



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO SALUTE DELLA DONNA E DEL BAMBINO - SDB

U.O.C. di CLINICA GINECOLOGICA e OSTETRICA

Scuola di Dottorato di Ricerca Medicina dello Sviluppo e della Programmazione

Indirizzo: Emato-oncologia, genetica, malattie rare e medicina predittiva

Ciclo XXVII

**“DOSAGGIO SIERICO E FOLLICOLARE DI STEM CELLS FACTOR IN
PAZIENTI ‘POOR RESPONDER’ SOTTOPOSTE A TRATTAMENTI DI
PROCREAZIONE ASSISTITA: EVIDENZE E FUTURE APPLICAZIONI”**

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Giuseppe Basso

Coordinatore d’indirizzo: Ch.mo Prof. Giuseppe Basso

Supervisore: Ch.mo Prof. Michele Gangemi

Correlatore: Dott. Salvatore Gizzo

Dottorando: Dott.ssa Cecilia Zicchina

PARTE PRIMA

RIASSUNTO	6
SUMMARY	10
INTRODUZIONE.....	14
IL CICLO MESTRUALE	16
FOLLICOLOGENESI E GAMETOGENESI.....	18
Regolazione ormonale della follicologenesi	22
Teoria delle “due cellule-due gonadotropine”	24
PROCEDURE DI PROCREAZIONE MEDICALMENTE ASSISTITA	26
Terapie di stimolazione ovarica controllata	26
Il prelievo di ovociti	33
La fecondazione	34
Lo sviluppo embrionale.....	38
Il trasferimento degli embrioni in cavità uterina.....	39
LA STIMOLAZIONE OVARICA NELLE PAZIENTI “POOR RESPONDER”	40
Età e fertilità.....	44
Markers di riserva ovarica.....	45
Trattamento delle pazienti “poor responder”	47
STEM CELL FACTOR E c-KIT	48
STRUTTURA di c-Kit e SCF	49
DISTRIBUZIONE E FUNZIONE NELLE GONADI DI SCF/c-KIT	52
Gonadotropine e SCF/c-Kit	53

PARTE SECONDA

MATERIALI E METODI	59
Pazienti	59
Protocolli di trattamento	60
Dosaggio biochimico	62
Dati raccolti	62
Endpoint	64
Analisi statistica.....	65
RISULTATI	66
Valutazioni generali e confronto trattamento A e B.....	66
Dosaggi follicolari e sierici di SCF	73
DISCUSSIONE	79
CONCLUSIONI E POTENZIALI SVILUPPI.....	84
BIBLIOGRAFIA	86

PARTE PRIMA

RIASSUNTO

Scopo

Scopo dello studio è rilevare e quantificare il fattore di crescita Stem Cell Factor (SCF) nel liquido follicolare e nel siero di pazienti “poor responder” sottoposte a trattamenti di fecondazione in vitro (IVF) sia dopo trattamento convenzionale (rFSH) che dopo trattamento non-convenzionale (rFSH+rLH) al fine di comprendere il suo ruolo nella gametogenesi umana e le sue eventuali future applicazioni nella pratica clinica.

Materiali e Metodi

È stato condotto uno studio osservazionale cross-matched di coorte in pazienti “poor responder” afferite presso il Centro di PMA della Clinica Ostetrica e Ginecologica di Padova – Dipartimento di Salute della Donna e del Bambino – Università degli Studi di Padova nell’intervallo temporale compreso tra Gennaio 2012 e Dicembre 2014. Le pazienti eleggibili per lo studio (28) hanno ricevuto tutte 2 trattamenti di stimolazione ovarica e nello specifico: Trattamento A mediante protocollo lungo di stimolazione convenzionale con solo rFSH e Trattamento B mediante protocollo lungo di stimolazione con rFSH con l’aggiunta rLH. Al riscontro ecografico di almeno 3 follicoli di diametro medio \geq di 16 mm (o di almeno 1 follicolo più grande di 18 mm), è stato somministrato rhCG 250 μ g per l’induzione dell’ovulazione; il recupero ovocitario, sotto guida ecografica, è stato eseguito 36 ore dopo la somministrazione dell’hCG. Ad ogni paziente prima del pick up ovocitario è stato eseguito un prelievo di plasma e,

successivamente nello stesso soggetto, al prelievo ovocitario, è stato recuperato un campione di liquido follicolare.

I liquidi follicolari sono stati centrifugati a 250 g per 10 minuti e successivamente sono stati trasferiti in provette di polipropilene sterili e congelati a -70 ° C fino ad ulteriore analisi. Analogamente, i campioni di sangue sono stati centrifugati per 15 minuti a 1000 g entro 30 min dalla raccolta ed i sieri sono stati anch'essi trasferiti in provette sterili di polipropilene e congelati a -70 ° C. Prima dello stoccaggio, le provette sono state opportunamente contrassegnate con un codice alfanumerico corrispondente all'identificazione della paziente. Successivamente, il fattore SCF è stato dosato quantitativamente mediante apposito kit, usando il test biochimico ELISA. Tutti gli ovociti recuperati sono stati decoronizzati e solo gli ovociti maturi inseminati mediante tecnica ICSI (Intra Cytoplasmic Sperm Injection). Di tutte le pazienti sono stati raccolti dati clinici inerenti la riserva ovarica, l'andamento della risposta ovarica alla iper-stimolazione controllata ed la resa quantitativa e qualitativa del trattamento, in termini di ovociti ed embrioni. Sono stati raccolti dati inerenti il dosaggio sierico e follicolare di SCF di ogni paziente per entrambi i trattamenti.

Endpoint primario è stato confrontare i due trattamenti in termini di risposta clinica e dosaggio biochimico di SCF follicolare e sierico.

Endpoint secondario è stato confrontare i valori di SCF follicolare con quello sierico al fine di valutare se il valore sierico potesse rispecchiare quello follicolare.

Endpoint terziario è stato correlare i valori sierici di SCF con l'esito clinico del trattamento al fine di valutare la potenzialità del suo utilizzo come parametro predittivo di risposta clinica alla stimolazione ormonale.

Risultati

Sulla base dei criteri di inclusione sono risultate eleggibili per lo studio 28 pazienti (56 trattamenti). Il confronto tra i due gruppi di trattamento in termini di risposta clinica ha mostrato differenze significative per quanto riguarda il 17β estradiolo al momento dell'induzione [$p < 0.05$], lo spessore endometriale [$p < 0.001$], il numero di follicoli < 16 mm [$p < 0.05$], il numero totale di ovociti recuperati al prelievo ovocitario [$p < 0.05$], gli ovociti in Metafase II [$p < 0.001$] e la qualità degli embrioni [$p < 0.05$], risultati significativamente superiore con l'aggiunta di rLH (trattamento B).

Tuttavia l'analisi delle concentrazioni sieriche e follicolari tra i due gruppi di trattamento non ha mostrato differenze statisticamente significative. (endpoint primario)

Dalla correlazione tra i valori follicolari e sierici di SCF è emersa forte associazione lineare [$p < 0.001$; $r^2 0.998$] (endpoint secondario).

Dal confronto tra i parametri clinici ed i valori di SCF è emersa significatività statistica tra il valore sierico di SCF ed il numero di ovociti maturi (MII).

Nello specifico, per valori di SCF compresi tra 1200 e 1400 pg/mL è stata riscontrata una probabilità del 50% di recuperare 3 ovociti MII e per valori pari o superiori a 1400 pg/mL una probabilità del 95% di recuperare 1 ovocita MII.

Infine per valori inferiori a 350 pg/mL, è stata riscontrata una probabilità del 95% di non recuperare nessun ovocita. (endpoint terziario)

Conclusioni

L'aggiunta di rLH nel protocollo di stimolazione ovarica controllato di pazienti "poor responders" ha mostrato significativi miglioramenti in termini di risposta clinica, sia quantitativa che qualitativa. Tuttavia tale miglioramento indotto dall'rLH sembra non influenzare il pathway di SCF (probabilmente influenzato solo da FSH). Il riscontro di valori sierici di SCF, comparabili a quelli follicolari, apre la possibilità di predire prima del pick up i valori follicolari di SCF. Essendo il valore follicolare di SCF predittivo del numero di ovociti MII reclutabili, lascia ipotizzare che nel prossimo futuro SCF potrebbe essere utilizzato come marker predittivo della risposta ovarica alla stimolazione suggerendo aggiustamenti nei dosaggi di rFSH o suggerendo l'inutilità di giungere al prelievo ovocitario.

SUMMARY

Objective

The aim of the study was to detect and quantify the growth factor stem cell factor (SCF) in follicular fluid and serum of patients "poor responders" undergoing to in vitro fertilization (IVF) cycle both after conventional treatment (rFSH) and after non-conventional treatment (rFSH + RLH) in order to understand its role in human gametogenesis and future applications in clinical practice.

Materials and Methods

We conducted a cross-matched observational cohort study in patients "poor responder" addressed to Physiopathology Reproduction Unit of Padua University-Gynecology and Obstetrics Clinic-Department of Women and Child Health, in the time interval between January 2012 and December 2014.

All eligible patients (28) received both ovarian hyper-stimulation protocols, specifically: treatment-A using conventional long protocol stimulation with rFSH and treatment-B using long protocol stimulation with rFSH and rLH. At ultrasound imaging of at least 3 follicles with a mean diameter ≥ 16 mm (or at least 1 follicle greater than 18 mm), 250 g rhCG was administered for ovulation induction; oocyte retrieval, under ultrasound guide, was performed 36 hours after hCG administration. For each patient before the oocyte pick up it was collected a blood-serum sample and subsequently for each oocyte pick up it was recovered a sample of follicular fluid.

The follicular fluids were centrifuged at 250 g for 10 minutes and then were transferred to sterile polypropylene tubes and frozen at -70° C until further

analysis. Similarly, samples of blood were centrifuged for 15 minutes at 1000 g after 30 min of collection and serum were transferred to sterile polypropylene tubes and frozen at -70 ° C. Before storage, the tubes were appropriately marked with an alphanumeric code corresponding to the identification of the patient.

Subsequently, SCF factor was measured quantitatively by ELISA-kit. After the removal of the cumulus complex and corona radiate, only mature oocytes-MII were inseminated by ICSI (Intra Cytoplasmatic Sperm Injection). For all patients, were collected clinical data regarding ovarian reserve, trend of the ovarian response to hyper-stimulation and quantitative and qualitative data of oocytes and embryos. Data were collected regarding the dosage of serum and follicular SCF for each patient, for both treatments.

Primary endpoint was to compare the two treatments in terms of clinical response and biochemical assay of serum and follicular SCF.

Secondary endpoint was to compare the values of follicular SCF with serum SCF, in order to assess whether the value could reflect the serum follicle.

Tertiary endpoint was to correlate the serum SCF values, with the clinical outcome, in order to evaluate its use as a predictive parameter of clinical response to hormonal stimulation.

Results

Based on our inclusion criteria, 28 patients resulted eligible for the study (56 treatments). The comparison between the two treatment groups considering clinical response demonstrated significant differences, higher with the addition of rLH (treatment B), in terms of 17 β estradiol at the time of ovulation induction [p

<0.05], endometrial thickness [p <0.001], number of follicles <16 mm [p <0.05], total number of oocytes retrieved at pick up [p <0.05], oocytes MII [p <0.001] and embryos quality [p <0.05]. However, the analysis of serum and follicular SCF concentrations between the two treatment groups, showed no statistically significant difference. (primary endpoint).

From the correlation between the values of serum and follicular SCF emerged a strong linear association [p <0.001; r^2 0.998] (secondary endpoint).

From the comparison of clinical and biochemical parameters of SCF, emerged a significant correlation between the SCF serum value and number of oocytes MII, and specifically: for values between 1200 and 1400 pg / mL there was a likelihood of 50% to recover 3 MII oocytes and for values greater than or equal to 1400 pg / mL there was a likelihood of 95% to recover 1 MII oocyte. Finally, for values lower than 350 pg / mL, it was observed a probability of 95% to not retrieve any oocyte. (tertiary endpoint)

Conclusions

In controlled ovarian hyper-stimulation protocols of "poor responders" patients, the administration of rLH showed significant improvements in terms of clinical response, both quantitative and qualitative. However this improvement induced by rLH, seems to not affect the pathway of SCF (probably influenced only by FSH). The detection of SCF serum values comparable to SCF follicular ones, opens the possibility of predicting the SCF follicular values before the oocyte pick-up. Since SCF follicular value is predictive of the number of MII oocytes recruitable, we can hypothesize that in the next future SCF could be used as a pre pick-up marker

to predict the ovarian response to hormonal hyper-stimulation avoiding oocyte pick up in the absence of oocytes.

INTRODUZIONE

Ad ogni ciclo mestruale, una coppia al massimo della propria capacità riproduttiva ha circa il 25% di possibilità di concepire. Questa percentuale, alquanto modesta, si riduce significativamente con l'aumentare dell'età della donna, non superando il 20% oltre i 35 anni e calando ulteriormente al 10% oltre i 40. Non sorprende dunque che una coppia, che intenda espressamente concepire, sia spesso costretta ad attendere alcuni mesi, prima di vedere il proprio desiderio coronato da successo. Nel caso in cui l'incapacità di procreare si protragga per un paio di anni, è possibile che la coppia sia interessata da uno stato di infertilità. La compromissione della capacità riproduttiva, oltre a costituire un problema di carattere medico, comporta anche aspetti altrettanto complessi di natura psicologica e sociale. L'infertilità, maschile e femminile, è indubbiamente un problema di consistenti proporzioni. Secondo alcuni dati dell'OMS (Organizzazione Mondiale della Sanità) nei paesi occidentali la sterilità colpisce dal 15% al 20% delle coppie. Si stima infatti che il 15% delle coppie in età fertile sia portatrice di severe disfunzioni riproduttive e che un ulteriore 10% soffra di patologie di più modesta gravità. Dai dati epidemiologici, è indubbio, dunque, che anche nel nostro Paese l'infertilità affligga decine di migliaia di persone.

Grazie alle tecniche di Procreazione Medicalmente Assistita, un numero ormai significativo di coppie infertili è riuscita ad ottenere una tanto desiderata gravidanza. La nascita del primo essere umano dopo fecondazione in vitro (FIV) di un ovocita aspirato dal follicolo preovulatorio ed il trasferimento in utero dell'embrione (ET) risale al 1978 (Steptoe ed Edwards). Questa tecnica era stata il risultato di trent'anni di studi che avevano portato dapprima lo sviluppo in vitro di

embrioni di topo (1,2) e dopo, nel 1959, la fecondazione in vitro di embrioni di coniglio (3). Finalmente, per la prima volta nella storia della medicina, era stato possibile ottenere un concepimento in presenza di compromissione funzionale e strutturale delle tube. Notevoli miglioramenti e innovazioni si sono susseguiti negli ultimi anni soprattutto per quanto riguarda le tecniche di laboratorio: dall'IMSI (Intracytoplasmic Morphologically selected Sperm Injection) alla Assisted Hatching, dalla PGD/PGS (Pre-implantation genetic diagnosis/preimplantation genetic screening) alla IVM (In Vitro Maturation). Anche i protocolli di stimolazione ormonale sono in continuo miglioramento ed emerge, sempre più, la volontà di rendere quanto più personalizzato possibile ogni singolo trattamento. A fronte del rinnovamento e dello sviluppo delle tecniche di PMA, manca però un parallelo aumento delle gravidanze ottenute, con una media italiana pari al 25.9% secondo gli ultimi dati disponibili del Registro Nazionale PMA.[1] Questi dati sono in parte legati al progressivo aumento dell'età media delle coppie che intraprendono il percorso della Procreazione Medicalmente assistita e in parte legati alla non conoscenza di molti meccanismi che regolano, primo tra tutti, l'impianto dell'embrione e la recettività dell'endometrio, ma anche la crescita e la maturazione dell'ovocita in corso di crescita follicolare multipla. Per migliorare i protocolli di stimolazione ormonale ed ottenere, così, un numero maggiore ed una migliore qualità di ovociti, è fondamentale rifarsi alla fisiologia del ciclo ovarico e ai meccanismi che regolano la selezione e la crescita dei follicoli.

IL CICLO MESTRUALE

Il ciclo mestruale è il risultato di una serie di eventi correlati tra loro, che coinvolgono diversi organi funzionalmente uniti in un unico asse “ipotalamo-ipofisi-ovaio”. La complessa interazione tra gli ormoni secreti dalle suddette ghiandole coordina lo sviluppo follicolare, l’ovulazione e l’eventuale gravidanza.

Gli ormoni principalmente coinvolti in questo delicato processo sono:

GnRH, ormone secreto in maniera pulsatile dall’ipotalamo con il compito di stimolare l’ipofisi a produrre le gonadotropine (FSH e LH);

FSH (ormone follicolo stimolante) e LH (ormone luteinizzante), entrambi secreti dall’ipofisi che vanno ad agire a livello ovarico, regolando sia la maturazione follicolare sia la steroidogenesi;

Estrogeni e progesterone, ormoni secreti dall’ovaio, che agiscono su vari organi bersaglio, specialmente sull’endometrio.

Durante il periodo riproduttivo della donna, che va dal menarca alla menopausa, con una ciclicità mensile si assiste alla produzione di un ovocita maturo e alla contemporanea preparazione dell’endometrio uterino per l’eventuale impianto dell’ovocita fecondato. Nel caso di mancato impianto, l’endometrio va incontro a sfaldamento e ha di nuovo inizio un altro ciclo mestruale. L’intervallo di tempo che intercorre tra l’inizio di due mestruazioni (ritmo mestruale) è in media di 28 giorni. La prima fase del ciclo mestruale, detta fase follicolare, ha una durata variabile, in media 14 giorni, ed è caratterizzata dalla stimolazione delle ovaie da parte delle due gonadotropine ipofisarie FSH e LH. Durante questa fase si assiste alla crescita delle dimensioni dei follicoli e alla selezione del singolo follicolo dominante; contemporaneamente a livello uterino, per l’ aumento della secrezione

degli estrogeni, si assiste ad un progressivo aumento dello spessore endometriale (fase proliferativa). Quando il follicolo dominante raggiunge la maturazione, si ha la produzione di un picco di LH che determina l'ovulazione. Segue una seconda fase del ciclo detta fase luteale, con durata fissa, caratterizzata da un progressivo aumento dei livelli di progesterone e progressiva diminuzione dei livelli di estrogeni e di gonadotropine ipofisarie. In questa fase il progesterone agisce principalmente sull'endometrio per prepararlo per un'eventuale gravidanza (fase secretiva). (Figura 1)

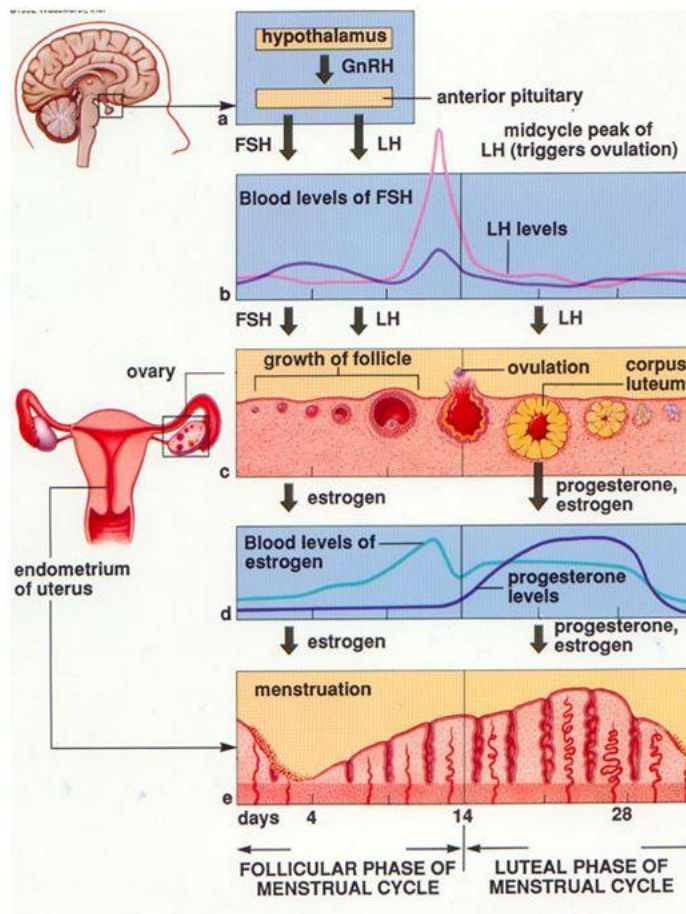


Figura 1: Ciclo mestruale

FOLLICOLOGENESI E GAMETOGENESI

Per follicologenesi si intende il processo attraverso il quale a partire da un pool di follicoli “immaturi” si assiste all’iniziale reclutamento e alla crescita di un gruppo di follicoli dai quali si arriverà alla selezione del singolo follicolo dominante. Quest’ultimo sarà quello destinato a portare a maturazione l’ovocita in esso contenuto e ad andare incontro all’ovulazione. Ogni follicolo è formato da un ovocita, che nel corso dei vari passaggi acquisisce dimensioni progressivamente crescenti, e da cellule somatiche (cellule della teca e cellule della granulosa) sulle quali agiscono gli stimoli ormonali.

