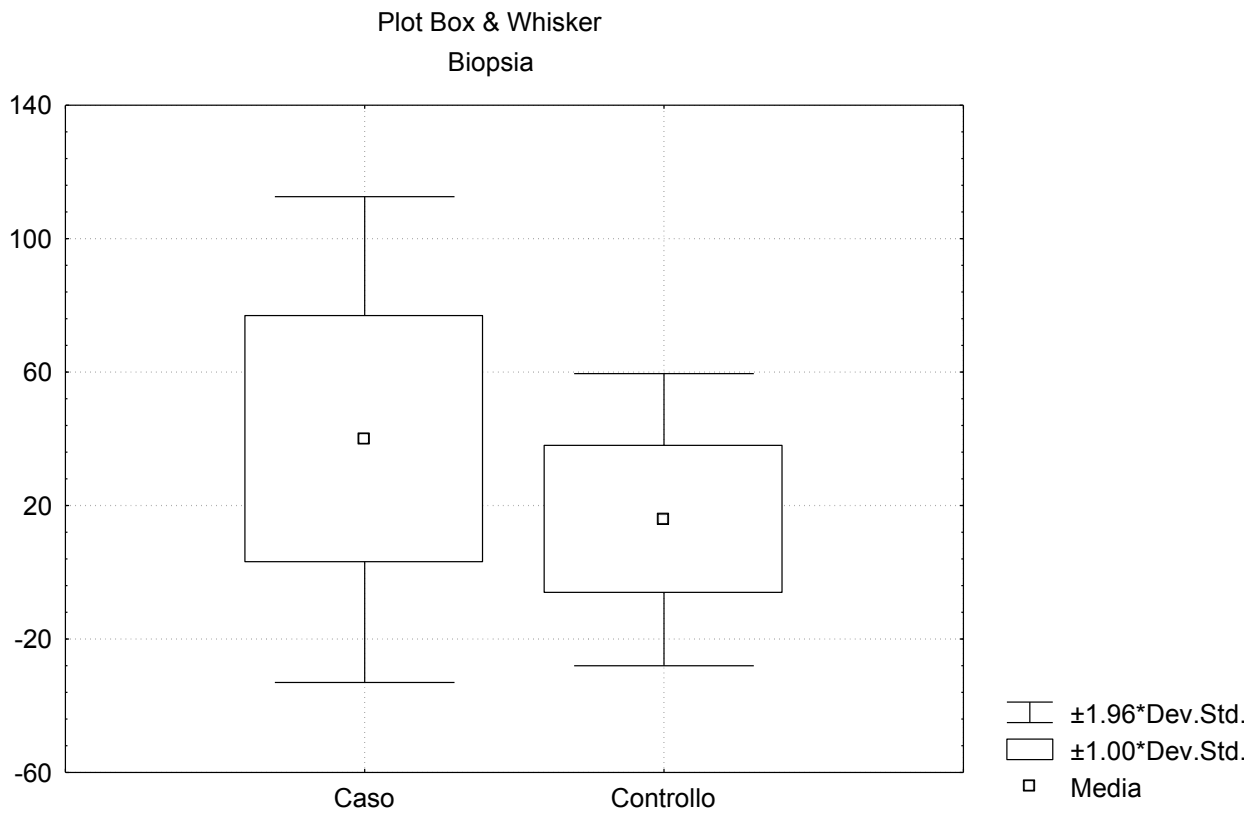


Tabella 7: Livelli di Inf- γ su biopsia



I dati ottenuti dalle suddette ricerche sono stati pubblicati nel seguente

studio:

Endometrial polyps in infertile patients: do high concentrations of interferon-gamma play a role?

Antonio Mollo, M.D., Ph.D.,^a Antonella Stile, M.D.,^a Carlo Alviggi, M.D., Ph.D.,^a Marcello Granata, M.D.,^a Giuseppe De Placido, M.D., Ph.D.,^a Alessandro Perrella, M.D.,^b Anna d'Antonio, B.D.,^b and Ettore Cicinelli, M.D., Ph.D.^c

^a Department of Obstetrics, Gynecology, Urology and Reproductive Medicine, Federico II University of Naples; ^b Department of Infectious Disease and Immunology, Hospital D. Cotugno, Naples; and ^c Fourth Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, University of Bari, Bari, Italy

Objective: To assess levels of interferon-gamma (IFN- γ) both in serum and in endometrial biopsy samples from infertile patients with endometrial polyps, to investigate the molecular background involved in the formation of endometrial polyps and its potential role in infertility.

Design: Prospective controlled trial.

Setting: Academic infertility clinic.

Patient(s): Twenty-one infertile women affected by endometrial polyposis represented the study group, and 21 homogeneous women without endometrial polyps were enrolled as control subjects.

Intervention(s): Blood and endometrial biopsy collection from infertile women with and without endometrial polyps.

Main outcome measure(s): IFN- γ -positive cells were analyzed and counted as spot-forming colonies.

Result(s): IFN- γ levels were significantly higher both in serum and in tissue biopsies of women with endometrial polyps.

Conclusion(s): High concentrations of IFN- γ were detected in infertile patients with endometrial polyps. The possible role of an inflammatory factor in a proliferative pathology represents a novel insight into the understanding of endometrial polyposis and its relationship with infertility. (Fertil Steril® 2011;96:1209–12. ©2011 by American Society for Reproductive Medicine.)

Key Words: Infertility, IFN- γ , endometrial polyps, endometritis

The association between endometrial polyps and infertility is still a matter of debate (1–4). Cakmak and Taylor in a recent review reported that endometrial polyps are identified by hysteroscopy in 16%–26% of women with otherwise unexplained infertility (5). In the absence of other causes of infertility the benefits of a polypectomy have been demonstrated (6, 7).

Successful implantation strictly relies on embryo-endometrium communication and is mediated by a complex cytokine network during the apposition phase, which involves numerous adhesion molecules during the adhesion phase and tissue metalloproteinases during the invasion phase (8). Any alteration in the molecular environment on the endometrial surface may cause different mechanisms to control implantation and early pregnancy, resulting in infertility and abortion. The pattern of helper T cell types 1 (T_H1) and type 2 (T_H2) has been recognized to play a key role in physiologic and pathologic networks in humans. T_H1 cells are potent producers of interleukin-2 (IL-2), interferon-gamma (IFN- γ), and tumor necrosis factor alpha (TNF- α), and T_H2 cells can produce IL-4, IL-5, IL-10, or IL-13. T_H1 cytokines have been found to

have an embryotoxic effect, thus having a negative impact on pregnancy (9).

In particular, alterations of the endometrial cytokine pattern influence the implantation process: T_H2 lymphocyte cytokines improve fetal survival by inhibiting T_H1-type response (10). Direct correlation between recurrent miscarriage and high levels of IFN- γ , IL-2, IL-12, and TNF- β has been shown (11). Inversely, high levels of T_H2 cytokines, such as IL-4, IL-6, and IL-10, are correlated with a normal reproductive outcome (12, 13).

In the present study, we aimed to evaluate the levels of IFN- γ both in serum and in tissue biopsies of infertile patients with endometrial polyps. Results were compared with a group of infertile patients with a normal uterine cavity.

PATIENTS AND METHODS

Patients

Participants were recruited from a population of infertile women scheduled for IVF, aged 18–35 years, referring to the outpatient infertility clinic of our institution between January 1, 2010, and October 31, 2010. Institutional Review Board approval was obtained from the Ethics Committee of our institution. Only normogonadotrophic normoovulatory women with body mass indexes (BMIs) ranging between 18 and 28 kg/m² were considered. All women underwent a diagnostic work-up for the detection of endocrine, chronic inflammatory, infectious, anatomic, and chromosomal alterations.

Endocrinometabolic assessment included tests for diabetes, dysthyroidism, hypopituitarism, hyperprolactinemia, luteal insufficiency, and hyperandrogenism. A transvaginal ultrasound scan was also performed to evaluate pelvic anatomy and ovarian structure. Serum levels of the rheumatoid factor, C-reactive protein, and antibodies against nucleus, mitochondria, smooth

Received March 7, 2011; revised July 29, 2011; accepted August 1, 2011; published online August 26, 2011.

A.M. has nothing to disclose. A.S. has nothing to disclose. C.A. has nothing to disclose. M.G. has nothing to disclose. G.D.P. has nothing to disclose. A.P. has nothing to disclose. A.d'A. has nothing to disclose. E.C. has nothing to disclose.

Reprint requests: Antonio Mollo, M.D., Ph.D., Department of Obstetrics, Gynecology, Urology, and Reproductive Medicine, Federico II University of Naples, Via Pansini 5, 80131 Naples, Italy (E-mail: antmollo@unina.it).

