

REPRONEWS

ORGANO UFFICIALE DELLA SOCIETÀ ITALIANA DELLA RIPRODUZIONE

Anno 12 - N. 2 - Ottobre 2010



Società Italiana della Riproduzione®

XV Week-end Clinico su Infertilità e Contraccezione

Presidenti:

P.G. Crosignani, D. Granese, A. Volpe

Segreteria scientifica:

A. La Marca, R. Granese, R. Grasso

Taormina

12•13 Novembre 2010

SEGRETERIA ORGANIZZATIVA

◆ CG MKT

Via Cassia, 1110 - 00189 Roma

Tel. 0639746189 - Fax. 0645438292

E-mail: sidr@mkt-consulting.it

www.mkt-consulting.it

CONSIGLIO DIRETTIVO S.I.d.R.

Presidente:	Annibale Volpe volpe.annibale@unimo.it
Vice Presidente:	Roberto Palermo roberto.palermo@tin.it
Segretario:	Lamberto Coppola coppola@centrotecnomed.it
Consigliere:	Laura Rienzi laurarienzi@fastwebnet.it
Consigliere:	Carlo Alviggi alviggi@unina.it
Past President:	Guido Ragni g.ragni@icp.mi.it

Direzione esecutiva: **Mkt Consulting**
Via Cassia, 1110 - 00189 Roma
Tel. 06 39746189 - Fax 06 45438292
e-mail sidr@mkt-consulting.it

REPRONEWS

Editor in Chief:	Piergiorgio Crosignani
Direttore Responsabile:	Guido Ragni
Managing Editors:	Antonio Lanzone Antonio Lauria

Comitato di Redazione:

Carlo Alviggi	Faustina Lalatta
Paola Anserini	Carlo La Vecchia
Rosanna Apa	Alberto M. Luciano
Barbara Barboni	Aldo Matteelli
Angelo Cagnacci	Tiziano Motta
Giovanni Maria Colpi	Paolo Moghetti
Nicoletta Di Simone	Ivo Noci
Franco Dondero	Guido Ragni
Anna Pia Ferraretti	Alberto Revelli
Anna Maria Fulghesu	Laura Rienzi
Luca Gianaroli	Edgardo Somigliana
Secondo Guaschino	Filippo Ubaldi
Csilla Krausz	Annibale Volpe

NUMERO 2 - ANNO XII

Editrice Arte Grafica 2B
via Privata dei Cybo, 3 - 20127 MILANO
Tel 02.26143837 - Fax 02.2829211
e-mail: info@artegrafica2b.it
Sped. in Abb. Post. - AP 70% - Filiale di Milano
- Iscr. Trib. Milano N. 655 del 13/ 10/99
ISBN 88-86611-20-6



Società Italiana della Riproduzione®

La SIdR è una libera Associazione interdisciplinare, apolitica, senza fini di lucro fondata nel 1999 a seguito di sollecitazioni e consensi provenienti da più parti, su iniziativa di un folto gruppo di medici e ricercatori.

La S.I.d.R. ha lo scopo di favorire lo sviluppo della clinica, della ricerca e dell'informazione, nonché di promuovere l'aggiornamento e l'educazione permanente in tema di medicina e biologia della riproduzione.

L'Associazione si rivolge al contesto scientifico Italiano della riproduzione in tutte le sue diverse connotazioni sia applicative che di base, anche attraverso le più ampie aperture verso le Società scientifiche affini, le Associazioni degli utenti ed il mondo della ricerca e della produzione farmaceutica. I suoi associati sono infatti per lo più medici, biologi e ricercatori che operano nei settori della medicina e della biologia della riproduzione compreso quello delle tecnologie e delle biotecnologie riproduttive applicate agli animali domestici e di laboratorio.

Organo ufficiale della Associazione è il periodico REPRONEWS.

SOMMARIO

3 *Analisi della birifrangenza:
nuovo criterio di analisi e selezione
spermatICA*

10 *L'ormone anti-Mülleriano (AMH)
come marker predittivo
nelle tecniche di PMA*

17 *News*

21 *Calendario*

ANALISI DELLA BIRIFRANGENZA: NUOVO CRITERIO DI ANALISI E SELEZIONE SPERMATICA

Andor Crippa, Silvia Resta, Ilaria Stanghellini, Angela Filannino, Erbeha Boudjema,
M. Cristina Magli, Anna Pia Ferraretti e Luca Gianaroli.

Introduzione

L'infertilità di coppia rappresenta un problema di vaste proporzioni che coinvolge migliaia di persone. L'organizzazione mondiale della sanità stima intorno al 15-20% le coppie con problemi di fertilità nei paesi industrializzati avanzati. Tale percentuale è destinata ad aumentare per varie ragioni, tra cui quella ambientale, alimentare e di stile di vita. La possibilità di stimare precisamente l'infertilità maschile rappresenta oramai da molti anni un obiettivo nel mondo della ricerca e della clinica.

Nell'ambito delle tecniche della medicina riproduttiva, lo scopo principale è quello di ottenere alte percentuali di embrioni vitali, al fine di migliorare le possibilità d'impianto, con la concomitante riduzione nel numero di embrioni trasferiti. Per tal motivo, risulta di estremo interesse la possibilità di individuare dei criteri guida nonché delle indagini preposte alla selezione di gameti di buona qualità.

Benché la qualità ovocitaria abbia un ruolo preponderante nel determinare la vitalità embrionale, l'identificazione di spermatozoi con potere fecondante per la metodica di ICSI (Iniezione Spermatica IntraCitolasmatica) è di uguale importanza, soprattutto in quei casi in cui la motilità e la morfologia spermatica risultano essere gravemente compromesse.

Diversi studi condotti sull'analisi delle cellule spermatiche hanno evidenziato una relazione fra la qualità del seme e l'infertilità maschile, osservando una correlazione inversa fra indici spermatici e frequenza di anomalie cromosomiche numeriche e strutturali, più frequenti in uomini infertili rispetto alla popolazione normale. La più alta incidenza di queste anomalie è stata osservata in pazienti con severe oligoastenoteratospermie (OAT) e azoospermie e in pazienti con alti livelli di FSH (Van Assche et al., 1996; Yoshida et al., 1996). In questi casi, una presenza elevata di spermatozoi con anomalie cromosomiche potrebbe risultare in un aumentato rischio riproduttivo, dovuto alla produzione di embrioni con aneuploidie

di origine paterna (Egozcue et al., 2000; Bernardini et al., 2004; 2005). Considerando, inoltre, l'importanza del centrosoma di origine paterna nella corretta organizzazione della piastra metafasica durante la prima divisione mitotica dello zigote, la presenza di difetti nella struttura centriolare potrebbe causare un blocco e/o dei difetti nel cleavage con conseguenti anomalie cromosomiche nei blastomeri (Sathanathan et al., 1991). Uno studio condotto su spermatozoi ottenuti mediante la tecnica TESE (Estrazione Spermatica Testicolare) da soggetti con azoospermie non ostruttive, ha osservato un'elevata presenza di strutture centriolari immature con una conseguente elevata incidenza di mosaicismi embrionali (Silber et al., 2003).

In considerazione di quanto detto, è evidente che la qualità del campione spermatico ha un effetto non solo sul tasso di fertilizzazione e d'impianto, ma anche sull'incidenza di aberrazioni cromosomiche che aumenta proporzionalmente alla severità delle condizioni del seme (Bartoov et al., 2002, Calogero et al., 2003; Bernardini et al., 2005; Gianaroli et al., 2005a, b).

Gran parte delle tecniche mirate all'analisi di specifiche caratteristiche per la valutazione della qualità spermatica sono altamente invasive e, per questo, non utilizzabili per la selezione degli spermatozoi da utilizzarsi per la fecondazione. Negli ultimi anni, nuove strategie sono state ideate affinché l'identificazione di spermatozoi morfologicamente normali e a miglior carattere fecondante possa avvenire in vivo senza avere effetti sulla vitalità spermatica, nonché sulla motilità e sull'integrità di membrana, al fine di migliorare ulteriormente le procedure di selezione spermatica durante l'ICSI. Ad oggi, sono state proposte due tecniche: l'IMSSI (Iniezione Intracitolasmatica di Spermatozoi Selezionati Morfologicamente) e l'analisi della birifrangenza associata alle cellule spermatiche.

La tecnica IMSSI (Bartoov et al., 2002, 2003) consen-

te di selezionare le cellule spermatiche attraverso l'uso di un microscopio a luce invertita implementato da un sofisticato sistema ottico e digitale che consente l'osservazione ad elevati ingrandimenti (fino a 6300X). Questa tecnica permette di visualizzare eventuali difetti della testa spermatica, come i vacuoli e di riconoscere cellule morfologicamente normali al momento dell'inseminazione. L'applicazione clinica dell'IMSSI ha consentito l'ottenimento di più alti tassi di gravidanza, rispetto al gruppo controllo in studio, con una concomitante riduzione nel numero di aborti spontanei (Bartoov et al., 2003; Berkovitz et al., 2006). Dal punto di vista tecnico questa metodica richiede un tempo prolungato rispetto a quello richiesto per l'ICSI convenzionale poiché la selezione delle cellule spermatiche avviene ad elevati ingrandimenti.

La birifrangenza

La birifrangenza, o doppia rifrazione della luce, è un fenomeno visibile in un materiale trasparente "molecolarmente ordinato" (un solido cristallino) con proprietà ottiche anisotrope, cioè con caratteristiche differenti in sezione longitudinale e trasversale. La birifrangenza è rappresentata dalla scomposizione di un raggio di luce entrante in un cristallo in due distinti raggi, a causa dell'anisotropia del materiale. Questi due raggi producono due diversi cammini ottici, con diverse velocità di trasmissione e quindi con diversi indici di rifrazione. L'indice maggiore corrisponde al raggio più "lento", mentre quello minore corrisponde al raggio più "veloce". Se la luce incidente non è polarizzata sono possibili molti indici di rifrazione per ciascuno dei due raggi. Il ritardo del raggio lento rispetto a quello veloce genera birifrangenza.

Al fine di valutare la corretta struttura dei diversi compartimenti cellulari spermatici (nucleo, acroso-

ma, testa e coda) è stato applicato alla metodica ICSI l'uso di un microscopio a luce polarizzata ai fini della selezione per la fecondazione *in vitro* mediante la birifrangenza.

La birifrangenza negli spermatozoi

Le prime osservazioni sul carattere anisotropo che gli spermatozoi presentano, ad ogni stadio della loro maturazione, risalgono al XIX secolo (Valentin, 1861; Engelmann, 1875). Successivamente Bearden e Bendet (Bearden e Bendet, 1972a,b) hanno osservato che gli spermatozoi di mammifero (bovini e umani) e di seppia mostrano una birifrangenza intrinseca, dovuta all'anisotropia delle loro strutture. Ad esempio, nel nucleo la birifrangenza è dovuta all'orientamento della cromatina, caratterizzata da filamenti di nucleoproteine (protamine) orientati longitudinalmente e parallelamente all'asse lungo della testa dello spermatozoo. Lo stesso tipo di birifrangenza osservata nell'acrosoma maturo degli spermatozoi ha suggerito che anche la struttura di questa porzione della testa abbia carattere di filamenti proteici orientati longitudinalmente. Il fenomeno della birifrangenza è visibile anche nella porzione del tratto intermedio, grazie all'organizzazione microtubulare dell'assonema e nella coda. Studiando, quindi, la birifrangenza e le sue variazioni, è possibile trarre informazioni relative all'organizzazione delle strutture interne protoplasmatiche degli spermatozoi. Studi comparativi condotti tramite microscopia elettronica hanno confermato come la presenza di birifrangenza sia realmente associata a normali caratteristiche strutturali del nucleo e dell'acrosoma (Baccetti et al., 2004; Figura 1A, B). Studi recenti, inoltre, hanno evidenziato come la proporzione di spermatozoi birifrangenti sia positivamente correlata con la concentrazione ($r = 0.67$), vitalità ($r = 0.63$) e motilità progressiva ($r = 0.64$) sper-

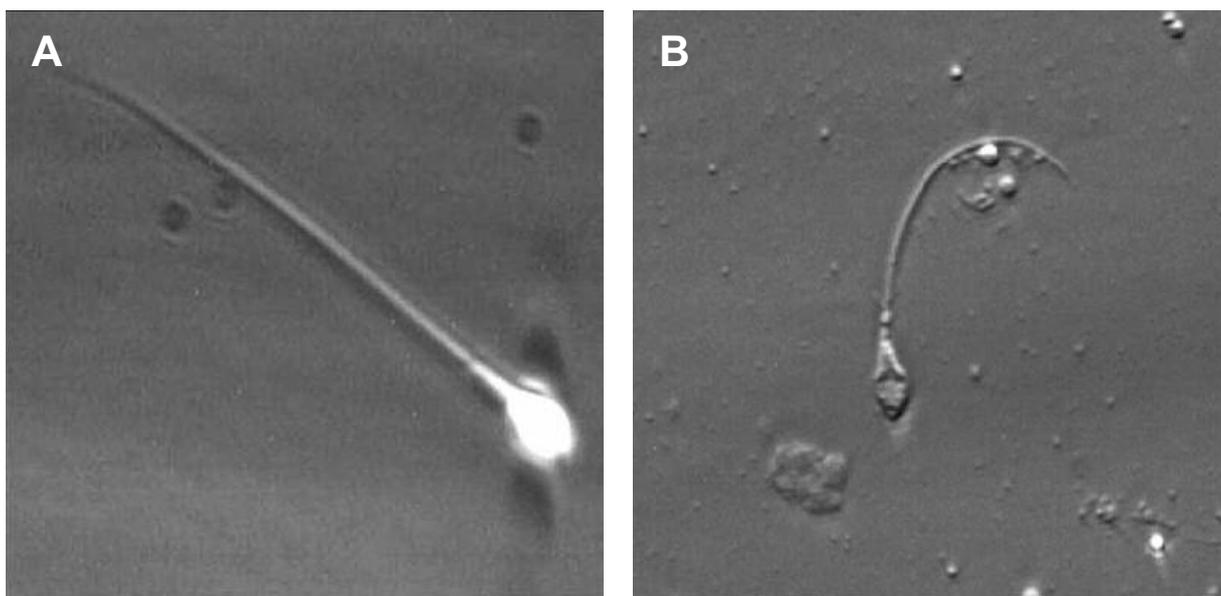


Figura 1: Spermatozoi osservati al microscopio a luce polarizzata. A: La birifrangenza è presente a livello della testa (regione acrosomiale e nucleo) e nel tratto intermedio, indicativa di spermatozoo con strutture protoplasmatiche intatte. B: Spermatozoo necrotico privo di birifrangenza.

matica (Gianaroli et al., 2008). Come mostrato in figura 2, è stato osservato che la frazione di cellule spermatiche presentanti birifrangenza nella regione della testa diminuisce significativamente in campioni

di studi prospettici randomizzati su campioni spermatici di pazienti sottoposti a cicli di fecondazione assistita e per i quali si è utilizzata l'ICSI, come metodica di fertilizzazione *in vitro* (Gianaroli et al., 2008; 2010).