A seconda del loro stadio di maturazione i follicoli sono stati classificati da Gougeon [2] in:

Follicolo primordiale (0.2 - 0.3 cm) è costituito da un ovocita bloccato nella profase della prima divisione meiotica, circondato da un singolo strato di cellule fusate, dalle quali deriveranno le cellule della granulosa.

Follicolo primario (0.45 - 0.6 cm) è caratterizzato da cellule della granulosa cuboidali che contornano l’ovocita, a sua volta circondato dalla zona pellucida; iniziano a distinguersi, esternamente alle cellule della granulosa, le cellule della teca. Rappresenta il primo stadio di follicoli che vanno incontro alla crescita e allo sviluppo.

Follicolo secondario (0.45 - 0.6 cm) è caratterizzato da due strati di cellule stromali: uno strato di cellule della granulosa e uno strato di cellule tecali ben distinte.

Follicolo preantrale e antrale (0.5 - 0.8 cm) in esso aumentano gli strati delle cellule della granulosa e iniziano a formarsi tra le cellule, piccole cavità contenenti liquido. Successivamente questi piccoli spazi liquidi si uniscono a formare un'unica cavità contenente il liquido follicolare mentre le cellule follicolari andranno a circondare l'ovocita, adesso in posizione periferica, e a trasformarsi in cumulo ooforo e corona radiata, subito a ridosso della zona pellucida. Le cellule della teca si differenziano in teca esterna e teca interna. In questo stadio le cellule della granulosa e della teca esprimono i recettori per FSH e LH.

Follicolo preovulatorio (0.8 – 1.0 cm) che va incontro al progressivo aumento di diametro fino a diventare follicolo ovulatorio (1.8 - 2.0 cm) destinato in breve tempo a rompersi per la formazione di enzimi litici. Nelle fasi immediatamente precedenti l'ovulazione, l'ovocita completa la sua prima divisione meiotica con l'estrusione del primo globulo polare, che va a localizzarsi nello spazio perivitellino.

Il follicolo dopo l'ovulazione viene rapidamente trasformato in corpo luteo, destinato a degenerare in caso di mancato impianto o a persistere e continuando a produrre progesterone in caso di gravidanza. (Figura 2)

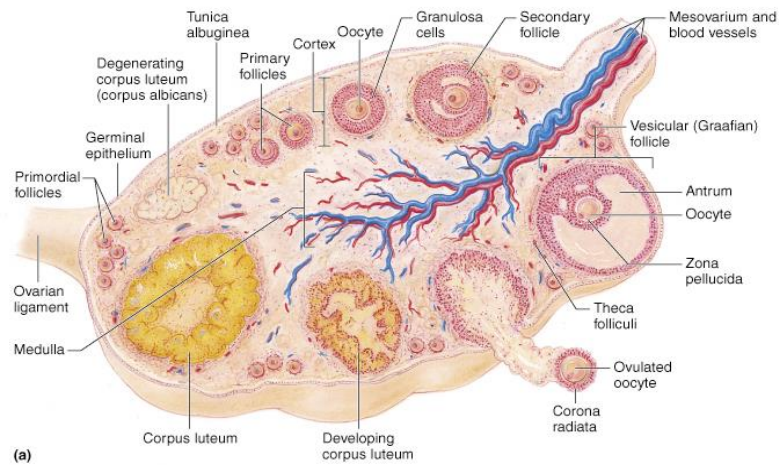


Figura 2: Follicologenesi

Alla fine del quinto mese di vita intrauterina nel feto di sesso femminile, le due gonadi contengono circa 7.000.000 di ovogoni, ossia cellule germinali primordiali caratterizzate, come tutte le cellule somatiche, da corredo genetico diploide. Durante la prima divisione mitotica originano gli ovociti primari: in questo stadio il nucleo dell'ovocita è evidente nel complesso del citoplasma e prende il nome di vescicola germinale (VG). Successivamente ha inizio la prima divisione meiotica con dimezzamento del corredo cromosomico ma questo processo si arresta nella profase I della meiosi I e così rimane fino all'inizio dell'età fertile.

Tutti questi ovociti primari vengono “custoditi” nella corticale ovarica come follicoli primordiali. Già durante la parte finale della vita fetale, la maggior parte dei follicoli primordiali va incontro ad apoptosi, tanto che alla nascita ne rimangono circa 1-2 milioni. Dopo la nascita il loro numero va lentamente calando cosicché al momento del menarca ne rimangono circa 300.000-400.000 [3]. Nel corso della vita, a livello della corticale ovarica, è possibile osservare follicoli in diversi stadi di sviluppo: i follicoli primordiali, infatti, entrano

continuamente a far parte del pool di follicoli che inizia il processo di crescita e questo determina il loro progressivo depauperarsi. [2].

Circa il 99.9% della riserva ovarica iniziale sarà caratterizzata da follicoli che non completeranno mai il loro sviluppo e che andranno incontro ad atresia. Si può calcolare, di contro, che nel corso della vita di una donna circa 400 follicoli completeranno la loro maturazione e ovuleranno. [4]

Con l'inizio dell'età fertile e quindi dei cicli mestruali, mensilmente sia ha il completamento della prima divisione meiotica solo nell'ovocita del follicolo destinato all'ovulazione. Questo processo porta alla formazione di un ovocita secondario e di un globulo polare (ovocita in metafase II-ovocita maturo), entrambi contenenti un corredo cromosomico aploide. (Figura 3)

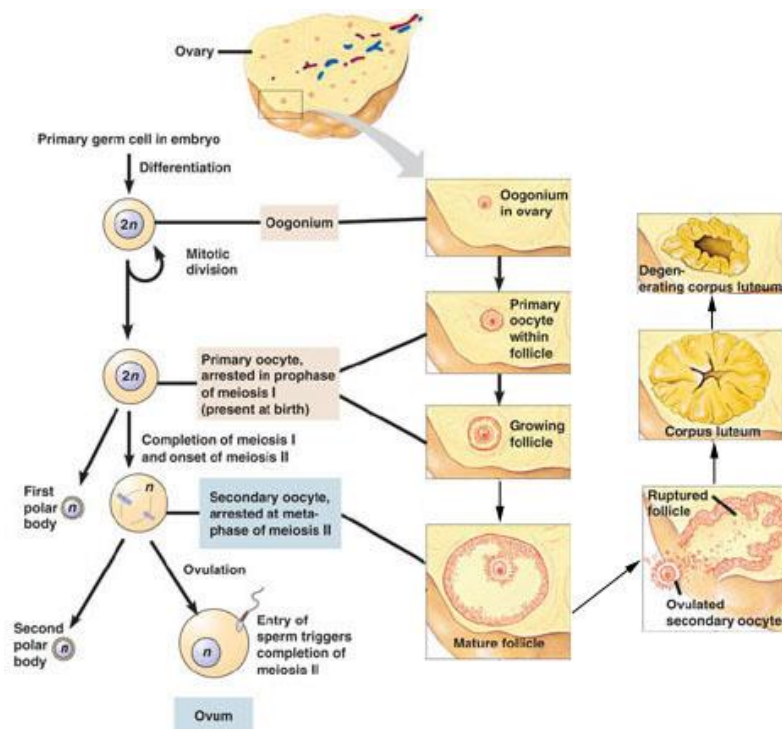


Figura 3: Gametogenesi

Regolazione ormonale della follicologenesi

Il processo di crescita follicolare si può suddividere a sua volta in 3 fasi, differenti per quanto riguarda i meccanismi di stimolo e controllo: (Figura 4)

Sviluppo follicolare iniziale gonadotropino indipendente

I follicoli primordiali, come precedentemente detto, diventano in modo continuo follicoli primari e secondari. Le gonadotropine non sembrano giocare un ruolo in questa prima fase, mentre è stato dimostrato che alcuni fattori intraovarici (GDF-9 e BMP-15) contribuiscono al reclutamento e allo sviluppo dei follicoli primordiali [5,6];

Progressione FSH dipendente

La fase successiva di sviluppo dei follicoli preantrali e antrali fino alla selezione del follicolo dominante preovulatorio, è fortemente dipendente dall' FSH. All'inizio di ogni ciclo mestruale, l'alta concentrazione di FSH supporta il pool di follicoli precedentemente selezionati per la crescita e permette a quelli in stadio maturativo più avanzato, e quindi più sensibili all'FSH stesso, di procedere nelle fasi successive (concetto di valore soglia di FSH). Successivamente la concentrazione di FSH va progressivamente diminuendo a causa del feedback negativo determinato dall'estradiolo e dall'inibina B; a questo punto, con la caduta del FSH di nuovo sotto il livello soglia, solo un singolo follicolo antrale, il follicolo dominante, continuerà nella sua crescita e questo perché ha sviluppato una sensibilità maggiore all'FSH (maggior numero di recettori per l'FSH), tale da non risentire della sua diminuita concentrazione. [7] Si parla pertanto di "finestra dell'FSH" per definire quel periodo temporale in cui la concentrazione di FSH

rimane sopra la soglia di sensibilità dei follicoli: in questa finestra i follicoli antrali più sensibili continuano nello sviluppo e alla fine si selezionerà un singolo follicolo dominante mentre gli altri andranno incontro ad atresia. [8]

Maturazione LH dipendente

Il follicolo antrale dominante completerà le sue fasi di crescita e maturazione sotto l'azione combinata di FSH e LH; LH risulta infine fondamentale per completare la maturazione dell'ovocita e permettere l'ovulazione di un ovocita maturo che ha completato la prima divisione meiotica ed è pronto per la fecondazione. [9]

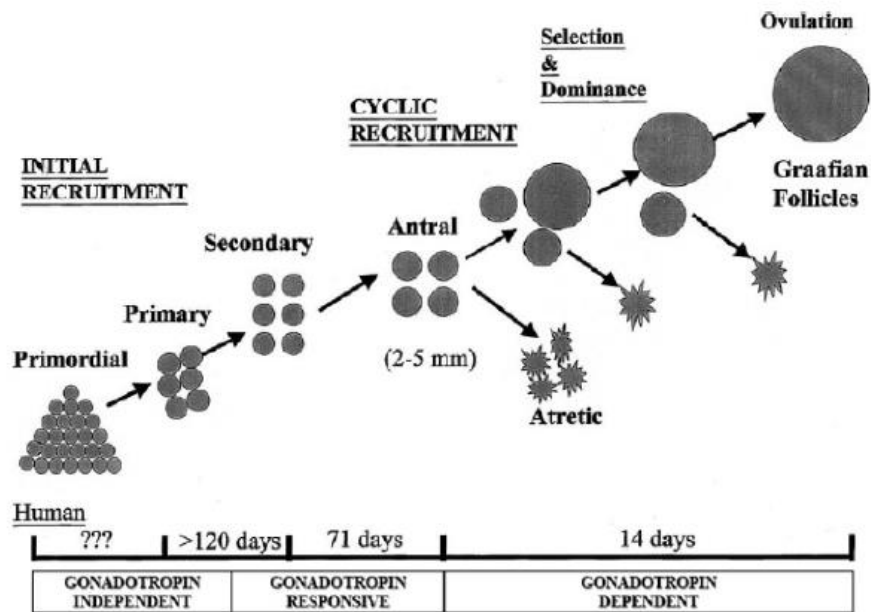


Figura 4: Rappresentazione schematica della crescita follicolare e dei suoi meccanismi di controllo. Adattata da McGee e Hsueh 2000.

Teoria delle “due cellule-due gonadotropine”

La teoria secondo la quale sia l'ormone follicolo stimolante FSH che l'ormone luteinizzante LH risultino essere necessari per lo sviluppo e la maturazione follicolare, risale a circa 70 anni fa.

Già a partire dagli anni '40 vari autori tra cui Greep [10] e Fevold [11] sostennero la teoria delle due cellule-due gonadotropine così chiamata perché, secondo tale teoria, la steroidogenesi ovarica aveva luogo secondo una relazione fissa tra le due gonadotropine, FSH e LH, e le cellule della granulosa e della teca rispettivamente.

In dettaglio nelle cellule della teca ovarica, in risposta allo stimolo dell'LH, aveva luogo la produzione di androgeni; gli androgeni, a loro volta, attraversavano la membrana basale a livello delle cellule della granulosa ovarica e venivano convertiti in estrogeni ad opera dell'enzima aromatasi, indotto dall'FSH. L'aumento degli estrogeni, con un meccanismo di feedback negativo, andava a ridurre la concentrazione di FSH permettendo la maturazione finale del singolo follicolo dominante sotto l'azione dell'LH. (Figura 5)

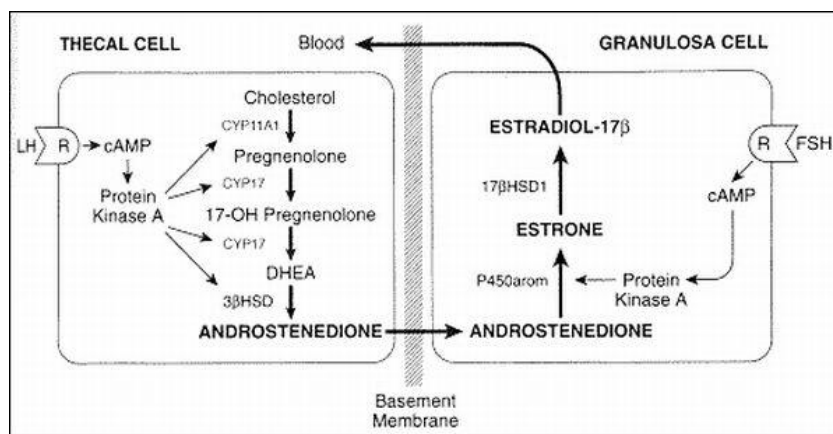


Figura 5: Rappresentazione grafica della teoria delle due cellule-due gonadotropine.

Successivamente si è osservato come la crescita dei follicoli ovarici non dipenda dalla sola azione dell'FSH ma come l'LH vada ad agire anche sulle cellule della granulosa dei follicoli antrali dove sono espressi sia recettori per FSH sia per LH, FSH, estrogeno – indotti. [12] Le cellule della granulosa, a partire dalla fase follicolare intermedia, rispondono quindi agli stimoli sia dell'FSH sia dell'LH e di conseguenza la steroidogenesi è controllata da entrambe le gonadotropine così come la crescita follicolare. In questa fase LH controlla sia la sintesi degli androgeni (agendo sulle cellule della teca) sia direttamente la sintesi degli estrogeni (a livello delle cellule della granulosa). Successivamente, nella fase in cui i livelli di FSH iniziano a decrescere mentre quelli di LH ad aumentare, si ha la selezione del follicolo dominante e la progressiva atresia di quelli meno sensibili. [13,14]

Ricapitolando, i ruoli dell'LH nella follicologenesi sono molteplici e si esprimono a vari livelli:

Agendo a livello delle cellule della teca, LH induce la produzione degli androgeni ovarici;

A partire dalla fase follicolare intermedia, agendo sulle cellule della granulosa, induce la produzione di varie molecole (Inibina B e IGF I e IGFII) che promuovono la crescita delle cellule della granulosa stesse e contribuiscono con esse a regolare la maturazione ovocitaria; [13,15]

Contribuisce alla degenerazione (androgeno – indotta) dei follicoli non dominanti. [13,14]

PROCEDURE DI PROCREAZIONE MEDICALMENTE ASSISTITA

La fisiologia del ciclo ovarico, la follicologenesi e la sua regolazione ormonale risultano fondamentali per capire le varie fasi dei trattamenti di fecondazione assistita, che si possono così riassumere:

- stimolazione ovarica controllata per induzione della crescita follicolare multipla;
- prelievo degli ovociti;
- fecondazione in vitro e coltura embrionaria nei primi stadi della segmentazione;
 - trasferimento degli embrioni in cavità uterina.

Terapie di stimolazione ovarica controllata

Sebbene le prime gravidanze siano state ottenute dopo il recupero di un singolo ovocita in cicli ovulatori spontanei [16], l'utilità di indurre una crescita follicolare multipla, deriva dalla evidenza che il tasso di gravidanza si incrementa significativamente parallelamente al numero di embrioni trasferiti. [17]

I protocolli di stimolazione ormonale per l'induzione della crescita follicolare multipla sono numerosi e tutti hanno la finalità di incrementare i livelli plasmatici delle gonadotropine, per sovrapporre al processo di selezione fisiologica di un singolo follicolo dominante, una selezione e maturazione follicolare multipla.

Nei cicli di stimolazione ovarica controllata si realizza un "soverchiamento" della finestra di FSH: si hanno cioè valori di FSH superiori alla soglia di reclutamento dei follicoli per tutta la durata della stimolazione. Questo fa sì che non si verifichi

la selezione del follicolo dominante, ma che molti follicoli possano contemporaneamente procedere fino alla fase ovulatoria. [18]

1. Farmaci utilizzati nella stimolazione ovarica controllata

L'induzione della crescita follicolare multipla necessita di due categorie principali di farmaci: le gonadotropine per il reclutamento e la maturazione dei follicoli e gli agonisti/antagonisti del GnRH per un miglior controllo del ciclo.

1.1 Gonadotropine

Le gonadotropine (FSH e LH) sono due ormoni prodotti dall'ipofisi anteriore che controllano la funzione gonadica e la cui secrezione è controllata dalla secrezione pulsatile del GnRH ipotalamico.

FSH e LH, hCG e TSH sono tutti ormoni glicoproteici formati da due subunità legate da legami non covalenti. La subunità α , composta da 92 aminoacidi, è identica tra i quattro ormoni mentre la subunità β è diversa e conferisce le proprietà tipiche del singolo ormone e l'unicità di legame allo specifico recettore. In particolare, le subunità β dell'LH e dell'hCG, seppur diverse, sono molto simili e questo spiega come i due ormoni abbiano alcune attività biologiche in comune seppur differendo nettamente nell'emivita (20 minuti per LH versus 24 ore per hCG). Le prime gonadotropine di origine animale furono estratte attorno agli anni '30, mentre nel 1947 Donini [19] sviluppa per la prima volta un procedimento per estrarre gonadotropine dalle urine delle donne in menopausa (hMG). Inizia così il capitolo delle gonadotropine urinarie che occuperà la scena per molti anni fino a quando, negli anni '90, lo sviluppo della tecnologia del DNA ricombinante ha

permesso di ottenere inizialmente FSH ricombinante (rFSH) seguito da rhCG e rLH. Nei prodotti ricombinanti, a differenza degli urinari, è possibile stabilire con precisione l'attività biologica di farmaco contenuto e produrre gonadotropine pure quasi al 100% con conseguente maggior efficacia e sicurezza del prodotto. Inoltre non essendo dei derivati biologici, risulta azzerato il rischio di contaminazione, ovviamente a discapito di un costo superiore. [20] Le gonadotropine attualmente disponibili in commercio sono descritte nella tabella sottostante. (Tabella I)

Tabella 1: gonadotropine attualmente presenti in commercio.

GONADOTROPINE ATTUALMENTE IN COMMERCIO	
GONADOTROPINE ESTRATTE DA URINE DI DONNE IN MENOPAUSA	HMG
	HMG-HP
	uFSH- HP
GONADOTROPINE ESTRATTE DA URINE DI DONNE IN GRAVIDANZA	uhCG
GONADOTROPINE RICOMBINANTI	r-hFSH
	r-hLH
	r-hCG
	r-FSH + rLH
	Corifollitropina α

1.2 Agonisti e antagonisti del GnRH

Altre due categorie di farmaci, attualmente utilizzate nei protocolli di stimolazione ovarica controllata, sono gli agonisti e gli antagonisti del GnRH. Seppur con meccanismi d'azione differenti, l'utilizzo di questi farmaci si è reso necessario,

parallelamente allo sviluppo delle conoscenze e delle tecniche di procreazione medicalmente assistita, per inibire il picco prematuro di LH che frequentemente si verificava in corso di stimolazione e che era indotto dalle elevate concentrazioni di estrogeni. E' stato, in questo modo, possibile ridurre il numero di cicli cancellati per ovulazione spontanea o luteinizzazione precoce.[21]

Un innalzamento dei livelli sierici di LH che avviene prima della completa maturazione follicolare può, infatti, causare una prematura luteinizzazione delle cellule della granulosa che si può tradurre in aumento dei livelli circolanti di progesterone e danneggiamento della recettività endometriale. In aggiunta, un prematuro picco di LH può danneggiare la maturazione ovocitaria con conseguente ridotto tasso di fertilizzazione e di impianto.

