



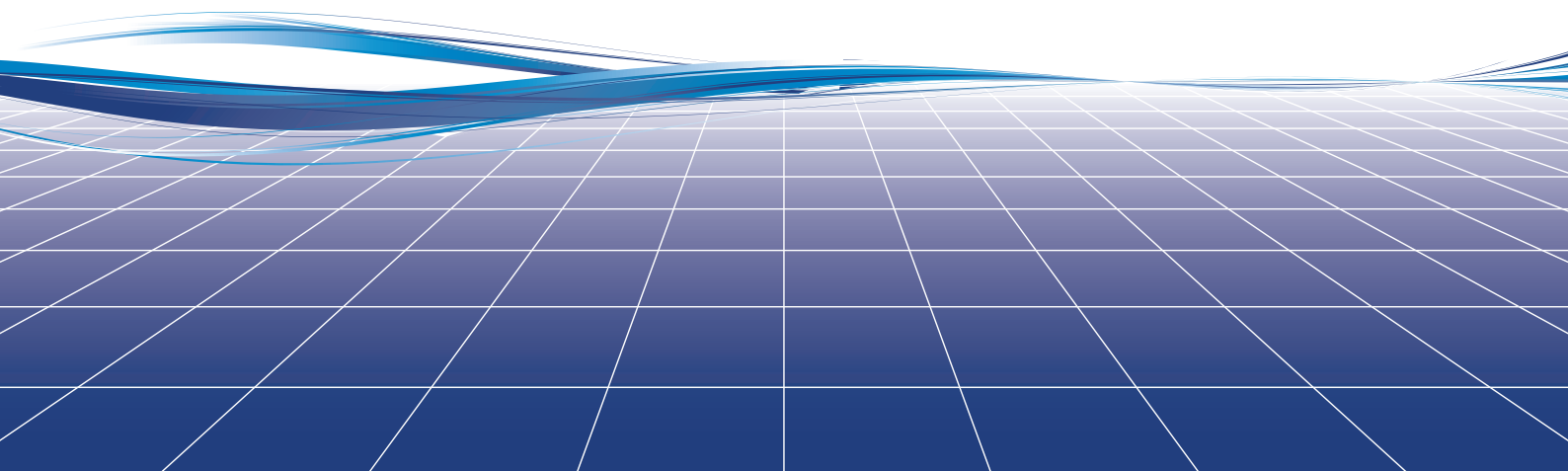
**AIFA**

*Agenzia Italiana del Farmaco*

**AIFA POSITION PAPER**

---

**Approccio farmacologico  
all'infertilità di coppia:  
le gonadotropine**



<b>1. INTRODUZIONE</b>	<b>3</b>
<b>2. LE GONADOTROPINE ESOGENE</b>	<b>4</b>
<b>3. AMBITI E MODALITA' DI UTILIZZO DELLE GONADOTROPINE: DONNA</b>	<b>6</b>
FSH ricombinante (rFSH) vs FSH estrattivo di origine urinaria	7
HCG ricombinante (rHCG) o LH ricombinante (rLH) ad alte dosi vs HCG estrattiva urinaria (uHCG) per l'induzione della maturazione finale ovocitaria	8
Analoghi del GnRH	8
Gli agonisti del GnRH (GnRH-ago)	9
Gli antagonisti del GnRH (GnRH-anta)	9
Utilizzo di formulazioni contenenti LH	10
Risposte inadeguate alla COS	11
COS nelle pazienti <i>poor responders</i>	11
COS nelle pazienti <i>high responders</i>	12
COS per i cicli di inseminazione intrauterina (IUI)	12
COS per Preservazione della fertilità	13
<b>4. AMBITI E MODALITA' DI UTILIZZO DELLE GONADOTROPINE: UOMO</b>	<b>14</b>
<b>5. ASPETTI RELATIVI ALLA SICUREZZA DELLE GONADOTROPINE DI ORIGINE ESTRATTIVA NEI CONFRONTI DI QUELLE OTTENUTE CON DNA RICOMBINANTE</b>	<b>18</b>
Fonte dell'FSH	18
Metodi di purificazione delle gonadotropine	18
Metodi di produzione delle gonadotropine ricombinanti	18
Sicurezza ed efficacia	18
Gonadotropine e patologia ginecologica oncologica	19
<b>6. FARMACOGENOMICA NELL'IMPIEGO DELLE GONADOTROPINE NELLA DONNA E NELL'UOMO</b>	<b>20</b>
Polimorfismi del recettore dell'FSH e delle catene dell'FSH	20
<b>7. IMPIEGHI OFF-LABEL DELLE GONADOTROPINE</b>	<b>22</b>
Perdita di peso	22
Terapia del dolore cronico	22
Miglioramento delle prestazioni sportive (Doping)	22
<i>Social Freezing</i>	22
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>23</b>

## 1. INTRODUZIONE

L'infertilità di coppia viene definita come l'incapacità di concepire dopo un periodo di 12-18 mesi di rapporti sessuali regolari senza adozione di misure contraccettive; essa viene distinta in primaria, quando la coppia non è mai riuscita a concepire, e secondaria, quando si è già verificato un concepimento.

Attualmente si stima che l'infertilità di coppia interessi dall'8% al 20% delle coppie in età fertile. Complessivamente la stima di prevalenza internazionale è pari al 9% (3,5%-16,7% nei Paesi industrializzati e 6,9%-9,3% nei Paesi in via di sviluppo).

Va considerato che la probabilità di un concepimento si aggira intorno al 20%-25% per ogni ciclo potenzialmente riproduttivo e al 60% nei primi 6 mesi, per arrivare all'84% nel primo anno e al 92% nel secondo. Circa una coppia su dieci si rivolge al medico a causa di problemi di infertilità.

Le cause dell'infertilità possono essere ricondotte a fattori maschili, come alterazioni quantitative e qualitative dei parametri seminali, femminili o riferiti a entrambi i membri della coppia, mentre in circa il 5%-15% dei casi rimane di origine sconosciuta. In particolare, i dati del registro italiano sulla Procreazione Medicalmente Assistita (PMA) mostrano che le indicazioni a tali trattamenti sono nel 35,5% dei casi determinate da cause femminili (disordini ovulatori, endometriosi, malformazioni degli organi sessuali), nel 35,4% da cause maschili, nel 15% da cause di coppia, nel 13,2% da cause idiopatiche e circa nell'1% da altre cause.

L'approccio farmacologico all'infertilità di coppia può variare in base all'eziologia e sia nell'uomo che nella donna si avvale dell'impiego delle gonadotropine umane (estrattive e ricombinanti) FSH, LH o HCG, da sole o in combinazione e di altre molecole.

Le gonadotropine sono ormoni di natura glicoproteica composte da due subunità proteiche, alfa e beta, legate da legami non covalenti. La subunità alfa contiene 92 aminoacidi (AA) ed è identica nell'FSH, LH e HCG. Al contrario, le subunità beta sono differenti e conferiscono una specificità recettoriale, nonché proprietà biologiche differenti. Il grado e le caratteristiche di glicosilazione di queste molecole conferiscono carica, bioattività ed emivita differenti per ciascun tipo di glicoproteina. Gli oligosaccaridi terminano spesso con acido sialico o solfonato. Le molecole con un gran numero di solfonati hanno un'emivita più breve rispetto alle isoforme meno solfonate, in relazione alla loro maggiore affinità con specifici recettori epatici. D'altra parte, gli acidi sialici ne aumentano l'emivita.

## 2. LE GONADOTROPINE ESOGENE

Le gonadotropine esercitano un effetto stimolante sulle gonadi maschili e femminili e includono l'ormone follicolo-stimolante (FSH) e l'ormone luteinizzante (LH), di origine ipofisaria, e la gonadotropina corionica (HCG), di origine placentare. Le gonadotropine utilizzate a scopo farmacologico si possono ottenere per estrazione da urina umana o mediante tecnologia del DNA ricombinante. La varietà dei prodotti a nostra disposizione consente di effettuare protocolli di trattamento altamente personalizzati.

La prima generazione di gonadotropine, utilizzata negli anni '70, era costituita dalla menotropina (*Human Menopausal Gonadotropin* - HMG), ossia da gonadotropine umane estratte dalle urine di donne in postmenopausa e costituite da una combinazione di LH e FSH in rapporto 1:1.

In seguito, dagli inizi degli anni '80, è stata prodotta una notevole varietà di gonadotropine, come l'FSH purificato (FSH-P), con contenuto inferiore a 1 UI di LH per 75 UI di FSH, fino all'avvento, nei primi anni '90, delle gonadotropine urinarie di terza generazione, altamente purificate (*Highly Purified* FSH, FSH-HP) in cui il contenuto di LH è ridotto a meno di 0,1 UI per 75 UI di FSH. Alla fine degli anni '90 è comparsa la quarta generazione di gonadotropine, prodotta attraverso la tecnologia del DNA ricombinante (rFSH), totalmente purificata dal contenuto di LH, seguita poi dalla realizzazione di una formulazione di LH ricombinante (rLH). Di recente, è stata messa a punto una nuova forma di FSH ricombinante, la corifollitropina alfa, che presenta, rispetto all'rFSH che necessita di somministrazione giornaliera, una farmacocinetica diversa, che si traduce in una più lunga durata di azione richiedendo, per i primi sette giorni di stimolazione, una sola somministrazione settimanale invece delle singole somministrazioni giornaliere degli altri tipi di FSH.

Ancora più recentemente è stata messa a punto la Follitropina delta, FSH ricombinante espressa unicamente in linee cellulari fetali di retina umana. Essa, in un recente RCT, ha dimostrato la non inferiorità, sia per l'efficacia che per la sicurezza, rispetto alle altre gonadotropine (Anders Nyboe Andersen et al., 2017).

Una ulteriore novità è rappresentata da una nuova formulazione di HMG, in cui l'attività LH proviene da HCG placentare (Lockwood G. et al., 2017).