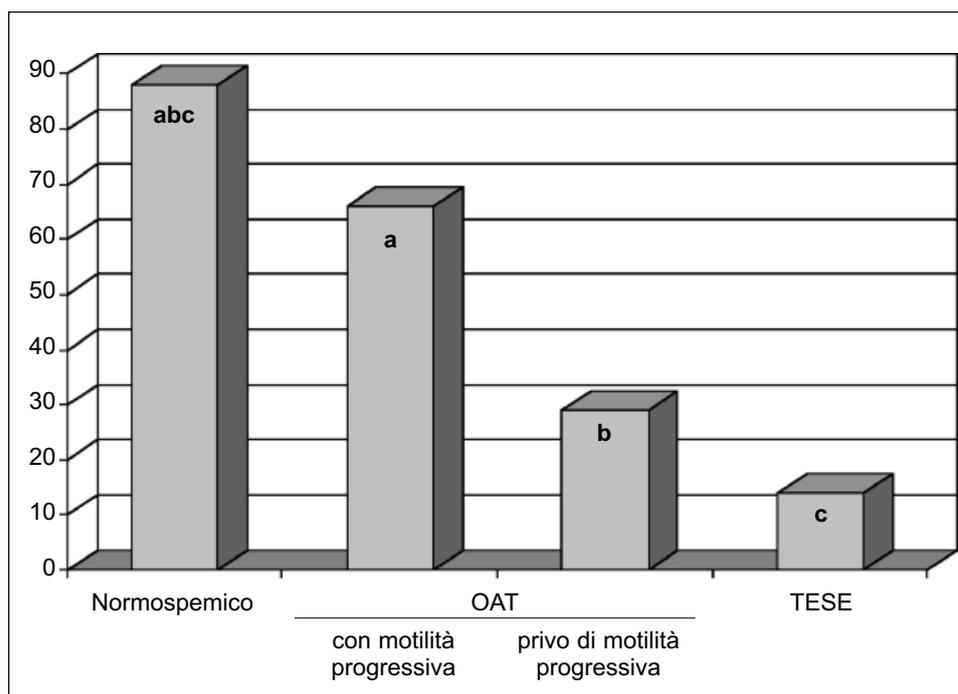


Figura 2: Percentuali di cellule spermatiche presentanti birifrangenza nella regione della testa in diverse categorie di campioni seminali.

ottenuti da TESE o da soggetti con severe OAT, rispetto ai casi di normospermia (Gianaroli et al., 2008).

Nel momento in cui si seleziona lo spermatozoo ipoteticamente ottimale destinato ad ICSI tramite un classico microscopio a luce invertita, viene persa la maggior parte delle informazioni di tipo ultrastrutturale e la selezione avviene esclusivamente sulla base della motilità e della morfologia valutate a fresco. Introducendo lenti polarizzanti in un normale microscopio invertito, associato al sistema di micromanipolazione, è invece possibile selezionare le cellule spermatiche per ICSI sfruttando la birifrangenza come un criterio aggiuntivo e non invasivo.

Birifrangenza: nuovo criterio per la selezione degli spermatozoi durante ICSI

Recentemente, per testare la validità clinica del suddetto approccio, sono stati condot-

ti gruppi presentavano una distribuzione equa delle quattro categorie di seme incluse nel disegno sperimentale. E' stato osservato come i tassi di fertilizzazione e di *cleavage* non abbiano presentato differen-

Un primo studio, condotto da Gianaroli e colleghi (Gianaroli et al., 2008) ha valutato quattro categorie di seme: normospermia, OAT con motilità progressiva, OAT senza motilità progressiva (OAT severi) e TESE. Il gruppo di studio includeva 112 campioni seminali da pazienti per i quali è stata effettuata l'ICSI selezionando gli spermatozoi mediante birifrangenza (figura 3). Il gruppo di controllo comprendeva 119 campioni per i quali, invece, l'inseminazione è stata condotta mediante i parametri convenzionali di selezione. Entrambi i

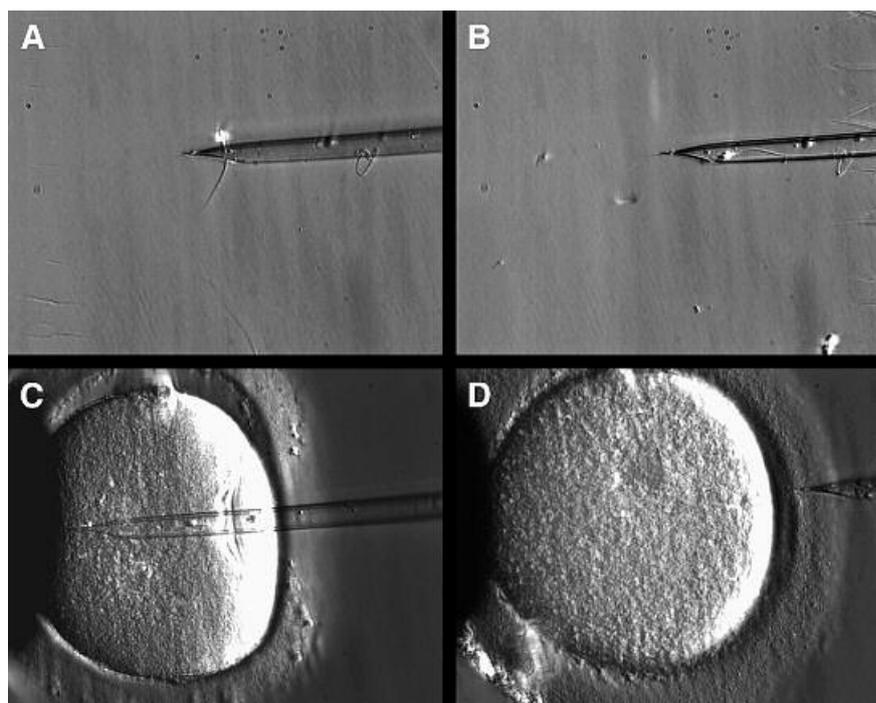


Figura 3: Procedura di ICSI effettuata mediante il microscopio a luce polarizzata. Lo spermatozoo è immobilizzato (A), aspirato (B), iniettato (C) e rilasciato nell'ooplasm (D).

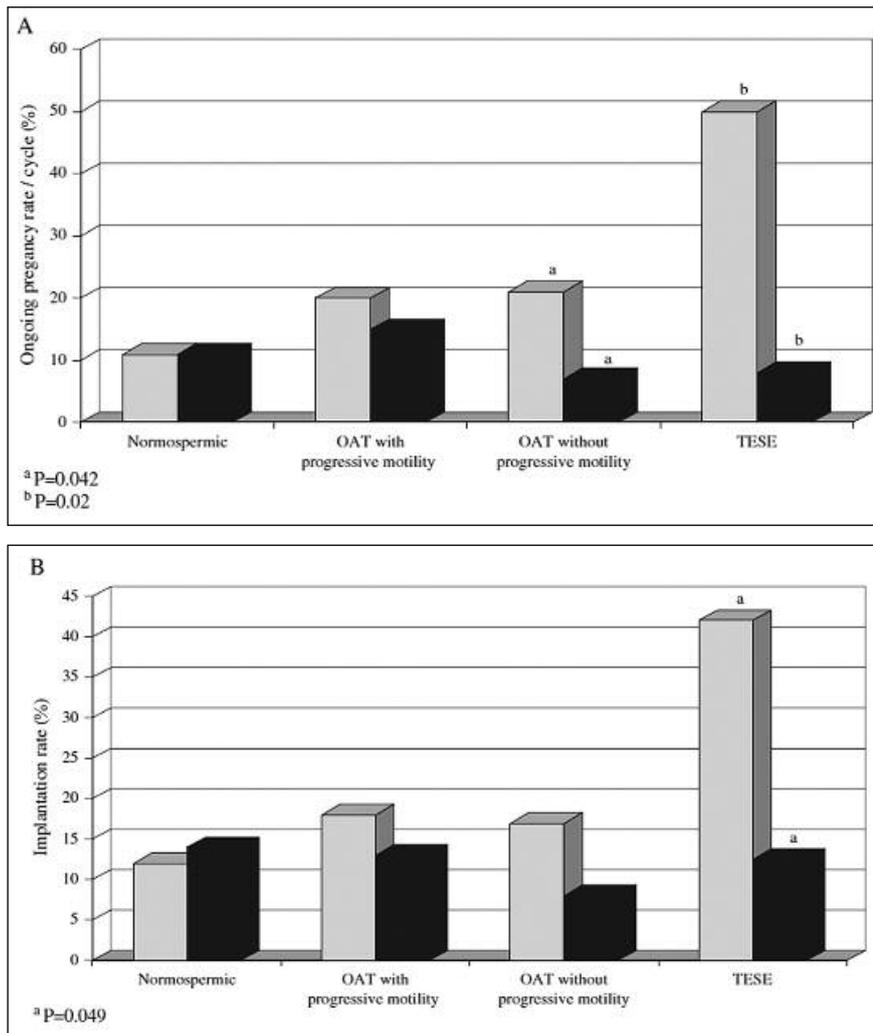


Figura 4: Ongoing pregnancy rate (tasso di gravidanza clinica in evoluzione, A) e l'implantation rate (tasso d'impianto, B) in relazione a diverse categorie di seme con differenti qualità spermatiche.

Normospermic=normospermico; OAT with progressive motility=oligoastenoteratospermico con motilità progressiva; OAT without progressive motility=oligoastenoteratospermico senza motilità progressiva; TESE=Estrazione Spermatica Testicolare.

ze tra il gruppo di studio e quello di controllo. Il tasso di gravidanza clinica in evoluzione (*ongoing pregnancy rate*) era significativamente ($P < 0.025$) più alto nel gruppo di studio (23%) rispetto a quello controllo (11%). Tale differenza era associata alla più alta incidenza di aborti spontanei presente nel gruppo di controllo (41% vs 16% nel gruppo di studio con un $P = 0.035$). Analizzando i dati per categoria di seme, nessuna differenza significativa è emersa nei tassi d'impianto e di *ongoing pregnancy rate* per i soggetti normospermici e OAT con progressiva motilità, rispetto ai controlli corrispondenti (figura 4 A, B). Per quel che concerne i soggetti appartenenti alle categorie di OAT severi e TESE l'*ongoing pregnancy rate* per ciclo è risultato significativamente aumentato ($P < 0.05$) nei gruppi di studio rispetto a quelli di controllo (figura 4 A). Il tasso d'impianto ha presentato un aumento statisticamente significativo ($P < 0.05$) nel gruppo di studio dei TESE rispetto a quello controllo, come mostrato in figura 4 B.

Un ulteriore aspetto interessante riguardante la visualizzazione della birifrangenza è stato quello di poter distinguere spermatozoi con acrosoma intatto da quelli reattati, dato confermato dalla microscopia elettronica (Gianaroli et al., 2010). Come mostrato in figura 5A la presenza di birifrangenza nella regione postacrosomiale è indicativa di uno spermatozoo andato incontro a reazione acrosomiale, mentre la birifrangenza totale della testa è rappresentativa di uno spermatozoo non reattato (figura 5B). Nello studio sono stati inclusi 71 cicli di fecondazione assistita per i quali è stata utilizzata la ICSI ed in particolare 45 riguardavano campioni OAT severi e 26 campioni TESE. Per questi campioni la selezione per l'inseminazione si è condotta mediante birifrangenza. In particolare, per 23 di questi campioni si sono selezionati spermatozoi andati incontro a reazione acrosomiale (RA+), per 26 sono stati utilizzati spermatozoi non reattati (RA-) e per i restanti 22 sono stati adoperate entrambe le categorie di spermatozoi (RA mixed). Per questi tre gruppi non è stata osservata una differenza nei

tassi di fertilizzazione e *cleavage*. Il tasso d'impianto è risultato significativamente più alto nel gruppo dei RA+ e dei RA mixed (39% e 24.4%, rispettivamente) rispetto al gruppo dei RA- (8.6%; $P < 0.002$ e $P < 0.048$, rispettivamente), così come la percentuale di parti per pick-up per cui RA+ (44%) vs RA- (8%) = $p < 0.004$ e RA mixed (32%) vs RA- (8%) = $p < 0.033$. Questo studio evidenzia come spermatozoi che sono andati incontro a reazione acrosomiale abbiano maggiori possibilità di generare embrioni vitali, dato recentemente riportato anche da Chattopadhyay e colleghi (Chattopadhyay et al., 2009), mediante l'utilizzo del polscopio.