L'azione dei GnRH agonisti è caratterizzata da un'iniziale fase di stimolazione (effetto flare-up) con rilascio ipofisario di FSH ed LH, da una successiva fase di desensibilizzazione, con una riduzione del numero dei recettori del GnRH sulla membrana cellulare (down-regulation) e infine dal blocco ipofisario reversibile. [22,23]

Al contrario gli antagonisti del GnRH sono in grado di legarsi al recettore ma non di indurre la sua dimerizzazione (blocco competitivo); essi quindi riducono la secrezione di gonadotropine, occupandone il recettore e senza scatenare l'azione ormonale.[24,25] L'introduzione di questi farmaci in corso di stimolazione determina quindi una immediata soppressione dei livelli sierici di LH.

2. Protocolli di stimolazione

Diversi sono i protocolli di stimolazione attualmente in uso, ma a tutt'oggi non è stato identificato alcun farmaco o alcuno schema terapeutico, che abbia consentito di ottenere una risposta ovarica e/o dei risultati finali di trattamento nettamente superiori rispetto agli altri.

E' necessario sottolineare come esista un'ampia variabilità biologica, fra soggetti ugualmente normovulatori, nel rispondere ad un identico stimolo esogeno e questo aspetto rende estremamente complessa l'individuazione di trattamenti standardizzati.

L'esperienza del singolo centro appare il fattore determinante nell'adozione di determinati protocolli, poiché la migliore resa della crescita follicolare multipla, si deve necessariamente correlare con le particolari situazioni operative e con gli standard individualmente raggiunti.

Qualunque strategia si adoperi, gli obiettivi della induzione della crescita follicolare multipla sono:

- la maturazione di follicoli multipli, morfologicamente e funzionalmente adeguati;
- il recupero di multipli ovociti preovulatori di "buona qualità";
- la sincronizzazione dello stadio di maturazione endometriale e della crescita embrionaria.

I principali protocolli di stimolazione sono rappresentati da.

- **protocollo lungo con GnRH agonista** si basa sulla somministrazione in fase medio luteale dell'agonista del GnRH (formulazioni giornaliera o depot) allo scopo di determinare una fase di soppressione ipofisaria e solo successivamente si

procede alla stimolazione ovarica mediante gonadotropine. Rappresenta il protocollo di scelta per le pazienti “normo responder”, consente una buona sincronizzazione della crescita follicolare e diminuisce il rischio di luteinizzazione precoce. [26] (Figura 6-a)

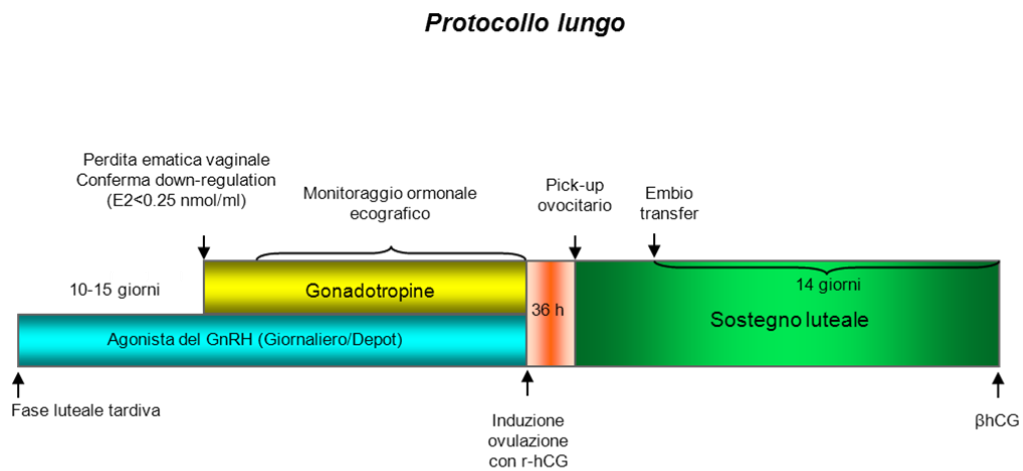


Figura 6-a: Protocollo di stimolazione ormonale mediante ciclo lungo.

- protocollo corto in flare up** si basa sulla somministrazione a partire dal secondo giorno del ciclo mestruale sia delle gonadotropine sia dell’agonista del GnRH in formulazione prevalentemente giornaliera. In questo modo, nei primi giorni di trattamento, l’iniziale stimolo al rilascio endogeno di gonadotropine dato dall’agonista del GnRH va a sommarsi alla stimolazione esogena, potenziando la fase di reclutamento dei follicoli. Successivamente questo effetto “flare up” viene meno e si instaura l’effetto di “down regulation” che permette di continuare la stimolazione fino al raggiungimento della maturità follicolare. [26] (Figura 6-b)

Protocollo corto con agonista GnRH

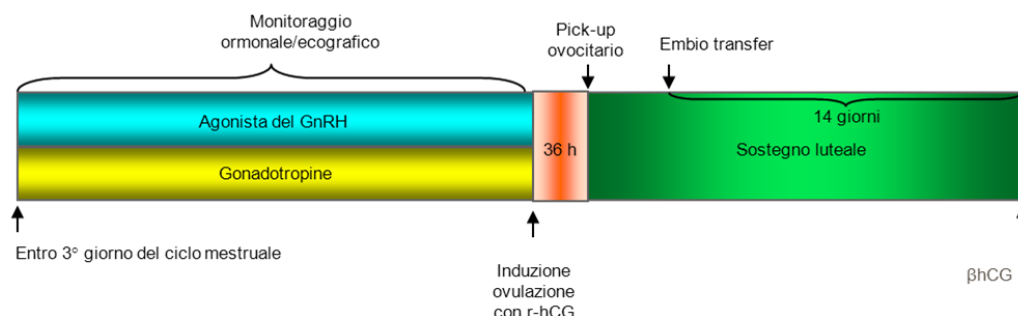


Figura 6-b: Protocollo di stimolazione ormonale mediante ciclo corto con agonista.

- **protocollo corto con antagonista** prevede l'inizio della sola stimolazione con gonadotropine sempre a partire dal secondo giorno del ciclo mestruale. La somministrazione dell'antagonista può seguire uno schema fisso e in questo caso viene introdotto sempre dopo 5 giorni di stimolazione oppure uno schema variabile qualora l'introduzione avvenga al momento del riscontro ecografico di almeno un follicolo con diametro medio di 14 mm; la sua azione di blocco alla produzione delle gonadotropine endogene è immediata. In questo modo, durante i primi giorni di stimolazione, alle gonadotropine somministrate si somma l'effetto delle gonadotropine endogene prodotte dalla paziente durante la fase follicolare precoce. L'antagonista del GnRH può essere utilizzato in dose singola o in dose frazionata con somministrazione giornaliera. [27] (Figura 6-c)

Protocollo corto con antagonista GnRH

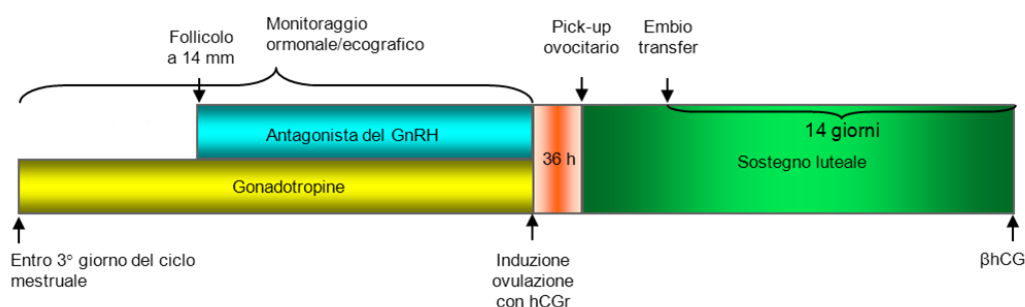


Figura 6-c: Protocollo di stimolazione ormonale mediante ciclo corto con antagonista.

Il prelievo di ovociti

Una volta ottenuta la crescita follicolare, al momento opportuno si deve procedere al recupero degli ovociti. Il prelievo ovocitario è preceduto da una singola somministrazione di hCG 36 ore prima della procedura stessa e l'induzione dell'ovulazione viene eseguito quando almeno 3 follicoli hanno raggiunto un diametro medio di 18 mm. Tale somministrazione mima il fisiologico picco ovulatorio di LH ed è fondamentale per indurre la maturazione degli ovociti che, analogamente a quanto avviene durante il ciclo mestruale, all'ovulazione portano a completamento la prima divisione meiotica. La scelta del hCG al posto dell'LH dipende dalla sua più lunga emivita (24 ore versus 20 minuti) e dalla conseguente maggior maneggevolezza.

Il primo approccio al prelievo ovocitario era stato quello laparoscopico [28] successivamente soppiantato dalla tecnica ecografica, prima per via

transaddominale e poi per via trans vaginale. Ben presto la tecnica di prelievo transvaginale con guida si è affermata come la metodica più semplice, più sicura, più rapida e più accettata dalle pazienti ed attualmente rappresenta, in pratica, l'unica utilizzata. [29,30]

Gli ovociti, dopo essere stati recuperati con il prelievo del liquido follicolare, vengono preincubati in incubatore a 37°C e 5% CO₂. Nel 1982 Trounson [31] avevano osservato che, lasciando ad incubare gli ovociti per 5-6 ore prima di inseminarli, la percentuale di fecondazione e il numero di embrioni ottenuti aumentava enormemente. Questo periodo, denominato pre-incubazione, permetteva a molti ovociti di raggiungere lo stadio di metafase II, ottenendo così un notevole miglioramento dei tassi di fecondazione. Nei protocolli attuali tale periodo dura 3 o 4 ore e permette di recuperare un 65% di ovociti in metafase II.

La fecondazione

Dopo il pick up e la preincubazione degli ovociti, viene richiesta al partner maschile la raccolta del liquido seminale. Successivamente ovociti e spermatozoi vengono messi in fecondazione secondo due diverse tecniche: FIVET (Fertilizzazione In Vitro con Embryo Transfer) o ICSI (Intracytoplasmatic Sperm Injection).

Gli ovociti destinati alla FIVET conserveranno il complesso di cellule cumulo ooforo-corona radiata e verranno posti, per la fecondazione, a contatto con gli spermatozoi precedentemente preparati. Sarà lo spermatozoo da solo a penetrare nell'ovocita e fecondarlo.

Nel caso ci sia indicazione ad una tecnica ICSI, gli ovociti devono precedentemente essere denudati dalle cellule del cumulo-corona radiata e in questo modo verranno selezionati solo gli ovociti maturi. [32]

Dopo la decoronizzazione degli ovociti, si possono distinguere:

- **Ovocita MII (metafase II)**

Ovocita maturo che ha completato la prima meiosi e che ha estruso il primo globulo polare. Solamente tale ovocita è idoneo alla fecondazione. (Figura 7-a)



Figura 7-a: Ovocita MII e sue componenti caratteristiche.

- **Ovocita MI (metafase I)**

Ovocita immaturo che non può essere utilizzato per le tecniche di fecondazione in vitro. Non ha ancora completato il processo di maturazione e non presenta il globulo polare. (Figura 7-b)

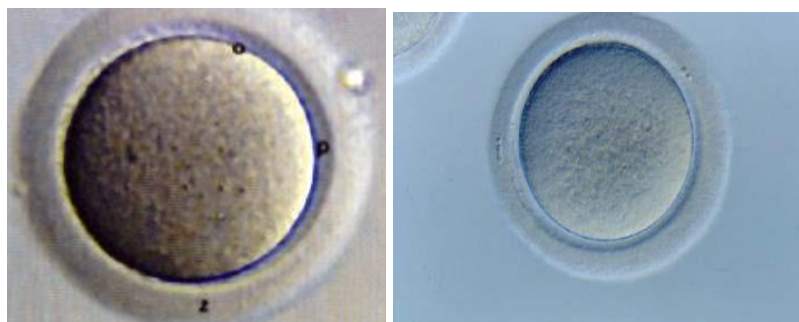


Figura 7-b: Ovociti MI.

- **Vescicola germinale**

Ovocita immaturo che ha appena finito la divisione mitotica o è arrestato nella profase della prima divisione meiotica. In questo stadio il nucleo dell'ovocita è evidente nel complesso del citoplasma e prende il nome di vescicola germinale (VG). (Figura 7-c)

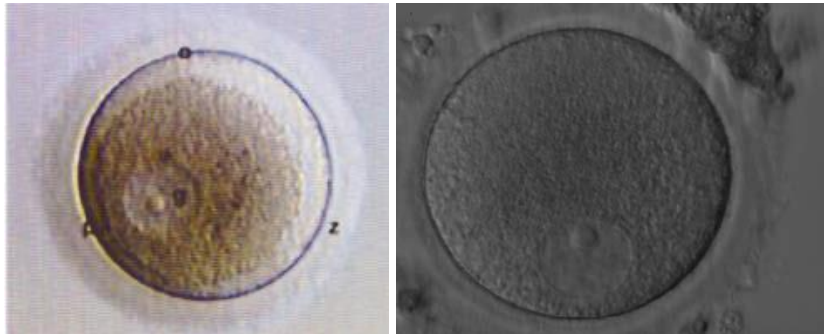


Figura 7-c: Vescicole germinali VG.

La ICSI è una tecnica di micromanipolazione e consiste nell'iniezione di un singolo spermatozoo, selezionato sulla base della morfologia e della motilità, all'interno dell'ovocita maturo per ottenere la fecondazione. [33,34] (Figura 8)

I vari passaggi possono essere così riassunti:

L'ovocita maturo viene agganciato con una speciale micropipetta, "holding pipete";

- Un singolo spermatozoo viene immobilizzato ed aspirato all'interno di un microago, "injection pipete";
- L'"injection pipete" contenente lo spermatozoo viene inserita lentamente all'interno del citoplasma dell'ovocita;

- Lo spermatozoo viene depositato delicatamente all'interno dell'ovocita e l'"injection pipete" viene lentamente rimossa;

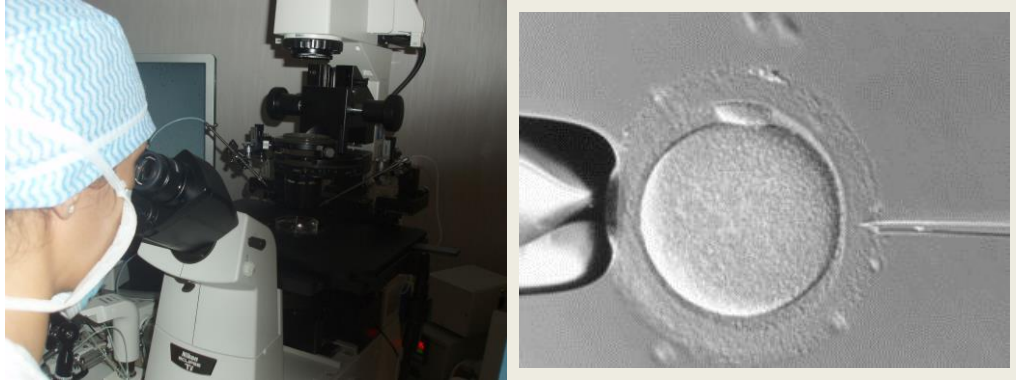


Figura 8: Micromanipolatore e iniezione intracitoplasmatica del singolo spermatozoo mediante tecnica ICSI.

Il giorno dopo l'inseminazione viene effettuato il controllo delle fertilizzazioni.

[35,36] Si considerano (Figura 9):

- normalmente fertilizzati (2PN) gli ovociti che presentano due pronuclei (PN), uno di origine materna e uno paterno e due globuli polari;
- non fertilizzati gli ovociti che non mostrano pronuclei;
- fertilizzati in maniera anomala (>3 PN) gli ovociti con più PN.



Figura 9: In successione ovocita correttamente fertilizzato con 2 pronuclei all'interno del citoplasma e ovocita fertilizzato in maniera anomala con 3 pronuclei all'interno del citoplasma.

Lo sviluppo embrionale

Il clivaggio dell'embrione coinvolge una serie di divisione mitotiche del citoplasma senza un aumento del volume dell'embrione, che rimane praticamente costante durante tutto il periodo, circondato dalla zona pellucida.

Ogni blastomero mantiene la capacità di svilupparsi indipendentemente, in un embrione normale, per diverse divisioni cellulari prima di esaurire la capacità di totipotenza. Tutti i blastomeri sono in grado di comunicare tra di loro attraverso dei canali proteici presenti e condivisi dalle membrane di due cellule adiacenti, che consentono il passaggio di molecole di circa 1000 di peso molecolare. Un regolare clivaggio a 2 cellule è osservato a 22-24 ore dall'inseminazione, un clivaggio a 4 cellule è osservato attorno alle 36-50 ore dall'inseminazione e in fine un clivaggio a 8 cellule viene osservato a 72 ore. I blastomeri sono perfettamente definiti fino allo stadio di 10-12 cellule dopo di che è molto difficile valutare il grado di sviluppo perché l'embrione inizia a compattarsi per dare origine alla blastocisti. (Figura 10)

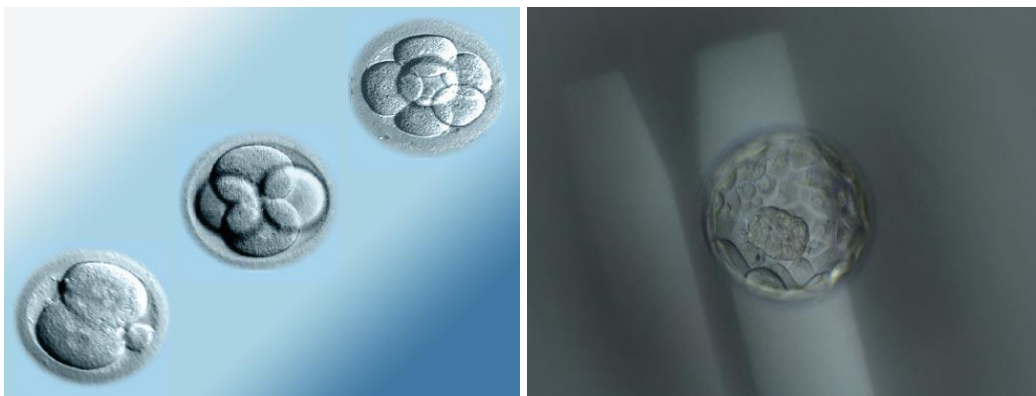


Figura 10: In successione embrione a 2 cellule, 4 cellule, 8 cellule e blastocisti.

La selezione dell'embrione, con le più alte potenzialità di impianto, è basata quasi esclusivamente sull'osservazione morfologica. Per garantire maggiori possibilità di successo normalmente vengono trasferiti più di un embrione. Tra i fattori maggiormente importanti per la selezione embrionale ricordiamo: lo stadio di sviluppo, le percentuali di frammentazione [37,38], la presenza di un nucleo in ogni blastomero [39], l'uniformità nella dimensione dei blastomeri [37,40] e la simmetria di clivaggio. [41]

Il trasferimento degli embrioni in cavità uterina

Storicamente la tecnica del trasferimento degli embrioni è un procedimento poco studiato rispetto alle altre procedure della riproduzione assistita. Solo recentemente si è presa coscienza di come esso rappresenti la tappa più importante di tutto il procedimento della fecondazione in vitro, così come la più delicata. [42] Infatti basti pensare che il recupero di almeno 1 ovocita al prelievo ovocitario si ha nel 95% dei casi, i tassi di fecondazione oscillano tra il 60% e il 95%, l'80% delle pazienti giunge al transfer ma solo il 15-40% avrà poi una gravidanza. Molti fattori sembrano coinvolti nelle possibilità di successo, tra cui l'età della paziente, il tipo di stimolazione, le condizioni del prelievo ovocitario e della coltura degli ovociti, la qualità dell'embrione e la tecnica dell'embrio-transfer.

Infine gioca un ruolo di primo piano il fattore endometriale, in quanto le ripercussioni della stimolazione ovarica sull'endometrio uterino potrebbero contribuire ai fallimenti di impianto. Nei cicli stimolati infatti si ha un aumento

del rapporto Estradiolo/progesterone con tassi elevati di estradiolo, che provocano una maturazione più rapida dell'endometrio nella fase luteale. [43]

LA STIMOLAZIONE OVARICA NELLE PAZIENTI “POOR RESPONDER”

In base alla risposta ovarica alla stimolazione ormonale mediante gonadotropine, si possono distinguere pazienti con normale risposta ovarica (Normo responder), pazienti con elevata risposta (High responder) e pazienti con scarsa risposta alla stimolazione (Poor responder).

La definizione di “Poor responder” è stata per molti anni eterogenea e al suo interno sono rientrate tutte quelle donne che, sottoposte ad una stimolazione ovarica controllata, o andavano incontro ad una crescita follicolare esigua o recuperavano un basso numero di ovociti al pick up e di conseguenza avevano a disposizione pochi embrioni per l'embrio-transfer.