Nella Tabella 1 vengono riassunte le gonadotropine attualmente in commercio in Italia. La rimborsabilità da parte del SSN è regolata dalla Nota AIFA 74, su diagnosi e piano terapeutico di strutture specialistiche, ed è limitata a:

1. Trattamento dell'infertilità femminile in donne di età non superiore ai 45 anni e con valori di FSH, al 3° giorno del ciclo, non superiori a 30 mUI/mL;
2. Preservazione della fertilità femminile: in donne di età non superiore ai 45 anni affette da patologie neoplastiche, che debbano sottoporsi a terapie oncologiche in grado di causare sterilità transitoria o permanente;
3. Trattamento dell'infertilità maschile in uomini con ipogonadismo-ipogonadotropo con livelli di gonadotropine bassi o normali e, comunque, con FSH non superiore a 8 mUI/mL.

TABELLA 1. Gonadotropine attualmente in commercio in Italia

	ATTIVITÀ - INDICAZIONI	PRINCIPIO ATTIVO
<b>FSH</b>	Stimolazione farmacologica della crescita mono e multi-follicolare per l'induzione dell'ovulazione. Trattamento dell'ipogonadismo ipogonadotropo nell'uomo (la corifollitropina alfa non ha indicazione nell'uomo).	<b>RICOMBINANTE:</b> Follitropina alfa Follitropina beta Corifollitropina alfa CLASSE A, NOTA 74
		<b>ESTRATTIVO:</b> Urofollitropina CLASSE A, NOTA 74
<b>LH</b>	In associazione con una preparazione a base di FSH, è raccomandato per la stimolazione dello sviluppo follicolare in donne adulte con grave insufficienza di LH ed FSH. Negli studi clinici tali pazienti venivano identificate in base a livelli sierici di LH endogeno <1,2 UI/l.	<b>RICOMBINANTE:</b> Lutropina alfa CLASSE A, NOTA 74
<b>FSH + LH</b>	Stimolazione farmacologica della crescita follicolare in donne adulte con carenza di LH ed FSH (ipogonadismo ipogonadotropo); negli studi clinici tali pazienti venivano identificate in base a livelli sierici di LH endogeno < 1,2 UI/L.	<b>RICOMBINANTE:</b> Follitropina alfa + Lutropina alfa CLASSE A, NOTA 74
	Anovulazione, inclusa la Sindrome dell'Ovaio Policistico (PCOD), in donne che non rispondono al trattamento con clomifene citrato.  Iperstimolazione ovarica controllata per l'induzione dello sviluppo follicolare multiplo durante tecniche di riproduzione assistita (ART) [ad esempio: fecondazione in vitro/trasferimento embrionale (FIVET), trasferimento di gameti all'interno delle tube (GIFT) e iniezione intracitoplasmatica di spermatozoi (ICSI)].	<b>ESTRATTIVO:</b> Menotropina CLASSE A, NOTA 74
<b>HCG</b>	Induzione della maturazione finale del/i follicolo/i e della luteinizzazione dopo la stimolazione della crescita follicolare.	<b>RICOMBINANTE:</b> Coriogonadotropina alfa CLASSE A, NOTA 74
	Nella donna: induzione dell'ovulazione nei casi di infertilità dovuta ad anovulazione o a mancata maturazione del follicolo; preparazione dei follicoli al prelievo nel corso della applicazione di programmi di iperstimolazione ovarica controllata; supporto alla fase luteinica.	<b>ESTRATTIVO:</b> Gonadotropina Corionica CLASSE A
	Nell'uomo: ipogonadismo ipogonadotropo, induzione della spermatogenesi nell'ipogonadismo ipogonadotropo, ritardo puberale associato a deficit della funzione gonadotropica dell'ipofisi; criptorchidismo non dovuto ad ostruzione anatomica.	<b>ESTRATTIVO:</b> Gonadotropina Corionica CLASSE A/C

### 3. AMBITI E MODALITA' DI UTILIZZO DELLE GONADOTROPINE: DONNA

La perdita progressiva del potenziale di fertilità nelle donne, con il passare degli anni, è dovuta principalmente al declino quantitativo e qualitativo dei follicoli ovarici e quindi degli ovociti, processo che si accentua soprattutto durante la quarta e quinta decade di vita. Questo problema assume un'importanza fondamentale nel trattamento dell'infertilità di coppia, in quanto l'invecchiamento ovarico è un fattore determinante per l'efficacia dei trattamenti. La qualità ovocitaria è età-dipendente, mentre il patrimonio ovocitario è influenzato da fattori genetico-familiari, pregressi interventi chirurgici a livello pelvico, endometriosi, chemioterapie e radioterapie. Prima di impostare un protocollo terapeutico, pertanto, è necessario stabilire i criteri di un'accurata valutazione della riserva ovarica (La Marca & Sunkara, 2014). Tale valutazione si basa, oltre che sugli usuali parametri della semeiotica classica, su indagini strumentali e ormonali quali la conta ecografica dei follicoli antrali (AFC) e il dosaggio sierico dell'ormone antimulleriano (AMH).

I disordini ovulatori che possono manifestarsi con alterazioni del ciclo mestruale sono la causa del 25% dei casi di infertilità di coppia (WHO, 2004).

L'utilizzo delle gonadotropine per ripristinare l'ovulazione per rapporti spontanei rappresenta un efficace trattamento, insieme con un adeguato stile di vita, per le forme di anovularietà, classificate come Gruppo 1 e 2 dal WHO; peraltro, la terapia con antiestrogeni (citrato di clomifene) rimane il trattamento di prima linea per le donne con PCOS. Nel trattamento degli stati anovulatori la finalità è ottenere la maturazione di un unico follicolo, utilizzando dosaggi medio-bassi di gonadotropine, attraverso una rigorosa personalizzazione delle dosi, allo scopo di mantenere inalterato il meccanismo di dominanza follicolare.

L'introduzione della stimolazione ovarica controllata (COS) per lo sviluppo multiplo follicolare ha significativamente aumentato i tassi di gravidanza nelle tecniche PMA. L'uso di farmaci induttori dell'ovulazione ad alto dosaggio, infatti, permette il superamento della dominanza monofollicolare e consente di portare a maturazione finale la coorte di follicoli antrali presenti. La prima tappa del trattamento della sterilità mediante tecniche di PMA consiste nell'induzione della crescita follicolare multipla (ICFM) utilizzando, in maniera personalizzata e nel rispetto della sicurezza, dosaggi di gonadotropine maggiori rispetto a quelli utilizzati per l'induzione dell'ovulazione. Sono attualmente disponibili diversi protocolli che utilizzano FSH, eventualmente associato ad LH. Allo scopo di prevenire il picco intempestivo di LH, che comporterebbe il fallimento del ciclo di ICFM, sono stati introdotti nell'uso terapeutico farmaci analoghi del GnRH con azione agonista o antagonista.

I protocolli di stimolazione sono stati sviluppati e raffinati per permettere il miglior rapporto costo-efficacia in termini di *compliance* e *safety* della paziente e costo complessivo dei trattamenti.

In questi ultimi anni, alla ricerca di una sempre maggiore personalizzazione dei trattamenti, si sono fatti grandi passi avanti per quanto riguarda la corretta profilazione della paziente prima di intraprendere un percorso di fecondazione assistita in base all'età, alla riserva ovarica, alla tipologia del trattamento e/o a eventuali stimolazioni precedenti.

Un problema chiave nella gestione dei cicli di stimolazione ovarica controllata è la dose ottimale di FSH da impiegare nelle singole pazienti per ottimizzare i risultati minimizzando i rischi.

La personalizzazione del protocollo di stimolazione si dovrebbe basare sulla predizione della risposta ovarica di ogni singola paziente.



La molecola principale che viene impiegata per la stimolazione della crescita follicolare è l'FSH sotto forma di somministrazione giornaliera o, come nel caso della corifollitropina alfa, in un'unica somministrazione settimanale.

FSH (somministrazione giornaliera a dosaggi variabili): è utilizzato per l'induzione della crescita follicolare, che viene monitorata per via ecografica e/o attraverso il dosaggio ematico dell'estradiolo. La durata della stimolazione è variabile da caso a caso e si conclude quando il follicolo/follicoli selezionato/selezionati raggiunge/raggiungono dimensioni adeguate. In caso di carenza assoluta o relativa di LH (ipogonadismo ipogonadotropo), oltre a FSH, può essere somministrata una gonadotropina ricombinante ad attività LH (rLH) o un'associazione di FSH e LH.

Corifollitropina alfa (100 o 150 mcg in base all'età e al peso corporeo della paziente): rappresenta una nuova forma di FSH ricombinante a più lunga emivita, che consente, grazie alla particolare farmacocinetica, di sostenere la crescita follicolare multipla per 7 giorni. Ciò è possibile grazie ad una singola somministrazione sottocutanea in fase follicolare precoce seguita, se necessario, a partire dall'ottavo giorno di stimolazione, da somministrazioni giornaliere di FSH ricombinante. La Corifollitropina alfa viene proposta nell'ambito di un protocollo a schema fisso con antagonista del GnRH. Una volta raggiunti i criteri per l'induzione della maturazione finale ovocitaria viene somministrata un'iniezione unica di HCG (5.000 o 10.000 UI di HCG estrattivo o 250 µg di rHCG).

In letteratura i dati sull'impiego della corifollitropina alfa in associazione a un GnRH agonista sono limitati; pertanto, il suo utilizzo non è raccomandato in associazione ad un GnRH agonista (Fatemi et al., 2010; Polyzos et al., 2015).

Tale molecola è controindicata nelle pazienti affette da sindrome dell'ovaio policistico e/o con anamnesi positiva per rischio di sviluppo della sindrome da iperstimolazione ovarica.

### **FSH ricombinante (rFSH) vs FSH estrattivo di origine urinaria**

In un recente documento (marzo 2016) la Società Italiana di Farmacologia (SIF) giunge alla conclusione che "in linea generale, sulla base delle evidenze scientifiche descritte precedentemente, le gonadotropine di origine urinaria/estrattiva e ricombinanti sono farmaci di sovrapponibile efficacia e sicurezza nella stimolazione ovarica delle ART". Tale affermazione è condivisibile sulla base dei dati della letteratura citati in seguito ed è in linea con quanto riportato dal Royal College of Obstetricians and Gynaecologists (NICE Clinical Guidelines, 2013, raccomandazione 142).