0015-0282/\$36.00

doi:10.1016/j.fertnstert.2011.08.001

Fertility and Sterility® Vol. 96, No. 5, November 2011

Copyright ©2011 American Society for Reproductive Medicine, Published by Elsevier Inc.

1209

muscle cells, phospholipids, and cardiolipin (IgM and IgG) were additionally assessed. Moreover, cervical swabs were implemented to diagnose *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis*, and *Ureaplasma urealyticum* infections. *Chlamydia* antibody testing (IgM and IgG) was also done. Hysteroscopy was performed to detect either müllerian malformations or organic pathologies. Karyotype was studied to detect chromosomal aberrations.

Patients with endometriosis, polycystic ovary syndrome, or endouterine pathologies different from polyposis and those affected by anovulation were excluded from the study. Women with endocrine-metabolic, autoimmune, or chromosomal diseases diagnosed by anamnestic data or during the diagnostic phase were also excluded from the trial.

Five hundred fifty-eight patients underwent diagnostic hysteroscopy earlier IVF during the period of the study. Our inclusion criteria identified 126 eligible patients, 21 of them with endometrial polyps. Women meeting the selection criteria were chronologically enrolled. More specifically, for each woman with endometrial polyp included in the study as a case subject, the subsequent age- and BMI-matched woman presenting normal cavity was selected as a control subject. Consent for biopsy and blood collection was obtained before hysteroscopy. Twenty-one women affected by endometrial polyposis constituted the study group (group A) and 21 the control group (group B). Diagnostic hysteroscopy was performed during the early proliferative phase, between the 6th and 10th days of the cycle. In all patients, an endometrial biopsy was performed with the use of a 4 mm Novak curette. Approximately 36 mL of peripheral blood was collected from all patients in three different 12-mL test tubes.

Immunology

Enzyme-linked immunosorbent spot (ELISpot) assay was performed to evaluate the immune system network both locally and in periphery, according to previous experience (14–16). Briefly, mononuclear cells from the biopsy were isolated after mechanical separation from endometrial tissue at large, whereas peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were separated immediately from fresh heparinized blood with the use of Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation. Samples were washed with phosphate-buffered saline solution and resuspended in RPMI 1640 supplemented with 25 mmol/L Hepes, 2 mmol/L glutamine, 50 mg/mL of gentamycin, and 10% heat-inactivated human AB serum (complete medium). Using 200,000 cells per well, IFN- γ -positive cells were analyzed and counted as spot-forming colonies (SFCs) with the use of an ELISpot plate reader (Bio-reader 2000; Biosys), according to the manufacturer's instructions. The background, evaluated in complete medium alone, was always <20 SFCs (range 10–25 SFCs) for IFN- γ . Separation of mononuclear cells from the biopsy was performed after mechanical separation from tissue. Results were expressed as SFCs according to our previous experience (14–16). All experiments were done in triplicate.

Statistical Analyses

The results are expressed as mean \pm SD. The analysis has been performed using the linear regression model, Student *t* test or Fisher exact chi-square test, when applicable. A *P* value of < .05 was considered to be statistically significant. Data were analyzed with Statistic 98 for Windows (kernel release 5.1; Statsoft).

RESULTS

In the present study, serum and endometrial IFN- γ levels were assessed in 42 infertile women. Twenty-one patients had endometrial polyps (group A), and the remaining 21 comprised the control group (group B). The two groups were similar in age, BMI, and duration of infertility (Table 1).

Regarding the IFN- γ concentration in blood serum, group A revealed 85.7 ± 84.14 SFCs and group B 36.7 ± 45.55 SFCs ($P < .05$; Fig. 1). When the endometrial polyp biopsy samples were analyzed, the mean number of spots in group A was 39.8 ± 34.15 ,

TABLE 1

Clinical characteristics of the patients.

	Group A	Group B
Patients, n	21	21
Age (y), mean \pm SD	31.0 \pm 3.5	31.4 \pm 3.7
Infertility (y), mean \pm SD	1.9 \pm 0.7	2.0 \pm 0.9
Body mass index (kg/m ²), mean \pm SD	24.6 \pm 2.4	24.1 \pm 3.0

Mollo. High levels of IFN- γ in endometrial polyposis. Fertil Steril 2011.

and in group B the value was significantly lower: 15.7 ± 22.34 ($P < .05$; Fig. 2).

DISCUSSION

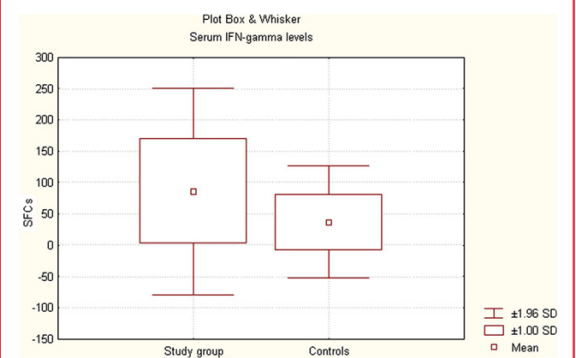
The data of the present study demonstrate that infertile women with endometrial polyps/polyposis show significantly higher concentrations of IFN- γ both in endometrium and in circulating blood compared with women without endometrial pathology.

To avoid any bias during the collection of endometrial samples, we chose to perform blind biopsies with the use of a Novak curette in both case and control subjects. We assumed that comparing hysteroscopic polyps' biopsies with endometrial biopsies would have distorted the results. In the present study, a pilot evaluation of differences between groups was proposed. Furthermore, lack of data in the literature rendered any power analysis questionable. Nevertheless, the sample size was chosen assuming that the prevalence of chronic endometritis is $\geq 10\%$ in infertile women (17), whereas it could be higher in those with polyps. On these bases, we calculated that even a relatively small sample size of 20 women per group could be sufficient for detecting statistically significant difference through the mean value.

Our data are consistent with an earlier study that reported higher levels of IFN- γ in uterine washing samples of patients with

FIGURE 1

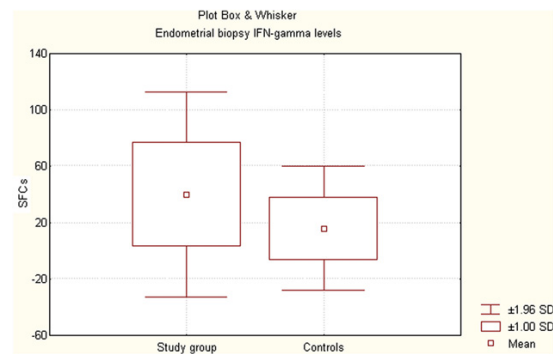
Number of spot-forming colonies (SFCs) on blood serum. The difference between the groups was statistically significant ($P < .05$). IFN = interferon.



Mollo. High levels of IFN- γ in endometrial polyposis. Fertil Steril 2011.

FIGURE 2

Number of spot-forming colonies (SFCs) on endometrial biopsy. The difference between the groups was statistically significant ($P < .05$). IFN = interferon.



Mollo. High levels of IFN- γ in endometrial polyposis. *Fertil Steril* 2011.

endometrial polyps compared with a nonhomogeneous group of patients without polyps (18). To the best of our knowledge, the present study is the first to compare IFN- γ levels both in periphery and in endometrial tissue between two homogeneous groups of infertile patients differing only in the presence or absence of endometrial polyps. These findings shed light on the pathogenesis of endometrial polyps and the relationship between polyps and infertility, which is still a matter of debate (19).

The results of this study suggest that cytokines, particularly IFN- γ , may play a critical role in this process. In 1993, Wegmann hypothesized that T_H2 cytokines inhibit the T_H1 response, which consequently improves fetal survival, based on the observation that T_H1 cytokines compromise pregnancy and T_H2 cytokines are produced at the maternal-fetal interface (10). Subsequently other authors highlighted the key role that immune system cells and cytokines play in implantation failure (20, 21) and recurrent miscarriage (22, 23). A recent in vitro study underscores the role of IFN- γ in the modulation of metalloproteinase activity, indicating that it is deleterious for mouse embryo outgrowth (24). Our results support the idea that a possible mechanism for infertility

among women with endometrial polyps could reside in the alterations of cytokine patterns with a T_H1 response and a preferential increase in INF- γ concentration.

Growing evidence correlates chronic inflammation with an increased risk of cancer. Approximately 20% of human cancers are estimated to develop from chronic inflammation (25). For example, it is widely accepted that colorectal cancer is the consequence of long-standing inflammatory bowel disease. It has also been demonstrated that in SOCS1-deficient mice possessing higher levels of IFN- γ , a spontaneous development of IFN- γ -dependent colorectal carcinoma is observed (26).