Parametri precisi ed univoci per la definizione di cattiva risposta alla stimolazione ormonale, non sono mai stati definiti ed in una review del 1999 sono riportate ben 35 diverse definizioni. [44]

Per alcuni autori una scarsa risposta alla stimolazione poteva essere definita in caso di picco massimo di 17β estradiolo inferiore a 300 pg/ml, per altri inferiore a 500 pg/ml, per altri ancora in caso di 17β estradiolo inferiore a 100 pg/ml dopo 5 giorni di gonadotropine al dosaggio standard. In molti studi la definizione di “cattiva risposta alla stimolazione” veniva stabilita sulla base del numero di follicoli sviluppati o di ovociti recuperati al pick up ma anche in questo caso,

senza mai fissare dei limiti numerici precisi. Secondo altri autori, già nella fase diagnostica, mediante i test di riserva ovarica associati all'età anagrafica, era possibile individuare le pazienti a cattiva prognosi. Importanti indicazioni inoltre potevano essere fornite dal risultato di precedenti trattamenti di stimolazione ormonale.

Come conseguenza di questa enorme eterogeneità di definizione, i vari studi condotti nel tentativo di individuare la miglior strategia terapeutica per queste pazienti, non hanno portato, fino a questo momento, risultati significativi ma soprattutto non sono tra loro confrontabili per l'estrema eterogeneità dei campioni.

La rivalutazione della letteratura presente ha portato alla stesura, nel corso di un consensus ESHRE (European Society of Human Reproduction and Embryology), dei criteri di Bologna per la definizione di “poor response” alla stimolazione ovarica per la fecondazione in vitro. [45]

Secondo questo documento la definizione di “poor response” deve comprendere almeno 2 dei seguenti punti:

- Età materna avanzata ≥ 40 anni o altri possibili fattori di rischio anamnestici per POR (poor ovarian response)
- Una precedente POR definita come il recupero di un numero di ovociti ≤ 3 dopo una stimolazione ovarica standard
- Un test di riserva ovarico alterato in particolare la presenza di un numero di follicoli antrali AFC $< 5-7$ o un valore di AMH $< 0.5-1.1$ ng/ml
- Due precedenti trattamenti caratterizzati da una scarsa risposta alla massima stimolazione ovarica (criterio sufficiente da solo).

Tale definizione rappresenta il primo tentativo realistico da parte di una comunità scientifica, quale l'ESHRE, di standardizzare la definizione di "poor responder" in modo semplice e riproducibile e fare in modo che gli studi successivi ad essa possano comprendere una popolazione il più possibile omogenea e confrontabile. Inoltre la presenza di una definizione univocamente accettata potrà anche fornire una corretta stima dell'incidenza di tale sottogruppo, nella popolazione di donne che si sottopongono a tecniche di fecondazione medicalmente assistita.

Come sottolineato dagli autori stessi, lo scopo di questa definizione non ha voluto, in alcun modo, individuare un gruppo di pazienti a cattiva prognosi da escludere da possibili trattamenti. Vari studi hanno dimostrato come le gravidanze possano essere ottenute e portate a termine anche nelle cattive risponditrici, anche se bisogna sottolineare come, anche all'interno di questo gruppo appena definito, esistano delle differenze soprattutto in termini di risultato finale del trattamento: ad esempio una "poor responder" giovane ha, in termini di ottenimento della gravidanza, una prognosi migliore di una donna in cui la cattiva risposta ovarica dipende principalmente dall'età avanzata.

Questa sottopopolazione di donne che si rivolge ai centri di procreazione assistita sta assumendo un rilevanza sempre maggiore in termini quantitativi e rappresenta attualmente uno dei maggiori scogli per gli specialisti che si occupano di Medicina della Riproduzione.

Il numero sempre crescente è per la maggioranza dovuto all'aumentare delle coppie che ritardano il loro progetto riproduttivo ad età superiore ai 40 anni. A questo proposito molte strutture hanno allargato il limite anagrafico entro il quale

poter accedere alle tecniche di PMA e anche a livello istituzionale, in alcuni casi, è emersa la volontà di garantire questi trattamenti alle donne di età più avanzata.

Nella Deliberazione della Giunta Regionale Veneta N. 822 del 14 giugno 2011 è stato allargato l'accesso alle tecniche di PMA come riportato in seguito:

“.....si propone che:

- *l'età di accesso delle coppie sia così determinato:*
 - ✓ *età femminile fino al compimento di 50 anni*
 - ✓ *età maschile fino a compimento di 65 anni*
- *il numero dei cicli sia così determinato:*
 - ✓ *4 cicli di trattamento di 1° livello nei limiti di dosaggio previsti dalla nota AIFA 74*
 - ✓ *3 cicli di trattamento di 2° livello (pazienti arrivate ad eseguire il Pick up) nei limiti di dosaggio previsti dalla nota AIFA 74.*

Circa l'età di accesso per le donne, essa viene determinata come sopra riportato in quanto si ritiene opportuno tener conto dell'aspettativa di vita in crescita, degli sviluppi della ricerca scientifica e quindi dare una maggiore opportunità alle donne..”.

In Italia, la regione Veneto è l'unica ad aver allargato in modo così significativo l'età di accesso alle tecniche mentre nelle altre regioni rimane un limite d'età variabile ma in media tra i 41 e 43 anni.

Anche se attualmente la maggioranza delle pazienti con cattiva risposta alla stimolazione ovarica sono rappresentate da donne in età riproduttiva avanzata e con conseguente fisiologica diminuzione della riserva ovarica, non dimentichiamo che all'interno di questo eterogeneo gruppo fanno parte anche donne in cui è stata

documentata una diminuita riserva ovarica ed un'inappropriata risposta alla stimolazione ormonale indipendentemente dall'età.

Età e fertilità

Al momento attuale l'età rimane il più rilevante determinante nella fertilità femminile, sia essa naturale o legata a trattamenti di procreazione assistita. [46] Molte donne pospongono la ricerca di una gravidanza convinte che le tecniche di procreazione assistita possano sopperire al naturale calo della fertilità e che possano essere ugualmente efficaci indipendentemente dall'età. Da varie ricerche è emerso come la fertilità mensile inizi a decrescere già a partire dai 30 anni, mentre la perdita della fertilità (intesa come l'età all'ultimo figlio in assenza di controllo riproduttivo) venga indicata ad un'età media di 41 anni. [47](Figura 11)

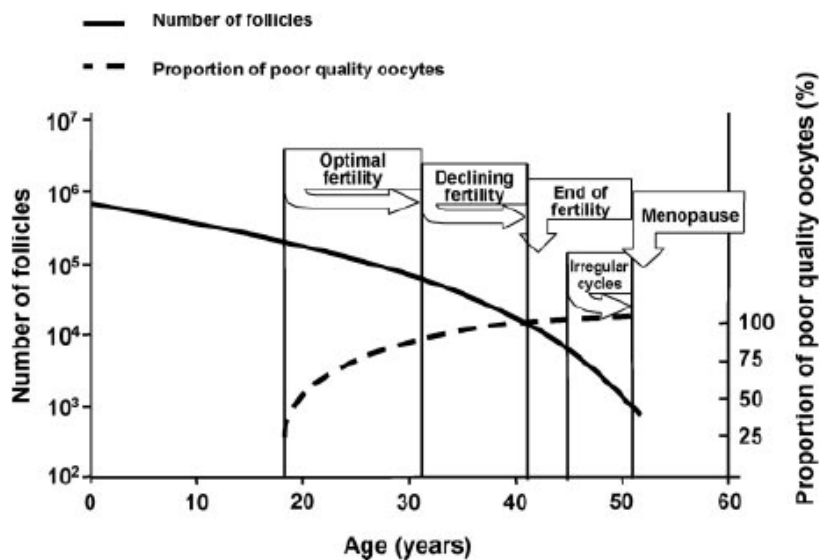


Figura 11: Rappresentazione schematica della progressiva diminuzione sia quantitativa che qualitativa della riserva ovocitaria in relazione all'età. Tratta da Broekmans FJ et al.2009.

E' noto da molti anni come, con l'avanzare dell'età della donna, si assista ad un progressivo depauperamento del numero dei follicoli primordiali presenti a livello della corteccia ovarica.

Parallelamente al declino in termini numerici anche la qualità degli ovociti va incontro ad un progressivo peggioramento e questo va ricondotto principalmente ad un aumentata ricorrenza di non disgiunzioni meiotiche, con il risultato di un elevato tasso di embrioni portatori di aneuploidie. [48,49]

Markers di riserva ovarica

Allo scopo di sopperire al silenzioso declino della fertilità e al suo manifestarsi solo in stadi avanzati, sono stati sviluppati vari markers sia ormonali che ecografici atti a fornire indicazioni sulla riserva ovarica di ciascuna donna. Attualmente tra i più utilizzati ricordiamo:

Conta ecografica dei follicoli antrali

Si definisce come il numero totale di follicoli antrali delle dimensioni comprese tra 2 e 10 mm presenti in entrambe le ovaie, visibili durante una ecografia trans vaginale eseguita tra il secondo e il quinto giorno del ciclo mestruale.

Vari studi hanno dimostrato come esista una forte correlazione tra il numero di follicoli antrali e la risposta alla stimolazione ovarica controllata [50] e anche tra una bassa AFC e la fase di transizione menopausale. [51]

La conta dei follicoli antrali rappresenta quindi un ottimo marker dell'aspetto quantitativo della riserva ovarica.

AMH (Anti Mullerian Hormone)

E' una glicoproteina dimerica prodotta esclusivamente dalle cellule della granulosa di follicoli preantrali e di follicoli antrali iniziali (2-7 mm). Quando i follicoli iniziano a differenziarsi dalla fase primordiale a quella primaria inizia la produzione di AMH che persiste fino al raggiungimento dello stadio medio antrale, quando l'AMH inizia ad avere effetto inibitorio sia sul reclutamento di altri follicoli primari sia va a diminuire la sensibilità dei follicoli antrali all'FSH, impedendo loro lo sviluppo verso follicoli preovulatori. [52] (Figura 12)

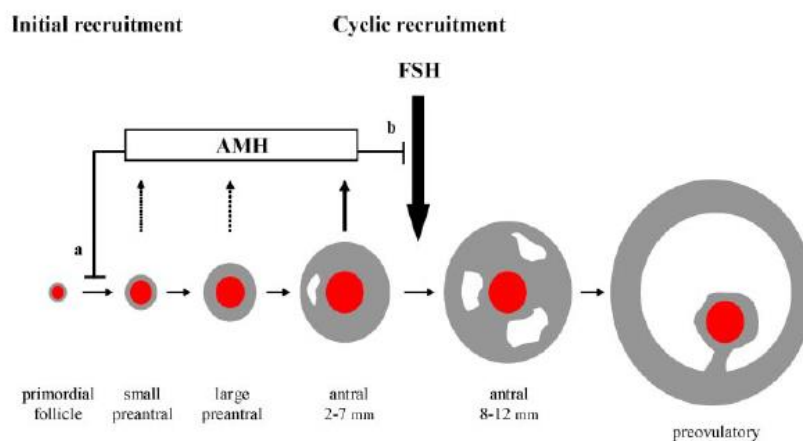


Figura 12: Ruolo dell'AMH nella crescita follicolare. Tratta da Broekmans FJ et al. 2008.

Il dosaggio sierico dell'AMH riflette quindi principalmente il pool dei piccoli follicoli antrali, che a loro volta riflette quello dei follicoli primordiali.

Attualmente l'AMH è il parametro più utilizzato per la determinazione della riserva ovarica, ha il vantaggio di poter essere dosato in un qualsiasi momento del ciclo mestruale ed è soggetto, rispetto all'FSH, ai minor variabilità interciclo.

[53,54]

Trattamento delle pazienti “poor responder”

In letteratura non esiste un approccio ideale per il trattamento delle pazienti “poor responders” [55] e vari sono i protocolli suggeriti per migliorare la risposta alla stimolazione ovarica tra i quali ricordiamo:

- aumento della dose di gonadotropine;
- protocollo flare-up con GnRH-a;
- uso di mini dosi di GnRH-a;
- uso di Clomifene citrato + gonadotropine estrattive o ricombinanti;
- combinazioni di gonadotropine (FSH-r/HMG, FSH-r/LH-r);
- protocolli con GnRH antagonisti;
- uso preliminare di CO (contraccettivi orali);
- uso del Letrozolo + gonadotropine estrattive o ricombinanti.

Nessuna di queste strategie si è dimostrata essere, dai dati presenti in letteratura, superiore o preferibile rispetto alle altre e questo è dovuto alla mancanza di omogeneità nella definizione dei campioni, come già discusso in precedenza.[56,57] L'unico trattamento che, secondo la maggioranza degli studi, sarebbe da evitare è rappresentato dal protocollo lungo con down-regulation in quanto l'“oversuppression” ovarica causata dai GnRH agonisti si traduce in un prolungamento dei cicli, maggiori costi di trattamento senza miglioramento dei risultati. [55,58]

STEM CELL FACTOR E c-KIT

Stem Cell Factor (SCF) è un fattore pleiotropico di crescita, noto anche come KIT ligando, Steel factor o Mast Cell Growth [59], che svolge un ruolo fondamentale nella ematopoiesi, nella gametogenesi, e nella melanogenesi [60,61,62], attraverso la regolazione di molti processi biologici, come la proliferazione cellulare, il differenziamento, la migrazione e l'apoptosi [63,64]. c-KIT è un recettore di tipo III tirosin-chinasico [65] che interagisce con Stem Cell factor. SCF ed il suo recettore c-Kit vengono prodotti principalmente dalle cellule ematopoietiche, come monociti, cellule del midollo osseo, ma anche da diverse cellule non ematopoietiche, come fibroblasti, cellule endoteliali, cellule progenitrici delle isole pancreatiche etc. [66,67,68,69]. SCF è ampiamente espresso durante l'embriogenesi e si trova nel cervello, nell'endotelio, nei gameti, nel cuore, nel rene, nel polmone, nei melanociti, nella pelle, nelle cellule stromali del midollo osseo, nel fegato e nel timo [70]. Il pattern di espressione di SCF e di c-kit è stato studiato dapprima nell'uomo, nelle pecore e nei roditori. Livelli di espressione anomali di SCF e c-KIT sono stati associati a disturbi riproduttivi e ad infertilità [71,72,73]. E' noto che la fertilità umana dipenda da diversi fattori psicologici, fisici e biochimici, tra cui l'intricata e complessa regolazione ormonale che governa la produzione e la maturazione delle cellule germinali. Nello specifico, la spermatogenesi e l'ovogenesi, sono coordinati da una serie di ormoni e fattori paracrini in risposta all'attività dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi [74]. È interessante notare che recenti studi hanno dimostrato che sia gli ormoni ipofisari che gonadici, regolano i livelli di espressione tissutale di SCF e c-KIT [75,76,77].

STRUTTURA di c-Kit e SCF

Sia c-KIT che SCF mostrano isoforme distinte, che differiscono per la posizione, nella membrana cellulare o a livello citoplasmatico [78].

c-Kit

Una forma tronca citoplasmatica di c-KIT (tr-KIT), con solo una parte del dominio chinasi e la coda carbossiterminale (Figura 14A), è originata da un meccanismo che prevede l'utilizzo di un promotore alternativo [79]. c-KIT può essere scisso proteoliticamente originando una isoforma solubile (s-KIT, Figura 13A) [80,81]. L'interazione di SCF con c-KIT porta alla dimerizzazione del recettore, all'attivazione della sua attività tirosin chinasi ed all'apertura di vie di trasduzione del segnale [82].

SCF

SCF è presente a livello della membrana cellulare come omodimero non covalente (mSCF) [83,84,85], ed il taglio proteolitico attivato da una variante di splicing alternativo dà origine alla sua isoforma solubile (sSCF, Figura 13B.) [70,86].

Entrambe le isoforme contengono inizialmente un dominio extracellulare, un segmento transmembrana, ed una componente intracellulare [87]. Il precursore isoforma 1, da cui il fattore solubile è derivato, contiene 273 amminoacidi. I residui 1-25 comprendono la sequenza di segnale, i residui 26-214 compongono il dominio extracellulare, i residui 215-237 rappresentano il segmento transmembrana, ed i residui 238-273 costituiscono la componente intracellulare.

In seguito alla rimozione della sequenza segnale, un'elaborazione aggiuntiva porta alla formazione della forma solubile di SCF (residui 26-189). L'enzima che

catalizza la liberazione di SCF solubile dall'isoforma 1 è una metalloproteasi-9 [88]. L'isoforma 2 contiene 28 aminoacidi in meno. Negli esseri umani, l'isoforma 2 non ha il sito di taglio della metalloproteasi-9 e si trova ancorata alla membrana.

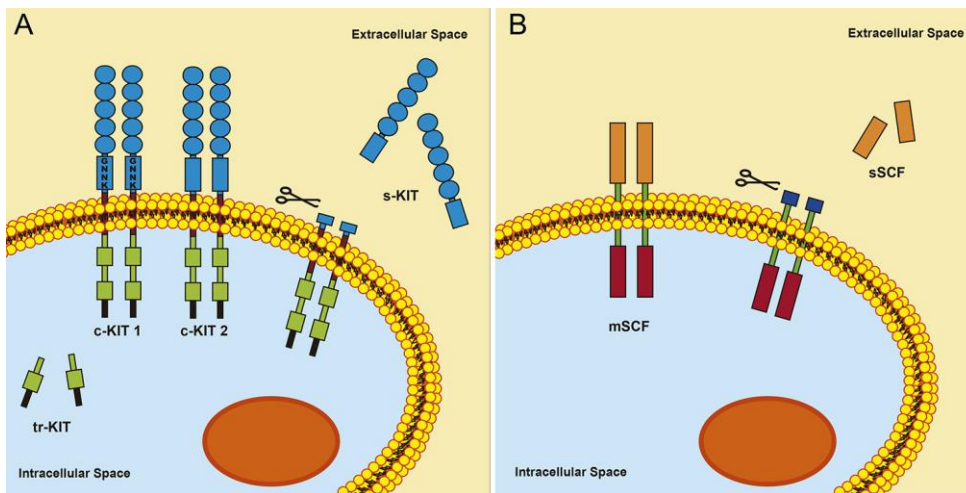


Figura 13 Isoforme di membrane, citoplasmatiche e solubili di c-KIT (A) and SCF (B).

Nishikawa S, Kusakabe M, et al.2014 (A)

La proteina c-KIT contiene tre domini funzionali: i) il dominio extracellulare che interagisce con il ligando, che contiene i cinque tipici domini immunoglobulin-like (blu); ii) il dominio transmembrana (marrone); iii) il dominio citoplasmatico che contiene i domini prossimale e distale, separati da una regione interchinasica (verde), e una coda carbossiterminali (nero). c-KIT presenta diverse forme derivate da splicing alternativo caratterizzate dalla presenza o assenza del tetrapeptide Gly-Asn-Asn-Lys (GNNK) nel dominio extracellulare juxtamembrana (c-KIT 1 e c-KIT 2, rispettivamente). Il c-kit può essere scisso proteoliticamente dando origine ad una isoforma solubile (s-KIT) rilasciata nello spazio extracellulare. Un meccanismo che prevede l'utilizzo di un promotore alternativo origina una isoforma troncata citoplasmatica di c-KIT (tr-KIT), che manca del dominio extra-cellulare, della regione transmembrana e parte del dominio chinasico. (B) SCF, esiste come isoforma di membrana (mSCF) o può subire un taglio proteolitico originando una isoforma solubile (sSCF).

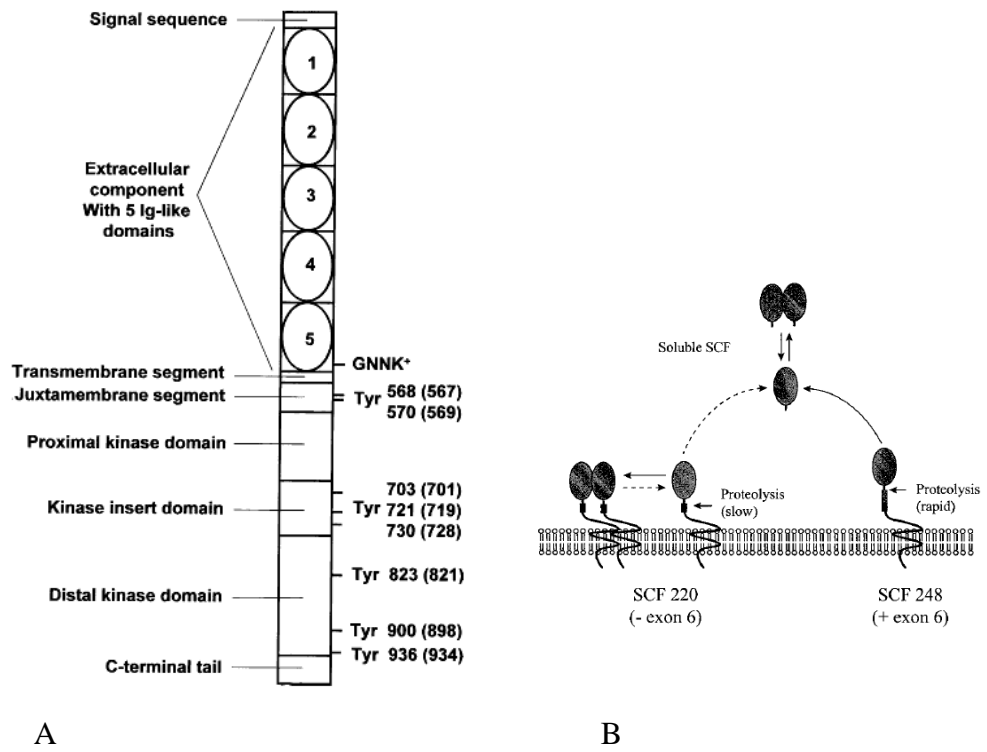


Figura 14 A) Siti Tirocinici e organizzazione di Kit. R.Roskoski Jr. "Signaling by Kit protein-tyrosine kinase – The Stem Cell Factor receptor. B) Generazione di SCF. L.K.