In una revisione di Trew et al. (2010) sono stati messi a confronto i risultati ottenuti con rFSH o HMG-HP in cicli di fecondazione in vitro nell'ambito di protocolli lunghi di stimolazione con GnRH agonista. Gli autori concludono che l'impiego di rFSH consente di ottenere un maggior numero di ovociti maturi impiegando un numero di UI inferiore rispetto a HMG-HP. Non si è riscontrata una differenza significativa sulle percentuali di gravidanza, mentre si è avuta una maggiore incidenza di sindrome da iperstimolazione con rFSH. In uno studio, su 400.135 cicli di PMA, Sunkara et al. (2011) hanno dimostrato che, in tutte le fasce di età, vi è una correlazione tra il numero di ovociti recuperati e il tasso di nati vivi nei cicli a fresco. Il recupero di un numero ottimale di ovociti può garantire un migliore tasso di gravidanza cumulativo ottenuto dal trasferimento di embrioni freschi e congelati (Capalbo et al., 2011; Ji J et al., 2013).

Nella metanalisi del 2011 di Van Wely è stata confrontata l'efficacia nella stimolazione follicolare multipla

in donne sottoposte a fecondazione in vitro mediante FIVET o ICSI, della follitropina ricombinante (rFSH) con tutti i diversi tipi di gonadotropine urinarie disponibili (HMG, FSH-P, FSH-HP), considerando come *outcome* primario la percentuale di nati vivi e come *outcome* secondario la percentuale di gravidanze clinicamente accertate (a qualunque settimana).

I due tipi di trattamento non hanno mostrato differenza significativa in termini di percentuale di nati vivi o gravidanze in corso (23,6% per rFSH vs 24,5% per gonadotropine urinarie, 28 RCT, 7339 coppie, (OR) 0.97, 95% CI 0.87 a 1.08). Anche in relazione all'*outcome* secondario, nell'analisi degli studi inclusi non si sono riscontrate differenze statisticamente significative (OR 1,05; IC 95%: 0,91-1,20). In una meta-analisi di Lehert et al. (2010) sono stati valutati sedici studi controllati randomizzati che confrontavano l'utilizzo di HMG e r-FSH nella stimolazione ovarica, con il numero di ovociti recuperati come *endpoint* primario di efficacia. Il trattamento con HMG comportava un numero inferiore di ovociti (-1,54; 95% CI: -2,53 a -0,56;  $P < 0,0001$ ) rispetto all'r-FSH e una dose totale di HMG necessaria più elevata rispetto all'r-FSH (differenza media 235,46 UI [95% CI: 16,62 a 454,30;  $P = 0,03$ ]).

Nella metanalisi di Gerli et al. (2013) è stata confrontata l'efficacia clinica in cicli FIVET ed ICSI di una preparazione di FSH altamente purificato vs rFSH. Non ci sono state differenze tra l'FSH-HP e l'r-FSH in termini di percentuale di nati vivi (OR 0,85, 95% CI 0,68-1,07), numero di ovociti recuperati, numero di ovociti maturi e giorni di stimolazione.

#### **HCG ricombinante (rHCG) o LH ricombinante (rLH) ad alte dosi vs HCG estrattiva urinaria (uHCG) per l'induzione della maturazione finale ovocitaria**

Nella metanalisi di Youssef et al. (2011) è stata confrontata l'efficacia e la *safety* nell'induzione della maturazione finale dell'ovocita in donne sottoposte a FIVET o ICSI, di HCG ricombinante (rHCG) vs HCG urinario (uHCG) e di LH ricombinante (rLH) ad alte dosi vs uHCG. Tali autori hanno incluso 14 *Randomized Clinical Trial* (RCT), per un totale di 2.306 donne di età compresa tra 18-45 anni, con ciclo mestruale regolare di 24-35 giorni, livelli di FSH  $< 12$  UI/L al 3° giorno del ciclo, senza precedente sindrome da iperstimolazione ovarica (OHSS). L'analisi dell'*endpoint* primario, gravidanze in corso o nati vivi per coppia, ha evidenziato che non esiste una differenza significativa di efficacia né per rHCG vs uHCG in 6 studi per 1.019 coppie (35,4% vs 40,0%, OR 1,04; IC 95% 0,79-1,37), né per rLH vs uHCG in 2 studi per 280 coppie (18,8% con rHCG vs 19,9% con uHCG, OR 0,94; IC 95% 0,50-1,76). Il numero delle sole gravidanze in corso per coppia è stato significativamente maggiore con l'utilizzo di rHCG rispetto a uHCG (36,4% vs 31,2%, OR 1,28; IC 95% 1,00-1,65) in 8 studi per 1.206 coppie, ma non con rLH vs uHCG, in 2 studi per 280 coppie partecipanti (25,0% vs 26,5%, OR 0,93; IC 95% 0,53-1,63). In conclusione, non è emersa alcuna differenza statisticamente significativa fra i due tipi di trattamento.

#### **Analoghi del GnRH**

Gli analoghi del GnRH sono stati introdotti nelle strategie di stimolazione ovarica controllata (COS) al fine di consentire il pieno controllo della follicologenesi multipla da parte delle gonadotropine esogene, prevenendo, quindi, possibili attivazioni delle connessioni funzionali dell'attività ovarica con la funzione dell'unità ipotalamo-ipofisaria (feedback positivo mediato dagli estrogeni). Nella COS, così come nelle altre indicazioni, l'effetto farmacologico che si intende ottenere con l'impiego di queste molecole è l'inibizione della funzione dell'asse ipofisi-gonadi e il picco intempestivo di LH.

L'esperienza clinica degli ultimi 20 anni ha identificato negli analoghi del GnRH imprescindibili strumenti



nei protocolli di stimolazione in PMA e oggi vengono considerati parte dei protocolli di stimolazione (Raccomandazione 137/138 NICE).

Gli analoghi del GnRH si dividono in agonisti e antagonisti, che differiscono per il meccanismo d'azione e per l'impiego terapeutico nella pratica clinica.

### **Gli agonisti del GnRH (GnRH-ago)**

Gli agonisti del GnRH sono stati introdotti nella pratica clinica a partire dagli anni '80 per evitare il picco prematuro dell'LH durante un protocollo di stimolazione. L'impiego di tali molecole ha portato a una significativa diminuzione dei cicli cancellati. Sono una categoria di molecole di origine sintetica in cui sono stati sostituiti vari aminoacidi presenti nella struttura iniziale del GnRH.

La somministrazione dei GnRH-ago determina una sequenza di eventi a livello delle cellule gonadotrope della adenoipofisi quali:

- a. Una fase iniziale di rilascio massivo di gonadotropine (effetto *flare-up*), la cui durata è di 1-2 settimane;
- b. Una successiva fase di inibizione della sintesi e del rilascio di gonadotropine determinata dalla desensibilizzazione dei recettori specifici delle cellule gonadotrope ipofisarie, che si prolunga alcuni giorni oltre la sospensione della somministrazione del GnRH-ago.

Le diverse vie di somministrazione dei GnRH-ago possono influenzare il loro assorbimento e il grado di soppressione (sottocutanea o nasale, quest'ultima oramai poco utilizzata).

Attualmente vengono impiegati vari schemi di trattamento: lungo, corto o ultra-corto. Il protocollo lungo prevede la somministrazione del GnRH-ago generalmente a partire dalla fase luteinica del ciclo precedente la stimolazione fino al giorno dell'induzione della maturazione finale ovocitaria con HCG.

Il protocollo corto, invece, prevede la somministrazione dell'agonista del GnRH contemporaneamente all'inizio della stimolazione con le gonadotropine, fino all'induzione della maturazione finale con HCG o, più precocemente, nel caso del protocollo ultra-corto. Questo allo scopo di sfruttare il suddetto effetto *flare-up*.

### **Gli antagonisti del GnRH (GnRH-anta)**

I GnRH-anta sono decapeptidi con una proporzione di sostituzione nella sequenza aminoacidica che varia dal 50% al 70% delle posizioni.

A differenza dei GnRH-ago, tutti i GnRH-anta si legano competitivamente al recettore per il GnRH nativo, non ne determinano desensibilizzazione e inducono un'immediata soppressione del rilascio delle gonadotropine, con un effetto dose-dipendente.

Gli antagonisti del GnRH possono essere utilizzati con:

- Schema fisso (dal 5°- 6° giorno di stimolazione, a seconda della risposta ovarica e/o dei livelli di estradiolo);
- Schema flessibile (in base al diametro follicolare di 14 mm), per evitare il picco spontaneo dell'LH.

L'introduzione nella pratica clinica dei GnRH antagonisti, oramai ampiamente utilizzati, ha consentito una riduzione nella durata dei protocolli di stimolazione, nella dose complessiva di gonadotropine utilizzata e nell'incidenza del rischio di OHSS.

L'introduzione degli antagonisti del GnRH ha reso possibile l'impiego nella pratica clinica dei protocolli di *mild stimulation* basati sulla teoria della "Finestra dell'FSH", secondo la quale la crescita del follicolo dominante è tempo-dipendente e FSH-dose dipendente. Pertanto tale protocollo è caratterizzato da livelli di FSH continui ma moderati durante la fase medio-tardiva della follicologenesi, in modo tale da ottenere un'estensione del periodo finestra e una selezione di più follicoli.

Un'altra modalità terapeutica attualmente impiegata è quella di riprendere, in pazienti trattate con analoghi e antagonisti del GnRH, la stimolazione follicolare nei giorni immediatamente successivi al prelievo ovocitario. Tale trattamento può consentire l'accumulo di ovociti da sottoporre a congelamento allo scopo di aumentare il numero di gameti femminili disponibili per le procedure di microiniezione (Vaiarelli et al., 2017).