I suddetti studi dimostrano come questa strategia di analisi, attraverso la birifrangenza, consenta di condurre l'ICSI mediante una più accurata selezione degli spermatozoi, sfruttando criteri aggiuntivi per la selezione delle cellule, oltre alla motilità e alla morfologia. Questo vantaggio si traduce nella possibilità di poter migliorare gli *outcomes* clinici anche di pa-

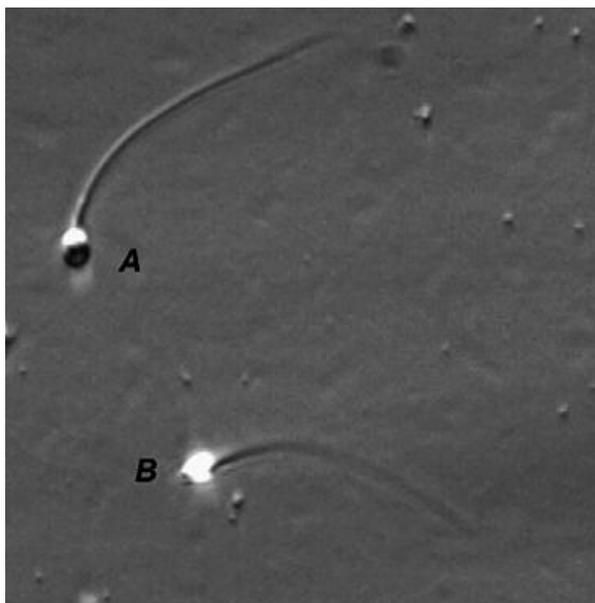


Figura 5: Spermatozoo andato incontro a reazione acrosomiale con birifrangenza concentrata nella regione postacrosomiale della testa (A) e spermatozoo con cappuccio acrosomiale intatto con testa completamente birifrangente (B).

zienti con severe forme di infertilità e azoospermia, per i quali le cellule potrebbero essere prive di motilità o presentare una morfologia anomala.

Relazione fra birifrangenza, aneuploidie e integrità del DNA

La presenza della birifrangenza nelle cellule spermatiche è stata valutata anche in correlazione con la frequenza delle aneuploidie (Crippa et al., 2008) e con l'incidenza di DNA spermatico frammentato (Crippa et al., 2009). Entrambi gli studi hanno incluso nel loro disegno sperimentale campioni seminali normospermici, OAT e OAT severi.

La frequenza di aneuploidie totali è stata valutata mediante la tecnica FISH (Fluorescence in Situ Hybridization) nei campioni seminali delle tre categorie in studio ed è risultata significativamente più alta ($P < 0.05$) nei soggetti OAT severi, rispetto ai valori di riferimento per i cromosomi analizzati (Egozcue et al., 2003). È stato, inoltre, valutato come la popolazione totale di cellule birifrangenti e quella di cellule birifrangenti con motilità fosse inversamente correlata con la frequenza delle aneuploidie totali ($r = -0.56$ e $r = -0.59$, rispettivamente; Crippa et al., 2008).

Lo studio che ha analizzato la correlazione esistente tra l'integrità delle strutture protoplasmatiche degli spermatozoi, attraverso l'analisi della birifrangenza, e la frammentazione del DNA spermatico, ha valutato quest'ultimo parametro mediante la tecnica TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-digoxigenin nick-end labeling; Crippa et al., 2009). Una porzione di cellule presentanti frammentazione del DNA è naturalmente presente in un liquido seminale. Esistono diverse cause che possono portare a questo fenomeno, fra cui i radicali liberi, pre-

senti nel tratto genitale maschile. Un'elevata frammentazione del DNA compromette la vitalità embrionale, causando una diminuzione dei tassi d'impianto e un aumento dei tassi di aborti spontanei (Benchaib et al., 2003). Crippa e colleghi (Crippa et al., 2009) hanno osservato come le percentuali di cellule con DNA frammentato superiore al valore soglia del 20% (attribuito da Seli et al., 2004; Sergerie et al., 2005; Chohan et al., 2006) era significativamente più elevato ($P < 0.05$) nei soggetti OAT severi, rispetto a quelli appartenenti alle altre due categorie analizzate. Inoltre, è stato valutato come la proporzione di spermatozoi con teste birifrangenti fosse inversamente correlata con l'incidenza del DNA frammentato ($r = -0.42$).

Questi studi sottolineano come l'analisi delle caratteristiche di birifrangenza, indicative della qualità spermatica, possa rappresentare uno strumento importante per minimizzare al momento dell'ICSI il rischio di selezionare spermatozoi con frammentazione del DNA o condizioni di aneuploidie.

Analisi della birifrangenza ad elevati ingrandimenti

La valutazione della birifrangenza, come analisi informativa delle strutture protoplasmatiche, è stata anche considerata in relazione alla morfologia spermatica. A tal fine è stato adoperato un obiettivo 63X e un sistema di *imaging* digitale che ha consentito l'analisi a un ingrandimento totale compreso tra 2500 X e 5500 X. Inoltre, l'utilizzo del software Leica Application Suite (versione 2.8.1) ha consentito di misurare le dimensioni dello spermatozoo ed, in particolare, di eventuali vacuoli presenti a livello della testa (figura 6A,B).

In tal modo Boudjema e colleghi (Boudjema et al., 2009, 2010) hanno potuto valutare le caratteristiche di birifrangenza e contemporaneamente la morfologia di ogni singola cellula analizzata. Sulla base dell'analisi della birifrangenza della testa sono state considerate categorie di spermatozoi con birifrangenza totale, birifrangenza parziale (localizzata nella regione postacrosomiale) e assenza di birifrangenza. La morfologia è stata valutata secondo i criteri del WHO (World Health Organization, quarta edizione), considerando anomalie della testa (forma, dimensioni, presenza di vacuoli, nucleo e acrosoma), del collo, del tratto intermedio, della coda e la presenza di gocce citoplasmatiche. In merito all'analisi della birifrangenza associata a più elevati ingrandimenti sono stati condotti due studi: il primo su un gruppo eterogeneo di campioni seminali ottenuti da pazienti normospermici, OAT e OAT severi (Boudjema et al., 2009) e il secondo su un gruppo comprendente campioni ottenuti mediante la tecnica TESE (Boudjema et al., 2010). In entrambi gli studi la popolazione di cellule con anomalie morfologiche presentava una percentuale di cellule con birifrangenza totale significativamente inferiore ($p < 0.01$) rispetto a quella presente nella popolazione di spermatozoi morfologicamente

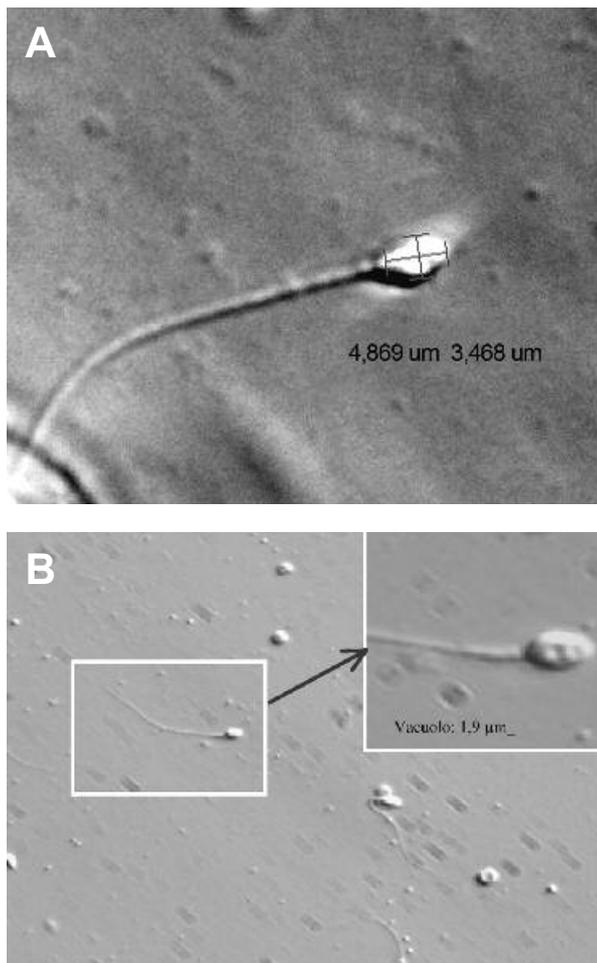


Figura 6: Spermatozoi birifringenti osservati ad un maggior ingrandimento, compreso tra 2500 X e 5500 X (A e B). Le dimensioni della testa e dei vacuoli sono stati calcolati mediante un il software Leica Application Suite - versione 2.8.1 (A e B).

normali. Al contrario, la percentuale di cellule con birifrangenza parziale e/o assente risultava significativamente più alta ($p < 0.01$) nella popolazione di cellule con anomalie morfologiche rispetto a quella con cellule con morfologia normale. Le alterazioni morfologiche maggiormente riscontrate sono state quelle associate alla testa (48%). In questo sottogruppo la percentuale di cellule con birifrangenza parziale e/o assente (62%) era significativamente più elevata ($p < 0.01$) rispetto a quella presente nella popolazione di cellule normali (43%). Simili risultati si sono ottenuti nei sottogruppi di cellule con difetti della coda (14%) e con presenza di gocce citoplasmatiche (12%) per i quali la percentuale di cellule con assenza di birifrangenza (40% e 28%, rispettivamente) risultava significativamente più elevata ($p < 0.05$) rispetto a quella presente nella popolazione di cellule normali (21%). Solo nei campioni TESE per il sottogruppo di spermatozoi con

difetti del collo e del tratto intermedio (14%) la percentuale di cellule con assenza di birifrangenza (65%) è risultata significativamente più elevata ($p < 0.05$) rispetto a quella presente nella popolazione di cellule morfologicamente normali (20%).

Dai suddetti studi emerge come spermatozoi con normale morfologia potrebbero nel 16% dei casi presentare anomalie nelle loro strutture protoplasmatiche, osservate mediante l'analisi della birifrangenza. Questa percentuale risulta aumentata in spermatozoi con anomalie morfologiche e immobili (Boudjema et al., 2009), con severe implicazioni, al momento della selezione per ICSI, per campioni seminali OAT severi o TESE nei quali vi è una bassa concentrazione di cellule e motilità spermatica.

Conclusioni

In considerazione del fatto che oggi la severità del fattore maschile influenza sostanzialmente l'infertilità di coppia e che, di conseguenza, l'ICSI rappresenta ormai una delle metodiche prescelte per la fecondazione *in vitro*, risulta pressante la necessità di definire dei criteri aggiuntivi alla selezione di spermatozoi fertilizzanti. Con tale finalità lo studio delle proprietà di birifrangenza delle cellule spermatiche associate ai dati clinici finora riportati potrebbe effettivamente rappresentare un nuovo ed utile approccio rivolto al miglioramento della vitalità embrionale e, di conseguenza, dei tassi d'impianto e di *ongoing pregnancy rate*.

Bibliografia

- Baccetti B. Microscopical advances in assisted reproduction. *J Submicrosc Cytol Pathol.* 2004; 36: 333-339.
- Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F, Kogosowski A, Menezes Y, Barak Y. Real-time fine morphology of motile human sperm cells is associated with IVF-ICSI outcome. *J Androl.* 2002;23:1-8.

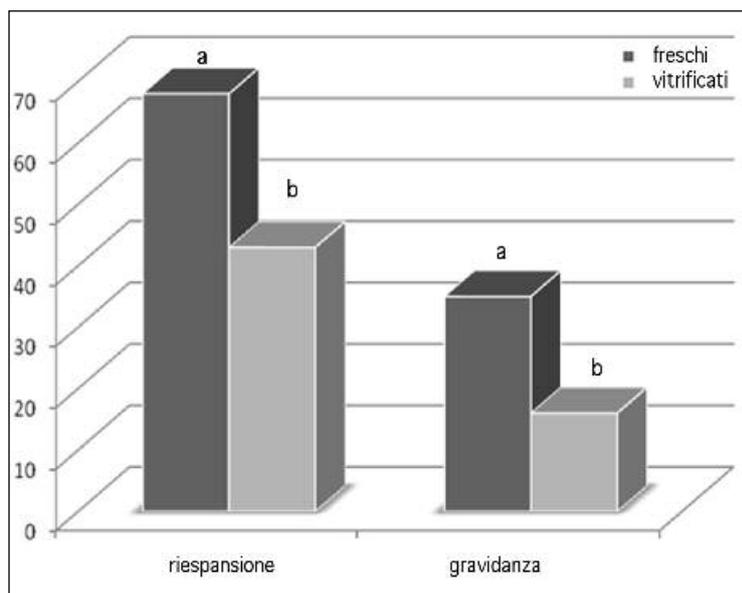


Figura 5. Vitalità e percentuali di gravidanza di blastocisti crioconservate derivate da oociti di ovino maturati *in vitro* freschi e vitrificati.

- Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F, Kogosowski A, Yagoda A, Lederman H, Artzi S, Gross M, Barak Y. Pregnancy rates are higher with intracytoplasmic morphologically selected sperm injection than with conventional intracytoplasmic injection. *Fertil Steril.* 2003; 80:1413-9
- Bearden J, Bendet JJ. Birefringence of spermatozoa. I. Birefringence melting of squid, bull, and human nucleoprotein. *J Cell Biol.* 1972a;55:489-500.
- Benchaib M, Braun V, Lornage J, Hadj S, Salle B, Lejeune H, Gue´rin JF. Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in assisted reproductive technique. *Hum Reprod.* 2003 18,1023-1028
- Bendet JJ, Bearden J. Birefringence of spermatozoa. II. Form birefringence of bull sperm. *J Cell Biol.* 1972b;55:501-510.
- Berkovitz A, Eltes F, Lederman H, Peer S, Ellenborg A, Feldberg B, Bartoov B. How to improve IVF-ICSI outcome by sperm selection. *Reprod Biomed Online.* 2006;12:634-8.
- Bernardini LM, Costa M, Bottazzi C, Gianaroli L, Magli MC, Venturini PL, Francioso R, Conte N, Ragni N. Sperm aneuploidy and recurrent pregnancy loss. *Reprod Biomed Online.* 2004;9:312-320.
- Bernardini LM, Calogero AE, Bottazzi C, Lanteri S, Venturini PL, Burello N, De Palma A, Conte N, Ragni N. Low total normal motile count values are associated with increased sperm disomy and diploidy rates in infertile patients. *Int J Androl.* 2005;28:328-336.
- Boudjema E, Magli MC, Crippa A, Baccetti B, Ferraretti AP, Gianaroli L. Correlation between sperm morphology and birefringence properties in human spermatozoa: implications for sperm selection at ICSI. *Hum Reprod.* 2009;24:suppl 1,i72.
- Boudjema E, Magli MC, Crippa A, Baccetti B, Ferraretti AP, Gianaroli L. High incidence of protoplasmic abnormalities in human testicular spermatozoa: implications for sperm selection at ICSI. *Hum Reprod.* 2010;25:suppl 1,i142.
- Calogero AE, Burello N, De Palma A, Barone N, D'Agata R, Vicari E. Sperm aneuploidy in infertile men. *Reprod Biomed Online.* 2003;6:310-317.
- Chattopadhyay R, Ghosh S, Goswami SK, Goswami M. Selection of birefringent sperm head under polscope and its effect on outcome of ICSI in azoospermia and complete asthenozoospermia. *Hum Reprod.* 2009;24:suppl 1,i76.
- Chohan KR, Griffin JT, Lafromboise M, De Jonge CJ, Carrell DT. Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. *J Androl.* 2006;27(1):53-9.
- Crippa A, Gianaroli L, Ferraretti AP, Baccetti B, Cetera C, Magli MC. Chromosomal status and characteristics of birefringence in sperm cell heads. *Hum Reprod.* 2008;23:suppl1,i112.
- Crippa A, Magli MC, Paviglianiti B, Boudjema E, Ferraretti AP, Gianaroli L. DNA fragmentation and characteristics of birefringence in human sperm head. *Hum Reprod.* 2009;24:suppl1,i95.
- Egozcue S, Blanco J, Vendrell JM, Gracia F, Veiga A, Aran B, Barri PN, Vidal F, Egozcue J. Human male infertility: chromosome anomalies, meiotic disorder, abnormal spermatozoa and recurrent abortion. *Human Reprod Update.* 2000;6:93-105.
- Egozcue J, Blanco J, Anton E, Egozcue S, Sarrete Z, Vidal F. Genetic analysis of sperm and implications of severe male infertility-a review. *Placenta.* 2003;24 Suppl B:62-5.
- Engelmann ThW. Kontraktilitat und Doppelbrechung. *Pflugers Arch* 1875;11:432.
- Gianaroli L, Magli MC, Cavallini G, Crippa A, Nadalini M, Bernardini L, Menchini-Fabris GF, Voliani S, Ferraretti AP. Frequency of aneuploidy in spermatozoa from patients with extremely severe male factor infertility. *Hum Reprod.* 2005[a];20:2140-2152.
- Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP. Sperm and blastomere aneuploidy detection in reproductive genetics and medicine. *J Histochem Cytochem.* 2005[b];53:261-268.
- Gianaroli L, Magli MC, Collodel G, Moretti E, Ferraretti AP, Baccetti B. Sperm head's birefringence: a new criterion for sperm selection. *Fertil Steril.* 2008;90:104-112.
- Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Crippa A, Lappi M, Capitani S, Baccetti B. Birefringence characteristics in sperm heads allow for the selection of reacted spermatozoa for intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.* 2010;93:807-813.
- Sathananthan AH, Kola I, Osborne J, Trounson A, Ng SC, Bongso A, Ratnam SS. Centrioles in the beginning of human development. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991;88:4806-4910.
- Seli E, Gardner DK, Schoolcraft WB, Moffatt O, Sakkas D. Extent of nuclear DNA damage in ejaculated spermatozoa impacts on blastocyst development after in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 2004;82(2):378-83.
- Sergerie M, Laforest G, Bujan L, Bissonnette F, Bleau G. Sperm DNA fragmentation: threshold value in male fertility. *Hum Reprod.* 2005;20(12):3446-51.
- Silber S, Escudero T, Lenahan K, Abdelhadi I, Kilani Z, Munné S. Chromosomal abnormalities in embryos derived from testicular sperm extraction. *Fertil Steril.* 2003;79:30-38.
- Valentin G. Die Untersuchung der Pflanzen und Tiergewebe in polarisiertem Lichte. *Leipzig* 1861;305-306.
- Van Assche EV, Bounduelle M, Tournaye H, Joris H, Verheyen A, Devroey P, Van Steirteghem A., Libaers I. Cytogenetics of infertile men. *Hum. Reprod.* 1996;11:1-26.
- World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 4th ed. Cambridge University Press. 1999.
- Yoshida A, Miura K, Shirai M. Chromosome abnormalities and male infertility. *Assist Reprod Rev.* 1996;67:93-99.

L'ORMONE ANTI-MÜLLERIANO (AMH) COME MARKER PREDITTIVO NELLE TECNICHE DI PMA

G. D'Ippolito¹, A. La Marca^{1,2}, A. Volpe¹

Introduzione

L'ormone anti-mülleriano (AMH) è una glicoproteina dimerica, membro della superfamiglia del TFG-beta, originariamente identificato a causa del suo ruolo fondamentale nella differenziazione del sesso maschile. Infatti, espresso nelle cellule del Sertoli dei testicoli fetali, l'AMH induce la regressione dei dotti mülleriani. In assenza di AMH, i dotti mülleriani evolvono in utero, salpingi e nella parte superiore della vagina. Nelle donne, l'AMH è prodotto dalle cellule della granulosa, dai follicoli preantrali e antrali e il suo maggior ruolo fisiologico nell'ovaio sembra limitato all'inibizione dello sviluppo degli stadi precoci del follicolo (1).

L'AMH è stato valutato da alcuni gruppi come potenziale nuovo marker clinico di riserva ovarica e di risposta alle gonadotropine (per review vedi ref.2). In particolare negli ultimi anni, sono stati pubblicati alcuni ampi studi prospettici che riportavano nuovi da-

ti estremamente interessanti per una possibile applicazione clinica delle misurazioni di AMH nella predizione sia in termini quantitativi che qualitativi della risposta ovarica nelle tecniche di riproduzione assistita.

L'AMH nella fisiologia ovarica

L'AMH è prodotto dalle cellule della granulosa dei follicoli preantrali e antrali. La sua espressione è limitata ai follicoli in crescita, fino a che essi non hanno raggiunto le dimensioni e lo stato di differenziazione in cui vengono selezionati per divenire follicoli dominanti dall'azione dell'FSH ipofisario (3). Nell'essere umano ciò accade nei follicoli antrali di 4-6 mm di grandezza. L'espressione dell'AMH ovarico è stata osservata fin dalla 36esima settimana di gestazione nel feto umano (4). L'AMH esercita i suoi effetti biologici attraverso un recettore trans membrana serina/treonina chinasi di tipo 2 (AMHRII), che è specifi-

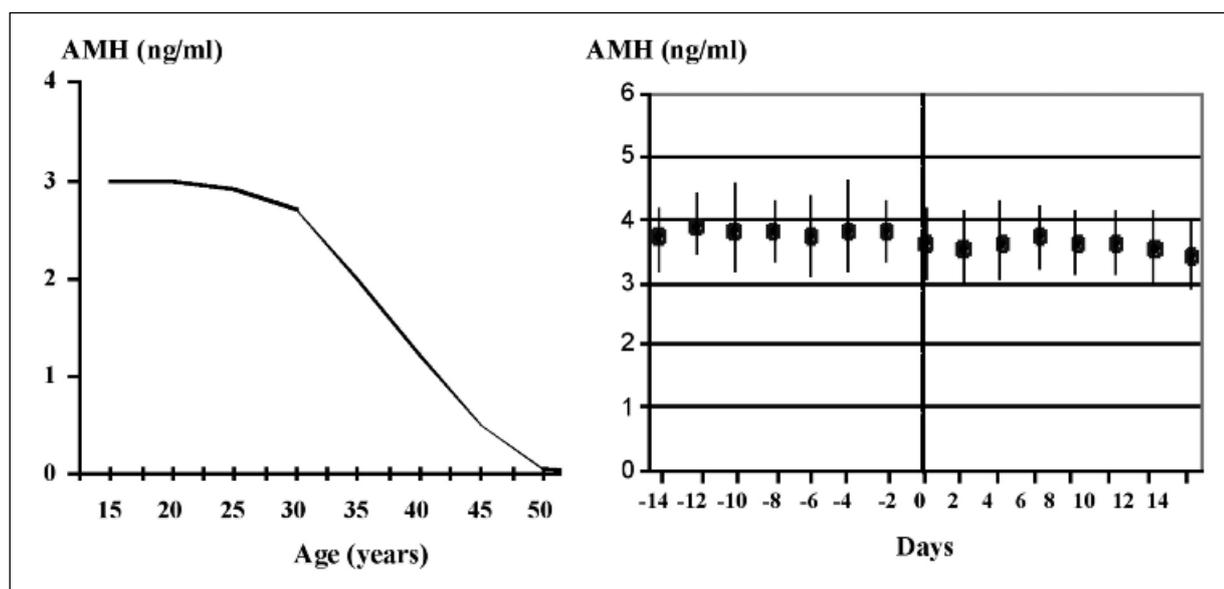


Fig.1 I livelli sierici dell'AMH mostrano una graduale diminuzione nel corso della vita riproduttiva. Essi diventano indosabili dopo la menopausa. A destra: Il pattern circolatorio dell'AMH durante il ciclo mestruale di giovani donne di età compresa tra 18 e 24 anni. I livelli sierici di AMH sono risultati stabili durante tutto il corso del ciclo mestruale. Day 0 = giorno di picco dell' LH.

camente espresso nelle gonadi e nelle cellule mesenchimali adiacenti ai dotti mülleriani (5). In più, l'espressione dell'AMHR11-mRNA è stata osservata nelle cellule della teca dei follicoli preantrali e nei piccoli follicoli antrali. Il principale ruolo fisiologico che esercita l'AMH nell'ovaio sembra essere limitato all'inibizione dei primi stadi dello sviluppo follicolare (6), dato che esperimenti sia in vivo che in vitro hanno indicato che il passaggio da follicoli primordiali a follicoli in crescita aumenta in assenza di AMH, portando ad un esaurimento precoce del pool follicolare primordiale (7).

Le teorie correnti suggeriscono anche un ruolo dell'AMH come co-regolatore della steroidogenesi in cellule della granulosa, poichè i livelli di AMH sembrano

riduzione del numero dei piccoli follicoli in crescita può essere seguita da una riduzione dell'AMH circolante. La riduzione della riserva ovarica è un processo fisiologico che si verifica durante tutto il periodo riproduttivo ed è coerentemente associato ad una diminuzione dei livelli di AMH (9). La forte correlazione esistente tra i livelli di AMH e il pool follicolare residuo è stato recentemente confermato in studi che hanno dimostrato come la misurazione dell'AMH possa essere usata per predire l'insorgenza della menopausa (10).

Variazioni non significative di AMH durante il ciclo mestruale sono state segnalate dal nostro gruppo (6) e confermate da una serie di studi indipendenti (11-13) (Fig. 1). Nella pratica clinica, la variabilità inter-ed

Tabella I. Studi sull'AMH come marker di risposta ovarica alla stimolazione ovarica controllata. Confronto con altri predittori.

Author	n	R with oocytes*	AMH better than					
			AFC	Ov. Vol	d3 FSH	d3 E2	d3 inbB	age
Seifer (2002)	107	0.48			√	√		
Van Rooij (2002)	130	0.57	=		√	√	√	√
Fanchin (2003)	93	0.43						
Muttukrishna (2004)	69	0.69			√		√	
Hazout (2004)	109	0.38			√	√	√	√
Muttukrishna (2005)	108	0.5	=		√			
Elder Geva (2005)	56	0.64	X		√		√	
Silberstein (2006)	257	0.33			√			
Ficicioglu (2006)	50	0.56	√		√	√		√
Lekamge (2007)	126	0.34	=					
La Marca (2007)	48	0.7						
Kwee (2007)	110	0.63	X	√	√			√
Nakhuda (2007)	77	0.63			√			
McIlveen (2007)	84	0.78	√	√	√		=	√
Nelson (2007)	340	0.71			√			√
Elgindy (2008)	33	0.88	=	√	√			
Lie Fong (2008)	125	0.47						
Jee (2008)	59	0.53					X	
Jayaprakasan (2008)	135	0.47	=	√	√	√		√
Wunder (2008)	276	0.35			√		X	

* R with oocytes: correlazione tra livelli sierici di AMH e numero di ovociti recuperati.
 √ migliore, X peggiore, = uguale performance.

essere legati ai livelli di estradiolo presenti nel liquido follicolare dei piccoli follicoli antrali (8).