In the present cases as well, an altered pattern of cytokines in a proinflammatory direction could therefore be the cause of endometrial proliferation, which could in turn determine the origin of polyps of a real inflammatory nature. It must be emphasized that the association between endometrial micropolyposis (polyps <1 mm) and chronic endometritis (CE) has already been reported (27). A strict correlation between the two pathologies through liquid diagnostic hysteroscopy was found, leading to the hypothesis that the micropolyposis could be an endometrial reply to inflammatory stimulations. In a large study encompassing more than 25,000 hysteroscopies, it was demonstrated that CE might be associated with 40%–50% of cases with hyperplastic abnormalities of the endometrium (specifically micropolyps and polyps). The etiopathogenesis of hyperplastic lesions of the endometrium in cases of CE is unknown. These observations led us to hypothesize that at least a portion of endometrial polyps is not, as traditionally believed, a dysfunction or hormonally determined, but of inflammatory origin and that the sensitivity to infectious agents and the effects of chronic inflammation may be influenced by individual variabilities.

In conclusion, the incidence of an inflammatory factor in association with a proliferative pathology opens new perspectives in understanding the etiology of endometrial polyposis and its relationship with infertility. The present data have demonstrated that infertile patients affected by endometrial polyps present molecular alterations, represented by a statistically significant increase in the concentration of INF- γ , both in the endometrium and in peripheral blood, compared with a homogeneous group of infertile patients without endometrial pathology. Increased levels of INF- γ may be the result of chronic inflammation of the endometrium, which is chronic endometritis, and could represent the mechanism underlying the growth of polyps and of impaired endometrial receptivity and reproductive failure.

REFERENCES

1. Valle RF. Hysteroscopy in the evaluation of female infertility. *Am J Obstet Gynecol* 1980;15(137):425–31.
2. de Sa Rosa e de Silva AC, Rosa e Silva JC, dos Reis FJ, Nogueira AA, Ferriani RA. Routine office hysteroscopy in the investigation of infertile couples before assisted reproduction. *J Reprod Med* 2005;50:501–6.
3. Yanaihara A, Yorimitsu T, Motoyama H, Iwasaki S, Kawamura T. Location of endometrial polyp and pregnancy rate in infertility patients. *Fertil Steril* 2008;90:180–2.
4. de Placido G, Clarizia R, Cadente C, Castaldo G, Romano C, Mollo A, et al. Compliance and diagnostic efficacy of mini-hysteroscopy versus traditional hysteroscopy in infertility investigation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2007;135:83–7.
5. Cakmak H, Taylor HS. Implantation failure: molecular mechanisms and clinical treatment. *Hum Reprod Update* 2011;17:242–53.
6. Stamatellos I, Apostolides A, Stamatopoulos P, Bontis J. Pregnancy rates after hysteroscopic polypectomy depending on the size or number of the polyps. *Arch Gynecol Obstet* 2008;277:395–9.
7. Pérez-Medina T, Bajo-Arenas J, Salazar F, Redondo T, Sanfrutos L, Alvarez P, et al. Endometrial polyps and their implication in the pregnancy rates of patients undergoing intrauterine insemination: a prospective, randomized study. *Hum Reprod* 2005;20:1632–5.
8. Makrigiannakis A, Minas V. Mechanisms of implantation. *Reprod Biomed Online* 2007;14:102–9.
9. Ng SC, Gilman-Sachs A, Thaker P, Beaman KD, Beer AE, Kwak-Kim J. Expression of intracellular T_H1 and T_H2 cytokines in women with recurrent spontaneous abortion, implantation failures after IVF/ET or normal pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 2002;48:77–86.
10. Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a T_H2 phenomenon? *Immunol Today* 1993;14:353–6.
11. Lin H, Mosmann TR, Guilbert L, Tuntipopipat S, Wegmann TG. Synthesis of T helper 2-type cytokines at the maternal-fetal interface. *J Immunol* 1993;151:4562–73.
12. Lim KJ, Odukoya OA, Ajjan RA, Li TC, Weetman AP, Cooke ID. Profile of cytokine mRNA expression in peri-implantation human endometrium. *Mol Hum Reprod* 1998;4:77–81.
13. Winger EE, Reed JL, Ashoush S, El-Toukhy T, Ahuja S, Taranissi M. Degree of TNF- α /IL-10 cytokine elevation correlates with IVF success rates in women undergoing treatment with adalimumab (Humira) and IVIG. *Am J Reprod Immunol* 2011;65:610–8.

14. Perrella A, Sbreglia C, Atripaldi L, Esposito C, D'Antonio A, Perrella O. Rapid virological response in peripheral blood mononuclear cells with an increase of hepatitis C virus-specific interferon-gamma production predisposes to sustained virological response in patients with chronic hepatitis C genotype 1 undergoing treatment with pegylated-interferon alpha 2a plus ribavirin. *Scand J Gastroenterol* 2010;45:250–5.
15. Perrella A, Grattacaso S, d'Antonio A, Atripaldi L, Sbreglia C, Gnarin M, et al. Evidence of hepatitis C virus-specific interferon gamma-positive T cells in health care workers in an infectious disease department. *Am J Infect Control* 2009;37:426–9.
16. Cuomo O, Sbreglia C, Militerno G, Atripaldi L, Darretta G, Perrella A, et al. T-Lymphocyte kinetics in acute rejection after orthotopic liver transplantation. *Transplant Proc* 2001;33:3303–4.
17. Polisseni F, Bambirra EA, Camargos AF. Detection of chronic endometritis by diagnostic hysteroscopy in asymptomatic infertile patients. *Gynecol Obstet Invest* 2003;55:205–10.
18. Inagaki N, Ung L, Otani T, Wilkinson D, Lopata A. Uterine cavity matrix metalloproteinases and cytokines in patients with leiomyoma, adenomyosis or endometrial polyp. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2003;111:197–203.
19. Afifi K, Anand S, Nallapeta S, Gelbaya TA. Management of endometrial polyps in subfertile women: a systematic review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2010;151:117–21.
20. Lucena E, Cubillos J. Immune abnormalities in endometriosis compromising fertility in IVF-ET patients. *J Reprod Med* 1999;44:458–64.
21. Kalu E, Bhaskaran S, Thum MY, Vishwanatha R, Croucher C, Sherriff E, et al. Serial estimation of Th1:th2 cytokines profile in women undergoing in vitro fertilization-embryo transfer. *Am J Reprod Immunol* 2008;59:206–11.
22. Daher S, de Arruda Geraldes Denardi K, Blotta MH, Mamoni RL, Reck AP, Camano L, et al. Cytokines in recurrent pregnancy loss. *J Reprod Immunol* 2004;62:151–7.
23. Kheshtchin N, Gharagozloo M, Andalib A, Ghahiri A, Maracy MR, Rezaei A. The expression of T_H1- and T_H2-related chemokine receptors in women with recurrent miscarriage: the impact of lymphocyte immunotherapy. *Am J Reprod Immunol* 2010;64:104–12.
24. Fontana VA, Sanchez M, Cebal E, Calvo JC. Interferon-gamma inhibits metalloproteinase activity and cytotrophoblast cell migration. *Am J Reprod Immunol* 2010;64:20–6.
25. Terzić J, Grivennikov S, Karin E, Karin M. Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology* 2010;138:2101–14.
26. Hanada T, Kobayashi T, Chinen T, Saeki K, Takaki H, Koga K, et al. IFN γ -dependent, spontaneous development of colorectal carcinomas in SOCS1-deficient mice. *J Exp Med* 2006;203:1391–7.
27. Cicinelli E, Resta L, Nicoletti R, Zappimulso V, Tartagni M, Saliani N. Endometrial micropolyps at fluid hysteroscopy suggest the existence of chronic endometritis. *Hum Reprod* 2005;20:1386–9.