### Utilizzo di formulazioni contenenti LH

L'aggiunta di LH alla stimolazione ormonale con FSH è prevista in casi selezionati in cui non sono garantiti livelli endogeni sufficienti di LH (ipogonadismo ipogonadotropo, aumentata soppressione di LH endogeno in cicli con analoghi del GnRH, età avanzata, ridotta sensibilità all'FSH). In tali casi appare opportuno aggiungere dosi terapeutiche di LH esogeno fin dai primi giorni di stimolazione, o nel corso della stessa, utilizzando formulazioni contenenti FSH ed LH, ovvero aggiungendo LH puro al protocollo con FSH, o sfruttando l'azione LH simile delle preparazioni contenenti HCG.

Come indicato nella Tabella 1 sono disponibili numerose formulazioni dove LH è presente in proporzioni variabili con FSH di origine estrattiva o ricombinante. Esiste altresì una formulazione di LH ricombinante priva di FSH. In particolare, sono disponibili tre gruppi di gonadotropine con attività LH: l'HMG urinaria, in cui l'attività LH è dovuta alla presenza dell'HCG, la molecola pura di LH prodotta dalla tecnologia del DNA ricombinante (lutropina alfa) e una combinazione di FSH e LH in un rapporto fisso di 2:1, prodotto anche mediante tecnologia ricombinante.

In un recente studio prospettico randomizzato controllato sono state confrontate le gonadotropine umane menopausali (HMG) e FSH ricombinante per quanto riguarda gli *outcomes* clinici e l'insorgenza di una sindrome da iperstimolazione ovarica (OHSS) in pazienti con sindrome dell'ovaio policistico (PCOS) sottoposte a FIVET (Figen Turkcapar et al., 2013).

Nel gruppo HMG è stato osservato un picco di estradiolo significativamente inferiore ( $p=0.02$ ), meno follicoli di diametro intermedio ( $p=0.001$ ), un più basso numero di ovociti recuperati ( $p=0.002$ ) e di ovociti in metafase II (MII) ( $p=0.003$ ), quest'ultimo dato verosimilmente atteso anche per la categoria di pazienti incluse nello studio. Bühler et al. (2014) hanno evidenziato che, nella pratica clinica, l'LH (nello studio in oggetto utilizzato in associazione con rFSH in un rapporto 1:2) è utilizzato principalmente nelle pazienti *poor responders* e in quelle di età superiore ai 35 anni. Il rationale di questa scelta consiste nell'ipotesi che, in questo sottogruppo di pazienti, i livelli di LH possano essere troppo bassi riducendo sia la risposta alla stimolazione che la percentuale di successo (Humaidan et al., 2004). Sebbene sia stato dimostrato che per un'adeguata steroidogenesi ovarica è sufficiente che sia occupato solo l'1% dei recettori per LH (Chappel & Howles, 1991), nella pratica clinica è difficile determinare quali siano i livelli minimi di LH per ottenere questo effetto e quindi definire a priori quali siano le pazienti che possono beneficiare di una supplementazione di LH.

Una meta-analisi di Hill et al., pubblicata nel 2012, che ha incluso sette studi con diversi protocolli di soppressione ipofisaria (quattro con agonisti, uno con il *flare-up* e uno con antagonisti) per un totale di 902 cicli, suggerisce che l'aggiunta di LH potrebbe essere vantaggiosa nelle pazienti di età superiore ai 35 anni. D'altra parte altri due studi prospettici pubblicati successivamente (Fábregues, 2011 e Musters, 2012) non hanno confermato questa ipotesi, trattandosi di pazienti di età avanzata sopresse con agonisti.

Un altro punto controverso riguarda il giorno di inizio di un'eventuale supplementazione di LH in queste pazienti. Nella maggior parte degli studi condotti in donne di età superiore ai 35 anni, la somministrazione di LH ricombinante è stata iniziata in fase medio-follicolare (König et al., 2013). Al contrario, secondo Bosch et al. (2014) l'inizio della somministrazione di LH dovrebbe essere il primo giorno di stimolazione, sia per la riduzione dei livelli di progesterone il giorno dell'induzione con HCG, sia per la selezione di un maggior numero di ovociti MII. Questa ipotesi della somministrazione precoce di LH non è tuttavia confermata da una recente meta-analisi su pazienti non selezionate per età (Xiong et al., 2014).

Da una recentissima revisione realizzata da Mochtar et al. (2017) non emerge con chiara evidenza una differenza significativa tra regimi che prevedano l'uso combinato di rLH e rFSH rispetto a trattamenti che prevedevano solo rFSH, sia in termini di nascite che di rischio di OHSS.

Il gruppo di lavoro ha concluso che al momento non ci siano evidenze in grado di scoraggiare o incoraggiare regimi terapeutici che prevedano l'associazione di rLH al rFSH nei programmi di iperstimolazione ovarica controllata per i cicli di FIV/ICSI.

### Risposte inadeguate alla COS

Una risposta alla stimolazione ovarica controllata di una paziente *normoresponder* dovrebbe consentire non solo un recupero ovocitario adeguato sulla base della riserva ovarica precedentemente valutata, ma anche un numero di embrioni adeguato, sia per un singolo *transfer* che per eventuali *transfer* successivi con embrioni scongelati.

Le COS con risposte inadeguate sono, invece, quelle associate a uno scarso (paziente *poor responder*) o a un eccessivo (paziente *high responder*) recupero ovocitario. Queste deviazioni da una condizione definibile arbitrariamente di adeguatezza, determinano rischi di natura diversa: per le pazienti *poor responders* il problema è quello di una bassa prognosi, mentre per le pazienti *high responders* il problema è quello di evitare la Sindrome da Iperstimolazione Ovarica Severa (OHSS).

### COS nelle pazienti *poor responders*

La risposta inadeguata si associa all'età riproduttiva avanzata e, comunque, alla riserva ovarica ridotta, ovvero a una riduzione critica della coorte di follicoli che esprimono sensibilità alla supplementazione di gonadotropine esogene. Questo fenomeno, fisiologico in età riproduttiva avanzata, quando si manifesta prematuramente si associa a un esaurimento precoce del patrimonio follicolare.

Secondo la Consensus ESHRE del 2011 (Ferraretti et al., 2011) una paziente si può definire *poor responder* quando presenta almeno due dei tre seguenti criteri ("Criteri di Bologna"):

- Età materna avanzata (>40anni) o altri fattori di rischio per POR;
- Una precedente risposta *poor* (<3 ovociti) con un protocollo di stimolazione convenzionale;
- Un test di riserva ovarica anormale (es. AFC < 5-7 follicoli o AMH 0,5 - 1,1 ng/ml).

Una risposta “povera” alla COS può essere preventivamente attesa valutando alcuni parametri in grado di predire la riserva ovarica, quali: il dosaggio sierico di FSH ed estradiolo in fase follicolare precoce (giorno 2°-3°), la valutazione ecografica del numero dei follicoli antrali in fase follicolare precoce-media (AFC), il dosaggio sierico dell'ormone anti-mulleriano (AMH) e, infine, una precedente risposta *poor* ( $\leq 3$  ovociti) con un protocollo di stimolazione convenzionale.

Dalla letteratura si evince che esiste una correlazione tra AMH, AFC e numero di ovociti recuperati. Questi criteri, applicati nella pratica clinica, sono stati oggetto di una recente Consensus (La Marca et al., 2016), che conferma l'importanza dell'utilizzo di tali *markers* di riserva ovarica per migliorare l'efficacia e la sicurezza dei protocolli di stimolazione in PMA. In caso di previsione di una ridotta risposta ovarica alla stimolazione, il dosaggio di gonadotropine può essere incrementato fino 350-400 U.I. Oltre tali valori non è dimostrato un reale beneficio in termini di numero di ovociti recuperati e di *outcome* riproduttivo.

Lo studio POSEIDON (Alviggi et al. 2016), nel tentativo di migliorare la personalizzazione del trattamento, ha introdotto nuovi criteri per la profilazione dei pazienti e ha diviso le *poor responders* in 4 gruppi:

- Gruppo 1: Pazienti <35 anni con parametri di riserva ovarica pre-stimolazione sufficienti (AFC  $\geq 5$ , AMH  $\geq 1.2$  ng/mL) e con una risposta ovarica inaspettatamente povera o subottimale. Questo gruppo dovrebbe essere ulteriormente diviso in: sottogruppo 1a, costituito da pazienti con meno di 4 ovociti; sottogruppo 1b, costituito da pazienti con 4-9 ovociti prelevati dopo una stimolazione ovarica standard che, indipendentemente dall'età, presentano un più basso tasso di nati vivi che le corrispondenti *normal responders* di pari età.
- Gruppo 2: Pazienti  $\geq 35$  anni con parametri di riserva ovarica pre-stimolazione sufficienti (AFC  $\geq 5$ , AMH  $\geq 1.2$  ng/mL) e con una risposta ovarica inaspettatamente povera o subottimale. Questo gruppo dovrebbe essere ulteriormente diviso in: sottogruppo 2a, costituito da pazienti con meno di 4 ovociti; sottogruppo 2b, costituito da pazienti con 4-9 ovociti prelevati dopo una stimolazione ovarica standard che, indipendentemente dall'età, presentano un più basso tasso di nati vivi che le corrispondenti *normal responders* di pari età.
- Gruppo 3: Pazienti <35 anni con parametri di riserva ovarica pre-stimolazione poveri (AFC <5, AMH <1.2 ng/mL).
- Gruppo 4: Pazienti  $\geq 35$  anni con parametri di riserva ovarica pre-stimolazione poveri.

### **COS nelle pazienti *high responders***

Le pazienti a rischio di una risposta esagerata alla COS sono, abitualmente, donne giovani, con basso BMI e con aspetto ecografico delle ovaie di franca PCO o di ovaio multifollicolare. Tutti i protocolli di stimolazione impiegati in PMA possono essere utilizzati anche in questa tipologia di pazienti ponendo attenzione a una corretta predizione della riserva ovarica con l'ausilio dei markers convenzionali (AFC, AMH, età, FSH). Il protocollo con GNRH-antagonista, rispetto all'agonista, consente di realizzare un trattamento più breve, con l'utilizzo di un minor quantitativo complessivo di gonadotropine e con una riduzione importante del rischio di OHSS (Al. Inany et al., 2011; Kolibianakis et al., 2007; Xiao et al., 2014) grazie, soprattutto, alla possibilità di ricorrere, quando necessario, all'induzione della maturazione finale ovocitaria mediante agonista del GnRH piuttosto che dell'HCG (Humaidan et al., 2013).