Fattori modulanti i livelli di amb nelle donne

I livelli sierici di AMH delle donne sono inferiori a quelli degli uomini e restano tali per tutta la durata della vita. Nelle donne i livelli di AMH sono quasi inosservabili alla nascita con un lieve aumento nei primi 2 o 4 anni di vita, dopodichè i livelli di AMH appaiono stabili fino all'età adulta, ma poi iniziano a diminuire dando quindi segno dell'esaurimento della riserva follicolare, diventando poi indosabili in menopausa (Fig. 1) (8). Poichè i livelli di AMH sostanzialmente riflettono il pool follicolare ovarico, la ri-

intra-ciclo dei livelli di AMH nel siero può essere considerata sufficientemente bassa da consentire misurazioni random dell'AMH durante tutto il ciclo mestruale.

Le donne con sindrome dell'ovaio policistico (PCOS) mostrano un incremento dello sviluppo dei follicoli antrali rispetto alle donne normali (14). All'esame istologico, le ovaie policistiche (PCO) mostrano un normale numero di follicoli primordiali, mentre il numero dei follicoli in via di sviluppo è doppio rispetto alle ovaie normali (15). Di conseguenza i livelli circolanti di AMH nelle donne con sindrome dell'ovaio policistico sono da due a tre volte superiori rispetto ai controlli sani (16-21). Nelle donne con sindrome del-

l'ovaio policistico, l'aumento dei livelli di AMH può essere non solamente dovuto all'eccessivo accumulo di follicoli antrali ma anche all'aumentata secrezione da parte delle cellule della granulosa di AMH. Infatti, i livelli di AMH sono in media 75 volte superiori nelle cellule della granulosa provenienti da PCO, rispetto ai livelli in cellule della granulosa provenienti da ovaie normali (22).

I livelli di AMH sembrano essere correlati alla gravità della sindrome, poiché sono stati osservati livelli più alti nelle donne PCOS insulino-resistenti rispetto alle

e valore clinico dell'antral follicle count (AFC) nella predizione della risposta ovarica (25).

Predizione di poor response e di cancellazione del ciclo

Numerosi criteri sono stati utilizzati per definire una poor response. Il numero di follicoli sviluppati e il numero di ovociti recuperati sono due dei criteri più importanti per la definizione di poor response. Il numero proposto varia tra i diversi autori e va da meno di tre a meno di cinque follicoli

Tabella II. Confronto tra i markers di riserva ovarica maggiormente utilizzati

<i>Characteristics for a good marker</i>	<i>Age</i>	<i>AMH</i>	<i>FSH</i>	<i>AFC</i>
Prediction of poor response	+	+++	++	+++
Prediction of hyper response	+	+++	-	++
Low inter-cycle variability	+++	++	-	++
Low intra-cycle variability	+++	++	-	++
Blinded to the operator	+++	+++	+++	-
Applicable to all patients (a)	+++	+++	+	+
Cheapness	+++	-	-	-

(a): FSH e AFC non sono attendibili nelle pazienti che sono in trattamento con GnRH agonisti o che assumono contraccettivi ormonali. Inoltre la conta follicolare antrale può risultare difficoltosa nelle donne che presentano cisti ovariche o che hanno una pregressa storia di chirurgia pelvica.

pazienti con normale sensibilità all'insulina (23). Allo stesso modo l'AMH è più alto in donne con sindrome dell'ovaio policistico amenorroiche, rispetto a quelle oligomenorroiche (19, 20) e ciò potrebbe indicare un ruolo per l'AMH nella patogenesi dell'anovulazione PCOS-correlata.

Predizione della risposta ovarica quantitativa nella PMA

Una gran quantità di dati mostra una forte correlazione positiva tra i livelli sierici basali di AMH ed il numero di ovociti recuperati nelle donne sottoposte a stimolazione ovarica (Tabella D). Il primo articolo che riporta un'associazione tra AMH circolante e risposta ovarica alla gonadotropina è di Seifer e collaboratori (24).

Gli autori hanno osservato che i livelli più alti di AMH al 3° giorno del protocollo di stimolazione erano associati ad un maggior numero di ovociti recuperati. In particolare, i livelli di AMH erano 2,5 volte più alti nelle pazienti con almeno undici ovociti rispetto a quelle con sei o meno ovociti recuperati. In Tabella I sono stati riassunti tutti gli studi retrospettivi e prospettici che hanno trovato una correlazione tra il numero di ovociti recuperati e i livelli di AMH. La maggior parte degli autori ha confrontato l'AMH con l'età anagrafica ed altri marcatori ormonali ed ecografici. Il bilancio degli studi pubblicati sembra indicare che l'AMH è un migliore marker nel predire la risposta ovarica alla stimolazione ovarica rispetto all'età della paziente, all'FSH in terza giornata, all'estradiolo e all'inibina B. L'AMH sembra offrire lo stesso livello di precisione

dominanti presenti il giorno della somministrazione dell'hCG, e da meno di tre a meno di cinque ovociti recuperati (per review vedi 26). A prescindere da qualunque definizione usata, le pazienti poor responders hanno tassi di gravidanza decisamente inferiori rispetto alle pazienti normal-responder di pari età (27- 29).

Un gran numero di parametri clinici ha dimostrato di predire la scarsa risposta ovarica alla stimolazione con gonadotropine esogene ed è stato introdotto nella pratica clinica. Questi parametri includono l'età, l'FSH basale e i livelli di inibina B, l'AFC, il volume ovarico, una serie di test dinamici e più recentemente l'AMH.

La sensibilità e la specificità della predizione della poor response basata sull'AMH varia in letteratura tra il 44-97% e il 41-100%, rispettivamente.

Uno dei principali vantaggi dell'AMH rispetto agli altri markers ormonali di riserva ovarica è la possibilità di essere usato come un marcatore indipendente dal ciclo-mestruale, poiché l'AMH sembra essere stabile ed ha una variabilità inter-ed intra-ciclo molto bassa. In conclusione, il bilancio degli studi clinici sembra suggerire che la misurazione dell'AMH, prima della somministrazione di gonadotropine, può essere utile per la predizione di quali pazienti saranno poor responders o non risponderanno affatto alle gonadotropine.

Inoltre, l'assenza di modifiche nei livelli sierici di AMH durante tutto il ciclo mestruale, permette ai clinici di avere un marcatore sierico affidabile di riserva ovarica che può essere misurato indipendentemente dal giorno del ciclo.

Predizione di hyper-response e OHSS

L'iperresponsa ovarica rappresenta l'estremità opposta dello spettro della risposta ovarica alla stimolazione e può condurre ad una condizione potenzialmente pericolosa per la salute della donna quale la sindrome da iperstimolazione ovarica (OHSS).

La sindrome ha un ampio spettro di manifestazioni cliniche e va da un lieve malessere che necessita solo di un'attenta osservazione fino ad una grave condizione generalizzata che necessita invece di cure intensive e di ospedalizzazione. I fattori di rischio specifici per l'OHSS comprendono l'età giovane, il basso BMI, segni di PCOS, una precedente storia di OHSS ed elevato estradiolo il giorno della somministrazione dell'hCG (30). Una delle strategie di prevenzione della sindrome è il riconoscimento dei fattori di rischio dell'OHSS, che deve portare ad un'individualizzazione della dose iniziale di gonadotropine che dovrebbe essere la dose minima necessaria per ottenere l'obiettivo terapeutico. Tuttavia, la previsione esatta di OHSS in un ciclo individuale di fecondazione in vitro rimane un compito difficile. Infatti, la PCOS (il principale fattore di rischio utilizzato per la previsione di OHSS) è presente solo nel 20% delle donne sottoposte a COS e in meno del 20% delle pazienti che sviluppano sintomi di OHSS imminente (31, 32).

Il riconoscimento di una relazione dose-risposta tra AMH e la risposta ovarica all'FSH porta ad ipotizzare che l'iperresponsa all'induzione dell'ovulazione potrebbe derivare dall'AMH alto. In questo contesto, un AMH basale alto può essere associato ad un aumentato rischio di sviluppo di OHSS.

Allo stato attuale solo pochi studi sono stati pubblicati su questo argomento.

Tuttavia, sembra che l'iperresponsa e l'OHSS possano essere effettivamente associati a livelli basali di AMH significativamente più elevati (per review vedi ref. 2). In particolare gli studi di Lee et al. (2008) (33) e Nardo et al. (2008) (34) hanno mostrato, in modo indipendente, una simile performance dell'AMH per la predizione di iperresponsa e OHSS. In conclusione, la misurazione dell'AMH prima della stimolazione con gonadotropine potrebbe fornire informazioni utili per l'applicazione di protocolli di stimolazione "mild" per la paziente al fine di evitare l'OHSS.

Predizione della risposta ovarica qualitativa in PMA

E' ampiamente riconosciuto che il successo riproduttivo nella PMA è influenzato più dagli aspetti qualitativi che quantitativi della risposta ovarica ai trattamenti. Poiché lo stato della riserva ovarica comprende sia la quantità sia la qualità del pool follicolare ovarico, l'AMH può riflettere non solo la risposta quantitativa ma anche qualitativa.

Infatti, diversi autori hanno rilevato una significativa correlazione positiva tra i livelli di AMH, la qualità degli ovociti (35, 36) e la morfologia degli embrioni (35). Tuttavia, questo rapporto non è stato confermato da altri (37).

Studi sull'AMH nel liquido follicolare

In uno studio su 118 cicli IVF con singolo follicolo dominante (36), l'AMH è stato misurato nel liquido follicolare ed è stato osservato il destino degli ovociti e degli embrioni generati. Si è constatato che l'impianto dell'embrione e il tasso di gravidanze aumentavano drammaticamente dal gruppo con basso AMH nel fluido follicolare a quello con alto AMH. La morfologia embrionaria era simile nei gruppi, indicando che l'AMH nel fluido follicolare può essere un ulteriore fattore nella selezione dell'ovocita (36). Ciò è particolarmente rilevante nei paesi con leggi restrittive che limitano il numero di ovociti che possono essere inseminati.

Studi sull'AMH circolante

Anche se gli studi sul liquido follicolare sembrano indicare che l'AMH possa essere utile nel predire la qualità ovocitaria ed embrionaria e infine la gravidanza, lo stesso non si può dire per l'AMH circolante. Attualmente solo pochi studi sono giunti alla conclusione che la misurazione dell'AMH sierico possa essere in grado di fornire informazioni rilevanti sui gameti e sulla qualità degli embrioni e sull'esito del ciclo di trattamento.

L'AMH basale non sembra predire la gravidanza o la non-gravidanza, ma semplicemente consente ai pazienti di essere identificati come soggetti con una probabilità bassa o alta di gravidanza dopo fecondazione in vitro (38).

L'AMH e l'ovarian reserve testing

Il test ideale di riserva ovarica dovrebbe permettere l'identificazione delle donne che hanno una probabilità di gravidanza dopo IVF vicina allo zero in conseguenza di una riserva ovarica estremamente ridotta. L'esclusione di queste coppie dalla PMA potrebbe effettivamente ridurre i costi per il sistema sanitario. Inoltre sarebbero evitati alla paziente trattamenti medici inutili, rischi chirurgici, lo stress e la delusione derivanti dal fallimento. D'altro canto, il valore predittivo di AMH per la poor response non è assoluta, con conseguenti risultati falsi positivi e negativi. Soprattutto risultati falsi positivi potrebbero avere conseguenze negative sulla vita della coppia, in quanto tale risultato potrebbe erroneamente proibire a queste donne di sottoporsi a fecondazione in vitro. Inoltre, è stato ampiamente dimostrato che molte poor responders possano raggiungere la gravidanza e avere figli (39, 40). In particolare le poor responders giovani hanno una prognosi diversa rispetto alle poor responders più anziane (41).

Quindi, prima di proporre la misurazione di AMH nei test di riserva ovarica, dovremmo definire qual è lo scopo del test stesso. L'eventuale scopo di testare la riserva ovarica nell'impostazione dell'IVF è: (i) di informare le pazienti circa i rischi / benefici del trattamento, (ii) di ridurre i costi evitando il trattamento alle coppie con cattiva prognosi e (iii) di individuare la corretta strategia di trattamento.

Significato di un basso AMH prima dell'IVF

Per le donne con bassi livelli di AMH, sia la cancellazione del ciclo sia la poor response possono essere molto probabili. Quindi, le coppie dovrebbero essere informate che non tutti i cicli esiteranno con il trasferimento di embrioni e che è molto probabile che le possibilità di successo siano ridotte.

La misurazione di AMH in fase di test di riserva ovarica dovrebbe essere usato con cut-off molto basso, al fine di minimizzare l'evenienza di test falsamente positivi.

Per quanto riguarda il trattamento, non è ancora chiaro se l'individualizzazione della terapia possa migliorare l'outcome. Infatti, in diversi studi le pazienti predette poor responders sembrano non aver tratto molti benefici dalla modificazione della terapia(28). Allo stesso modo non è chiaro quale tipo di GnRH-analogo, agonista o antagonista, possa essere più adatto per la soppressione ipofisaria in queste pazienti.

La Natural-IVF e l'uso di terapie adiuvanti sembrano dare risultati simili allo standard IVF e devono ancora essere valutate in ampi studi, randomizzati controllati (26, 42).

Significato di livelli normali di AMH prima dell'IVF

Le donne con livelli di AMH normali sono molto probabilmente normal responders e può essere anticipata una buona prognosi. Attualmente, non vi è alcuna evidenza per modificare la normale strategia basata sul protocollo standard lungo (43).

Significato di alti livelli di AMH prima dell'IVF

Le donne con livelli di AMH alti sono considerate a rischio per hyperresponse e OHSS. Queste donne dovrebbero, quindi, essere informate di questo rischio. Le donne con alti livelli di AMH sono coloro che possono davvero beneficiare dell'individualizzazione del trattamento. Infatti, un basso dosaggio di partenza di FSH seguita dall'uso di GnRH-antagonisti (44, 45) ha dimostrato di ridurre l'incidenza di OHSS e può essere proposta come trattamento di prima linea per le pazienti con elevati livelli sierici di AMH.