CONCLUSIONI

I PROGETTO DI RICERCA

I dati riportati nel seguente studio, suggeriscono come in un determinato sottogruppo di pazienti giovani, normogonadotrope, la presenza della variante allelica dell'FSHR Ser680 possa tradursi in una significativa diminuzione della risposta ovarica al rFSH, durante cicli di PMA e, quindi, riflettersi in un sensibile incremento del consumo di farmaco. Più specificamente, i risultati emersi nel corso della sperimentazione hanno evidenziato come, tra le pazienti che richiedono una dose cumulativa più elevata di rFSH, il genotipo Ser/Ser presenti un'incidenza significativamente più elevata rispetto ai sottogruppi contrassegnati dalle varianti Asn/Ser o Asn/Asn. In questo contesto, va sottolineato che la necessità di impiego di dosi di rFSH più elevate rispetto a quelle attese, si è tradotta in una crescita follicolare ed una produzione di E₂ che, per quanto "soddisfacenti", sono risultate significativamente inferiori rispetto a quelle osservate nelle pazienti con normale profilo di risposta alle dosi standard. Nonostante l'esigua dimensione campionaria, va evidenziato come la frequenza del polimorfismo della popolazione di studio "in toto" sia risultata differente rispetto a quella descritta da Perez-Mayorga *et al.*, nel 2000, nell'ambito della popolazione generale. Gli autori riportavano, infatti, una prevalenza Ser/Ser pari al 26%, dell'eterozigosi Asn/Ser uguale al 45% e dell'omozigosi Asn/Asn pari al 29% (fig. 5). Tale evidenza può essere spiegata alla luce di due differenti osservazioni: in primo luogo, la diversa frequenza potrebbe trovare giustificazione in un particolare *pattern* di distribuzione delle

varianti nella Regione Campania; tale ipotesi non è attualmente verificabile in relazione all'assenza, in letteratura, di dati epidemiologici relativi alla distribuzione del polimorfismo medesimo nei diversi ambiti territoriali italiani. La seconda ipotesi è legata alle caratteristiche specifiche della nostra popolazione di studio; più specificamente, il nostro campione non è "casuale", bensì selezionato nell'ambito di un serbatoio di coppie affette da problematiche riproduttive. Tale considerazione assume maggiore rilevanza se consideriamo, inoltre, le peculiari caratteristiche della popolazione di studio: in 17 su 42 pazienti, infatti, era stata osservata una spiccata "resistenza" ai protocolli di stimolazione ovarica, laddove ben 10 di tali soggetti avevano presentato la variante Ser680 in omozigosi. In altre parole, l'elevata frequenza del polimorfismo in oggetto, riscontrata in uno dei due sottogruppi, potrebbe avere impattato in misura rilevante sulla distribuzione delle frequenze alleliche della intera popolazione di studio e, quindi, giustificare la discrepanza osservata tra quest'ultima e la popolazione generale.

I risultati del presente studio, indipendentemente dalla problematica delle varianti alleliche relative all'FSHR, rappresentano un'ulteriore evidenza a favore del concetto di *hypo-response*, ovvero dell'esistenza di un sottogruppo di pazienti (*hypo-responders*), in cui il recupero di un numero di ovociti ≥ 5 , avviene a spese di un incremento della dose cumulativa di rFSH somministrata. Tutte le pazienti selezionate nello studio, infatti, avevano mostrato un *outcome* caratterizzato dal recupero di almeno 5 ovociti e da livelli di E₂ al picco >500 pg/ml. Di conseguenza, almeno sulla base dei criteri classici, erano classificabili come "*normal responders*". Tuttavia, una volta praticata la stratificazione nei due gruppi sulla base della dose cumulativa di rFSH, è emersa una chiara differenza tra i

gruppi, nei principali parametri di esito. Più specificamente, il numero medio di ovociti recuperati ed i livelli sierici di E₂ al picco, sono risultati statisticamente più elevati nel gruppo che aveva ricevuto la dose cumulativa di gonadotropina più bassa. Questa osservazione ci pone, per l'appunto, di fronte alla necessità di riconoscere l'esistenza di una categoria prognostica "intermedia" che, pur non presentando i caratteri tipici della risposta "poor" (recupero di meno di 4 ovociti e/o livelli di E₂ al picco <500 pg/ml), è contrassegnata da una notevole resistenza ovarica ai farmaci e da una prognosi meno favorevole rispetto alle classiche "normali risponditrici".

L'osservazione, nella nostra popolazione di studio, di un'associazione tra variante Ser80 e resistenza ovarica alle gonadotropine esogene è in accordo con i risultati di altri studi clinici pubblicati. In particolare, Perez-Mayorga *et al.* (2000) avevano chiaramente mostrato come pazienti portatrici di genotipo Ser680 in omozigosi avessero ricevuto una dose cumulativa di gonadotropine per PMA significativamente più elevata rispetto a quella somministrata alla popolazione Asn/Ser – Asn/Asn, valutata "in toto". La principale differenza tra la nostra sperimentazione ed il sopra menzionato studio riguarda l'analisi della frequenza dei genotipi FSHR nelle differenti categorie di risposta ovarica. Più specificamente, gli autori dello studio precedente adottavano i classici criteri di classificazione, identificando *poor* e *normal responders* sulla sola base del numero di follicoli/ovociti. Gli autori evidenziavano, in tal modo, un aumento della frequenza del tasso di *poor response* tra le pazienti portatrici dell'omozigosi Ser/Ser. Il dato emerso nella nostra sperimentazione è da considerarsi integrativo rispetto alle osservazioni di Perez-Mayorga *et al.* Più specificamente, la classica *poor response*

è stata, in relazione ai criteri di arruolamento, esclusa dalla nostra popolazione di studio. Al contrario, è stata effettuata una stratificazione in categorie prognostiche sulla base del consumo di gonadotropine: questa strategia ci ha consentito di mettere maggiormente in evidenza l'impatto dei differenti genotipi sul potenziale di risposta ovarica al rFSH. Il dato più rilevante è stato, infatti, rappresentato dalla differenza statisticamente significativa, relativa alla frequenza del Ser/Ser, tra gruppo A e gruppo B (58,8% *versus* 20,0%).

La scelta di utilizzare una dose cumulativa di rFSH pari a 2500 UI come *cut-off* per definire i due profili di risposta nasce da osservazioni che derivano dalla pratica clinica. È noto, infatti, come in oltre l'85% delle pazienti giovani, normogonadotrope e con BMI <27 kg/m² una risposta ovarica adeguata sia ottenuta con dosi cumulative di FSH che non superano le 2000-2225 UI.

Un ulteriore aspetto da sottolineare è quello relativo all'impatto che la variante Ser680 in omozigosi sembrerebbe avere sui livelli sierici di E₂. Infatti, le pazienti con tale genotipo, mostrano livelli di E₂ inferiori, in corso di stimolazione, rispetto a quelle con genotipo Asn/Asn. Qualora confermata, questa osservazione potrebbe essere rapportata al rischio di sindrome da iperstimolazione ovarica (OHSS).

In studi precedentemente pubblicati dal nostro gruppo (De Placido *et al.*, 2004; 2005) era chiaramente emerso come pazienti *hypo-responders* traessero chiaramente beneficio da una supplementazione, in corso di stimolazione, con attività LH esogena. In questo contesto aveva suscitato una certa curiosità il fatto che tali pazienti presentassero livelli endogeni di LH nella norma. Questa osservazione aveva condotto all'ipotesi che la *hypo-response* all'rFSH potesse essere legata alla presenza di un LH endogeno meno attivo sotto il profilo

biologico. In altre parole, era stata ipotizzata la presenza di una variante allelica comunque “funzionale” nell’ambito di cicli spontanei, ma relativamente meno efficiente nel supportare l’attività FSH esogena nell’ambito di una crescita follicolare multipla. L’ipotesi di uno scenario siffatto aveva condotto ad indagare la frequenza di una variante allelica dell’LH, nota come V-beta-LH, molto comune nella popolazione (13-40%) e contrassegnata, per l’appunto, da una minore bioattività “in vivo” (Pettersson *et al.*, 1994). In un recente studio condotto presso il nostro Dipartimento (Alviggi *et al.*, *in press*) è stato dimostrato un incremento statisticamente significativo della suddetta variante in pazienti con storia di *hypo-response* rispetto ad una popolazione di normali risponditrici al rFSH. Tuttavia, dallo studio emergeva chiaramente come la presenza della V-beta-LH giustificasse circa il 30% dei casi di *hypo-response*. Dalla presente sperimentazione, sembrerebbe che in circa il 58% delle *hypo-responders* sia dimostrabile la presenza di un FSHR con genotipo Ser680 in omozigosi. Sebbene entrambi gli studi siano contrassegnati da dimensioni campionarie esigue, sembra emergere l’idea di una forte associazione tra i due polimorfismi oggetto di studio ed il rischio di resistenza ovarica all’FSH esogeno.

II PROGETTO DI RICERCA

Questo è il primo studio che indaga la frequenza di v-βLH in una popolazione di donne danesi sottoposte a PMA. La presenza di V-βLH è stata riscontrata nel 10,9% delle pazienti, mentre la frequenza allelica è risultata pari al 12,2%, ossia sovrapponibile a quella riportata per altre popolazioni europee (Nilsson *et al.*, 1997).