### **COS per i cicli di inseminazione intrauterina (IUI)**

L'inseminazione intrauterina rappresenta una consolidata, valida forma di trattamento nei casi di infertilità

su base maschile lieve-moderata, nell'infertilità *sine causa*, o in caso di disabilità fisica o psicologica ad ottenere rapporti sessuali penetrativi, coppie siero discordanti per HIV (maschio siero positivo), utilizzo di seme di donatore e nell'endometriosi di basso grado. L'obiettivo principale della COS, che resta quello di ottenere un trattamento efficace, mantenendo basso il rischio di iperstimolazione ovarica e/o di gemellarità, nel trattamento della incapacità riproduttiva mediante IUI, si realizza con l'induzione della maturazione di non più di 1-2 follicoli preovulatori, utilizzando dosaggi medio-bassi di gonadotropine (a seconda della tipologia della paziente) e non ricorrendo generalmente all'utilizzo degli analoghi del GnRH.

È consolidata l'importanza dell'induzione dell'ovulazione nell'aumentare la percentuale di successo per ciclo di trattamento, quando confrontata con il ciclo naturale.

È opportuno ricordare che esistono vari protocolli di trattamento con l'utilizzo di farmaci diversi dalle gonadotropine:

- Antiestrogeni (Clomifene Citrato);
- Antiestrogeni in combinazione con gonadotropine;
- Gonadotropine in combinazione con analoghi del GnRH, agonisti e antagonisti.

### **COS per Preservazione della fertilità**

Una recente applicazione farmacologica delle gonadotropine è rappresentata dalla induzione della crescita follicolare multipla per la preservazione della fertilità in pazienti oncologiche candidate a terapie con impatto notevole sul potenziale riproduttivo. Oggi questo ambito, visti i progressi dell'oncologia medica e l'aumento della sopravvivenza delle donne con patologie oncologiche di diverso tipo, rappresenta una grande sfida e una priorità per la medicina. Vista l'importanza di tale aspetto, la prescrizione delle gonadotropine nella Nota 74 è stata allargata alle "donne di età non superiore ai 45 anni affette da patologie neoplastiche che debbano sottoporsi a terapie oncologiche in grado di causare sterilità transitoria o permanente".

Nelle donne con cancro, una delle possibili strategie di preservazione della fertilità consiste nella stimolazione ovarica controllata (COS) seguita dalla crioconservazione degli ovociti recuperati. I protocolli di stimolazione ovarica sono sovrapponibili a quelli utilizzati nei cicli PMA di II livello, massimizzando il recupero ovocitario dal singolo ciclo di stimolazione, aggiungendo, quando necessario, presidi farmacologici che riducano il rischio di esposizioni a livelli ormonali eccessivamente alti, come accade nei tumori con recettori ormonali positivi della mammella. Dal momento che tra la decisione di procedere alla conservazione ovocitaria e l'inizio del trattamento anti-neoplastico non possono trascorrere tempi lunghi, si è cercato di iniziare la stimolazione ovarica in fasi del ciclo diverse da quella follicolare precoce.

Pertanto sono stati sviluppati protocolli COS a inizio casuale, iniziando la stimolazione ovarica indipendentemente dalla fase del ciclo. Diversi studi comparativi hanno dimostrato che il numero di ovociti maturi e totali recuperati e i tassi di fecondazione non vengono compromessi nei cicli COS con "inizio casuale" rispetto ai cicli convenzionali. Per le donne con tumori ormono-responsivi, recentemente, è stato proposto l'uso *off-label* degli inibitori dell'aromatasi, come il letrozolo, durante la stimolazione ormonale per ridurre i livelli di estradiolo in circolo.

L'uso del letrozolo non ha influenzato il numero degli ovociti recuperati, ma in alcuni studi è stato riportato un tasso di maturità ovocitaria più basso.



#### 4. AMBITI E MODALITA' DI UTILIZZO DELLE GONADOTROPINE: UOMO

Mentre vi sono numerosi studi di confronto tra rFSH e FSH estrattivo nell'induzione dell'ovulazione, i dati sulla spermatogenesi sono più scarsi, anche se non sembrano esserci differenze significative nell'uso dell'una o dell'altra forma.

Le caratteristiche farmacocinetiche del rFSH, che descrivono alcune modalità di comportamento del farmaco una volta iniettato nell'organismo, sono molto simili a quelle delle preparazioni estrattive urinarie. L'uso delle gonadotropine (GT) ha un fondamento razionale nella terapia sostitutiva dell'ipogonadismo ipogonadotropo, dove il deficit di GT è il responsabile dell'assenza di spermatogenesi e la somministrazione di preparati ad azione LH simile e FSH-simile avvia la maturazione tubulare e porta alla comparsa di spermatozoi nell'eiaculato (Matsumoto, 1984). Lo schema classico prevede la somministrazione di 150 UI di FSH 3 volte/settimana in associazione con HCG 2000 UI 2 volte/settimana. Tale protocollo si prosegue per un periodo compreso tra i 4 e i 18 mesi. Una volta indotta la spermatogenesi in questi soggetti, si può proseguire con la sola somministrazione di HCG. I risultati ottenuti nell'ipogonadismo ipogonadotropo hanno giustificato l'estensione dell'uso delle gonadotropine alla stimolazione della spermatogenesi in soggetti con alterazioni del liquido seminale e normali livelli di gonadotropine. Sia l'HMG da sola che in associazione con l'HCG è stata largamente utilizzata, anche se l'efficacia del trattamento non è mai stata testata in maniera appropriata. I primi risultati positivi nell'impiego delle GT si riferiscono a studi aperti, non controllati che hanno dimostrato notevoli miglioramenti della qualità nemaspermica; questa serie di studi ha indotto altri autori a mettere a punto ulteriori studi non controllati che hanno ingenerato l'opinione comune che l'impiego delle GT fosse la terapia più efficace in caso di alterazione dei parametri seminali. Peraltro, nel 1987 uno studio clinico controllato con placebo, in doppio cieco, dimostrava che non vi era alcun miglioramento dei parametri seminali nei pazienti trattati con HMG rispetto ai pazienti trattati con placebo, concludendo che non vi era efficacia della terapia con GT rispetto alla normale fluttuazione dei parametri seminali, che possono essere osservati nel tempo (Knuth et al., 1987). Negli anni successivi la progressiva comparsa di preparazioni di FSH sempre più purificate, sino alle attuali formulazioni ottenute con tecnologia ricombinante, hanno portato vari autori all'impiego del solo FSH, sia come opzione terapeutica nel miglioramento della fertilità naturale, sia come terapia di preparazione alle tecniche di PMA. L'FSH urinario altamente purificato (FSH-HP) è stato utilizzato nel trattamento dell'infertilità maschile idiopatica in numerosi studi non controllati, che riportavano miglioramenti della capacità fecondante degli spermatozoi utilizzati in cicli di PMA, nel gruppo dei soggetti trattati con FSH. Questi effetti sono stati messi in relazione con un miglioramento della morfologia nemaspermica, valutata con la microscopia elettronica a trasmissione, nonostante non si osservassero variazioni significative nei parametri seminali classici (Bartoov et al., 1994; Ben Rafael et al., 2000). Anche in questo caso gli effetti degli studi non controllati non sono stati confermati da studi effettuati con gruppi di controllo (Matorras et al., 1997; Foresta et al., 1998). Peraltro, altri lavori controllati con impiego di FSH urinario pre-ICSI (Ashkenazy et al., 1999) hanno dimostrato differenze statisticamente significative nella percentuale di gravidanze, pur non avendosi miglioramenti significativi dei classici parametri nemaspermici. In uno studio randomizzato a singolo cieco, Baccetti et al. (1997) hanno trattato per 12 settimane 66 pazienti con una dose giornaliera di 150 UI di FSH-HP sottocute. Come gruppo di controllo sono stati impiegati 15 soggetti trattati con placebo. I pazienti sono stati sottoposti prima e dopo terapia all'analisi degli spermatozoi mediante microscopia elettronica. Nel gruppo sottoposto a terapia si è dimostrato un aumento statisticamente significativo di nuclei nemaspermici con cromatina compatta e una diminuzione altrettanto significativa (valore iniziale 33,5%, dopo terapia 18,05%) dei nuclei con cromatina marginalizzata, tipico segno di apoptosi.

Nel complesso questi studi non offrono sufficienti e inequivocabili evidenze di un miglioramento significa-



tivo della percentuale di fecondazione e di gravidanze e dei parametri nemaspermici convenzionali nei pazienti trattati con differenti formulazioni di FSH. La meta-analisi Cochrane di Attia et al. (2006) conclude che *"This review did not find enough studies to draw strong conclusions about the use of gonadotrophins for the treatment of idiopathic male infertility. However, analysis of the results of the four included studies showed a significant increase in the pregnancy rates, during and within three months, after gonadotrophin treatment of men with idiopathic subfertility"*.