Conclusioni

Recenti studi hanno indicato l'AMH come una nuova importante misura di riserva ovarica. I livelli sierici di AMH mostrano una riduzione nel corso della vita riproduttiva sino a diventare indosabili dopo la menopausa. Allo stesso modo, l'invecchiamento ovarico precoce e l'insufficienza ovarica prematura sono associati, rispettivamente, a livelli sierici molto bassi o non rilevabili (46, 47). Inoltre, i livelli di AMH non cambiano in modo significativo durante il ciclo mestruale (11, 6), mentre per tutti gli altri ormoni secreti dalle ovaie si evidenziano variazioni significative durante il ciclo. La stabilità e la coerenza dei suoi livelli indicano che l'AMH possa essere utilizzato come il più affidabile singolo marcatore dell'invecchiamento ovarico e della risposta ovarica alla COS.

Per le donne che desiderano avere una gravidanza con l'aiuto della PMA, è importante offrire consulenza circa il rapporto rischi/benefici.

Anche se la misurazione dell'AMH è ovviamente più costosa della valutazione dell'età anagrafica come singolo indicatore della riserva ovarica, essa è chiaramente superiore nel predire sia una poor response sia una iperresponsa alla stimolazione (Tabella II). Inoltre, la facilità della misurazione dell'AMH conferisce un rilevante vantaggio rispetto all'FSH, che è ciclo-dipendente ed è meno performante. Infine, sembra che la poor response possa essere predetta dall'AMH con una performance che è simile a quella offerta dall'AFC. Viceversa l'AMH sembra superiore all'AFC nella previsione dell'iperresponsa (34). Considerando queste particolari caratteristiche, si può quindi concludere affermando che l'AMH è l'ormone candidato ad essere il marker ideale per la valutazione della riserva ovarica (Tabella II).

Un nuovo campo di applicazione interessante per la misurazione dell'AMH, può essere il suo impiego nella individuazione di regimi di stimolazione ovarica. In molti centri, la dose iniziale di FSH per la prima fecondazione in vitro è spesso scelta in base all'età e forse anche all'indice di massa corporea della paziente. Alcuni autori hanno recentemente proposto un adeguamento della strategia di trattamento in base ai livelli di AMH (38, 48, 49).

Dal momento che valori bassi e alti di AMH sono predittivi, rispettivamente, di poor- e high- response alle gonadotropine, è stato proposto che la dose giornaliera di FSH fosse calibrata in base ai livelli di AMH pre-FIVET e fosse indipendente dall'età e dall'indice di massa corporea della paziente (38, 48, 49). Ovviamente la possibile individualizzazione della terapia in IVF basata solo su una singola misurazione dell'AMH deve essere confermata in appropriati trial randomizzati controllati.

Referenze

- Visser JA, Themmen AP (2005) Anti-Müllerian hormone and folliculogenesis. *Mol Cell Endocrinol*, 234, 81-6.
- La Marca A, Sighinolfi G, Radi D, Argento C, Baraldi E, Arsenio AC, Stabile G, Volpe A. Anti-Mullerian hormone (AMH) as a predictive marker in assisted reproductive technology (ART). *Hum Reprod Update*. 2010;16:113-30.
- Weenen C, Laven JS, Von Bergh AR, Cranfield M, Groome NP, Visser JA, Kramer P, Fauser BC, Themmen AP (2004) Anti-Mullerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment. *Mol Hum Reprod*, 10, 77-83.
- Rajpert-De Meyts E, Jørgensen N, Graem N, Müller J, Cate RL, Skakkebaek NE. (1999) Expression of anti-Müllerian hormone during normal and pathological gonadal development: association with differentiation of Sertoli and granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 84, 3836-44.
- di Clemente N, Josso N, Gouédard L, Belville C. (2003) Components of the anti-Müllerian hormone signaling

- pathway in gonads. *Mol Cell Endocrinol.*, 211,9-14.
- La Marca A, Stabile G, Arsenio AC, Volpe A. (2006a) Serum anti-Müllerian hormone throughout the human menstrual cycle. *Hum Reprod.*, 21, 3103-7.
- Durlinger AL, Gruijters MJ, Kramer P, Karels B, Kuman TR, Matzuk MM, Rose UM, de Jong FH, Uilenbroek JT, Grootegoed JA, Themmen AP. (2001) Anti-Müllerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary. *Endocrinology*, 142, 4891-4899.
- La Marca A, Broekmans FJ, Volpe A, Fauser BC, Macklon NS; ESHRE Special Interest Group for Reproductive Endocrinology—AMH Round Table. Anti-Müllerian hormone (AMH): what do we still need to know?. *Hum Reprod Update.* 2009;24:2264-75.
- van Rooij IA, Broekmans FJ, Scheffer GJ, Looman CW, Habbema JD, de Jong FH, Fauser BJ, Themmen AP, te Velde ER. (2005) Serum antimüllerian hormone levels best reflect the reproductive decline with age in normal women with proven fertility: a longitudinal study. *Fertil Steril.*, 83,979-87.
- Van Disseldorp J, Faddy MJ, Themmen AP, de Jong FH, Peeters PH, van der Schouw YT, Broekmans FJ. (2008) Relationship of serum antimüllerian hormone concentration to age at menopause. *J Clin Endocrinol Metab.* 93, 2129-34
- Hehenkamp WJ, Looman CW, Themmen AP, de Jong FH, Te Velde ER, Broekmans FJ. (2006) Anti-Müllerian hormone levels in the spontaneous menstrual cycle do not show substantial fluctuation. *J Clin Endocrinol Metab.*, 91,4057-63.
- Tsepelidis S, Devreker F, Demeestere I, Flahaut A, Gervy Ch, Englert Y (2007). Stable serum levels of anti-Müllerian hormone during the menstrual cycle: a prospective study in normo-ovulatory women. *Hum Reprod*, 22, 1837-1840.
- Streuli I, Fraise T, Pillet C, Ibecheole V, Bischof P, de Ziegler D. (2008) Serum antimüllerian hormone levels remain stable throughout the menstrual cycle and after oral or vaginal administration of synthetic sex steroids. *Fertil Steril*, 90, 395-400.
- Pigny P, Jonard S, Robert Y, Dewailly D. (2006) Serum Anti-Müllerian Hormone as a Surrogate for Antral Follicle Count for Definition of the Polycystic Ovary Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.*, 91,941-5
- Webber LJ, Stubbs S, Stark J, Trew GH, Margara R, Hardy K, Franks S. (2003) Formation and early development of follicles in the polycystic ovary. *Lancet.*, 362,1017-21.
- Fallat ME, Siow Y, Marra M, Cook C, Carrillo A. (1997) Müllerian-inhibiting substance in follicular fluid and serum: a comparison of patients with tubal factor infertility, polycystic ovary syndrome, and endometriosis. *Fertil Steril*, 67, 962-5.
- Cook CL, Siow Y, Brenner AG, Fallat ME (2002) Relationship between serum müllerian-inhibiting substance and other reproductive hormones in untreated women with polycystic ovary syndrome and normal women. *Fertil Steril*, 77,141-6.
- Pigny P, Merlen E, Robert Y, Cortet-Rudelli C, Decanter C, Jonard S, Dewailly D. (2003) Elevated serum level of anti-müllerian hormone in patients with polycystic ovary syndrome: relationship to the ovarian follicle excess and to the follicular arrest. *J Clin Endocrinol Metab.*, 88,5957-62.
- La Marca A, Malmusi S, Giulini S, Tamaro LE, Orvieto R, Levratti P, Volpe A. (2004) Anti-Müllerian hormone plasma levels in spontaneous menstrual cycle and during treatment with FSH to induce ovulation. *Hum Reprod.*, 19, 2738-41.
- La Marca A, Orvieto R, Giulini S, Jasonni VM, Volpe A, De Leo V (2004) Müllerian-inhibiting substance in women with polycystic ovary syndrome: relationship with hormonal and metabolic characteristics. *Fertil Steril*, 82, 970-2.
- Laven JS, Mulders AG, Visser JA, Themmen AP, De Jong FH, Fauser BC (2004) Anti-Müllerian hormone serum concentrations in normoovulatory and anovulatory women of reproductive age. *J Clin Endocrinol Metab*, 89, 318-323.
- Pellatt L, Hanna L, Brincat M, Galea R, Brain H, Whitehead S, Mason H (2007). Granulosa cell production of anti-Müllerian hormone is increased in polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol Metab.*, 92,240-5.
- Fleming R, Deshpande N, Traynor I, Yates RW. (2006) Dynamics of FSH-induced follicular growth in subfertile women: relationship with age, insulin resistance, oocyte yield and anti-Müllerian hormone. *Hum Reprod.*, 21,1436-41.
- Seifer DB, MacLaughlin DT, Christian BP, Feng B, Sheldon RM (2002) Early follicular serum müllerian-inhibiting substance levels are associated with ovarian response during assisted reproductive technology cycles. *Fertil Steril*, 77,468-471
- Broer SL, Mol BW, Hendriks D, Broekmans FJ. (2008) The role of antimüllerian hormone in prediction of outcome after IVF: comparison with the antral follicle count. *Fertil Steril.*, Mar 3. [Epub ahead of print]
- Tarlatzis BC, Zepiridis L, Grimbizis G, Bontis J. (2003) Clinical management of low ovarian response to stimulation for IVF: a systematic review. *Hum Reprod Update*, 9,61-76
- Galey-Fontaine J, Cédric-Durnerin I, Chaïbi R, Massin N, Hugues JN. (2005) Age and ovarian reserve are distinct predictive factors of cycle outcome in low responders. *Reprod Biomed Online.* 10,94-9.
- Klinkert ER, Broekmans FJ, Looman CW, Habbema JD, te Velde ER. (2005) Expected poor responders on the basis of an antral follicle count do not benefit from a higher starting dose of gonadotrophins in IVF treatment: a randomized controlled trial. *Hum Reprod.* 20, 611-5.
- Saldeen P, Källen K, Sundström P. (2007) The probability of successful IVF outcome after poor ovarian response. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 86,457-61.
- Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine. (2008) Ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril.* 90, S188-93.
- Bellver J, Muñoz EA, Ballesteros A, Soares SR, Bosch E, Simón C, Pellicer A, Remohí J. (2003) Intravenous albumin does not prevent moderate-severe ovarian hyperstimulation syndrome in high-risk IVF patients: a randomized

- controlled study. *Hum Reprod.*, 18, 2283-8.
- Tummon I, Gavrilova-Jordan L, Allemand MC, Session D. (2005) Polycystic ovaries and ovarian hyperstimulation syndrome: a systematic review. *Acta Obstet Gynecol Scand.*, 84, 611-6.
- Lee TH, Liu CH, Huang CC, Wu YL, Shih YT, Ho HN, Yang YS, Lee MS. (2008) Serum anti-Müllerian hormone and estradiol levels as predictors of ovarian hyperstimulation syndrome in assisted reproduction technology cycles. *Hum Reprod.*, 23, 160-7.
- Nardo LG, Gelbaya TA, Wilkinson H, Roberts SA, Yates A, Pemberton P, Laing I. (2008) Circulating basal anti-Müllerian hormone levels as predictor of ovarian response in women undergoing ovarian stimulation for in vitro fertilization. *Fertil Steril.*, Oct 16. [Epub ahead of print]
- Silberstein T, MacLaughlin DT, Shai I, Trimarchi JR, Lambert-Messerlian G, Seifer DB, Keefe DL, Blazar AS (2006) .Müllerian inhibiting substance levels at the time of HCG administration in IVF cycles predict both ovarian reserve and embryo morphology. *Hum Reprod.*, 21, 159-63.
- Fanchin R, Mendez Lozano DH, Frydman N, Gougeon A, di Clemente N, Frydman R, Taieb J. (2007) Anti-Müllerian hormone concentrations in the follicular fluid of the preovulatory follicle are predictive of the implantation potential of the ensuing embryo obtained by in vitro fertilization. *J Clin Endocrinol Metab.*, 92, 1796-802.
- Lie Fong S, Baart EB, Martini E, Schipper I, Visser JA, Themmen AP, de Jong FH, Fauser BJ, Laven JS. (2008) Anti-Müllerian hormone: a marker for oocyte quantity, oocyte quality and embryo quality? *Reprod Biomed Online*, 16, 664-70
- Nelson SM, Yates RW, Fleming R. (2007) Serum anti-Müllerian hormone and FSH: prediction of live birth and extremes of response in stimulated cycles—implications for individualization of therapy. *Hum Reprod.* 2007, 22, 2414-21
- Klinkert ER, Broekmans FJ, Looman CW, Te Velde ER. (2004) A poor response in the first in vitro fertilization cycle is not necessarily related to a poor prognosis in subsequent cycles. *Fertil Steril.*, 81, 1247-53.
- van der Gaast MH, Eijkemans MJ, van der Net JB, de Boer EJ, Burger CW, van Leeuwen FE, Fauser BC, Macklon NS. (2006) Optimum number of oocytes for a successful first IVF treatment cycle. *Reprod Biomed Online*, 13, 476-80.
- Ulug U, Ben-Shlomo I, Turan E, Erden HE, Akman MA, Bahceci M. (2003) Conception rates following assisted reproduction in poor responder patients: a retrospective study in 300 consecutive cycles. *Reprod Biomed Online*, 6, 439-43.
- Ubaldi FM, Rienzi L, Ferrero S, Baroni E, Sapienza F, Cobellis L, Greco E. Management of poor responders in IVF (2005) *Reprod Biomed Online*, 10, 235-46.
- Daya S. (2000) Gonadotropin releasing hormone agonist protocols for pituitary desensitization in in vitro fertilization and gamete intrafallopian transfer cycles. *Cochrane Database Syst Rev.*, CD001299
- Al-Inany HG, Abou-Setta AM, Aboulghar M. (2006) Gonadotrophin-releasing hormone antagonists for assisted conception. *Cochrane Database Syst Rev.*, CD001750
- Griesinger G, Diedrich K, Devroey P, Kolibianakis EM. (2006) GnRH agonist for triggering final oocyte maturation in the GnRH antagonist ovarian hyperstimulation protocol: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update*, 12, 159-68.
- La Marca A, Pati M, Orvieto R, Stabile G, Carducci Arsenio A, Volpe A. (2006b) Serum Anti-Müllerian Hormone levels in women with secondary amenorrhea. *Fertil Steril*, 85, 1547-9
- Knauff EA, Eijkemans MJ, Lambalk CB, Ten Kate-Booij MJ, Hoek A, Beerendonk CC, Laven JS, Goverde AJ, Broekmans FJ, Themmen AP, de Jong FH, Fauser BC (2008). Anti Müllerian hormone, inhibin B, and antral follicle count in young women with varying degrees of hypergonadotropic ovarian failure. *J Clin Endocrinol Metab.* [Epub ahead of print]
- Nelson SM, Yates RW, Lyall H, Jamieson M, Traynor I, Gaudoin M, Mitchell P, Ambrose P, Fleming R. (2009) Anti-Müllerian hormone-based approach to controlled ovarian stimulation for assisted conception. *Hum Reprod.* Jan 10. [Epub ahead of print]
- Gnoth C, Schuring AN, Friol K, Tigges J, Mallmann P, Godehardt E. Relevance of anti-Müllerian hormone measurement in a routine IVF program. (2008) *Hum Reprod.* 23, 1359-65.