Lo studio ha confermato i dati riportati in un precedente articolo (Alviggi *et al.*, 2009), dimostrando che il polimorfismo $v\text{-}\beta\text{LH}$ è associato ad un maggior consumo di r-hFSH durante SOC. Più specificamente, è stata trovata una relazione tra la dose cumulativa di r-hFSH e il genotipo LH. È interessante notare come sia emerso un vero e proprio gradiente nel consumo di r-hFSH, caratterizzato dalle dosi cumulative più basse nel gruppo di pazienti portatrici del genotipo wt/wt, e più alte nelle portatrici omozigoti di $v\text{-}\beta\text{LH}$ (Figura IX). Inoltre, una dose cumulativa di r-hFSH di 1862,5 UI è stata identificata come il più predittivo *cut-off* per la presenza della variante di LH. Nel loro insieme, questi dati sollevano una questione riguardo alla possibilità di valutare la presenza di $v\text{-}\beta\text{LH}$ in tutte le pazienti candidate a PMA. Più specificamente, andrebbe considerata la possibilità di effettuare la caratterizzazione del genotipo LH prima della stimolazione ovarica, o dopo il conseguimento dei risultati del primo ciclo di stimolazione. Seguendo questa linea, si potrebbe ipotizzare di effettuare l'analisi alle soglie di un secondo ciclo di PMA nelle pazienti a buona prognosi che, nonostante una dose iniziale di 150 UI r-hFSH, abbiano necessitato, in un primo trattamento, di una dose cumulativa superiore a 2000 UI. In caso di omo- o etero-zigosi per $v\text{-}\beta\text{LH}$, la raccomandazione sarebbe stata quella di aggiungere LH esogeno piuttosto che aumentare la dose di FSH durante il ciclo successivo (De Placido *et al.*, 2005).

Gli ormoni *wild-type* e $v\text{-}\beta\text{LH}$ sono funzionalmente differenti. Più specificamente, $v\text{-}\beta\text{LH}$ sembra avere una più breve emivita, ma con un'azione più potente a livello recettoriale rispetto al *wild-type* (Haavisto *et al.*, 1995, Huhtaniemi *et al.*, 1999). Pertanto, si prevede che l'espressione fenotipica delle

varianti alleliche possa essere diversa. Si potrebbe ipotizzare che gli individui eterozigoti abbiano cambiamenti fenotipici più evidenti dovuti alle azioni combinate dei due tipi di ormoni diversamente funzionanti. A causa della rarità della variante LH in omozigosi, non è possibile delineare in modo chiaro il profilo fenotipico delle pazienti con tale caratteristica. Diversi autori alludono ad una maggiore attività della variante LH a causa degli elevati livelli sierici di E₂, Testosterone e *Sex Hormone binding-globuline* (SHBG) riscontrati nelle portatrici rispetto alle donne con genotipo *wild-type* in omozigosi (Rajkhowa *et al.*, 1995). D'altra parte, vi è evidenza che v-βLH protegge donne obese dallo sviluppo di sintomi da sindrome dell'ovaio policistico, suggerendo che il wt-LH giochi un ruolo nel favorire le caratteristiche ovariche patologiche della sindrome (Tapanainen *et al.*, 1999). Inoltre, studi osservazionali suggeriscono che v-βLH è correlato ad una ridotta funzione gonadica e a subfertilità (Takahashi *et al.*, 1998). Infine, le differenze nella cinetica della circolazione tra i due tipi di LH può spiegare le diversità nella funzione di LH tra pazienti con disturbi ovulatori e donne con normali cicli ovulatori (Takahashi *et al.*, 2004). Il presente studio sembra confermare che le portatrici di v-βLH abbiano bisogno di una dose di FSH più alta durante SOC, sostenendo l'idea che questo polimorfismo rappresenti una forma biologicamente meno attiva di LH, incapace di supportare adeguatamente l'attività di FSH durante la stimolazione ovarica. In questa serie di pazienti non sono state trovate alcune differenze in termini di fertilizzazione e tassi di gravidanza. Ciò indica che l'aumento della dose di r-hFSH durante SOC può contrastare l'inferiore attività di v-βLH. Tuttavia, le donne con v-βLH hanno mostrato una riduzione statisticamente significativa nel

numero medio di embrioni trasferiti. Questa evidenza dovrebbe essere valutata in un gruppo di studio più ampio per verificare se l'uso di dosi più elevate di r-hFSH sia in grado di superare totalmente l'impatto della variante LH sull'esito della IVF. D'altra parte, si potrebbe sostenere che la supplementazione con LH esogeno in portatori v-βLH sia in grado di supportare la risposta ovarica all' FSH. Questa ipotesi è coerente con studi che dimostrano come giovani donne normogonadotrope che presentano ipo-risposta all'r-hFSH traggono benefici dalla supplementazione con r-hLH (De Placido *et al.*, 2004; Ferraretti *et al.*, 2004; De Placido *et al.*, 2005).

È interessante notare che i livelli sierici di Androstenedione al giorno dell'hCG, erano significativamente più elevati nei pazienti con v-βLH. Questa osservazione potrebbe essere legata alla esigua dimensione campionaria del gruppo di portatrici della variante; tuttavia, non è possibile escludere che il fenomeno potesse essere determinato dall'impiego di dosi elevate di r-hFSH che si è osservato nel gruppo medesimo.

E' noto, infatti, come l'FSH, a livello della granulosa, sia in grado di incrementare la produzione di androgeni.

In conclusione, i risultati attuali forniscono, per la prima volta, informazioni sulla frequenza di v-βLH in una popolazione danese di donne sottoposte a PMA e confermano che le portatrici del polimorfismo richiedano dosi più alte di FSH durante SOC. Questa evidenza supporta l'idea che v-βLH rappresenti una variante meno bioattiva di LH. Questi dati, infine, rappresentano un ulteriore elemento a favore dell'idea di una personalizzazione dei trattamenti nell'ambito del percorso PMA, tramite un approccio farmacogenomico alla SOC.

III PROGETTO DI RICERCA

Nel presente lavoro sperimentale sono stati analizzati i livelli di INF- γ in pazienti sterili affette da poliposi endometriale, al fine di indagare più approfonditamente le basi molecolari della patologia stessa ed i possibili meccanismi intercorrenti tra essa e la condizione di sterilità. I valori di questa citochina sono poi stati confrontati con i valori ottenuti in un comparabile gruppo di pazienti sterili senza patologia endometriale.

I risultati ottenuti hanno evidenziato come pazienti sterili affette da poliposi endometriale presentino un'alterazione del profilo molecolare, rappresentato da un aumento statisticamente significativo della concentrazione di INF- γ sia a livello endometriale sia a livello del sangue periferico, non evidenziabile in un comparabile gruppo di pazienti sterili in assenza di patologia endometriale.

Questi dati indicano come, all'interno di una patologia proliferativa di natura neoplastica, si possa rilevare una componente infiammatoria, rappresentata, in questo caso, da un'alterazione del profilo molecolare. A questo riguardo va sottolineato che sarebbe stato interessante estendere la valutazione a tutto il sistema delle citochine, in modo da ottenere una visione più completa delle alterazioni molecolari associate alla presenza di polipi endometriali.

Numerosi studi hanno evidenziato una stretta relazione tra polipi endometriali e sterilità, e la poliposi endometriale è stata da alcuni autori indicata come una delle principali cause di sterilità nell'ambito delle patologie malformative e/o proliferative dell'utero (Silberstein *et al.* 2006;). In particolare, Taylor *et al.* in

una interessante *review* riguardante le patologie uterine connesse con l'infertilità hanno riportato una incidenza di polipi uterini identificati tramite isteroscopia in donne con infertilità non altrimenti spiegata variabile dal 15% al 26.5%. Tuttavia, nonostante la stretta associazione tra le due patologie, i meccanismi alla base di questo legame restavano sempre un'incognita.

Con il presente studio abbiamo gettato le basi per una nuova interpretazione dell'associazione tra poliposi endometriale e sterilità. Prima di questa analisi infatti la relazione intercorrente tra la presenza di polipi a livello endometriale ed assenza di gravidanze era stata spiegata tramite la semplice interferenza meccanica con il processo dell'impianto. Il nostro studio, invece, sulla scorta di una vasta letteratura scientifica, sottolinea il ruolo fondamentale delle citochine a livello endometriale come principale fattore coinvolto nell'impianto, ipotizzando come possibile meccanismo alla base della sterilità non più la semplice interferenza meccanica ma la presenza di alterazioni del pattern citochinico ovvero un aumento preferenziale dell'INF- γ .