Le differenze che emergono da questi studi possono, in parte, essere giustificate da vari fattori, come i criteri adottati nella selezione dei pazienti, l'interpretazione dei parametri seminali, la posologia del trattamento e la sua durata. In effetti, il criterio più utilizzato nella selezione dei pazienti da trattare con FSH è rappresentato solitamente dalla normalità del livello basale di gonadotropine sieriche, mentre l'efficacia del trattamento è valutata esclusivamente sulla base della concentrazione nemaspermica oppure della percentuale di gravidanze. Per questa ragione sono stati eseguiti anche altri studi che hanno preso in considerazione, come fattori predittivi dell'efficacia del trattamento con FSH, parametri come la citologia testicolare e la concentrazione plasmatica di inibina B. In uno studio Foresta et al. (1998) hanno trattato 60 pazienti oligozoospermici, con normali concentrazioni di FSH sierico (<7 UI/l), usando FSH estrattivo alla dose di 75 UI a giorni alterni per 3 mesi. La funzione tubulare di questi pazienti è stata studiata tramite citoaspirato testicolare bilaterale, prima e dopo terapia. In base alla risposta al trattamento è stato possibile identificare due sottogruppi di pazienti. I *non-responders* che presentavano, al citoaspirato pre-terapia, un quadro di ipospermatogenesi associata a difetti della maturazione spermatidica, e i *responders* che presentavano un quadro di ipospermatogenesi con normali processi maturativi. L'esame citologico effettuato dopo il trattamento con FSH mostrava un aumento del numero di spermatogoni, spermatociti e spermatidi in tutti i pazienti. Nonostante ciò, solo nel gruppo dei *responders* veniva osservata l'attivazione del processo della spermiogenesi, con conseguente aumento sia del numero di spermatozoi intratesticolari che della concentrazione nemaspermica nel liquido seminale. I risultati di questo studio indicano che, in pazienti affetti da oligozoospermia idiopatica con gonadotropine sieriche nella norma, la terapia con FSH è in grado di stimolare la funzione tubulare.

Tale dato si conferma solo nel caso in cui l'oligozoospermia sia dovuta a ipospermatogenesi senza arresto maturativo.

Un altro parametro preso in considerazione come fattore predittivo del successo della terapia con FSH è stato il livello di inibina B. Foresta et al. (2000) hanno studiato 135 pazienti oligozoospermici prendendo in considerazione esame del liquido seminale, FSH, inibina B e citoaspirato testicolare. I pazienti sono stati suddivisi in tre gruppi sulla base delle concentrazioni plasmatiche di FSH e inibina B: gruppo A con normali concentrazioni di entrambi gli ormoni; gruppo B con FSH elevato e normale inibina B; gruppo C con FSH elevato e bassi livelli di inibina B. Di questi pazienti, 78 sono stati trattati con 75 UI di FSH estrattivo a giorni alterni per 3 mesi e 57 con 75 UI di FSH/die sempre per lo stesso periodo. Alla fine del trattamento solo i pazienti appartenenti al gruppo A senza alterazioni maturative della spermatogenesi hanno mostrato un incremento significativo della concentrazione di spermatozoi eiaculati. In questi pazienti non è stata evidenziata nessuna differenza, in termini di concentrazione nemaspermica, tra i due schemi terapeutici usati. Nei restanti pazienti del gruppo A (quelli con ipospermatogenesi associata ad alterazioni maturative) e in tutti i pazienti del gruppo B e C non è stato registrato nessun incremento significativo della conta nemaspermica. Questi dati confermano ulteriormente che i pazienti che rispondono alla terapia con FSH sono quelli caratterizzati da oligozoospermia con livelli di FSH normali e senza alterazioni della maturazione nemaspermica. Inoltre, veniva sottolineato che gli elevati livelli basali di FSH, indipendentemente dalla concentrazione di inibina B, erano un fattore predittivo negativo per l'efficacia del trattamento.

L'effetto della somministrazione di r-FSH sulla frammentazione del DNA è stato studiato da Colacurci et al. (2012) e da Ruvolo et al. (2013) in uomini con infertilità idiopatica. In entrambi gli studi, dopo 3 mesi di trattamento, non si riscontravano cambiamenti significativi in termini di conta spermatica, motilità e morfologia, mentre l'indice di frammentazione medio risultava ridotto in maniera significativa.

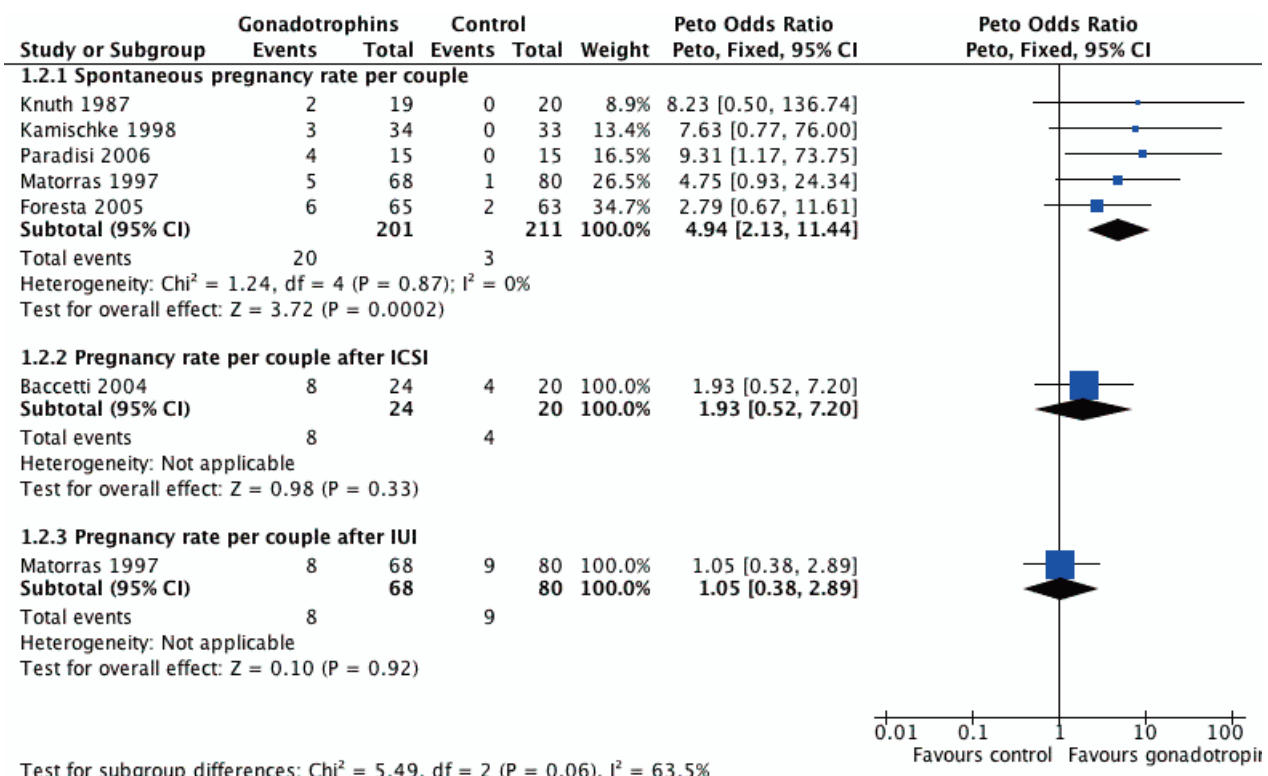
Nel mese di agosto 2013 è stata pubblicata l'ultima meta-analisi ad opera della Cochrane Library, sull'impiego delle gonadotropine nell'infertilità idiopatica (Attia et al., 2013) con lo scopo di determinare l'effetto della somministrazione sistemica dell'FSH, nell'uomo, sulla percentuale di gravidanze e di nascite vitali.

Gli autori hanno analizzato la percentuale di gravidanze spontanee nel corso dei tre mesi successivi al completamento della terapia con gonadotropine. Dall'analisi dei risultati risulta una differenza statisticamente significativa nella percentuale globale di gravidanze per coppia a favore del gruppo in trattamento con gonadotropine, (Peto OR 4.94, 95% CI 2.13 to 11.44) con un 16% di gravidanze (20/201) nel gruppo trattato rispetto al 7% (3/211) nel gruppo di controllo (Figura 1).

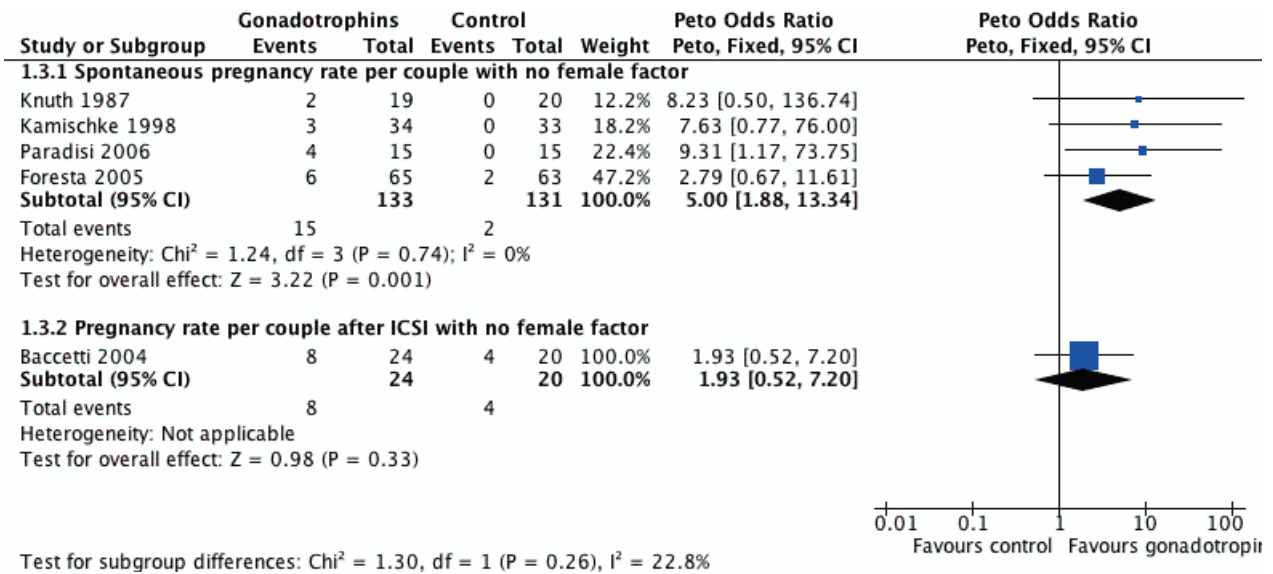
L'analisi di un sottogruppo che comprendeva *partners* femminili "normali" (*no female factor*) ha mostrato un risultato significativamente favorevole al gruppo trattato con FSH (Peto OR 5, 95% CI 1.88 to 13.34), con una percentuale di gravidanze dell'11.3% (15/133) nel gruppo con gonadotropine rispetto all'1.5% (2/131) nel gruppo di controllo (Figura 2).