¹ Dipartimento Materno-Infantile, Istituto di Ostetricia e Ginecologia, Università di Modena e Reggio Emilia, 41100 Modena, Italia

ESHRE NEWS

www.eshre.com

a cura di Anna Pia Ferraretti

Annual Meeting

Questo anno il consueto congresso organizzato dall'ESHRE, giunto oramai alla sua 26° edizione, si è tenuto a Roma dal 27 al 30 di Giugno.

Il numero dei partecipanti ha raggiunto un totale di 9204, registrando un aumento di 1149 iscrizioni rispetto ad Amsterdam 2009.

I relatori che hanno preso parte al congresso, provenivano, per la maggior parte, da paesi Europei ma sono intervenute anche personalità scientifiche giunte dagli Stati Uniti, dall'Australia e da paesi emergenti quali l'Egitto, India, Corea del Sud e Iran. Ci siamo così ritrovati al centro di un interessante palcoscenico internazionale, stimolante non solo da un punto di vista strettamente scientifico, ma anche fonte di un affascinante scambio interculturale.

Durante le giornate romane ampio spazio è stato dedicato a dibattiti riguardanti le aree di più recente interesse, come lo studio delle cellule staminali, la preservazione della fertilità e la c.d. "mild stimulation". Oltre alle consuete sessioni dedicate agli aggiornamenti medico-scientifici nel settore della l'andrologia, endocrinologia, l'embriologia e della genetica è stato dato maggior spazio alle problematiche sociali, psicologiche ed etiche che coinvolgono la Medicina della Riproduzione. Una delle tante novità è stata una intera sessione dedicata al "Cross Border Reproductive Care". Il fenomeno della migrazione fra i vari stati per problemi riproduttivi sta, infatti, attraendo sempre maggior attenzione a livello globale e non solo italiano. Certamente non è stato tolto spazio ad aspetti più tecnici quali discussioni sulle linee guida, risultati dei trattamenti, dei follow-up ed anche la chirurgia legata a problematiche connesse con l'infertilità.

Sono stati presentati i risultati dei trattamenti di PMA a livello Europeo del 2007 (Registro EIM) e del registro mondiale ICMART relativi al 2005. In particolare, il registro Europeo ha raccolto dati da 1110 centri di

32 Paesi, per un totale di 479.288 cicli. Il registro EIM copre oggi oltre il 90% della attività svolta in Europa. La percentuale di gravidanza /transfer è risultata del 33.3 % nei cicli FIVET/ICSI, del 21.6% nel trasferimento di embrioni crioconservati e del 43.5% nella donazione di ovociti. La incidenza delle gravidanze multiple è stata inferiore all'1%.

Mantenere un costante monitoraggio è considerato dalla Società Europea un punto fondamentale necessario per l'evoluzione delle procedure verso quell'equilibrio ottimale posto tra la massima efficacia e i minori rischi.

Per quanto riguarda il registro mondiale ICMART, nel 2005 sono stati registrati 838.000 cicli da 54 Paesi, con una "pregnancy rate/ aspiration" del 28.5%. Questi dati permettono di stimare che nel mondo vengono eseguiti ogni anno circa un milione e mezzo di cicli e che nascono circa 300.000 bambini.

Sono stati inoltre presentati i risultati dello studio pilota ESHRE (condotto dai due centri scelti di Bonn e Bologna) per valutare la attendibilità della tecnica di microarray per la cariotipizzazione completa dell'ovocita attraverso la analisi dei due globuli polari. Lo studio ha dimostrato che è possibile effettuare uno screening preimpianto efficace, accurato e riproducibile. La pubblicazione di questi dati servirà da trampolino di lancio per creare ampi trial clinici randomizzati.

Un altro importante aggiornamento è stato presentato sulla conservazione di tessuto ovario in pazienti affette da tumore. Ben 14 bambini nel mondo sono nati dopo trapianto di tessuto congelato/scongelato, alcuni dei quali con un concepimento naturale.

Il meeting è stato preceduto dai "Pre-congress courses" organizzati dai gruppi di interesse Speciale (SIGs) e dalle Task Forces.

In totale i corsi offerti sono stati 13.

Durante il congresso è stata presentata la Federazione

ne Italiana delle Società Scientifiche di Medicina della Riproduzione, le cui finalità sono: una integrazione scientifica dei vari campi di interesse (ginecologia, andrologia, embriologia, genetica etc.) e la formalizzazione di una "Voce univoca" nei confronti della Società e dei Politici.

Durante la consueta assemblea generale dei soci, sono state presentate tre **nuove Task Force**:

- EU tissues and Cells Directive
- Fertility and Viral Diseases
- Management of Fertility Units

Ricordiamo che il prossimo Meeting Annuale si terrà a Stoccolma dal 3 al 6 luglio e quello successivo nel 2012 ad Istanbul.

Ricorrenze nell'ambito ESHRE

Quest'anno la Società ha festeggiato due importanti ricorrenze:

- i 20 anni dalla nascita del primo bambino da PGD
- i 10 anni di attività del Registro Europeo EIM

In occasione della prima ricorrenza, l'ESHRE's PGD Consortium e la SIG Reproductive Genetics hanno organizzato un corso il 1 luglio a Roma. In tale occasione, una carrellata sulla storia ha sottolineato come le nuove tecniche di biologia molecolare abbiano consentito la nascita di figli sani anche in quelle coppie ritenute avere una scarsa e casuale possibilità legata alla presenza di anomalie genetiche e/o cromosomiche.

La seconda ricorrenza è stata celebrata a Monaco di Baviera l'11 di settembre, con un corso che ha visto la partecipazione di tutti i coordinatori nazionali, i veri protagonisti del registro.

Calendario dei Campus /Workshop ESHRE

Tra Ottobre e Dicembre 2010 sono in programma vari Campus, come sempre, organizzati in diversi Stati Europei.

Per quanto riguarda gli appuntamenti in Italia ci teniamo a ricordare:

- "Fertility preservation in cancer" che si terrà a Bologna il 25-26 Novembre 2010
- "Female and male surgery in human reproductive medicine" che si terrà a Treviso l' 8-9 Ottobre 2010

Sul sito della Società è possibile, inoltre, leggere tutte le informazioni riguardanti i training in medicina della riproduzione e la certificazione per gli Embriologi. Visitando la pagina "Special Interest Groups" sempre nel sito è comunque possibile avere un aggiornamento continuo sull'attività dei vari gruppi.

Novità dal sito

D'ora in poi, sul sito, sarà disponibile per i soci ESHRE una sessione denominata "EU connection"; la pagina offre tutte le informazioni sulle novità correlate alla Comunità Europea e alle problematiche legate agli aspetti legislativi della PMA.

Ricordiamo come in Croazia sia stata recentemente approvata una legge sulla PMA molto simile a quella italiana.

Visitare regolarmente il sito permette di avere un aggiornamento continuo sull'attività scientifica della Società, ma anche sulla sua politica più generale.

In particolare, segnaliamo di consultare costantemente la sessione "ESHRE position papers".

News in Medicina della Riproduzione

Tra le varie news clinico-scientifiche, ne riportiamo alcune su temi da tempo controversi.

- 1 Uno studio condotto nel Nord Europa, sul follow-up dei nati da PMA. La maggiore percentuale di difetti congeniti riscontrati nella popolazione PMA rispetto alla popolazione generale è equiparabile a quella osservata in coppie sub-fertili, cioè in coppie che hanno avuto una gravidanza spontanea dopo un prolungato lasso di tempo. Questo dato permette di affermare che, l'aumento dei difetti congeniti non è legato al trattamento in sé, bensì a caratteristiche biologiche specifiche dei soggetti sub-fertili. Conclusioni simili arrivano da uno studio caso-controllo condotto sulla popolazione americana.
- 2 Le Linee Guida della British Fertility Society sull'uso dell'agopuntura. La Società afferma che non esiste, ad oggi, alcuna evidenza sulla efficacia di queste terapie durante il percorso terapeutico dell'infertilità.
- 3 Durante il Campus ESHRE tenutosi a Bologna nel Marzo scorso è stato raggiunto un consenso condiviso da tutti i gruppi di interesse speciale della Società sulla definizione della "Poor Ovarian Response".

HOT TOPICS

dalla letteratura internazionale

a cura di Alberto M. Luciano

Chromosome abnormality rates in human embryos obtained from in-vitro maturation and IVF treatment cycles

Xiao Yun Zhang, Baris Ata, Weon-Young Son, William M. Buckett,
Seang-Lin Tan and Asangla Ao

Reproductive BioMedicine Online Article in Press,

doi:10.1016/j.rbmo.2010.05.002 Available online 13 May 2010

The aim of this retrospective study was to compare the incidence of chromosomal abnormality in embryos from in-vitro maturation (IVM) and IVF cycles. The copy numbers of chromosomes 13, 15, 16, 18, 21, 22, X and Y were assessed with fluorescence in-situ hybridization (FISH) in single blastomeres biopsied from cleavage stage embryos. Spare embryos that were not transferred or cryopreserved were also analysed in full. IVM and IVF groups comprised six and 30 couples, with mean \pm SD embryos with FISH result of 8.0 ± 4.4 and 11.7 ± 3.8 ,

respectively. The incidence of chromosomal abnormality per FISH result was similar in IVM and IVF embryos (58.7% versus 57.4%, respectively). When embryos were categorized based on maturation time of oocytes in IVM cycles, embryos derived from oocytes that matured 48 h after collection had a higher chromosomal abnormality rate compared with embryos derived from in-vivo matured oocytes and to embryos derived from oocytes that matured in the first 24 h after collection.

Effects of Low Methyl Donor Levels in Culture Medium During Mouse Follicle Culture on Oocyte Imprinting Establishment¹

Ellen Anckaert, Sergio Romero, Tom Adriaenssens, and Johan Smitz

BIOLOGY OF REPRODUCTION 83, 377-386 (2010) Published online before print 14 April 2010. DOI 10.1095/biolreprod.109.082164

Imprinted genes are differentially methylated during gameto-genesis to allow parent-of-origin-specific monoallelic expression. We previously demonstrated establishment of normal imprinting at four key imprinted genes in mouse metaphase II oocytes after in vitro follicle culture. Commercially available culture media feature a wide range of methyl donor levels. The aim of the present study was to examine the effect of low methyl donor (methionine, vitamin B12, folic acid, choline, and vitamin B6) levels during follicle culture on acquisition of DNA methylation at imprinted genes in mouse oocytes. Follicle culture performed under low methyl donor levels led to decreased antral follicle development (mean [SD] antral follicle rate, 87.5% [12.6%] vs. 97.7% [4.3%] in control conditions; P , 0.05) and to a dramatic decrease in polar body (PB) oocyte rate (mean [SD] PB oocyte rate, 38.7%

[25.5%] vs. 96.1% [7.1%]; P , 0.001). The methylation status of differentially methylated regions (DMRs) of four key imprinted genes was studied (by bisulphite sequencing) in normal-looking PB and germinal vesicle breakdown-arrested oocytes obtained from follicle culture under low methyl donor levels. DMRs of *Snrpn*, *Igf2r*, and *H19* showed no alteration in DNA methylation, but at *Mest* DMR in PB oocytes, we found a significant reduction in DNA methylation compared to that in control follicle culture (DNA methylation, 89.9% and 98.2%, respectively; P 1/4 0.0014). In conclusion, restriction of methyl donors during follicle culture led to a dramatic decrease in PB oocyte rate but induced no or only minor DNA methylation alterations at the studied regulatory sequences of key imprinted genes in oocytes.