Già nel 1994 Wegmann, sulla base dell'osservazione che le citochine Th-1 compromettono la gravidanza e che le citochine Th-2 sono prodotte all'interfaccia materno fetale, ipotizzò che le citochine Th-2, inibendo la risposta Th-1, migliorassero la sopravvivenza fetale. Successivamente altri autori hanno sottolineato il ruolo chiave che le cellule del sistema immunitario e le citochine giocano nei fallimenti d'impianto (Lucena *et al.* nel 1999) e nell'ambito dell'abortività ricorrente (Johnson *et a.*, 1999). Più specificamente, Lim *et al.* nel 2001 hanno evidenziato che elevati livelli di alcune citochine Th-1 quali INF γ , interleuchina-2, interleuchina-12 ed il fattore di necrosi tumorale- β si associano

con aborti ricorrenti, mentre elevati livelli di citochine Th-2 quali interleuchina-4-6 10-13 sono più frequentemente correlati ad un normale outcome riproduttivo.

Naturalmente ben altra questione è trovare un nesso di causalità tra la presenza di INF-gamma aumentato e la patologia in questione.

I nostri risultati danno origine a due ipotesi:

1. La presenza di un polipo endometriale, sia esso di natura neoplastica o ormonoresponsiva, potrebbe creare una condizione di infiammazione cronica interferendo con la normale morfologia uterina e determinando tramite irritazione meccanica un alterato rilascio di citochine in senso Th-1. Questa alterazione potrebbe impedire il normale shift Th-1\Th-2 e di conseguenza pregiudicare il meccanismo di adattamento immunologico alla base delle prime fasi dell'impianto embrionale.

2. La seconda ipotesi, più affascinante dal punto di vista speculativo, individua nella presenza di un'infiammazione cronica il primum movens della poliposi endometriale. Un alterato pattern di citochine in senso pro-infiammatorio sarebbe quindi alla base di una proliferazione endometriale, che determinerebbe l'origine di neoformazioni polipoidi di vera e propria natura infiammatoria, andando ad individuare così una nuova categoria di patologia uterina al di là di quelle di natura neoplastica o ormonale. A tal proposito, va sottolineato che è stata già dimostrata l'associazione tra micro poliposi endometriale (polipi < 1mm) ed endometrite cronica (Cicinelli *et al.* 2005). Infatti, gli Autori hanno trovato una stretta correlazione tra le due patologie alla isteroscopia diagnostica a liquido, ipotizzando che la micro poliposi sia una risposta dell'endometrio agli stimoli flogistici. Si potrebbe ipotizzare che su queste basi, alcuni di questi micro polipi

– all'interno dei quali è quasi sempre presente un asse vascolare - possano nel tempo assumere dimensioni maggiori sviluppandosi in un secondo tempo in senso iperplastico od ormonoresponsivo.

In conclusione, dai risultati ottenuti emerge una correlazione statisticamente significativa tra patologia poliposica e INF- γ , e, sebbene non sia ancora chiara la natura di questa associazione - ovvero se sia l'INF- γ a determinare la patologia poliposica o viceversa se sia quest'ultima a determinare un aumento locale e sistemico dell'INF- γ - certamente il rilievo di una componente infiammatoria in associazione ad una patologia ad impronta proliferativa apre nuove prospettive nella diagnosi e nella prognosi della sterilità in pazienti affette da poliposi endometriale

CONCLUSIONI FINALI

I risultati ottenuti nell'ambito dei progetti, descritti nella presente tesi, associati a una ampia revisione della letteratura ci hanno offerto la possibilità di evidenziare l'esistenza di alcuni sottogruppi di pazienti in cui, indipendentemente dalla causa di sterilità diagnosticata e dalle indicazioni alla tecnica di PMA, sussistono condizioni subcliniche in grado di condizionare l'esito delle tecniche medesime. Tali condizioni possono riguardare il potenziale di risposta ovarica alle gonadotropine esogene e/o la recettività endometriale. L'aspetto di maggior rilievo è rappresentato dal fatto che tali condizioni non si riflettono in manifestazioni cliniche conclamate, né tantomeno sono messe in evidenza facilmente nell'ambito del "work up" diagnostico-terapeutico della coppia infertile. Tuttavia, qualora i dati emersi nella nostra esperienza di ricerca dovessero trovare conferma in casistiche più ampie, potremmo confrontarci con la necessità di inserire, nell'iter medesimo, test ed indagini strumentali atte a una loro identificazione precoce.

Più nello specifico, la nostra ricerca ha evidenziato come un sottogruppo di pazienti, pur avendo una normale riserva ovarica, presenti un'iposensibilità alla somministrazione di gonadotropine esogene. Sebbene non sia possibile dedurre quanto tale caratteristica abbia concorso al determinismo della sterilità nelle singole coppie o abbia inciso sulla indicazione alla tecnica, resta indiscutibile che essa abbia condizionato la risposta alla stimolazione ovarica e, di riflesso, l'esito della tecnica di PMA.

In questo percorso di ricerca, per la prima volta si è cercato di affrontare in modo sistematico la problematica relativa alla patogenesi di tale fenomeno.

I risultati che si sono ottenuti supportano l'ipotesi che l'*hypo-response* ovarica possa trovare basi patogenetiche di ordine genetico, con particolare riferimento all'associazione della condizione medesima con le due variabili alleliche prese in esame. Più specificamente, la presenza della v-LH e/o della variante alelica Ser 680 dell'FSH-R sembra giustificare circa il 58% delle "hypo-responses".

In ogni caso, i due geni (LH e FSHR) si collocano in prima linea nell'ambito dei geni "candidati", ossia delle variabili genetiche da sottoporre, in ulteriori studi opportunamente disegnati, ad analisi di associazione con il fenotipo *hypo-response*. Qualora le nostre osservazioni dovessero trovare conferma, si verrebbero a configurare i presupposti per un approccio di tipo "farmacogenomico" alla stimolazione ovarica: l'identificazione "a priori" di polimorfismi a rischio potrebbe riflettersi in un maggiore adeguamento della scelta terapeutica alle esigenze specifiche delle pazienti: l'impiego di una supplementazione con LH esogeno e/o di dosi di attacco di FSH più elevate rispetto a quelle calcolate sulla base di parametri demografici, antropometrici ed ormonali, si potrebbe riflettere in un'ottimizzazione dei tempi di stimolazione, dei dosaggi di gonadotropine e dei risultati finali, con evidenti effetti positivi in termini di rapporto costi/benefici.

Sulla scorta di tali valutazioni è apparsa evidente la presenza di un 40% circa di pazienti *hypo-responders* con patogenesi idiopatica, anche se non è possibile escludere, allo stato, la presenza di altre variabili alleliche.

In una seconda linea di ricerca abbiamo inoltre voluto valutare l'ipotesi di una correlazione tra la patologia proliferativa-infiammatoria uterina e ridotte possibilità di impianto embrionario. Anche in questo caso, sebbene sul versante

endometriale, siamo di fronte ad una condizione che non presenta manifestazioni cliniche, che può, quindi, essere evidenziata solo con tecniche strumentali “ad hoc” e di cui non conosciamo il reale contributo nel determinismo della sterilità nelle singole coppie. Analogamente a quanto affermato per la controparte ovarica, la conferma dei nostri dati creerebbe i presupposti per consolidare l’impiego dell’isteroscopia diagnostica nel “work up” della sterilità e per il trattamento delle poliposi pre-PMA al fine di ottimizzare le probabilità di successo. In conclusione l’incidenza di un fattore infiammatorio in associazione a una patologia proliferativa apre nuove prospettive nella comprensione dell’eziologia della poliposi endometriale e della sua relazione con l’infertilità femminile.

I nostri dati hanno dimostrato che le pazienti infertili affette da poliposi endometriale presentano alterazioni molecolari rappresentate da un incremento statisticamente significativo dei livelli di INF-gamma nel tessuto endometriale e nel sangue periferico delle pazienti prese in esame. I livelli aumentati di INF-gamma potrebbero essere il risultato di uno stato infiammatorio cronico endometriale che potrebbe infine compromettere lo stato riproduttivo delle pazienti. Da una visione d’insieme delle linee di ricerca sviluppate emerge la necessità di indagare sulla presenza di eventuali comorbilità e/o cofattori che possano avere un impatto sulla condizione di sterilità e sull’esito della PMA in una cornice aderente alle necessità imposta dalla farmacogenomica e dell’analisi del rischio-beneficio.

BIBLIOGRAFIA

CHAPPEL SC AND HOWLES C (1991). Reevaluation of the roles of luteinizing hormone and follicle stimulating hormone in the ovulatory process. *Hum Reprod*; 6: 1206-1212.

DE CASTRO F, RUIZ R, MONITORO R, PEREZ-HERNANDEZ D, SANCHEZ-CASAS PADILLA E, REAL LM, RUIZ A (2003). Role of follicle-stimulating hormone receptor Ser680Asn polymorphism in the efficacy of follicle-stimulating hormone. *Fertile steril*; 80: 571-576.