Ashmsn "The Biology of Stem Cell Factor and its receptor C-kit".

DISTRIBUZIONE E FUNZIONE NELLE GONADI DI SCF/c-KIT

Ovaio

Nell'ovaio c-KIT è principalmente espresso negli ovociti, mentre le cellule della granulosa sintetizzano SCF che è ampiamente riconosciuto come uno stimolatore di crescita dell'ovocita. Le cellule della granulosa, infatti, secernono tutti i fattori nutrizionali richiesti per la crescita dell'ovocita [89]. L'interazione recettore-ligando, stabilendo una comunicazione tra gli ovociti e le cellule della granulosa, è anche coinvolto nello sviluppo dei follicoli primordiali, nella crescita dei follicoli primari e follicoli preovulatori. [90; 91].

In generale, le cellule primordiali germinali, le cellule della teca e gli ovociti esprimono il recettore c-kit, mentre le cellule della granulosa e le cellule epiteliali dell'ovaio producono SCF. SCF, dunque, parrebbe essere coinvolto anche nella fertilità femminile e la sua presenza a livello sierico e/o follicolare potrebbe essere predittiva dell'outcome dei trattamenti IVF.

Un recente studio [92] condotto su pazienti sottoposte a trattamenti di Procreazione Medicalmente Assistita, mette in evidenza come la concentrazione di SCF sia soggetta a continue fluttuazioni durante il ciclo mestruale, a partire dal processo di maturazione follicolare, all'ovulazione, all'impianto ed all'eventuale gravidanza.

Lo studio mette in relazione SCF dosato nel liquido follicolare e nel sangue, evidenziandone nessuna significativa differenza in termini di concentrazione: in ogni caso, la presenza di SCF nel liquido follicolare suggerisce che questo fattore sia coinvolto nello sviluppo del follicolo ovocitario. E' stato dimostrato infatti che

proprio durante lo sviluppo follicolare, i follicoli siano uno dei maggiori produttori di SCF. Ancora, è stata osservata un'importante e positiva correlazione tra la concentrazione totale di gonadotropine utilizzate durante i trattamenti IVF, dosaggi di Estradiolo, SCF sierico e follicolare ed il numero di follicoli sviluppati dopo stimolazione. Sembra che SCF diminuisca nelle pazienti "high responder" alla terapia ormonale.

Gonadotropine e SCF/c-Kit

GnRH (Gonadotropin-Releasing Hormone)

L'ormone GnRH stimola l'ipofisi a secernere FSH (ormone follicolo-stimolante) e LH (ormone luteinizzante). Gli agonisti e gli antagonisti di GnRH sono utilizzati nei trattamenti di procreazione assistita ed alcuni benefici di queste somministrazioni si associano a variazioni dei livelli di SCF nelle cellule ovariche. Recentemente è stato descritto l'effetto di agonisti di GnRH (triptorelina) e di antagonisti del GnRH (cetorelix) sull'espressione di SCF nelle cellule della granulosa. Trattamenti con $10^{-7}M$ di cetorelix aumentano notevolmente mRNA di SCF e la sua espressione proteica, invece trattamenti con triptorelina non cambiano i livelli di SCF [93]. Questo suggerisce che gli agonisti e gli antagonisti di GnRH possono avere effetti distinti sull'espressione di fattori ovarici autocrini/paracrini come SCF, incidendo in modo diverso sulla riserva ovarica [93; 94]. In sintesi le azioni di GnRH alterano l'espressione di SCF, così come la sua localizzazione nei compartimenti cellulari.

FSH

Saggi sperimentali che utilizzano l'actinomicina come inibitore della trascrizione e la cycloheximide come inibitore della traduzione indicano che la regolazione del FSH sull'espressione di SCF interviene a livello trascrizionale indipendentemente dalla sintesi de novo di proteina [95].

Nell'ovaio, l'FSH regola il rilascio di diversi fattori paracrini che portano alla crescita dell'ovocita. Sembra che il ruolo dell'FSH sia correlato al SCF in quanto il numero dei follicoli primordiali FSH-stimolati diminuisce in presenza di un anticorpo per SCF [96]. E' stato dimostrato infatti che l'FSH modula l'espressione di SCF nelle cellule della granulosa del topo e dei bovini [97; 98]. Tuttavia è stato riscontrato un doppio effetto nelle cellule della granulosa del topo: basse dosi di FSH aumentano l'espressione di mSCF diminuendo il rapporto tra la forma solubile e quella di membrana. D'altra parte alti livelli di FSH aumentano il suddetto rapporto [98]. Nonostante entrambe le dosi di FSH aumentino il diametro dei complessi ovocita-cellule della granulosa, solo basse dosi promuovono la crescita dell'ovocita e questa crescita viene inibita nel momento in cui c-KIT viene bloccato. E' interessante notare che quando viene aggiunta la forma s SCF in modo esogeno, la crescita degli ovociti FSH-stimolati viene soppressa, suggerendo in questo modo che gli effetti della crescita sono dipendenti dal rapporto s SCF/m SCF [98]. Ancora, è stato dimostrato che la regolazione di FSH sulla crescita degli ovociti prevede un'interazione tra le cellule della granulosa e della teca mediata dall'azione di SCF [97].

LH

Diversi autori hanno descritto la regolazione di SCF e di c-KIT da parte della gonatropina. Trattamenti che prevedono l'LH come agonista aumentano l'espressione di SCF sulla superficie dell'epiterio ovarico [99] e nelle cellule della granulosa [100; 101; 97]. Le azioni dell'LH possono essere mediate direttamente dal recettore presente sulle cellule della granulosa [102], o indirettamente attraverso le cellule della teca, che esprimono i geni che regolano l'attività delle cellule della granulosa [97]. Tuttavia l'aumento dell'espressione di SCF in risposta all'LH è collegato alla crescita epiteliale ovarica ed allo sviluppo follicolare [100; 101; 99 ;97]. Ancora, altri studi descrivono l'effetto dell'LH sui livelli di regolazione di c-KIT. Ciò nonostante questi studi hanno prodotto dei risultati contraddittori: alcuni indicano che l'LH induce una diminuzione dell'espressione di c-KIT al livello delle cellule della teca e interstiziali [101], altri hanno dimostrato che l'LH non è in grado di modulare i livelli di c-KIT [103]. Sono dunque necessari ulteriori studi per comprendere a fondo quale delicato ruolo svolgano gli ormoni gonatotropici nella modulazione dell'espressione di SCF/c-KIT nell'ovaio.

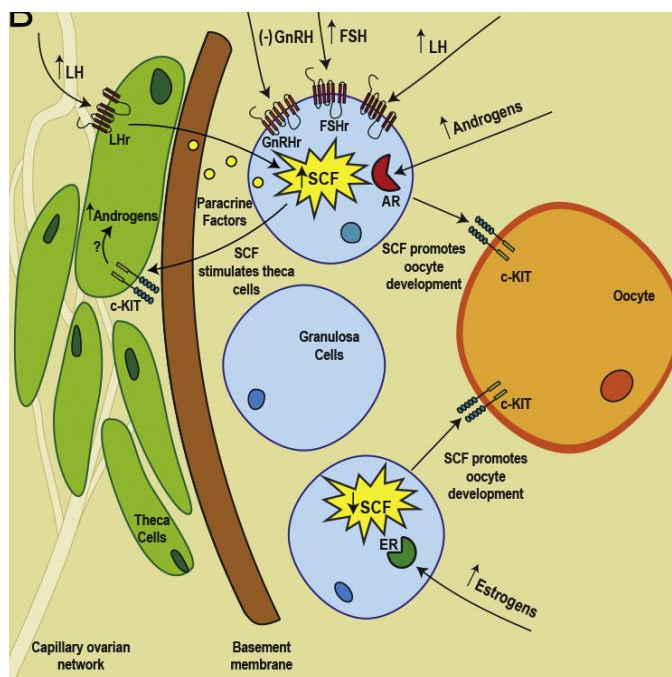


Figura 15. Regolazione ormonale di SCF/c-KIT nell'ovaio.

Gli antagonisti di GnRH portano ad un aumento dell'espressione di SCF attraverso un'azione diretta a livello delle cellule della granulosa, che esprimono il recettore di GnRH. L'LH può interagire con le cellule della granulosa direttamente con i loro recettori, o indirettamente attraverso le cellule della teca che rilasciano fattori paracrini che stimolano le cellule delle stesse variando in questo modo le concentrazioni di SCF.

(M.I. Figueira et al., 2014)

ESTROGENI (E_2 - 17β estradiolo)

L'effetto degli estrogeni, che è noto promuovere la migrazione e la proliferazione delle cellule germinali primordiali, risulta in qualche modo correlato all'espressione ed all'attività di SCF e c-Kit. Alcuni studi riportano infatti che trattamenti con gli estrogeni, sono in grado di aumentare l'espressione della forma solubile di SCF: parrebbe che i recettori per gli estrogeni, $ER\alpha$, interagiscano con AP-1 presente nel gene che codifica per SCF [104]. Ancora, l'utilizzo di anticorpi

anti-SCF bloccano la proliferazione cellulare indotta dal 17β estradiolo. La letteratura riporta inoltre che la stimolazione in vitro delle cellule germinali primordiali con E_2 , porta alla fosforilazione di c-Kit ed all'attivazione di una cascata fosforilativa di segnali intracellulari: è un processo ormai noto l'attivazione della fosfatidilinositolo 3 chinasi (PI3-K) e del suo bersaglio a valle Akt serina/treonina chinasi [105]. Sono stati successivamente condotti ulteriori studi che hanno dimostrato che utilizzando un potente inibitore di Akt c-Kit dipendente, ed uno specifico inibitore di PI3-K, la crescita delle cellule germinali primordiali ne risultava compromessa [104].

PARTE SECONDA

MATERIALI E METODI

Nell'intervallo temporale tra Gennaio 2012 e Dicembre 2014 è stato condotto uno studio osservazionale cross-matched di coorte in pazienti “poor responder” afferite presso l'unità di Procreazione Medicalmente Assistita della Clinica Ostetrica e Ginecologica – Dipartimento di Salute della Donna e del Bambino dell'Università di Padova. Tutte le pazienti incluse nello studio sono state correttamente informate riguardo ad esso, e hanno acconsentito all'utilizzo dei loro dati in accordo con la Legge sulla Privacy 675/96, previa firma del consenso informato. Sono state considerate eleggibili pazienti stimate “poor responder” in accordo ai criteri di Bologna [45] che avessero effettuato almeno un trattamento di stimolazione ovarica convenzionale (trattamento A). Le stesse sono state sottoposte ad un trattamento di stimolazione ovarica con l'aaggiunta di rLH (trattamento B) in caso di esito non positivo dopo il primo trattamento.

Pazienti

Tutte le pazienti incluse nello studio sono state correttamente informate riguardo ad esso, e hanno acconsentito all'utilizzo dei loro dati in accordo con la Legge sulla Privacy 675/96, previa firma su di un consenso informato.

Nello specifico sono state considerate “poor responder” pazienti con:

- età materna avanzata (≥ 40 anni) o qualora siano presenti altri fattori di rischio per una POR, come fattori genetici o ambientali, quali endometriosi, fattore tubarico, sindrome di Turner, menopausa precoce...;

- una precedente POR dopo una stimolazione con protocollo convenzionale che porta alla crescita di un numero ≤ 3 follicoli dominanti ed al recupero di un numero ≤ 4 di ovociti recuperati in laboratorio;
- valori anormali ai test di riserva ovarica (ORT); i due test più attendibili ad oggi, ed ai quali verrà fatto riferimento, sono la determinazione della concentrazione dell'ormone AMH e la conta dei follicoli antrali AFC (AMH $< 0,5 - 1,1$ ng/ml; AFC $< 5-7$ follicoli).

Sono stati considerati criteri di esclusione: fumo (per entrambi i partner) nei 6 mesi precedenti al trattamento, trombofilia acquisita o ereditaria, precedenti di chemioterapia e/o radioterapia per neoplasie, patologie uterine non trattate (quali polipi endometriali, miomi sottomucosi, setti uterini o sinechie), alterazioni severe qualitative e quantitative del liquido seminale, in accordo con linee guida WHO 2010, [106] anomalie del cariotipo e mutazioni a carico del gene della fibrosi cistica (per entrambi i partner).

Protocolli di trattamento

Con “Trattamento convenzionale” (**Trattamento A**), si intende un ciclo di stimolazione ovarica controllato che utilizza un protocollo lungo. Questo protocollo prevede la somministrazione di ormone GnRH agonista, dalla fase medio luteale del ciclo precedente quello di trattamento, 0.1 mg al giorno e di ormone ricombinante follicolo stimolante (rFSH) alla dose di 300 IU al giorno, somministrato in seguito ad un controllo dell'avvenuta inibizione dell'asse ipotalamo-ipofisi (17β estradiolo < 0.3 nmol/L; β hCG < 1.2 UI/L). Successivi

aggiustamenti del dosaggio di rFSH, sono stati effettuati dai Clinici in accordo con l'andamento ecografico ed ormonale della risposta ovarica, a partire dal 5° giorno della stimolazione.

Per quanto riguarda invece il **Trattamento B**, il ciclo di stimolazione ovarica controllato differisce, dal convenzionale, soltanto per la supplementazione di rLH, ovvero di 150 IU al giorno, a partire dal 5° giorno dopo la somministrazione di rFSH.

Per entrambi i protocolli, al riscontro ecografico di almeno 3 follicoli di diametro medio \geq di 16 mm (o di almeno 1 follicolo più grande di 18 mm), è stato somministrato rhCG 250 μ g per l'induzione dell'ovulazione; il recupero ovocitario viene eseguito 36 ore dopo la somministrazione dell'hCG. Tutti gli ovociti recuperati sono stati decoronizzati e solo gli ovociti maturi (MII) inseminati mediante tecnica ICSI (Intra Cytoplasmic Sperm Injection). Nella terza giornata successiva al prelievo ovocitario, sono stati trasferiti gli embrioni ottenuti (da uno fino ad un numero massimo di tre) in accordo all'età ed alla volontà della paziente, alla qualità embrionaria, optando per il trasferimento di 3 embrioni quando possibile. Come supporto della fase luteale è stato utilizzato progesterone micronizzato 400 mg in ovuli vaginali ogni 12 ore, a partire dalla sera successiva al prelievo ovocitario, fino al 14° giorno dopo il prelievo ovocitario.

Dosaggio biochimico

Per tutte le pazienti sono stati raccolti il liquido follicolare (FF) ed un campione di sangue (SS) il giorno del prelievo ovocitario. Dopo il recupero degli ovociti, il liquido follicolare è stato centrifugato a 250 g per 10 minuti, per separarlo dalle componenti cellulari, successivamente è stato trasferito in provette sterili di polipropilene ed infine è stato stoccato ad una temperatura di -70 °C fino ad ulteriore analisi. Analogamente, il campione di sangue è stato centrifugato per 15 minuti a 1000 g, entro 30 minuti dalla raccolta, e successivamente trasferito in provette sterili di polipropilene e stoccato a -70 °C. Prima dello stoccaggio, tutte le provette sterili sono stati contrassegnate con un codice alfanumerico (corrispondente all'identificazione della coppia, al fluido biologico contenuto ed tipo di COH effettuata) allo scopo di mantenere la riservatezza della paziente con il biologo coinvolto nel processamento del liquido follicolare e del siero.

Sia SFC follicolare che sierico, sono stati dosati quantitativamente mediante il test biochimico ELISA (R&D Systems Inc., USA, Human SCF Quantikine ELISA Kit - Catalog No: DCK00). I coefficienti di variazione intra e inter dosaggio sono <4 e <8 %, rispettivamente, la sensibilità di 9 pg/mL ed il range di dosaggio è compreso tra 31.2 e 2.000 pg/mL.

Dati raccolti

Di tutte le pazienti sono stati raccolti dati inerenti all'età, test di riserva ovarica, (b-FSH, b-AFC, b-AMH), durata della stimolazione ormonale (giorni), dose totale di rFSH e rLH (solo per Trattamento B) somministrata (UI), numero di follicoli

più grandi e più piccoli di 16 mm al momento dell'induzione, livelli sierici di 17β estradiolo al momento della somministrazione di hCG (nmol/L), numero totale di ovociti recuperati e gli ovociti in Metafase II, spessore endometriale al pick-up (mm), numero di embrioni ottenuti e gli embrioni di grado I, II, III valutati tenendo conto del numero di blastomeri, delle dimensioni e della percentuale di frammentazione [107] .

Il numero degli ovociti recuperati è stato valutato analizzando al microscopio il liquido follicolare su apposite piastre Petri sterili il giorno del prelievo ovocitario (giorno 0).

Successivamente liberando l'ovocita dalle cellule del cumulo ovocitario con gli appositi capillari, è stato valutato lo stadio maturativo in cui esso si trovava. La valutazione ovocitaria segue i criteri di L. Veeck, che prevede la divisione degli ovociti in classi specifiche di grado maturativo:

- ovociti in profase I: vescicola germinale visibile, assenza di globulo polare
- ovociti in metafase I: assenza di vescicola germinale, assenza di globulo polare
- ovociti in metafase II: assenza di vescicola germinale, I globulo polare visibile

L'ovocita in metafase II si trova nella fase idonea all'inseminazione.

La percentuale di fertilizzazione viene valutata il giorno seguente a quello del prelievo ovocitario (giorno 1), ovvero 18 ore dopo l'iniezione intracitoplasmatica dello spermatozoo (tecnica ICSI) all'interno dell'ovocita in metafase II. La presenza di un pronucleo maschile ed un pronucleo femminile all'interno del citoplasma e la presenza di due globuli polari estrusi sono segno di evidente

fertilizzazione. Il giorno seguente al controllo dell'avvenuta fecondazione (giorno 2), si procede con la valutazione embrionaria secondo i criteri riportati ne "The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting" [107]. Vengono presi in considerazione i seguenti parametri:

- N° di blastomeri;
- Dimensione e qualità dei blastomeri;
- Presenza di frammentazioni intra-citoplasmatiche;
- Forma dell'embrione.

Nello specifico sono stati differenziati:

EMBRIONI di I GRADO (top quality): quando presentavano in terza giornata post fecondazione un numero di cellule compreso tra 4-8 con poche o nessuna frammentazione e dimensioni concordanti tra i blastomeri

EMBRIONI di II GRADO (good quality): quando presentavano in terza giornata post fecondazione un numero di cellule compreso tra 4-8 con discrete frammentazioni e media concordanza nelle dimensioni dei blastomeri

EMBRIONI di III GRADO (impaired embryo quality): quando presentavano in terza giornata post fecondazione un numero di cellule compreso tra 4-8 con numerose frammentazioni e blastomeri diseguali oppure in presenza di 2 soli blastomeri o blastomeri in numero dispari.

Endpoint

Endpoint primario è il confronto tra i due trattamenti in termini di risposta clinica e di valori di SCF follicolare e sierico.

Endpoint secondario è il confronto tra i valori di SCF follicolare con quello sierico, al fine di valutare se il valore sierico potesse rispecchiare quello follicolare.

Endpoint terziario è l'eventuale correlazione tra i valori sierici di SCF ottenuti e l'esito clinico allo scopo di valutare il suo possibile utilizzo come parametro predittivo di risposta clinica alla stimolazione ormonale.

Analisi statistica

L'analisi statistica è stata eseguita mediante software SPSS (Chicago, IL) versione 19 per Windows, utilizzando test parametrici e non parametrici, quando appropriati. I dati sono stati analizzati mediante t test, e le variabili categoriche sono state espresse come valore percentuale e processate mediante χ^2 test o Fisher's exact test, quando appropriato. I risultati ottenuti dai dati raccolti sono stati espressi in numeri assoluti e percentuali per variabili discrete, media \pm deviazione standard per variabili continue. E' stata eseguita una regressione lineare per il confronto tra valori di SCF sierici e follicolari; sono state poi utilizzate le curve di Kaplan Meyer per stimare a quali livelli di SCF sierico e con quale probabilità si verificassero gli endpoint ovocitari prestabiliti. La significatività statistica è stata considerata per valori di $p < 0.05$.