Side-by-side comparison of five commercial media systems in a mouse model: suboptimal in vitro culture interferes with imprint maintenance

B.A. Market-Velker, A.D. Fernandes and M.R.W. Mann

BOR Papers in Press. Published on August 11, 2010 as DOI:10.1095/biolreprod.110.085480

Assisted reproductive technologies are becoming increasingly prevalent, and are generally considered safe medical procedures. However, evidence indicates that embryo culture may adversely affect the developmental potential and overall health of the embryo. One of the least studied but important areas in this regard are effects of embryo culture on epigenetic phenomena, genomic imprinting in particular, as assisted reproduction has been linked to development of the human imprinting disorders Angelman and Beckwith-Wiedemann Syndromes. In this study, we performed side-by-side comparisons of five commercial embryo culture systems (KSOMaa, global, human tubal fluid, preimplantation 1/multiblast, and G1v5PLUS/G2v5PLUS) in relation to a best case (in vivo-derived embryos) and a worst case scenario (Whittens culture). Imprinted DNA methylation and expression were examined at three well-studied loci,

H19, Peg3 and Snrpn, in mouse embryos cultured from the 2-cell to the blastocyst stage. We show that embryo culture in all commercial media systems resulted in imprinted methylation loss compared to in vivo-derived embryos, although some media systems were able to maintain imprinted methylation levels more similar to in vivo-derived embryos in comparison to embryos cultured in Whittens medium. However, all media systems exhibited loss of imprinted H19 expression that was comparable to Whittens medium. Combined treatment of superovulation and embryo culture resulted in an increase in perturbation of genomic imprinting above that of culture alone, indicating that multiple ARTs further disrupt genomic imprinting. These results suggest that time in culture and number of ART procedures should be minimized to ensure fidelity of genomic imprinting during preimplantation development.

Evaluation of epigenetic marks in human embryos derived from IVF and ICSI

Fatima Santos, Louise Hyslop, Petra Stojkovic, Christine Leary, Alison Murdoch, Wolf Reik, Miodrag Stojkovic, Mary Herbert, and Wendy Dean^{1,*}

^{*}Correspondence address. E-mail: wendy.dean@bbsrc.ac.uk

Human Reproduction, Vol.25, No.9 pp. 2387-2395, 2010

Advanced Access publication on July 15, 2010 doi:10.1093/humrep/deq151

Background: It has long been appreciated that environmental cues may trigger adaptive responses. Many of these responses are a result of changes in the epigenetic landscape influencing transcriptional states and consequently altering phenotypes. In the context of human reproductive health, the procedures necessary for assisted reproduction may result in altered phenotypes by primarily influencing DNA methylation. Among the well-documented effects of assisted reproduction technologies (ART), imprinted genes appear to be frequently altered, likely owing to their reliance on DNA methylation to impose parent-specific monoallelic expression. However, the generality of the potential deregulation of DNA methylation in ART-derived human embryos has not been evaluated.

Methods: In this study, we evaluate the genome-wide DNA methylation together with chromatin organisation

in human embryos derived by either IVF (n 14 89) or ICSI (n 14 76). DNA methylation was assessed using an antibody against 5-methyl-cytidine, and chromatin organisation by DNA staining.

Results: Irrespective of the ART procedure, similar errors were observed in both groups and abnormal chromatin was positively correlated (P , 0.001) with inappropriate DNA methylation. Development up to the blastocyst stage was consistent with normal DNA methylation and chromatin organisation, reinforcing the importance of epigenetic regulation to form the early lineages of the blastocyst. Most importantly, we found no evidence that ICSI blastocysts were more severely affected than those derived by IVF.

Conclusions: We conclude that ICSI does not lead to an increased incidence of epigenetic errors (DNA methylation and chromatin) compared with IVF.

CALENDARIO

9° Corso teorico-pratico di Procreazione Medicalmente Assistita*17-18 Settembre 2010**Milano - Aula Magna Mangiagalli*

Coordinatore: Guido Ragni

Segr.Organizzativa: Centro Italiano Congressi CIC

E mail: medicinadellariproduzione@gruppicic.it**16th Congress of The International Society of Psychosomatic Obstetrics and Gynecology***28-30 Ottobre 2010**Venezia*<http://www.ispog2010.com>**XV Week-End Clinico SidR (Società Italiana della Riproduzione)***12-13 Novembre 2010**Taormina*

Presidenti: P.G. Crosignani, A. Volpe

MKT Consulting - Via Cassia 1110 - 00189 Roma

E mail: congressi@mkt-consulting.it**I° Corso SIFIOG****Corso di Medicina complementare in Ginecologia ed Ostetricia***22 Ottobre 2010**Modena*

Direttore del corso: F. Facchinetti

MKT Consulting - Via Cassia 1110 - 00189 Roma

Tel +39 06 39746189 - Fax + 39 0645438292

E mail: congressi@mkt-consulting.it**II Corso Aspetti Clinici e Sociali della Menopausa:***10/11 Dicembre**Messina*

Presidenti: F. Cancellieri, A. Cordopatri, R. D'Anna

MKT Consulting - Via Cassia 1110 - 00189 Roma

E mail: congressi@mkt-consulting.it**VII Corso di Colposcopia SICPCV Gruppo Laziale***4/6 Novembre**Roma*

Presidenti: M. Moscarini, A. Vecchione

Email: congressi@mkt-consulting.it**Corso SidR "Endocrinologia dell'Infertilità Femminile"***28 Gennaio 2011**Palermo*

Presidente: R. Palermo

MKT Consulting - Via Cassia 1110 - 00189 Roma

Tel +39 06 39746189, Fax + 39 0645438292

Email: congressi@mkt-consulting.it**Diagnosi e Terapia della Infertilità di coppia***4/5 Febbraio 2011**Reggio Emilia*

Presidente: G.B., La Sala

MKT Consulting

Via Cassia 1110 - 00189 Roma

Tel +39 06 39746189 - Fax + 39 0645438292

E mail: congressi@mkt-consulting.it**III Workshop SIFIOG***18 Febbraio 2011**Milano*

Presidente F. Vicariotto

MKT Consulting

Via Cassia 1110 - 00189 Roma

E mail: congressi@mkt-consulting.it**III Corso Diagnosi e Terapia Ambulatoriale della Patologia del basso tratto urogenitale femminile***4/5 Marzo 2011**Trieste*

Presidente: F. De Seta

MKT Consulting

Via Cassia 1110 - 00189 Roma

E mail: congressi@mkt-consulting.it**VII Corso di Colposcopia: dalla diagnosi alla terapia***18/19 Marzo 2011**Roma*

Presidente: P.A. Todaro

MKT Consulting

Via Cassia 1110 - 00189 Roma

E mail: congressi@mkt-consulting.it**Congresso Nazionale congiunto SIM-SIFIOG***31 Marzo-2 Aprile 2011**Roma*

Presidenti: F. Facchinetti, V. Unfer, A. Volpe

MKT Consulting

Via Cassia 1110 - 00189 Roma

E mail: congressi@mkt-consulting.it**XVI Week Endo Clinico SidR***15/16 Aprile 2011**Catania*

Presidente: A. Cianci

MKT Consulting

Via Cassia 1110 - 00189 Roma

Tel +39 06 39746189, Fax + 39 0645438292

E mail: congressi@mkt-consulting.it

CORSO PERMANENTE TEORICO-PRATICO IN EMBRIOLOGIA UMANA

Sede del corso

Parte teorica

FONDAZIONE IRCCS Cà Granda
Clinica Mangiagalli
Aula Magna
Via Commenda, 12 Milano

Parte pratica

FONDAZIONE IRCCS Cà Granda
Padiglione Regina Elena
UOSD Centro Sterilità
Via M. Fanti, 6 Milano

Docenti

Sezione Biologia
UOSD Centro Sterilità

Liliana Restelli

Senior Clinical Embryologist
Responsabile Sezione Biologia
Referente Sistema Qualità
biologo

Alessio Paffoni

Senior Clinical Embryologist
Specialista in Genetica Medica
biotecnologo

Cristina Guarneri

biotecnologo

Enrica Capitanio

biotecnologo

Antonella Posa

tecnico di laboratorio

Felicita Boiocchi
tecnico di laboratorio

Sezione Biologia

ATTIVITA'

Le attività previste risultano conformi a:

- Certificazione UNI EN ISO 9001 : 2000
- Legge 40/2004 "Norme in materia di Procreazione Medicalmente Assistita"
- "Linee guida contenenti le indicazioni delle procedure e delle tecniche di Procreazione Medicalmente Assistita" art. 7 L.n° 40/2004. (rev. 2008)
- Decreto Legislativo n. 191 /2007
- Decreto Legislativo n. 16/2010
- Sentenza n°151 del 2009 della Corte Costituzionale
- "ESHRE Guidelines for Good Practice in IVF Laboratories" Revised 2008
- Linee guida "WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen" 5ª Edizione, 2010.

LABORATORIO di SEMINOLOGIA

- Esami liquido seminale
- Esami liquido seminale con test di capacitazione
- Preparazione del seme per IUI
- Tunel test: frammentazione del DNA spermatico

LABORATORIO di EMBRIOLOGIA

- Recupero ovocitario da liquido follicolare
- Classificazione del complesso corona-cumulo-ovocitario
- Classificazione della morfologia degli ovociti
- Selezione degli spermatozoi
- Selezione degli spermatozoi a contrasto interferenziale
- Fertilizzazione in vitro (IVF)/microiniezione intracitoplasmatica (ICSI)
- Coltura e tipizzazione degli embrioni
- Trasferimento in utero degli embrioni

BIOBANCA

- Criopreservazione del seme pre-terapia antitumorale
- Criopreservazione del seme pre-procedure di PMA
- Criopreservazione del seme dopo prelievo dall'epididimo o testicolo
- Criopreservazione degli ovociti
- Criopreservazione degli embrioni

Parte teorica

Durata: 1 giorno - Quota: gratuita

Il corso teorico prevede una giornata di accoglienza e introduzione alle diverse attività pratiche con i tutor qualificati del laboratorio di seminologia ed embriologia.

Parte pratica - Junior

Il corso pratico prevede un tutoraggio per singolo discente.

LABORATORIO di SEMINOLOGIA

Durata: 5 giorni - Quota: 2000 euro

- Esame del liquido seminale in conformità ai parametri di normalità dell'OMS 2010
- Tecniche di capacitazione del liquido seminale per fecondazione assistita
- Criopreservazione del seme

LABORATORIO DI EMBRIOLOGIA

Durata: 5 giorni - Quota: 2000 euro

- Controllo di Qualità nel laboratorio di Embriologia
- Recupero ovocitario da liquido follicolare
- Classificazione del complesso corona-cumulo-ovocitario
- Classificazione della morfologia degli ovociti
- Selezione degli spermatozoi
- Inseminazione degli ovociti. Fertilizzazione in vitro (IVF)/microiniezione intracitoplasmatica (ICSI)
- Valutazione della fecondazione ovocitaria
- Coltura e tipizzazione degli embrioni
- Trasferimento degli embrioni

PROGRAMMA COMPLETO

Durata: 10 giorni - Quota: 3000 euro

Parte pratica - Senior

Il corso pratico prevede un tutoraggio per singolo discente per l'approfondimento di una o più procedure di secondo e terzo livello.

LABORATORIO di SEMINOLOGIA

Durata: 1 giorno - Quota: 1000 euro

- Ricerca degli spermatozoi dall'epididimo o testicolo (Mesa Pesa Tese) e congelamento del seme
- Tunel test: frammentazione del DNA spermatico
- Selezione morfologica degli spermatozoi a contrasto interferenziale

LABORATORIO DI EMBRIOLOGIA

Durata: 2 giorni - Quota: 1500 euro

- Ottimizzazione delle condizioni di cultura
- Valutazione morfologica degli embrioni
- Cultura prolungata degli embrioni a blastocisti
- Valutazione morfologica delle blastocisti
- Microiniezione intracitoplasmatica (ICSI)

LABORATORIO DI CRIOPRESERVAZIONE OVOCITI ED EMBRIONI

Durata: 2 giorni - Quota: 1500 euro

- Tecnica di vitrificazione degli ovociti
- Tecnica di vitrificazione degli embrioni / blastocisti
- Devitrificazione

PROGRAMMA COMPLETO

Durata: 6 giorni - Quota: 2500 euro

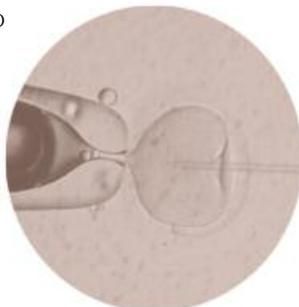
Dispense e attestato

Al termine del corso ad ogni discente verranno consegnate delle dispense inerenti le procedure affrontate durante la parte pratica e l'attestato di frequenza.



FONDAZIONE IRCCS CA' GRANDA

OSPEDALE MAGGIORE POLICLINICO DIPARTIMENTO
PER LA SALUTE DELLA DONNA DEL BAMBINO E DEL NEONATO
U.O.S.D. CENTRO STERILITA'



CORSO PERMANENTE TEORICO-PRATICO IN EMBRIOLOGIA UMANA



RESPONSABILE SCIENTIFICO

Dr. Guido Ragni

Fondazione per la Ricerca sull'Infertilità di Coppia

DIRETTORE DEL CORSO

Dr.ssa Liliana Restelli

Responsabile Sezione Biologia della UOSD

Tel.: 0255034305

e-mail: liliana.restelli@iscali.it

RESPONSABILE UOSD

Dr.ssa Claudia Scarduelli

e-mail: centrosterilita@policlinico.mi.it

SEGRETERIA SCIENTIFICA

Modalità di iscrizione

Dr.ssa Manuela Martorana

Fondazione per la Ricerca sull'Infertilità di Coppia

Tel.: 0255034304

e-mail: fondinfertilita@libero.it

Parte teorica

Iscrizione on-line:

http://corsi.formazione.eu.com

Parte pratica

Iscrizione presso Segreteria Scientifica

Martedì e Giovedì 09.00-14.00



... i prodotti
del nostro
benessere.

FLAM,

Integratore
alimentare

Acido Folico
Lattoferrina
Magnesio
Iodio



Florigen

Intimo
detergente
al tè verde

per informazioni:



GO FARMAS.r.l.
Tel. 06 45443290 • Fax 06 45438292
www.gofarma.it • info@gofarma.it