GREB R, GRIESHABER K, GROMOLL J, SONNTAG B, NIESCHLAG E, KIESEL L, SIMONI M (2005). A common single nucleotide polymorphism in exon 10 of the human follicle stimulating hormone receptor is a major determinant of length and hormonal dynamic of the menstrual cycle. *JCEM*; 90: 4866-4872.

PEREZ-MAYORGA M, GROMOLL G, BEHRE HM, GASSNER C, NIESCHLAG E, SIMONI M (2000). Ovarian response to follicle-stimulating hormone (FSH) stimulation depends on the FSH receptor genotype. *JCEM*; 85: 3365-3369.

POLAN LP (1986). Ovulation induction with human menopausal gonadotropin compared to urinary follicle-stimulating hormone result in a significant shift in follicular fluid androgen levels without discernible in granulosa-luteal cell function. *J Clin Endocrinol Metab*; 63: 1284-1291.

SCHOOT DC, COELINGH BENNINK HJ, MANNAERTS BM, LAMBERTS SW, BOUCHARD P, FAUSER BC (1992). 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 Endocrin*

ALVIGGI C, CLARIZIA R, MOLLO A, RANIERI A, DE PLACIDO G (2006). Who needs LH in ovarian stimulation?. **Reprod Biomed Online**; 12: 599-607.

ALVIGGI C, CLARIZIA R, PETTERSSON K, DE PLACIDO G (2009). Suboptimal response to GnRH-a long protocol is associated with a common LH polymorphism. **Reprod Biomed Online**; 18: 9-14.

DE PLACIDO G, MOLLO A, ALVIGGI C ET AL. (2001). Rescue of in vitro fertilisation cycles by human menopausal gonadotropin in pituitary down-regulated normogonadotrophic young women characterised by a poor initial response to recombinant follicle stimulating hormone. **Hum Reprod**; 16: 1875-1879.

DE PLACIDO G, ALVIGGI C, MOLLO A ET AL. (2004). Effects of recombinant LH (rLH) supplementation during controlled ovarian hyperstimulation (COH) in normogonadotrophic women with an initial inadequate response to recombinant FSH (rFSH) after pituitary down regulation. **Clin Endocrinol**; 60: 637-643.

DE PLACIDO G, ALVIGGI C, PERINO A ET AL., on behalf of the Italian Collaborative Group on Recombinant Human Luteinizing Hormone (2005). Recombinant human LH supplementation versus recombinant human FSH (r-hFSH) step-up protocol during controlled ovarian stimulation in normogonadotrophic women with initial inadequate ovarian response to r-hFSH.

A multicentre, prospective, randomized controlled trial. **Hum Reprod**; 20: 390-396.

DEVROEY P, FAUSER BCJM, DIEDRICK K ON BEHALF OF EVIAN ANNUAL REPRODUCTION WORKSHOP GROUP (2009). Approaches to improve the diagnosis and management of infertility. **Hum Reprod Update**; 15: 391-408.

FERRARETTI AP, GIANAROLI L, MAGLI MC ET AL. (2004) Exogenous luteinizing hormone in controlled ovarian hyperstimulation for assisted reproduction techniques. **Fertil Steril**; 82: 1521-1526.

FILICORI M, COGNIGNI GE, POCOGNOLI P, CIAMPAGLIA W, BERNARDI S (2003). Current concepts and novel applications of LH activity in ovarian stimulation. **Trends Endocrinol Metab**; 14: 267-273.

FURUI K, SAGAMURA N, TSUKAHARA S ET AL. (1994). Identification of two point mutations in the gene coding luteinizing hormone (LH) beta-subunit, associated with immunologically anomalous LH variants. **J Clin Endocrinol Metab**; 78: 107-113.

HAAVISTO AM, PETTERSSON K, BERGENDAHL M ET AL. (1995). Occurrence and biological properties of a common genetic variant of luteinizing hormone. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**; 80: 1257–1263.
HUHTANIEMI I, JIANG M, NILSSON C, PETTERSSON K (1999) Mutations and polymorphisms in gonadotropin genes. **Molecular and Cellular Endocrinology**; 151, 89–94.

HUMAIDAN P, BUNGUM M, BUNGUM L ET AL. (2002). Ovarian response and pregnancy outcome related to mid-follicular LH concentrations in women undergoing assisted reproduction with GnRH agonist down regulation and recombinant FSH stimulation. **Hum Reprod**; 17: 2016-2021.

LAMMINEN T, HUHTANIEMI I (2001). A common genetic variant of luteinizing hormone; relation to normal and aberrant pituitary-gonadal function. **Eur J Pharmacol**; 414: 1-7.

LIU S, OGATA T, MARUYAMA T ET AL. (2005). Association of common LH variant with hyperfunctional promoter in a Japanese infertile woman. **Endocr J**; 52: 781-784.

MOCHTAR MH, VAN DER VEEN F, ZIECH M, VANWELY M (2007). Recombinant luteinizing hormone (rLH) for controlled ovarian hyperstimulation in assisted reproductive cycles. **Cochrane Database Syst Rev**; 18: CD005070.

NILSSON C, PETTERSSON K, MILLAR RP, HUHTANIEMI IT ET AL. (1997). Worldwide Frequency Of A common genetic variant of luteinizing hormone: an international collaborative research. International Collaborative Research Group. **Fertil. Steril.**; 67:998-1004.

NILSSON C., JIANG M., PETTERSSON K., IITIA" A. ET AL. (1998) Determination of a common genetic variant of luteinizing hormone using DNA hybridization and immunoassays. **Clin Endocr**; 49: 369-376.

OKUDA K, TAKAMATSU J, OKAZAKI T ET AL. (1994). Hereditary abnormality of luteinizing hormone resulting in discrepant serum concentrations determined by different assays. **Endocrine Journal**; 41: 639-644.

PETTERSSON K, SÖDERHOLM JR ET AL. (1990). Ultrasensitive two-site immunometric assay of human lutropin by time-resolved fluorometry. **Clinical Chemistry**; 36: 1928–1933.

PETTERSSON K, SÖDERHOLM JR ET AL. (1991). Individual differences in lutropin immunoreactivity revealed by monoclonal antibodies. **Clinical Chemistry**; 37: 333–340.

PETTERSSON K, DING YQ, HUHTANIEMI I (1992). An immunologically anomalous luteinizing hormone variant in a healthy woman. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**; 74: 164–171.

RAJKHOWA M, TALBOT JA, JONES PW ET AL. (1995). Prevalence of an immunological LH beta-subunit variant in a UK population of healthy women and women with polycystic ovary syndrome. **Clinical Endocrinology**; 43: 297–303.

RAIVIO T., HUHTANIEMI I. ET AL. (1996). The role of luteinizing hormone beta gene polymorphism in the onset and progression of puberty in healthy boys. **J Clin Endocrinol Metab**; 81; 3278-3282.

SUGANUMA N, FURUI K, KIKKAWA F, TOMODA Y, FURUHASHI M (1996). Effects of the mutations Trp8TMArg and Ile15TMThr. in human luteinizing hormone LH.beta-subunit on LH bioactivity in vitro and in vivo. **Endocrinology**; 137: 831–838.

TAKAHASHI K. KURIOKA H, OZAKI T, KANASAKI H ET AL. (1998). Increased prevalence of luteinizing hormone beta-subunit variant in Japanese infertility patients. **Hum Reprod**; 13: 3338-3344.

TAPANAINEN JS, KOIVUNEN R, FAUSER BC, TAYLOR AE, CLAYTON,RN, PETTERSSON,KS, HUHTANIEMI IT (1999). A new contributing factor to polycystic ovary syndrome: the genetic variant of luteinizing hormone. **J Clin Endocrinol Metab**; 84: 1711-1715.

VAN DEN BELD A, HUHTANIEMI I, PETTERSSON K, POLS H, GROBBEE D, DE JONG F, LAMBERTS S (1999). Luteinizing hormone and different genetic variants, as indicators of frailty in healthy elderly men. **J Clin Endocrinol Metab**; 84: 1334-1339.

WEISS J, AXELROD L, WHITCOMB RW, HARRIS PE, CROWLEY WF, JAMESON JL (1992). Hypogonadism caused by a single amino acid substitution in the beta subunit of luteinizing hormone. **N Engl J Med**; 16; 326(3):179-83.

ANASTASIADIS PG, KOUTLAKI NG, SKAPHIDA PG, GALAZIOS GC, TSIKOURAS PN, LIBERIS VA. Endometrial polyps: prevalence, detection, and malignant potential in women with abnormal uterine bleeding. Eur J Gynaecol Oncol. 2000;21(2):180-3.