RISULTATI

Valutazioni generali e confronto trattamento A e B

Nella tabella III, sono state riportate alcune caratteristiche generali del campione oggetto dello studio. L'età delle pazienti è compresa tra i 31 e i 45 anni. Prima di essere sottoposte al trattamento di stimolazione, le pazienti vengono monitorate in un ciclo di controllo, in cui vengono valutati FSH, conta dei follicoli antrali (AFC) e AMH. L'FSH dosato varia da un valore di 7.8 a 29.8 con una media di 13.91; la conta dei follicoli antrali ha un range che varia da 2 a 7 follicoli; il valore dell'AMH è compreso tra 0.1 e 2.1 ug/L.

Tabella III: Caratteristiche generali del campione

	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
Età	56	31	45	39.41	3.19
FSH (UI/l)	56	7.8	29.8	13.91	4.70
AFC	56	2	7	5.25	1.28
AMH (ng/mL)	56	0.1	2.1	0.72	0.50

Tabella IV: caratteristiche generali stimolazione/laboratorio

	N	Min	Max	Mean	Std. Deviation
Giorni di stimolazione	56	5	17	10.52	2.66
Totale FSH (UI/L)	56	1500	6675	3451.79	1077.63
E2 induzione (nm/L)	56	1.40	12.09	4.82	2.34
Endometrio (mm)	56	7.0	13.3	9.52	1.41
Follicoli > 16 mm	56	1	6	2.46	1.32
Follicoli < 16 mm	56	0	5	2.55	1.33
Ovociti raccolti	56	1	6	3.02	1.27
ovociti/AFC	56	0.16	2.00	0.61	0.31
MII	56	1	4	1.98	0.82
MII/AFC	56	0.14	1.50	0.40	0.22
MII/ovo tot	56	0.50	1.00	0.69	0.17
Embrioni ottenuti	56	0	3	1.27	0.92
Embrioni trasferiti	56	0	3	1.20	0.84
grado I emb	56	0	2	0.93	0.75
grado II emb	56	0	1	0.11	0.31
grado III emb	56	0	2	0.23	0.46

In tabella IV sono state riportate le caratteristiche generali relative alla stimolazione (Trattamento A e Trattamento B) e alle valutazioni di laboratorio. I giorni di stimolazione hanno una media di 10.52 ± 2.66 e prevedono un dosaggio totale di FSH con range da 1500 UI, come dose minima, a 6675 UI, come dose massima (valore medio 3451.79 ± 1077.63). Il 17β estradiolo (E2), dosato prima della somministrazione dell'hCG, 36 ore prima del prelievo ovocitario, varia da 1.4 a 12.09 UI/L (valore medio 4.82 ± 2.34). E' stato valutato anche lo spessore endometriale, il cui valore medio è di 9.52 ± 1.41 mm. Ecograficamente, i follicoli sono stati divisi in due gruppi in base alla grandezza: follicoli $>$ di 16 mm e follicoli $<$ di 16 mm. Il valore medio dei follicoli $>$ 16 mm è 2.46 ± 1.32 ; per i follicoli $<$ 16 mm invece è di 2.55 ± 1.33 .

Sono riportate in seguito le valutazioni generali di laboratorio che riguardano gli ovociti e gli embrioni. Il numero totale di ovociti raccolti dopo il prelievo ovocitario varia da 1 a 6, valore medio 3.02 ± 1.27 . Il numero medio di ovociti in Metafase II ha un valore di 1.98 ± 0.82 . Sono stati anche valutati il numero di ovociti recuperati ed il numero di ovociti in Metafase II in rapporto alla conta dei follicoli antrali AFC, rispettivamente con valori di 0.61 ± 0.31 , e di 0.40 ± 0.22 . Il numero di ovociti in MII sul totale di ovociti recuperati varia da 0.50 come valore minimo a 1.00 come valore massimo (media 0.69 ± 0.17). Per quanto riguarda il numero degli embrioni ottenuti, i valori variano da un minimo di 0 ad un massimo di 3 (valore medio 1.27 ± 0.92); gli embrioni definiti di I grado variano da un minimo di 0 ad un massimo di 2 (valore medio di 0.93 ± 0.75) così come gli embrioni di III grado (valore medio 0.23 ± 0.46); infine gli embrioni di II grado hanno un range che varia da 0 a 1 (valore medio 0.23 ± 0.46).

Tabella V: confronto tra trattamento A e trattamento B.

	TRATT	N	Mean	Std. Deviation	p-value
Giorni di stimolazione	A	28	11.14	2.69	n.s.
	B	28	9.89	2.52	
Totale FSH (UI/L)	A	28	3616.07	1249.54	n.s.
	B	28	3287.50	865.02	
E2 induzione (nm/L)	A	28	4.19	1.93	<0.05
	B	28	5.45	2.57	
Endometrio ultima eco (mm)	A	28	8.77	0.94	<0.001
	B	28	10.28	1.41	
Follicoli > 16 mm	A	28	2.14	1.11	n.s.
	B	28	2.79	1.44	
Follicoli < 16 mm	A	28	2.18	1.54	<0.05
	B	28	2.93	0.97	
Ovociti raccolti	A	28	2.64	1.22	<0.05
	B	28	3.39	1.22	
ovociti/AFC	A	28	0.52	0.25	<0.05

	B	28	0.70	0.35	
MII	A	28	1.61	0.56	<0,001
	B	28	2.36	0.87	
MII/AFC	A	28	0.33	0.15	<0.05
	B	28	0.48	0.25	
MII/ovo tot	A	28	0.68	0.21	n.s.
	B	28	0.70	0.13	
Embrioni ottenuti	A	28	1.11	0.91	n.s.
	B	28	1.43	0.92	
Embrioni trasferiti	A	28	1.04	0.83	n.s.
	B	28	1.36	0.82	
grado I emb	A	28	0.64	0.62	<0.05
	B	28	1.21	0.78	
grado II emb	A	28	0.14	0.35	n.s.
	B	28	0.07	0.26	
grado III emb	A	28	0.32	0.54	n.s.
	B	28	0.14	0.35	

Si riporta in Tabella V il confronto delle caratteristiche della risposta alla stimolazione e delle valutazioni di laboratorio, tra il Trattamento A convenzionale ed il Trattamento B che prevede l'aggiunta di LH. Non risultano differenze statisticamente significative né per quanto riguarda i giorni di stimolazione, né il dosaggio totale di FSH somministrato in entrambi i Trattamenti. I livelli di 17β estradiolo (E2), dosati 36 ore prima del prelievo ovocitario invece, risultano essere differenti in modo significativo tra i due trattamenti [$p<0.05$]: l'aggiunta di LH nel trattamento B, porta ad un valore medio di E2 di 5.45 ± 2.57 , rispetto a 4.19 ± 1.93 del trattamento A.

Per quanto riguarda lo spessore endometriale misurato all'ultima ecografia prima del prelievo ovocitario, esiste una differenza significativa: per gli endometri del trattamento A il valore medio è di 8.77 ± 0.94 , per il trattamento B invece risulta essere di 10.28 ± 1.41 [$p<0.001$].

Considerando poi il numero di follicoli $<$ a 16 mm, nel trattamento B si riscontra un valore medio di 2.93 ± 0.97 , maggiore in modo statisticamente significativo [$p<0.05$] rispetto al valore medio del numero di follicoli $<$ a 16 mm misurati nel trattamento A. Al contrario non è risultata differenza significativa per il numero di follicoli con diametro $>$ di 16 mm.

Per quanto riguarda i parametri di laboratorio, dall'analisi dei dati è risultato esserci una significativa differenza sia nel numero di ovociti totali recuperati [$p<0.05$], che nel numero di ovociti in Metafase II [$p<0.001$]: nel trattamento B infatti il numero totale di ovociti ha un valore medio di 3.39 ± 1.22 superiore al valore medio 2.64 ± 1.22 del trattamento A, ed il numero medio degli ovociti in MII per il trattamento B risulta essere di 2.36 ± 0.87 per il trattamento B e $1.61 \pm$

0.56 per il trattamento A. Anche i rapporti tra gli ovociti raccolti e AFC e tra gli MII e AFC sono statisticamente significativi [$p < 0.05$]. Al contrario non vi è differenza nei due trattamenti per il numero di MII sul numero totale di ovociti recuperati.

Infine, nel trattamento B il numero di embrioni di I grado è superiore in modo statisticamente significativo rispetto agli embrioni di I grado del trattamento A: 1.21 ± 0.78 vs. 0.64 ± 0.62 [$p < 0.05$].

Dosaggi follicolari e sierici di SCF

Tabella VI: confronto concentrazioni scf follicolari nei trattamenti A e B.

	TRATT.	N	Mean	Std. Deviation	p-value
SCF FOLLICOLARE (pg/mL)	A	28	830.25	364.09	n.s.
	B	28	735.43	300.39	

Dall'analisi delle concentrazioni di SCF follicolare, è emerso che non vi è una significativa differenza tra le concentrazioni di SCF nei liquidi follicolari delle pazienti sottoposte a trattamento convenzionale A e le concentrazioni di SCF nei liquidi follicolari delle suddette pazienti sottoposte al trattamento B: il valore medio per il trattamento A è pari a 830.25 ± 364.09 , mentre quello per il trattamento B è pari a 735.43 ± 300.39 (Tabella VI; Grafico I).

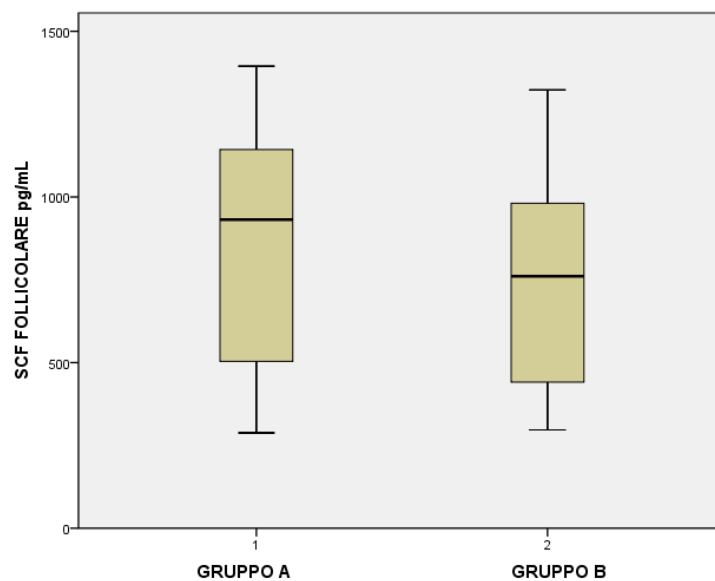


Grafico I: Dosaggio SCF follicolare nel Trattamento A e B.

Tabella VII: confronto concentrazioni scf sieriche nei
trattamenti A e B.

	TRATT	N	Mean	Std. Deviation	p-value
SCF SIERICO (pg/mL)	A	28	884.98	387.01	n.s.
	B	28	783.19	325.55	

Analogamente, anche per quanto riguarda le concentrazioni di SCF sierico, è emerso che non vi è una significativa differenza tra le concentrazioni di SCF nel siero delle pazienti sottoposte a trattamento convenzionale A e le concentrazioni di SCF nel siero delle suddette pazienti sottoposte al trattamento B: il valore medio per il trattamento A è pari a 884.98 ± 387.01 , mentre quello per il trattamento B è pari a 783.19 ± 325.55 (Tabella VII; Grafico I).

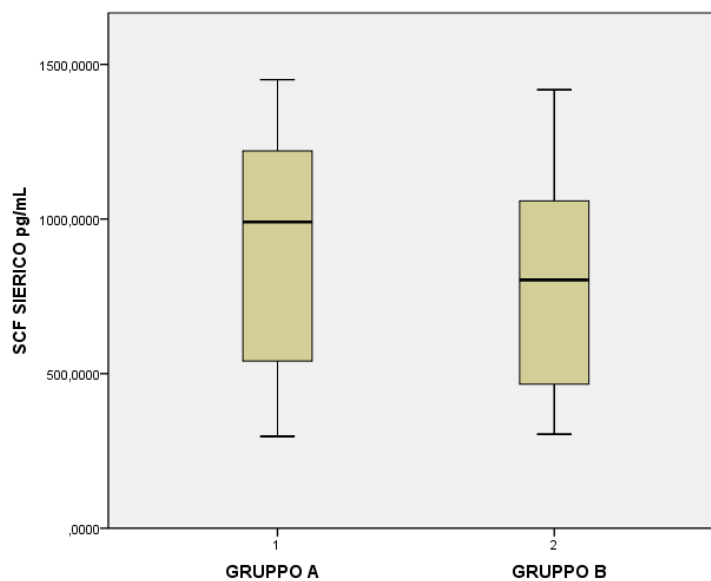


Grafico2: Dosaggio SCF sierico nel Trattamento A e B.

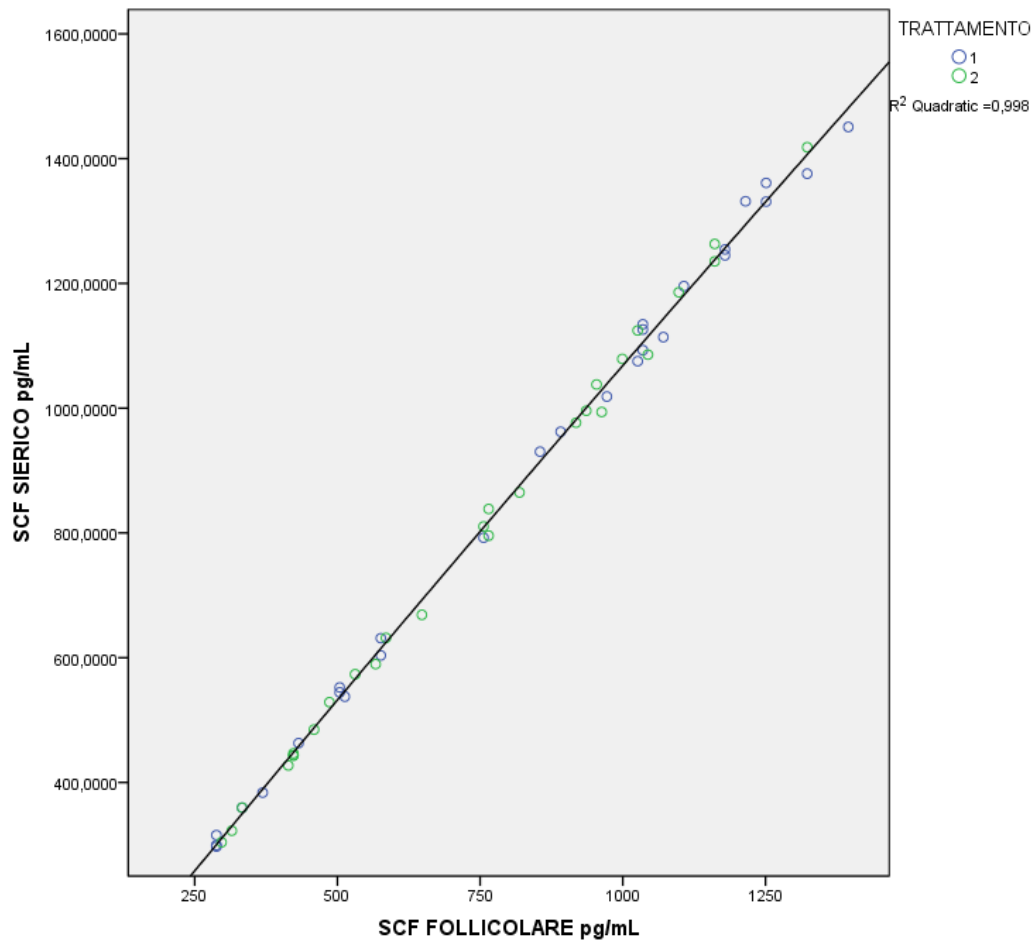


Grafico 3: *Regressione lineare valori SCF sierico e follicolare*

Dalla regressione lineare tra i valori di SCF sierico e follicolare e' emersa forte associazione lineare tra i due valori ($p < 0.001$; $r = 0.998$). Tale associazione mostrata nel grafico 3 ci consente di poter assumere il valore sierico di tutte le pazienti come rispecchiante in maniera accurata quello riscontrato a livello follicolare.

Mediante la stima del prodotto limite inverso (hazard risk) abbiamo costruito delle curve di Kaplan-Meier comparando la probabilità di recupero ovocitario in Metafase II (MII) ai valori sierici di SCF. Nello specifico il grafico 4 mostra come ad una concentrazione inferiore a 1000 pg/mL di SCF sierico la probabilità di recuperare almeno 3 ovociti sia inferiore al 20% mentre per valori compresi tra 1200 e 1400 pg/mL la probabilità può arrivare al 50%.

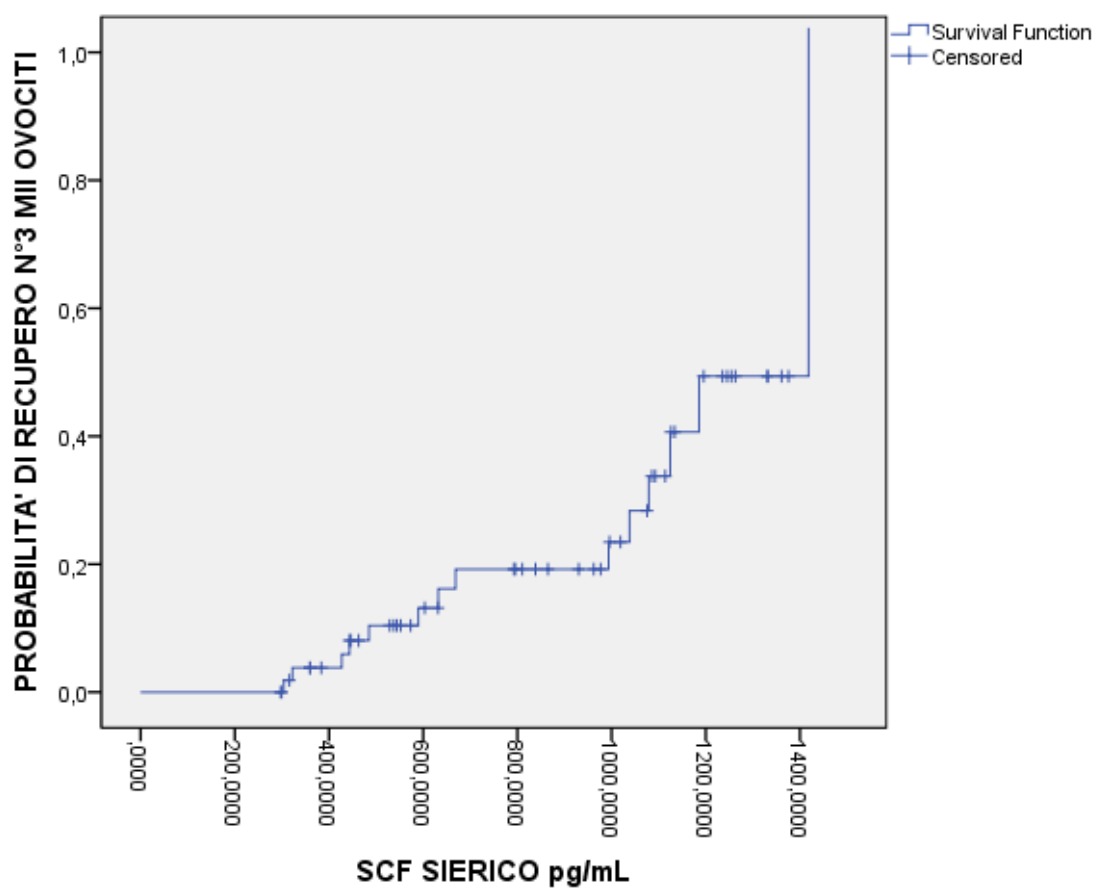


Grafico 4: Probabilità di recupero di 3 MII

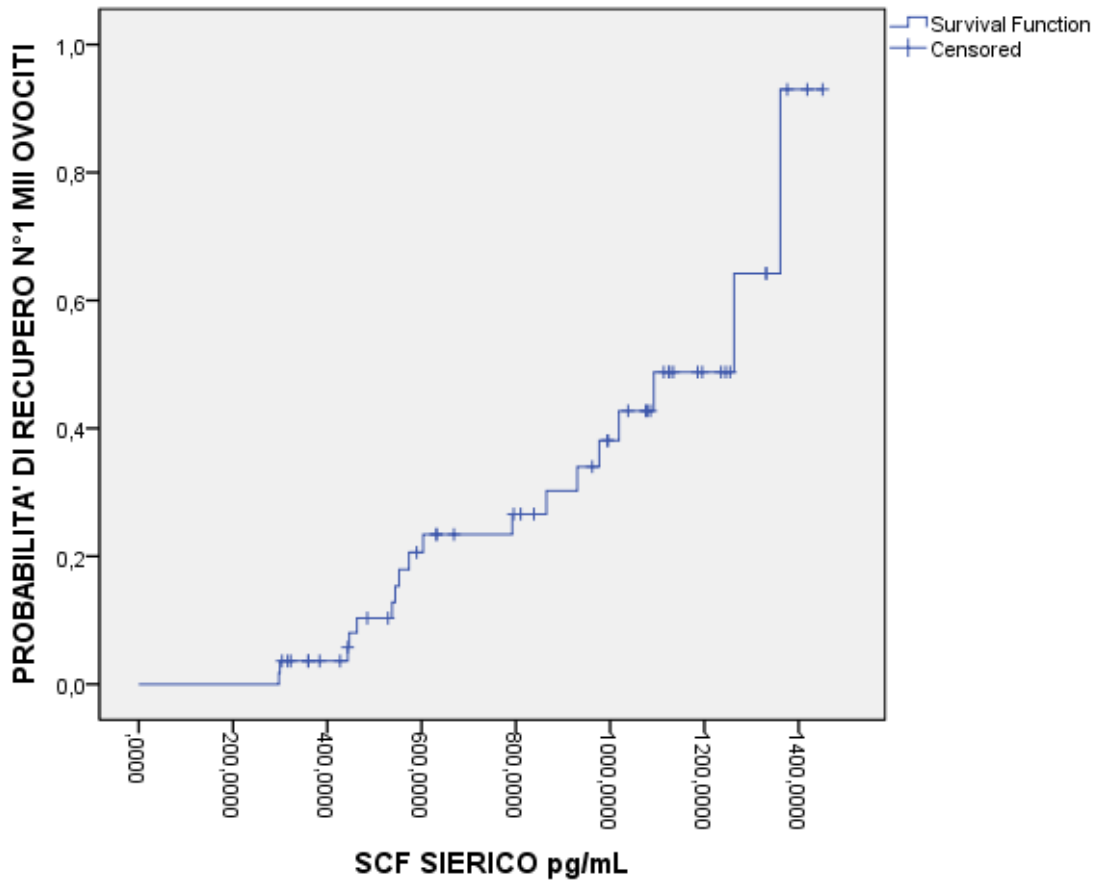


Grafico 5: Probabilità di recupero di 1 MII

Il grafico 5 mostra come la probabilità di recuperare almeno 1 ovocita in Metafase II (MII) sia del 95% per valori sieriche di SCF pari o superiore di 1400 pg/mL ma che tale probabilità si attesti intorno al 50% in caso di valori sierici compresi tra 1400 e 1000 pg/mL.