La conclusione è in definitiva favorevole all'impiego delle gonadotropine anche se riconosce che "il numero di studi e partecipanti è insufficiente per trarre conclusioni finali. È necessario un grosso studio multicentrico con un adeguato potere statistico".

**FIGURA 1.** Forest plot of comparison: 1 Gonadotrophins versus placebo/no treatment for the treatment of idiopathic male subfertility, outcome: 1.2 Pregnancy rate per couple randomly assigned.



**FIGURA 2.** Forest plot of comparison: 1 Gonadotrophins versus placebo/no treatment for the treatment of idiopathic male subfertility, outcome: 1.3 Subgroup analysis: pregnancy rate per couple randomly assigned with no female factor.



## 5. ASPETTI RELATIVI ALLA SICUREZZA DELLE GONADOTROPINE DI ORIGINE ESTRATTIVA NEI CONFRONTI DI QUELLE OTTENUTE CON DNA RICOMBINANTE

### Fonte dell'FSH

Escludendo l'origine pituitaria, la materia prima di FSH per uso farmaceutico può essere ottenuta dall'estrazione dalle urine menopausali umane o attraverso la tecnologia del DNA ricombinante (definita anche ingegneria genetica o *splicing* dei geni) dalle culture cellulari ovariche di mammiferi (es. *Chinese Hamster Ovary* - CHO). Provenendo dalla fonte menopausale, l'FSH di estrazione urinaria è per definizione ricco di isoforme di FSH iperglicosilate e acide.

L'FSH ricombinante (rFSH) viene prodotto dalle cellule CHO che posseggono un *pool* di enzimi che differiscono da quelli di tipo umano in termini di efficienza nella capacità di glicosilazione proteica; pertanto rFSH presenta un più basso grado di ramificazioni oligosaccaridiche oltre che un più basso contenuto di acido sialico. La iperglicosilazione e le isoforme molto acide ( $pI < 3$ ) sono presenti in bassa concentrazione.

### Metodi di purificazione delle gonadotropine

Le gonadotropine vengono purificate a partire da urine di donatrici volontarie in stato di gravidanza o in menopausa. Lo stato di salute delle donatrici è controllato da parte di appositi *team* di medici, al fine di ridurre fin dall'origine qualsiasi contaminazione del prodotto finale e di garantirne la tracciabilità.

Il processo di produzione industriale prevede una serie di fasi di estrazione, frazionamento, concentrazione, filtrazione e purificazione che includono diversi passaggi in grado di rimuovere e inattivare i potenziali agenti avventizi patogeni di origine umana. Le aziende sono altresì tenute a testare i loro prodotti durante il processo di produzione e a convalidare l'efficacia e la robustezza delle condizioni di produzione applicate al fine di ottenere medicinali caratterizzati da un elevato grado di sicurezza e di purezza del principio attivo.

### Metodi di produzione delle gonadotropine ricombinanti

Nell'ultimo decennio la tecnologia del DNA ricombinante ha consentito di produrre le gonadotropine su scala industriale, senza la necessità di ricorrere alla raccolta di urina umana.

La produzione di gonadotropine ricombinanti prevede l'identificazione e l'isolamento del gene codificante per la gonatropina di interesse e il clonaggio del gene in un vettore di espressione in grado di inserirsi ed esprimersi nelle cellule ospiti. Le cellule così trasformate vengono fatte replicare per ottenere una sufficiente quantità di proteina desiderata.

La linea cellulare che viene impiegata per la produzione dell'FSH ricombinante deriva dall'ovaio di criceto cinese (*Chinese Hamster Ovary* - CHO).

### Sicurezza ed efficacia

La terapia gonadotropinica, basata su farmaci a base di ormoni ipofisari, è utilizzata efficacemente in uomini e donne per il trattamento del deficit gonadotropinico a varia eziologia, utilizzando regimi basati su derivati urinari o su ricombinanti.

Nel confronto con le forme ricombinanti, gli studi più recenti a cui è possibile far riferimento per gli aspetti

relativi alla sicurezza sono le metanalisi di Al Inany et al. (2012), van Wely et al. (2011), e di Matorras et al. (2011). In relazione alla sicurezza, non si sono evidenziate differenze significative tra HP-HMG, FSH e rFSH nel tasso di gravidanze multiple, nella frequenza della sindrome da iperstimolazione ovarica (OHSS), nel tasso di interruzione del trattamento, né nei tassi di aborto spontaneo.

In merito alla sicurezza, un problema da valutare è quello della possibile trasmissione iatrogena delle malattie prioniche attraverso le iniezioni di ormoni, come le stesse gonadotropine.

Sul rischio potenziale di trasmissione di agenti infettivi con la somministrazione di prodotti ormonali derivanti da urine umane, si era espresso l'Istituto Superiore di Sanità nel 2005. Era stato suggerito l'inserimento di un'avvertenza di carattere generale ("non può essere totalmente escluso il rischio di trasmissione di malattie infettive dovuto alla trasmissione di agenti infettivi. Ciò si applica anche ai patogeni di natura finora sconosciuta") negli stampati dei medicinali derivati da urine umane, in analogia al rischio potenziale riscontrabile con l'impiego degli emo- e plasma derivati. Con la Determinazione del 20 Luglio 2006 "Modifica degli stampati dei medicinali contenenti gonadotropine derivate da urine umane" (GU 27/07/2006 n.173) tutte le aziende farmaceutiche produttrici di gonadotropine derivate da urine sono obbligate a riportare la seguente dicitura all'interno del foglietto illustrativo: "Pur non essendo stato riportato alcun caso di contaminazione virale associato alla somministrazione di gonadotropine estratte da urine umane, il rischio di trasmissione di agenti patogeni conosciuti o sconosciuti non può essere totalmente escluso". Per motivi regolatori tale avvertenza non è presente per i prodotti autorizzati con procedure europee di Mutuo Riconoscimento o Decentrata.

In tale contesto, la European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) e la Canadian Fertility and Andrology Society (CFAS) hanno precisato che le gonadotropine di derivazione urinaria possono contenere proteine prioniche normali ma attualmente sembra non esserci alcuna conseguenza clinica di questa osservazione e, ad oggi, non esistono dati a supporto del rischio di trasmissione di malattia da prioni a seguito di iniezioni sottocutanee di gonadotropine.

Le gonadotropine di origine estrattiva presenti attualmente in commercio presentano elevati standard di qualità e sicurezza in quanto sottoposte a un processo di purificazione che prevede una serie di fasi tra cui la nanofiltrazione. Tale metodica è ritenuta in grado di eliminare i virus, compresi quelli non capsulati e di più piccole dimensioni e rappresenta, inoltre, un'efficace procedura per rimuovere i prioni, come evidenziato nel recente lavoro di Caccia et al. (2011).

### **Gonadotropine e patologia ginecologica oncologica**

Sulla base dei dati disponibili, non sembra esserci una significativa associazione tra uso di gonadotropine e rischio di cancro ovarico, della mammella o endometriale; alcuni studi hanno mostrato un aumento del rischio, non significativo, di tumori ovarici *borderline*. Tuttavia, non vi sono sufficienti dati in letteratura che sostengano una relazione tra uno specifico farmaco e tumori ovarici *borderline*. Dall'analisi della letteratura disponibile, quindi, risulta necessario informare le pazienti che nelle donne infertili il rischio di tumore ginecologico (ovarico, endometriale e mammario), che sembra comunque indipendente dall'uso dei farmaci utilizzati per l'induzione dell'ovulazione, può essere più elevato.



## 6. FARMACOGENOMICA NELL'IMPIEGO DELLE GONADOTROPINE NELLA DONNA E NELL'UOMO

### Polimorfismi del recettore dell'FSH e delle catene dell'FSH

Le variazioni casuali nella sequenza nucleotidica tra diversi individui che siano presenti almeno nell'1% della popolazione sono definite polimorfismi. Questi consistono più spesso in singole sostituzioni nucleotidiche (denominate SNP - polimorfismi a singolo nucleotide), ma possono coinvolgere anche tratti di DNA più ampi nel caso di amplificazioni e traslocazioni o delezioni e inserzioni di più nucleotidi. Quando i polimorfismi interessano sequenze di DNA codificanti e/o regolatorie possono determinarsi alterazioni più o meno significative della funzione e/o dell'espressione della proteina sintetizzata.

Lo studio dei polimorfismi presenti su porzioni di DNA codificanti o che regolano l'espressione di recettori ormonali ci permette di identificare un'eventuale resistenza o riduzione di risposta sia a ormoni endogeni che a ormoni esogeni impiegati in terapia. Come abbiamo visto, l'FSH riveste un ruolo fondamentale nella riproduzione umana. Il suo recettore, FSH-R, si trova sulla superficie delle cellule della granulosa nell'ovaio e delle cellule del Sertoli nei testicoli: il legame specifico ormone-recettore induce la maturazione degli ovociti e la spermatogenesi. Negli ultimi anni sono stati identificati due polimorfismi a singolo nucleotide localizzati a livello dell'esone 10 del gene FSH-R che modificano la sensibilità della risposta ovarica, e secondo studi recenti anche della risposta testicolare, a una stimolazione con l'ormone FSH. Si tratta di due varianti alleliche tra loro in *linkare disequilibrium*: la variante Thr/Ala in posizione 307 e Asn/Ser in posizione 680 presenti con frequenza maggiore nelle combinazioni Thr307-Asn680 (TN) e Ala307-Ser680 (AS) e facilmente rilevabili tramite tecniche di amplificazione (*Polymerase Chain Reaction* - PCR) e/o di sequenziamento diretto del DNA.