VALLE RF. Therapeutic hysteroscopy in infertility. Int J Fertil1984;29:143–8.

GOLDSTEIN SR, MONTEAGUDO A, POPIOLEK D, MAYBERRY P, TIMOR-TRITSCHI. Evaluation of endometrial polyps. Am J Obstet Gynecol. 2002 Apr;186(4):669-74.

TALI SILBERSTEIN MD1, OSHRA SAPHIER PHD3, BRADLEY J. VAN VOORHIS MD2 AND SHAYNE M. PLOSKER.MD1 Endometrial Polyps in Reproductive-Age Fertile and Infertile Women. Isr Med Assoc J. 2006 Mar;8(3):192-5.

KAMMERER U, VON WOLFF M, MARKERT UR. Immunology of human endometrium. *Immunobiology* 2004, 209: 569-74

Granulated lymphocytes in human endometrium: histochemical and immunohistochemical studies. *Hum Reprod* 1991; 6: 791-8

OZENCI CC, KORGUN ET, DEMIR R. Immunohistochemical detection of CD45+, CD56+, and CD14+ cells in human deciduas during early pregnancy. *Early Pregnancy* 2001; 5: 164-75

DOSIOU C, GIUDICE LC. Natural killer cells in pregnancy and recurrent pregnancy loss: endocrine and immunologic perspectives. *Endocrine Reviews* 2005; 26: 44-62

SAITO S. Cytokine network at the feto-maternal interface. *J Reprod Immunol* 2000; 47: 87-103

VEENSTRA VAN NIEUWENHOVEN AL, HEINEMAN MJ, FAAS MM. The immunology of successful pregnancy. *Hum Reprod* 2003; 9: 347-57

RIEGER L, HOFMEISTER V, PROBE C, ET AL. Th1 and Th2-like cytokine production by first trimestre decidual large granular lymphocytes is influenced by HLA-G and HLA-E. *Mol Hum Reprod* 2002; 8: 255-61

GARCIA.LLORET MI, MORRISH DW, WEGMANN TG, ET AL. Demonstration of functional cytokine-placental interactions: CSF-1 and GM-CSF stimulate human cytotrophoblast differentiation and peptide hormone secretion. *Exp Cell Res* 1994; 214: 46-54

STEWART CL, KASPOAR P, BRUNET LJ, ET AL. Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature* 1992; 359: 76-9

RAGUPATHY R. Pregnancy: Success and failure within the Th1/Th2/Th3 paradigm. *Sem Immunol* 2001; 13: 219-27

LIN H, MOSMANN TR, GUILBERT L, ET AL. Synthesis of T helper 2-type cytokines at the maternal-fetal interface. *J Immunol* 1993; 151: 4562-73

WegmannTG, Lin H, Guilbert L, et al. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon ? *Immunol Today* 1993; 14: 353-6

HADDAD EK, DUCLOS AJ, ANTECKA E, ET AL. Role of interferon-gamma in the priming of decidual macrophages for nitric oxide production and early pregnancy loss. *Cell Immunol* 1997; 181: 68-75

DAS C, KUMAR VS, GUPTA S, ET AL. Network of cytokines, integrins and hormones in human trophoblast cells. *J Reprod Immunol* 2002; 53: 257-68

PICCINNI MP. T cell Cytokines in pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 2002 47: 289-94

PICCINNI MP, ROMAGNANI S. Regulation of fetal allograft survival by a hormone-controlled Th1-Th2-type cytokines. *Immunol Res* 1996; 15: 141-50

HO HN, CHAO KH, CHEN HF, ET AL. Distribution of Th1 and Th2 cell populations in human peripheral and decidual T cells from normal and anembryonic pregnancies. *Fertil Steril* 2001; 76: 797-803

KRASNOW JS, TOLLERUD DJH, NAUS G, ET AL. Endometrial Th2 cytokine expression throughout the menstrual cycle and early pregnancy. *Hum Reprod* 1996; 11: 1747-54

LIM KJ, ODUKOYA OA, AJJAN RA, ET AL. Profile of cytokine mRNA expression in peri-implantation human endometrium. *Mol Hum Reprod* 1998; 4: 77-81

CHAOUAT G, ZOURBAS S, OSTOJIC S, ET AL. A brief review of recent data on some cytokine expression at the maternal-fetal interface which might challenge the classical Th1/Th2 dichotomy. *J Reprod Immunol* 2002; 53: 241-56

VINCE GS, JOHNSON PM. Is there a Th2 bias in human pregnancy ? *J Reprod Immunol* 1996; 32: 101-4

GUILBERT LJ. There is a bias against type 1 (inflammatory) cytokine expression and function in pregnancy. *J Reprod Immunol* 1996; 32: 105-10

CLARK DA, ARCK PC, CHAOUAT G. Why did your mother reject you ? Immunogenetic determinants of the response to environmental selective pressure expressed at the uterine level. *Am J Reprod Immunol* 1999; 41: 5-22

BUYON JP, NELSON JL, LOCKSHIN M. The effects of pregnancy on autoimmune diseases. *Clin Immunol Immunopathol* 1996; 78: 99-104

OSTENSEN M, VILLIGER PM. Immunology of pregnancy – pregnancy as a remission inducing agent in rheumatoid arthritis. *Transplant Immunol* 2002; 9: 155-60

BEER AE, KWAK JY, RUIZ JE. Immunophenotypic profiles of peripheral blood lymphocytes in women with recurrent pregnancy losses and in infertile women with multiple failed in vitro fertilization cycles. *Am J Reprod Immunol* 1996; 35: 376-82

CLARK DA, COULAM CB, DAYA S, ET AL. Unexplained sporadic and recurrent miscarriage in the new millennium: a critical analysis of immune mechanisms and treatments. *Human Reprod Update* 2001; 7: 501-11

LI TC, MAKRIS M, TOMSU M, ET AL. Recurrent miscarriage: aetiology, management and prognosis. *Human Reprod Update* 2002; 8: 463-81

LAIRD SM, TUCKERMAN EM, CORK BA, ET AL. A review of immune cells and molecules in women with recurrent miscarriage. *Human Reprod Update* 2003; 9: 163-74

SPELEMAN F., CIN PD, VAN ROY N, VAN MARCK E., BUYTAER P., VAN DEN BERGHE H. LEROY JG. Is t(6;20)(p21;q13) a characteristic chromosome change in endometrial polyps? *Genes Chromosomes Cancer* 1991 Jul;3(4):318-9

MITTAL K, SCHWARTZ L, GOSWAMI S, DEMOPOULOS R: Estrogen and progesterone receptor expression in endometrial polyps. *Int J Gynecol Pathol.* 1996 Oct;15(4):345-8.

RAMONDETTA LM, SHERWOOD JB, DUNTON CJ, PALAZZO JP. Endometrial. Cancer in polyps associated with tamoxifen use. *Am J Obstet Gynecol.* 1999 Feb;180(2 Pt 1):340-1

KIM MR, KIM YA, JO MY, HWANG KJ, RYU HS.

High frequency of endometrial polyps in endometriosis. J Am Assoc Gynecol Laparosc 2003;10:46–8.

LUCENA E, CUBILLOS J. Immune abnormalities in endometriosis compromising fertility in IVF-ET patients.

J Reprod Med. 1999 May;44(5):458-64.

DE SA ROSA E DE SILVA AC, ROSA E SILVA JC, DOS REIS FJ, NOGUEIRA AA, FERRIANI RA. Routine office hysteroscopy in the investigation of infertile couples before assisted reproduction. J Reprod Med 2005; 50:501–6.

VARASTEH NN, NEUWIRTH RS, LEVIN B, KELTZ MD. Pregnancy rates after hysteroscopic polypectomy and myomectomy in infertile women. Obstet Gynecol 1999;94:168–71.

SPIEWANKIEWICZ B, STELMACHOW J, SAWICKI W, CENDROWSKI K, WYPYCH P, SWIDERSKA K. The effectiveness of hysteroscopic polypectomy in cases of female infertility.

Clin Exp Obstet Gynecol 2003;30:23–5

SHOKEIR TA, SHALAN HM, EL-SHAFEI MM. Significance of endometrial polyps detected hysteroscopically in eumenorrhic infertile women. J Obstet Gynaecol Res 2004;30:84

MUZII L, BELLATI F, PERNICE M, MANCI N, ANGIOLI R, PANICI PB. Resectoscopic versus bipolar electrode excision of endometrial polyps: a randomized study. Fertil Steril 2007;87:909–17.

EMANUEL MH,WAMSTEKER K. The Intra Uterine Morcellator: a new hysteroscopicoperating technique to remove intrauterine polyps and myomas. J Minim Invasive Gynecol 2005;12:62-6.