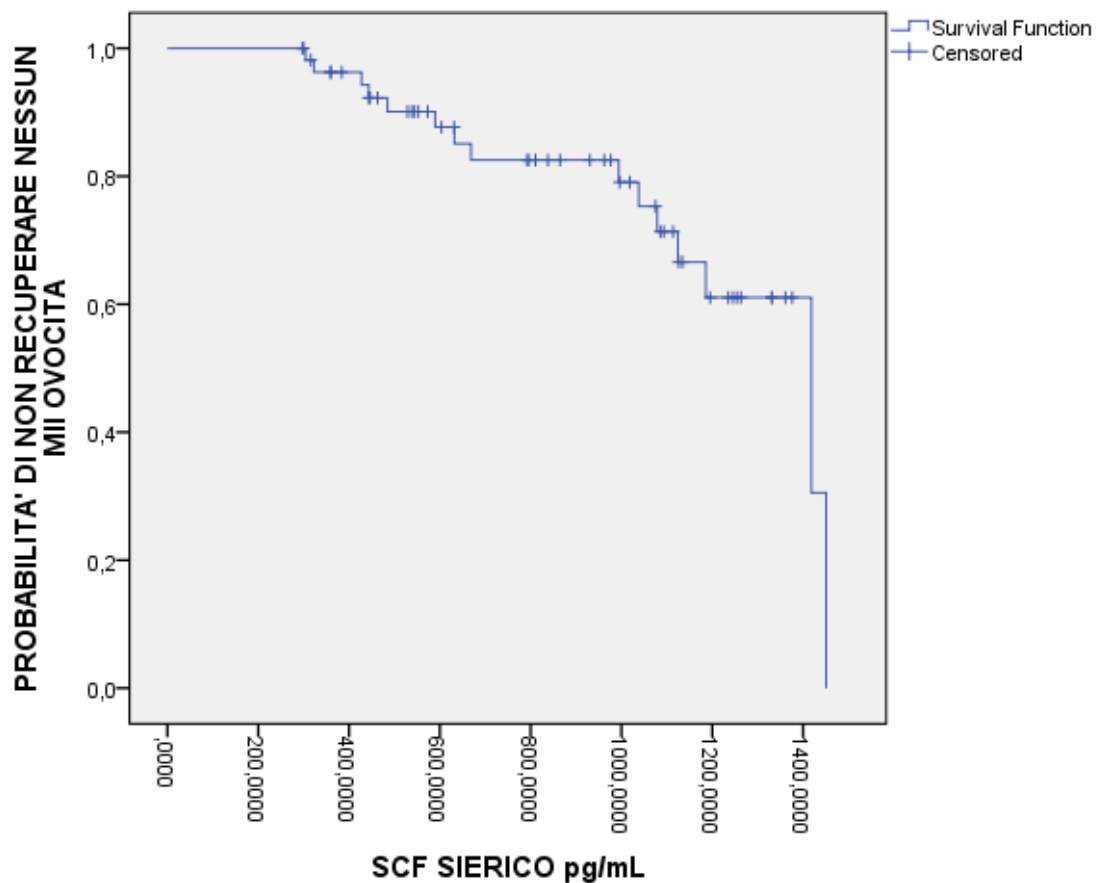


Grafico 6: Probabilità di non recuperare ovociti in MII

Volendo stimare le probabilità di non recuperare alcun ovocita in Metafase II (MII) dal grafico 6 si evince chiaramente che per valori sierici inferiori a <350 pg/mL la probabilità sia maggiore del 95% mentre essa decresce a circa il 60% per valori superiori a 1000 pg/mL. Certo che il valore ottimale sembra essere 1400 pg/mL laddove la curva chiaramente indica che la probabilità tende allo 0%.

DISCUSSIONE

Un recente studio [92] condotto su pazienti sottoposte a trattamenti di Procreazione Medicalmente Assistita, mette in evidenza come il fattore di crescita Stem Cell Factor svolga un ruolo nella gametogenesi umana e come la sua concentrazione sia soggetta a continue fluttuazioni durante il ciclo mestruale, a partire dal processo di maturazione follicolare, all'ovulazione, e successivamente all'impianto e durante la gravidanza. Abbiamo inoltre descritto nella parte introduttiva come l'espressione di SCF possa in qualche modo essere influenzata sia dagli ormoni ipofisari che da quelli gonadici.

Al fine di capire se il pathway di espressione di SCF e del suo recettore c-KIT (CD117) fosse maggiormente influenzato dalla stimolazione recettoriale mediata dall'FSH o da quella mediata dal LH, abbiamo dosato il fattore in pazienti sottoposte ad entrambi i trattamenti ormonali per la stimolazione ovarica controllata.

I nostri risultati lasciano ipotizzare che l'espressione di SCF sia prevalentemente mediata a livello ovarico dall'FSH e dal suo recettore. Tale dato è in accordo con quanto mostrato in un precedente studio condotto da Salmassi et al.[92] Gli Autori descrivono le variazioni a livello sierico delle concentrazioni di SCF, precisando come aumentino progressivamente dal 6° – 8° giorno di stimolazione con FSH fino al 9° – 11°. Il valore massimo si ha il giorno della somministrazione della gonadotropina corionica; successivamente questo valore scende leggermente il giorno del prelievo ovocitario, per poi risalire in modo significativo il giorno della conferma della gravidanza. SCF raggiunge infine le più alte concentrazioni durante la gestazione. Parrot e collaboratori in un lavoro del 2001 [99],

sostenevano che l'rLH aggiunto in trattamenti di stimolazione ovarica, potesse aumentare l'espressione del fattore SCF sulla superficie dell'epitelio dell'ovaio e nelle cellule della granulosa. Come già descritto nei capitoli introduttivi è noto che l'LH può interagire direttamente con recettori presenti sulle cellule della granulosa [102] o indirettamente attraverso le cellule della teca [97], le quali esprimono i geni che regolano l'attività delle cellule della granulosa. Ismail al contrario, in un lavoro del 1997 [103] aveva dimostrato che l'LH non era in grado di modulare i livelli di c-KIT e di SCF.

Dall'analisi dei dati del nostro studio, risulta che non vi è una significativa differenza tra le concentrazioni follicolari di SCF nei due trattamenti senza e con l'aggiunta di LH, così come tra le concentrazioni sieriche. rLH sembrerebbe dunque non influenzare il pathway di SCF. Probabilmente SCF viene influenzato solo dalle variazioni di FSH.

Tuttavia l'aggiunta di rLH al trattamento ormonale per la stimolazione ovarica ha mostrato alcuni vantaggi in termini di risposta clinica, probabilmente agendo attraverso altri pathway molecolari come per esempio EGF, Akt ed ERK, attualmente i più accreditati meccanismi di segnalazione mediata da LH grazie ad esperimenti eseguiti in modelli animali. [107]

L'analisi dei dati clinici evidenzia che le pazienti sottoposte al Trattamento B hanno beneficiato significativamente dell'aggiunta di rLH in termini di risposta follicolare ed ormonale, ovociti raccolti, ovociti in Metafase II ed embrioni ottenuti, rispetto agli esiti nelle pazienti sottoposte al Trattamento A. Esiste in letteratura un filone di pensiero unanime nell'affermare che le pazienti che potrebbero trarre beneficio dall'utilizzo di rLH siano rappresentate da una ristretta

coorte di donne con caratteristiche peculiari [110,111]: donne con età avanzata, donne con una iniziale inadeguata risposta alla stimolazione con solo rFSH e donne “expected poor responder” trattate con l’utilizzo di GnRH antagonisti (endpoint primario).

I valori di SCF follicolare erano comparabili tra i due gruppi di trattamento e pertanto è stato possibile confrontarli con quelli sierici al fine di valutare se i valori circolanti potessero rispecchiare lo status follicolare.

Dall’analisi dei dati del nostro studio è emersa infatti una forte associazione lineare tra i valori di SCF sierico e follicolare ($p < 0.001$; $r^2 = 0.998$). Tale associazione ci ha consentito di poter assumere il valore sierico di tutte le pazienti come rispecchiante in maniera accurata quello riscontrato a livello follicolare (endpoint secondario). I follicoli sono dunque uno dei siti di maggior produzione di SCF e forniscono un contributo all’aumento della concentrazione di SCF durante il loro sviluppo. Diversi autori hanno studiato e dimostrato come si esprime SCF nelle cellule della granulosa, della teca e nelle cellule stromali e come sia implicato nello sviluppo ovocitario. Nello specifico, Manova nel 1993 [90] e Packer nel 1994 [112], hanno scoperto che l’espressione di SCF all’interno dei follicoli contenenti ovociti maturi è inferiore rispetto all’espressione dello stesso all’interno dei follicoli contenenti ovociti non ancora maturi. Questo giustifica il fatto che in pazienti IVF normo responder i valori delle concentrazioni di SCF sono più bassi rispetto ai valori di pazienti low responder [92].

Anche lo studio pionieristico di Salmassi [92] aveva mostrato che la concentrazione follicolare di SCF non differisce in modo significativo da quella sierica. Altri autori avevano precedentemente riportato questi risultati [109].

Dunque la presenza di SCF nel liquido follicolare fa pensare alla sua produzione intrafollicolare e ad un suo potenziale ruolo autocrino o paracrino nell'ambito follicolare.

Alla luce di questo, ci siamo proposti nel nostro studio di correlare, mediante la stima del prodotto limite inverso (hazard risk), la probabilità di recupero ovocitario in Metafase II con i valori sierici di SCF. Dal confronto tra i parametri clinici e biochimici di SCF è emersa significatività statistica tra il valore sierico di SCF ed il numero di ovociti maturi (MII) e nello specifico per valori compresi tra 1200 e 1400 pg/mL è stata riscontrata una probabilità del 50% di recuperare 3 ovociti MII e per valori pari o superiori a 1400 pg/mL, una probabilità del 95% di recuperare 1 ovocita MII.

Infine per valori inferiori a 350 pg/mL, è stata riscontrata una probabilità del 95% di non recuperare nessun ovocita. Questo dato è molto interessante sia per l'originalità che per il riscontro che potrebbe avere nella pratica clinica.

La correlazione di un fattore presente nel siero di pazienti, ad una determinata probabilità di ottenere ovociti nella fase maturativa idonea alla fecondazione, permetterebbe ancora prima del prelievo ovocitario di avere una stima dei possibili esiti del trattamento di IVF. In questo modo in una situazione in cui si prospettino basse percentuali di recupero di ovociti maturi, gli Specialisti della Medicina della Riproduzione, sarebbero in grado di decidere di modificare il dosaggio di rFSH o di procedere alla sospensione del ciclo prima del prelievo ovocitario. Il riscontro di valori sierici di SCF, comparabili a quelli follicolari, apre la possibilità di predire prima del pick up i valori follicolari di SCF. Essendo

il valore follicolare di SCF predittivo del numero di ovociti MII reclutabili, lascia ipotizzare che nel prossimo futuro SCF potrebbe essere utilizzato come marker pre pick-up nella valutazione predittiva della risposta ovarica alla stimolazione ormonale per modificare la posologia od evitare prelievi ovocitari in assenza di ovociti.

CONCLUSIONI E POTENZIALI SVILUPPI

Sappiamo bene che per tutte le pazienti che intraprendono un percorso di Procreazione Medicalmente Assistita, l'aspettativa finale è rappresentata dall'ottenimento di una gravidanza e sappiamo anche come essa dipenda sia da fattori embrionali che da fattori endometriali. Sicuramente da questo studio è emerso che la supplementazione dell'rLH alle stimolazioni ormonali ha dimostrato di poter migliorare la qualità degli embrioni trasferiti. La ricerca della concentrazione del fattore di crescita SCF, ha permesso di ipotizzare una possibile correlazione tra stimolazione, risposta ormonale, maturità ovocitaria e qualità embrionaria. Negli ultimi anni il fattore di crescita SCF sta acquisendo sempre più interesse nel campo della Riproduzione Assistita, ma restano ancora non del tutto chiariti i dettagli della sua espressione e regolazione. Il riscontro di valori sierici di SCF, comparabili a quelli follicolari, apre la possibilità di predire prima del pick up i valori follicolari di SCF. Essendo il valore follicolare di SCF predittivo del numero di ovociti MII reclutabili, lascia ipotizzare che nel prossimo futuro SCF potrebbe essere utilizzato come marker pre pick-up nella valutazione predittiva della risposta ovarica alla stimolazione ormonale ed evitare prelievi ovocitari in assenza di ovociti.

Il passo successivo sarà quello di mettere in relazione il fattore SCF con un'altra citochina secreta sempre dalla granulosa, l'AMH. Entrambe svolgono un ruolo importante nel reclutamento del pool di follicoli primordiali e nello sviluppo degli ovociti. Eric Nilsson nel 2007 [113] ha sostenuto che l'AMH potrebbe inibire la crescita ovocitaria promossa dallo stesso SCF. AMH e SCF dunque giocherebbero ruoli opposti nell'ovaio. In uno studio più recente del 2013, Rong Hu e

collaboratori [114] hanno ipotizzato che l'AMH inibisca l'espressione dell'mRNA di SCF, dopo aver valutato i livelli di espressione del messaggero in cellule della granulosa trattate con rhAMH. Gli autori sostengono dunque che l'AMH potrebbe ridurre la trascrizione di SCF bloccando la fosforilazione di CREB in cAMP; così facendo CREB non riuscirebbe ad entrare nel nucleo cellulare, a legarsi al promotore del gene di SCF e ad attivarne la trascrizione.

Interessante risulterà correlare i valori di AMH e SCF nelle pazienti "poor responder", nelle quali, in linea con la letteratura, ci si aspetterebbero valori di SCF sierici/follicolari elevati e di AMH bassi.

Ancora, è noto che il termine "poor responder" si riferisce alla risposta ovarica, pertanto un ciclo di stimolazione è considerato essenziale per la diagnosi di POR. Tuttavia, pazienti con età avanzata o ORT anormali, che non hanno mai affrontato un ciclo di stimolazione ovarica, possono essere classificate più precisamente come "expected poor responder". Conoscendo la concentrazione sierica di SCF e correlandola a quella di AMH si potrà ipotizzare la possibilità di distinguere le pazienti "real poor responder" dalle "expected poor responder".

BIBLIOGRAFIA

1. *Relazione del ministro della salute al parlamento sullo stato di attuazione della legge contenente norme in materia di procreazione medicalmente assistita (legge 19 febbraio 2004, n. 40, articolo 15) Attività anno 2011 centri procreazione medicalmente assistita.* 19 Luglio 2013.
2. Gougeon A. *Dynamics of follicular growth in the human: a model for preliminary results.* Human reproduction 1986;1;81-87.
3. Palermo R. *Differential actions of FSH and LH during folliculogenesis.* Reprod Biomed Online. 2007;15(3):326-37.
4. Hsueh AJ, Billig H, Tsafiriri A. *Ovarian follicular atresia: a hormonally controlled apoptotic process.* Endocrine reviews 1994;15:707-724.
5. Aaltonen J, Laitinen MP, Vuojolainen K, Jaatinen R, Horelli-Kuitunen N, Seppä L, Louhio H, Tuuri T, Sjöberg J, Bützow R, Hovata O, Dale L, Ritvos O. *Human growth differentiation factor 9 (GDF-9) and its novel homolog GDF-9B are expressed in oocytes during early folliculogenesis.* J Clin Endocrinol Metab. 1999 Aug;84(8):2744-50.
6. Knight PG, Glister C. *Local roles of TGF-beta superfamily members in the control of ovarian follicle development.* Anim Reprod Sci. 2003 Oct 15;78(3-4):165-83.

7. Van Santbrink EJ, Hop WC, van Dessel TJ, de Jong FH, Fauser BC. *Decremental follicle-stimulating hormone and dominant follicle development during the normal menstrual cycle*. Fertil Steril. 1995 Jul;64(1):37-43.
8. Maklon NS, Fauser BC. *Follicle stimulating hormone and advanced follicle development in human*. Archives of Medical Research. 2001;32:595-600.
9. Sullivan MW, Stewart-Akers A, Krasnow JS, Berga SL, Zeleznik AJ. *Ovarian responses in women to recombinant follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone (LH): a role for LH in the final stages of follicular maturation*. J Clin Endocrinol Metab. 1999 Jan;84(1):228-32.
10. Greep RO, van Dyke HB, Chow BF. *Gonadotropin of swine pituitary: various biological effect of purified thykentrin FSH and pure matakentrin (ICSH)*. Endocrinology 1942;30:635-649.
11. Fevold HL. *Synergism of follicle stimulating and luteinizing hormone in producing estrogen secretion*. Endocrinology 1941;28:33-36.
12. Erickson GF, Wang C, Hsueh AJW. *FSH induction of functional LH receptors in granulosa cells cultured in a chemically defined medium*. Nature,1979; 279: 336–338.

13. Filicori M, Cognigni GE, Pocognoli P et al. *Current concepts and novel applications of LH activity in ovarian stimulation*. Trends in Endocrinology and Metabolism, 2003;14:267–273.
14. Filicori M, Cognigni GE, Ciampaglia W. *What clinical evidence for an LH ceiling?* Hum Reprod. 2003 Jul;18(7):1556-7.
15. Willis DS, Watson H, Mason HD, Galea R, Brincat M, Franks S. *Premature response to luteinizing hormone of granulosa cells from anovulatory women with polycystic ovary syndrome: relevance to mechanism of anovulation*. J Clin Endocrinol Metab. 1998 Nov;83(11):3984-91.
16. Steptoe PC., Edwards RG. *Birth after reimplantation of human embryo*. Lancet 1978; 2: 366.
17. Edwards RG, Fischel SB, Cohen J et al. *Factors influencing the success of in vitro fertilization for alleviating human infertility*. In vitro Fert Embryo Transf 1984;1:3-6.
18. Macklon NS, Fauser BC. *Follicle-stimulating hormone and advanced follicle development in the human*. Arch Med Res. 2001 Nov-Dec;32(6):595-600.
19. Balassi GP, Ricca C. *Donini and Bonfanti's method of determination of urinary pregnandiol*. Minerva Ginecol. 1951 Mar;3(3):103-6.

20. The Practice Committee of American Society for reproductive medicine. *Gonadotropin preparation: past, present, and future perspectives*. Fertility and Sterility 2008;90(3):S13-S19.
21. Hamori M, Stuckensen J, Rumpf D, Kniewald T, Kniewald A, Rurz C. *Premature luteinization for in vitro fertilization*. Hum. Reprod. 1988;2: 8.
22. Royal College of Obstetricians and Gynaecologists. *The management of infertility in tertiary care*, UK, Evidence-Based Clinical Guideline 2000;6.
23. Kiesel L, Runnebaum B. *Gonadotropin releasing hormone and analogs. Physiology and pharmacology*. Gynakol Geburtshilfliche Rundsch 1992;32:22–30.
24. Reissmann TH, Felberbaum R, Diedrich K, Engel J, Comaru-Schally AM, Schally AV. *Development and applications of luteinising hormone-releasing hormone antagonists in the treatment of infertility: an overview*. Hum Reprod 1995;10:1974–81.
25. Fauser BC, Laven JS, de Jong D, Macklon NS. *Gonadotrophin releasing hormone antagonists: application in ovary-stimulating and sex-steroid dependent disorders*. Ned Tijdschr Geneesk 2000; 144(8):370–4.

26. Maheshwari A, Gibreel A, Siristatidis CS, Bhattacharya S. *Gonadotrophin-releasing hormone agonist protocols for pituitary suppression in assisted reproduction*. Cochrane Database Syst Rev. 2011 Aug 10;(8).
27. Al-Inany HG, Youssef MA, Aboulghar M, Broekmans F, Sterrenburg M, Smit J, Abou-Setta AM. *Gonadotrophin-releasing hormone antagonists for assisted reproductive technology*. Cochrane Database Syst Rev. 2011 May 11;(5).
28. Wikland M, Enk L, Hamberger L. *Transvescical and transvaginal approaches for the aspiration of follicles by use of ultrasound*. Ann N Y Acad Sci 1985;442: 82-94.
29. Blackledge DG, Thomas WP, Turner SR, Richardson PA, Matson PL, Yovich JL. *Transvaginal ultrasonically-guided oocyte pick-up*. Med J Aust. 1986;145(6):300.
30. Hammarberg K, Wikland M, Nilsson L, Enk L. *Patients' experience of transvaginal follicle aspiration under local anesthesia*. Ann N Y Acad Sci.1988;541:134-7.
31. Trounson AO, Mohr L. *Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo*. Nature 1983; 305: 707-9.

32. Xia P. *Intracytoplasmic sperm injection: correlation of oocyte grade based on polar body, perivitelline space and cytoplasmic inclusions with fertilization rate and embryo quality.* Human Reprod 1997; 12: 1750-5.
33. Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. *Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte.* Lancet. 1992 Jul 4;340(8810):17-8.
34. Schlegel PN. *Micromanipulation of gametes for male factor infertility.* Urol Clin North Am. 1994 ;21(3):477-86.
35. Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Fortini D, Greco N. *Pronuclear morphology and chromosomal abnormalities as scoring criteria for embryo selection.* Fertil. Steril.2003;80(2):341-9.
36. Nagy ZP, Dozortsev D, Diamone M, Rienzi L, Ubaldi F, Abdelmassih R, Greco E. *Pronuclear morphology evaluation with subsequent evaluation of embryo morphology significantly increases implantation rates.* Fertil. Steril. 2003;80(1):67-74.
37. Giorgetti C, Terriou P, Auquier P, Hans E, Spach JL, Salzmann J and Roulier R. *Embryo score to predict implantation after in-vitro fertilization: based on 957 single embryo transfer.* Hum Reprod 1995;10:2427-2431.

38. Van Royen E, Mangelschots K, De Neubourg D, Valkenburg M, Van de Meerssche M, Ryckaert G, Eestermans W and Gerris J. *Characterization of a top quality embryo, a step towards single-embryo transfer*. Hum Reprod 1999;14:2345-2349.
39. Saldeen P and Sundstrom P. *Nuclear status of four-cell preembryo predict implantation potential in in vitro fertilization treatment cycles*. Fertil Steril 2005;84:584-589.
40. Ziebe S, Peterson K, Lindenberg S, Andersen AG, Gabrielsen A and Andersen AN. *Embryo morphology or cleavage stage: how to select the best embryo for transfer after in-vitro fertilization*. Hum Reprod 1997;12:1545-1549.
41. Dor J, Rudak E, Mashiach S, Nebel L, Serr DM and Goldman B. *Periovulatory 17-beta-estradiol changes and embryo morphologic features in conception and nonconceptional cycles after human in vitro fertilization*. Fertil Steril 1989;45:63-68.
42. Naaktgeboren N, Broers FC, Hijnsbroek I, et al. *Hard to believe, hardly discussed, nevertheless very important for the IVF/ICSI results: embryo transfer technique can double or halve the pregnancy rate*. Hum Reprod 1997;12(suppl):S149.

43. Smitz J, Devroey P, Camus M, Braeckmans P, et al. *Management of failed cycles in a IVF/GIFT programme with the combination of GnRH analogue and hMG*. Human Reprod. 1987;2: 309.
44. Surrey ES, Scholcraft WB. *Evaluating strategies for improving ovarian response of the poor responder undergoing assisted reproductive techniques*. Fertility and Sterility. 2000;73:667-676.
45. Ferraretti AP, La Marca A, Fauser BC, Tarlatzis B, Nargund G, Gianaroli L. *ESHRE working group on Poor Ovarian Response Definition. ESHRE consensus on the definition of 'poor response' to ovarian stimulation for in vitro fertilization: the Bologna criteria*. Hum Reprod. 2011 Jul;26(7):1616-24.
46. Broekmans FJ, Soules MR, Fauser BC. *Ovarian Aging: Mechanisms and clinical consequences*. Endocrine Reviews 2009; 30(5): 465-493.
47. van Noord-Zaadstra BM, Looman CW, Alsbach H, Habbema JD, te Velde ER, Karbaat J. *Delaying childbearing: effect of age on fecundity and outcome of pregnancy*. BMJ 1991;302:1361–1365.
48. Hunt PA, Hassold TJ. *Human female meiosis: what makes a good egg go bad?* Trends Genet 2008;24:86–93.

49. Pellestor F, Anahory T, Hamamah S. *Effect of maternal age on the frequency of cytogenetic abnormalities in human oocytes*. Cytogenet Genome Res 2005;111:206–212.
50. Chang MY, Chiang CH, Hsieh TT, Soong YK, Hsu KH. *Use of the antral follicle count to predict the outcome of assisted reproductive technologies*. Fertil Steril 1998;69:505–510.
51. Broekmans FJ, Faddy MJ, Scheffer G, te Velde ER. *Antral follicle counts are related to age at natural fertility loss and age at menopause*. Menopause 2004;11:607–614.
52. Weenen C, Laven JS, Von Bergh AR, Cranfield M, Groome NP, Visser JA, Kramer P, Fauser BC, Themmen AP. *Anti-Mullerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment*. Mol Hum Reprod 2004;10:77–83.
53. Hehenkamp WJ, Looman CW, Themmen AP, de Jong FH, Te Velde ER, Broekmans FJ. *Anti-Mullerian hormone levels in the spontaneous menstrual cycle do not show substantial fluctuation*. J Clin Endocrinol Metab 2006;91:4057–4063.
54. La Marca A, Broekmans FJ, Volpe A, Fauser BC, Macklon NS; ESHRE Special Interest Group for Reproductive Endocrinology--AMH Round Table.

Anti-Mullerian hormone (AMH): what do we still need to know? Hum Reprod. 2009; 24(9):2264-75.

55. Muasher S.J. *Controversies in assisted reproduction: Treatment of low responders.* J Assist Reprod Genet 1993;10:112–114.

56. Loutradis D, Vomvolaki E, Drakakis P. *Poor responder protocols for in-vitro fertilization: options and results.* Curr Opin Obstet Gynecol. 2008;20(4):374-8.

57. Tarlatzis BC, Zepiridis L, Grimbizis G, Bontis J. *Clinical management of low ovarian response to stimulation for IVF: a systematic review.* Hum Reprod Update. 2003;9(1):61-76.

58. Hugues JN, Cédric Durnerin I. *Revisiting gonadotropin releasing hormone agonist protocols and management of poor ovarian responses to gonadotropins.* Hum Reprod 1998;4:83-101.

59. Williams DE, Eisenman J, Baird A, Rauch C, Van Ness K, March CJ, et al. *Identification of a ligand for the c-kit proto-oncogene.* Cell 1990;63:167–74.

60. Nishikawa S, Kusakabe M, Yoshinaga K, Ogawa M, Hayashi S, Kunisada T, et al. *In utero manipulation of coatcolor formation by a monoclonal anti-c-kit*

antibody: two distinct waves of c-kit-dependency during melanocyte development.
Embo J 1991;10:2111–8.

61. Ratajczak MZ, Luger SM, Deriel K, Abraham J, Calabretta B, Gewirtz AM.
Role of the KIT protooncogene in normal and malignant human hematopoiesis.
Proc Natl Acad Sci U S A 1992;89:1710–4.

62. Sato T, Yokonishi T, Komeya M, Katagiri K, Kubota Y, Matoba S, et al.
Testis tissue explantation cures spermatogenic failure in c-Kit ligand mutant mice. Proc Natl Acad Sci U S A 2012;109:16934–8.

63. Farini D, La Sala G, Tedesco M, De Felici M. *Chemoattractant action and molecular signaling pathways of Kit ligand on mouse primordial germ cells.* Dev Biol 2007;306:572–83.

64. Ronnstrand L. *Signal transduction via the stem cell factor receptor/c-Kit.* Cell Mol Life Sci 2004;61:2535–48.

65. Yarden Y, Kuang WJ, Yang-Feng T, Coussens L, Munemitsu S, Dull TJ, et al. *Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand.* EMBO J 1987;6:3341–51.

66. Anderson, D.M., Lyman, S. D., Baird, A., et al., *Molecular cloning of mast cell growth factor, a hematopoietin that is active in both membrane bound and soluble forms*. Cell 1990, 63, 235-243.
67. Aye, M. T., Hashemi, S., Leclair, B., et al., *Expression of stem cell factor and c-kit mRNA in cultured endothelial cells, monocytes and cloned human bone marrow stromal cells (CFU-RF)*. Exp. Hematol. 1992, 20,523-527.
68. Li, J., Quirt, J., Do, H.Q., et al., *Expression of c-kit receptor tyrosine kinase and effect of [β]-cell development in the human fetal pancreas*. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 2007, 293,475-83.
69. Mitsunari, M., Harada, T., Tanikawa, M., Iwabie, T., Taniguchi, F., Terakawa, N., *The potential role of stem cell factor and its receptor c-kit in the mouse blastocyst implantation*. Mol.Hum.Reprod.1999 5,874-879.
70. Flanagan JG, Chan DC, Leder P. *Transmembrane form of the kit ligand growth factor is determined by alternative splicing and is missing in the Sld mutant*. Cell 1991;64:1025–35.
71. Blume-Jensen P, Jiang G, Hyman R, Lee KF, O’gorman S, Hunter T. *Kit/stem cell factor receptor-induced activation of phosphatidylinositol 3’-kinase is essential for male fertility*. Nat Genet 2000;24:157–62.

72. Ciruolo E, Morello F, Hobbs RM, Wolf F, Marone R, Iezzi M, et al. *Essential role of the p110beta subunit of phosphoinositide 3-OH kinase in male fertility.* Mol Biol Cell 2010;21:704–11.
73. Sandlow JI, Feng HL, Cohen MB, Sandra A. *Expression of c-KIT and its ligand, stem cell factor, in normal and subfertile human testicular tissue.* J Androl 1996;17:403–8.
74. Schlatt S, Ehmcke J. *Regulation of spermatogenesis: an evolutionary biologist's perspective.* Semin Cell Dev Biol 2014;29:2–16.
75. Correia S, Alves MR, Cavaco JE, Oliveira PF, Socorro S. *Estrogenic regulation of testicular expression of stem cell factor and c-kit: implications in germ cell survival and male fertility.* Fertil Steril 2014.
76. Diallo R, Rody A, Jackisch C, Ting E, Schaefer KL, Kissler S, et al. *C-KIT expression in ductal carcinoma in situ of the breast: co-expression with HER-2/neu.* Hum Pathol 2006;37:205–11.
77. Majumdar SS, Sarda K, Bhattacharya I, Plant TM. *Insufficient androgen and FSH signaling may be responsible for the azoospermia of the infantile primate testes despite exposure to an adult-like hormonal milieu.* Hum Reprod 2012;27:2515–25.

78. Fox RA, Sigman M, Boekelheide K. *Transmembrane versus soluble stem cell factor expression in human testis*. J Androl 2000;21:579–85.
79. Rossi P, Marziali G, Albanesi C, Charlesworth A, Geremia R, Sorrentino V. *A novel c-kit transcript, potentially encoding a truncated receptor, originates within a kit gene intron in mouse spermatids*. Dev Biol 1992;152:203–7.
80. Broudy VC, Lin NL, Liles WC, Corey SJ, O’laughlin B, Mou S, et al. *Signaling via Src family kinases is required for normal internalization of the receptor c-Kit*. Blood 1999;94:1979–86.
81. Turner AM, Bennett LG, Lin NL, Wypych J, Bartley TD, Hunt RW, et al. *Identification and characterization of a soluble c-kit receptor produced by human hematopoietic cell lines*. Blood 1995;85:2052–8.
82. Blume-Jensen P, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Zsebo KM, Westermarck B, Heldin CH. *Activation of the human c-kit product by ligand-induced dimerization mediates circular actin reorganization and chemotaxis*. EMBO J 1991;10:4121–8.
83. Lu HS, Clogston CL, Wypych J, Fausset PR, Lauren S, Mendiaz EA, et al. *Amino acid sequence and post-translational modification of stem cell factor isolated from buffalo rat liver cell-conditioned medium*. J Biol Chem 1991;266:8102–7.

84. Matous JV, Langley K, Kaushansky K. *Structure-function relationships of stem cell factor: an analysis based on a series of human-murine stem cell factor chimera and the mapping of a neutralizing monoclonal antibody.* Blood 1996;88:437–44
85. Zhang Z, Zhang R, Joachimiak A, Schlessinger J, Kong XP. *Crystal structure of human stem cell factor: implication for stem cell factor receptor dimerization and activation.* Proc Natl Acad Sci USA 2000; 97:7732–7.
86. Majumdar MK, Feng L, Medlock E, Toksoz D, Williams DA. *Identification and mutation of primary and secondary proteolytic cleavage sites in murine stem cell factor cDNA yields biologically active, cell-associated protein.* J Biol Chem 1994;269:1237–42.
87. Ciruolo E, Morello F, Hobbs RM, Wolf F, Marone R, Iezzi M, et al. *Essential role of the p110 beta subunit of phosphoinositide 3-OH kinase in male fertility.* Mol Biol Cell 2010;21:704–11.
88. Sandlow JI, Feng HL, Cohen MB, Sandra A. *Expression of c-KIT and its ligand, stem cell factor, in normal and subfertile human testicular tissue.* J Androl 1996;17:403–8.

89. Parrot JA, SkinnerMK. *Kit-ligand/stem cell factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis*. *Endocrinology* 1999;140:4262–71.
90. Manova K, Huang EJ, Angeles M, De Leon V, Sanchez S, Pronovost SM, et al. *The expression pattern of thec-kit ligand in gonads of mice supports a role for the c-kit receptor in oocyte growth and in proliferation of spermatogonia*. *Dev Biol* 1993;157:85–99.
91. Yoshida H, Takakura N, Kataoka H, Kunisada T, Okamura H, Nishikawa SI. *Stepwise requirement of c-kit tyrosinekinase in mouse ovarian follicle development*. *Dev Biol* 1997;184:122–37.
92. Ali Salmassi Sandy Zorn, Liselotte Mettler, Kerstin Koch, Walter Jonat, Andreas G Schmutzler. *Circulating concentration of stem cell factor in serum of stimulated IVF patients*. *Reproductive BioMedicine Online* 2011; 22, 140 – 147.
93. Dong M, Huang L, Wang W, Du M, He Z, Mo Y, et al. *Regulation of AMH and SCF expression in human granulosa cells by GnRH agonist and antagonist*. *Pharmazie* 2011;66:436–9.
94. Torrealday S, Lalioti MD, Guzeloglu-Kayisli O, Seli E. *Characterization of the gonadotropin releasing hormone receptor (GnRHR) expression and activity in the female mouse ovary*. *Endocrinology* 2013;154:3877–87.

95. Yan W, Linderborg J, Suominen J, Toppari J. *Stage-specific regulation of stem cell factor gene expression in the rat seminiferous epithelium*. *Endocrinology* 1999;140:1499–504.
96. Wang J, Roy SK. *Growth differentiation factor-9 and stem cell factor promote primordial follicle formation in the hamster: modulation by follicle-stimulating hormone*. *Biol Reprod* 2004;70:577–85.
97. Parrott JA, Skinner MK. *Thecal cell-granulosa cell interactions involve a positive feedback loop among keratinocyte growth factor, hepatocyte growth factor, and Kit ligand during ovarian follicular development*. *Endocrinology* 1998;139:2240–5.
98. Thomas FH, Ethier JF, Shimasaki S, Vanderhyden BC. *Follicle-stimulating hormone regulates oocyte growth by modulation of expression of oocyte and granulosa cell factors*. *Endocrinology* 2005;146:941–9.
99. Parrott JA, Doraiswamy V, Kim G, Mosher R, Skinner MK. *Expression and actions of both the follicle stimulating hormone receptor and the luteinizing hormone receptor in normal ovarian surface epithelium and ovarian cancer*. *Mol Cell Endocrinol* 2001;172:213–22.

100. Ismail RS, Okawara Y, Fryer JN, Vanderhyden BC. *Hormonal regulation of the ligand for c-kit in the rat ovary and its effects on spontaneous oocyte meiotic maturation*. Mol Reprod Dev 1996;43:458–69.
101. Motro B, Bernstein A. *Dynamic changes in ovarian c-kit and Steel expression during the estrous reproductive cycle*. Dev Dyn 1993;197:69–79.
102. Robert C, Gagne D, Lussier JG, Bousquet D, Barnes FL, Sirard MA. *Presence of LH receptor mRNA in granulosa cells as a potential marker of oocyte developmental competence and characterization of the bovine splicing isoforms*. Reproduction 2003;125:437–46.
103. Ismail RS, Dube M, Vanderhyden BC. *Hormonally regulated expression and alternative splicing of kit ligand may regulate kit-induced inhibition of meiosis in rat oocytes*. Dev Biol 1997;184:333–42.
104. Moe-Behrens GH, Klinger FG, Eskild W, Grotmol T, Haugen TB, De Felici M. *Akt/PTEN signaling mediates estrogen-dependent proliferation of primordial germ cells in vitro*. Mol Endocrinol 2003;17:2630–8.
105. Blume-Jensen P, Hunter T. *Oncogenic kinase signalling*. Nature 2001;411:355–65.

106. World Health Organization, Department of Reproductive Health and Research. *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen*. Fifth edition.
107. Balaban B et al. *The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting*. Hum Reprod, Vol.26, No.6 pp. 1270–1283, 2011.
108. Ryan KE, Casey SM, Canty MJ, Crowe MA, Martin F, Evans AC. *Akt and Erk signal transduction pathways are early markers of differentiation in dominant and subordinate ovarian follicles in cattle*. Reproduction. 2007 Mar;133(3):617-26.
109. Hammadeh, M.E., Fischer-Hammadeh, C., Hoffmeister, H., Herrmann, W., Rosenbaum, P., Schmidt, W., 2004. *Relationship between cytokine concentrations (FGF, sICAM-1 and SCF) in serum, follicular fluid and ICSI outcome*. Am.J. Reprod. Immunol. 51, 81-85.
110. Alviggi C. *Who needs LH in ovarian stimulation?* RBM Online 2006; 12: 599-607.
111. Hill MJ, Levens ED, Levy G, Ryan ME, Csokmay JM, DeCherney AH, Whitcomb BW. *The use of recombinant luteinizing hormone in patients*

undergoing assisted reproductive techniques with advanced reproductive age: a systematic review and meta-analysis. Fertil Steril. 2012;97(5):1108-14.

112. Packer, A.I., Hsu, Y.C., Besmer, P., Bachvarova, R.F., 1994. *The ligand of the c-kit receptor promotes oocyte growth.* Dev. Biol. 161, 194-205.

113. Nilsson, E., Rogers, N., & Skinner, M. K. *Actions of anti-mullerian hormone on the ovarian reserve and reactivity studies.* Reproduction and Contraception, 29, 515-519, 2007.

114. Rong Hu, Yan Lou, Fei-Miao Wang, Hui-Ming Ma, Xing W, Xiao-Mei Zhang, Juan Li, Ying-Pu Sun. *Effects of Recombinant Human AMH on SCF Expression in Human Granulosa Cells.* Cell Biochem Biophys 2013, 67; 1481-1485.