Il polimorfismo del gene FSH-R e, di conseguenza, la possibilità di rilevare la presenza di una particolare variante allelica e/o la combinazione di due o più varianti, potrebbe permettere di "personalizzare" i protocolli di stimolazione durante una IVF, con la possibilità di ridurre il rischio di iperstimolazione e di cancellazione del ciclo per risposta inadeguata e di individuare sottogruppi di pazienti maschi con maggiori possibilità di rispondere alla terapia. La ridotta percentuale di casi che si gioverebbero dei risultati di tale indagine, se eseguita sistematicamente prima di un trattamento di ICOS, ne giustifica l'utilizzo in un ristretto e selezionato numero di pazienti.

Nelle donne, recenti studi hanno dimostrato la presenza di polimorfismi del gene che codifica per il recettore dell'FSH capaci di influenzare i livelli circolanti di FSH e la sensibilità del recettore all'ormone (Aittomäki et al., 1995; Greb et al., 1995; Behre et al., 2005). Nel maschio il significato di questi polimorfismi è tuttora non chiaro (Simoni et al., 1999; Asatiani K. et al., 2002; Ahda et al., 2005) anche se i primi dati pubblicati sembrano dimostrare che i diversi genotipi del recettore dell'FSH non sono in grado di modificare i livelli di FSH in soggetti normali e infertili e non sembrano essere associati ad azoospermia o oligozoospermia (Pengo et al., 2006). Nonostante la mancanza di correlazione diretta tra polimorfismi del recettore dell'FSH e spermatogenesi, si può ipotizzare che polimorfismi di tale recettore possano influenzare la risposta al trattamento con FSH, al pari di quello che è stato osservato, ad oggi, solo nelle donne (Perez Mayorga et al., 2000). Oltre al recettore dell'FSH si sta iniziando a valutare anche il ruolo dei polimorfismi del gene FSHB che codifica per la subunità  $\beta$  dell'FSH. Gli studi di farmacogenomica consentono di affinare sempre più i criteri da utilizzare per impiegare le gonadotropine nel maschio. Recentemente è stato descritto un polimorfismo a singolo nucleotide (*Single-Nucleotide Polymorphism* - SNP) G/T nel promotore del gene FSHB (Grigorova et al., 2008). Studi funzionali hanno evidenziato che l'attività relativa del promotore dell'FSH in presenza dell'allele T è circa la metà rispetto all'allele G (Hoogendoorn et al., 2004). In accordo a tale attività funzionale, Grigorova et al. (2010) hanno dimostrato una significativa associazione tra questo



SNP ed i livelli circolanti di FSH nella popolazione generale in Estonia: i soggetti eterozigoti GT e gli omozigoti TT hanno infatti livelli di FSH più bassi rispettivamente del 15,7% e del 40%. Gli stessi autori hanno replicato queste evidenze in un gruppo di soggetti infertili, mostrando un arricchimento dell'allele T e dei soggetti omozigoti TT tra i soggetti infertili (Grigorova et al., 2010). Di recente, Ferlin et al. (2011) hanno dimostrato che la terapia con rFSH (150 UI a gg alterni per tre mesi) in 67 soggetti divisi in tre gruppi (38 omozigoti GG, 20 eterozigoti GT e 9 omozigoti TT) ha indotto un aumento statisticamente significativo dei parametri seminali nel gruppo degli omozigoti TT rispetto agli altri gruppi.

Pertanto, l'identificazione di *markers* genetici potrebbe rappresentare in futuro un valido approccio farmacogenetico per la selezione, all'interno di gruppi selezionati di pazienti, di potenziali *responders* alle gonadotropine.

## 7. IMPIEGHI OFF-LABEL DELLE GONADOTROPINE

L'uso *off-label* delle gonadotropine riguarda principalmente l'impiego della *Human-Chorionic Gonadotropin* (HCG) come prodotto dimagrante, nella terapia del dolore cronico e per il miglioramento delle prestazioni sportive (Doping).

### Perdita di peso

L'HCG viene spesso impiegato in un programma dietetico che prevede un introito calorico giornaliero di non più di 500 calorie abbinato ad iniezioni, gocce o compresse giornaliere di HCG. La durata di tale dieta è in genere di 45 giorni. Gli effetti collaterali più importanti nella donna sono l'aumento di volume delle mammelle e, più raramente, galattorrea; si possono verificare anche lievi quadri di iperstimolazione ovarica con formazioni di cisti funzionali, nonché un lieve aumento dell'irsutismo e della caduta dei capelli. Nell'uomo si può avere una riduzione della libido, disfunzione erettile, ginecomastia. A questi effetti collaterali "lievi" si associano *reports* di eventi avversi molto gravi, come embolia polmonare, depressione, eventi cerebrovascolari, arresto cardiaco e morte improvvisa (Yen & Ewald, 2012).

Purtroppo, di recente, alcuni organi di stampa e siti internet hanno riportato alla ribalta questo tipo di dieta, anche alla luce del fatto che pare sia stata seguita da personaggi celebri. Inutile dire che non c'è la minima evidenza scientifica che l'HCG abbia un ruolo nel dimagrimento e che la perdita di peso derivi da quello che possiamo definire un vero e proprio digiuno controllato: 500 calorie sono assolutamente insufficienti e neanche le diete più drastiche scendono mai sotto le 1.000 calorie. Gli eventuali cali di peso sono da attribuire alla drastica limitazione del numero di calorie assunte e non all'HCG. È purtroppo attualmente ancora possibile comperare su internet gocce o capsule "omeopatiche" a base di HCG!

### Terapia del dolore cronico

L'HCG è stata impiegata di recente in alcuni pazienti per ridurre a medio e lungo termine il dolore cronico. Gli studi sono iniziati dall'osservazione che le pazienti con dolore cronico durante la gravidanza necessitano di dosi minori di oppiacei e che tale effetto è dovuto ai livelli aumentati di HCG in gravidanza. In effetti, in vari studi dopo una singola iniezione di 10.000 UI di HCG si è riscontrata una riduzione statisticamente significativa della sintomatologia dolorosa. I motivi della funzione analgesica dell'HCG sono ad oggi ancora in fase di chiarimento, ma si ritiene che possano derivare dalla contemporanea stimolazione del testosterone, progesterone ed estradiolo indotta dall'HCG o da un suo presunto ruolo nella neurogenesi e nei processi di riparazione tissutale (Tennant, 2009).

### Miglioramento delle prestazioni sportive (Doping)

L'utilizzo delle gonadotropine in tali circostanze oltre a configurarsi come atto illecito per la giustizia ordinaria e sportiva, determina condizioni di rischio per la salute di chi ne dovesse fare uso. Ogni cura deve essere posta nel trasmettere ai praticanti delle attività sportive un corretto messaggio in tal senso e per evitare che tali farmaci possano divenire oggetto di prescrizioni fittizie per il trattamento dell'infertilità ed essere, invece, distratti verso un utilizzo illegale.

### Social Freezing

Consiste nel crioconservare gli ovociti di una donna ancora in età fertile per poi poterli riutilizzare in età avanzata per garantirsi un concepimento, altrimenti difficile con l'invecchiamento. In analogia con quanto accade per la fecondazione assistita, la paziente deve essere sottoposta a una stimolazione ormonale con FSH allo scopo di ottenere la crescita follicolare multipla e consentire il prelievo ovocitario. Tale impiego, ad oggi, va considerato *off-label* e non può essere richiesta la prescrivibilità a carico del Servizio Sanitario Nazionale.

## BIBLIOGRAFIA

- Ahda Y. Et al. *Follicle-stimulating hormone receptor gene haplotype distribution in ormozoospermic and azoospermic men*. J Androl. 2005;26:494-9.
- Aittomäki K. et al. *Mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene causes hereditary hypergonadotropic ovarian failure*. Cell. 1995;82:959-68.
- Al-Inany HG, Abou-Setta AM. *Are all human-derived follicle-stimulating hormone products the same? A systematic review and meta-analysis using direct and adjusted indirect analyses, todetermine whether Fostimon is more efficient than Metrodin-HP(®)*. Gynecol Endocrinol 2012;28(2):94-101.
- 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).
- Anders Nyboe Andersen, M.D., Ph.D.,a Scott M. Nelson, M.R.C.O.G., Ph.D.,b Bart C. J. M. Fauser, M.D., Ph.D.,c, Juan Antonio García-Velasco, M.D., Ph.D.,d Bjarke M. Klein, Ph.D.,e and Joan-Carles Arce, M.D., Ph.D.,f for the ESTHER-1 study group
- Asatiani K. et al. *Distribution and function of FSH receptor genetic variants in normal men*. Andrologia. 2002;34:172-6.
- Ashkenazi J. et al. *The role of purified follicle stimulating hormone therapy in the male partner before intracytoplasmic sperm injection*. Fertil Steril. 1999;72:670-3.
- Attia AM, Al-Inany HG, Proctor ML. *Gonadotrophins for idiopathic male factor subfertility*. Cochrane Database Syst Rev. 2006 Jan 25;(1).
- Attia AM, Abou-Setta AM, Al-Inany HG. *Gonadotrophins for idiopathic male factor subfertility*. Cochrane Database Syst Rev. 2013 Aug 23;issue 8
- Baccetti B, Strehler E, Capitani S, Collodel G, De Santo M, Moretti E, Piomboni P, Wiedeman R, Sterzik K. *The effect of follicle stimulating hormone therapy on human sperm structure (Notulae seminologicae 11)*. Hum Reprod. 1997 Sep;12(9):1955-68.
- Bartoov B. et al. *Sperm quality of subfertile males before and after treatment with human follicle-stimulating hormone*. Fertil Steril. 1994;61:727-34.
- Behre H.M. et al. *Significance of a common single nucleotide polymorphism in exon 10 of the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor gene for the ovarian response to FSH: a pharmacogenetic approach to controlled ovarian hyperstimulation*. Pharmacogenet Genomics. 2005;15:451-6.
- Ben-Rafael Z. et al. *Follicle-stimulating hormone treatment for men with idiopathic oligoteratoasthenozoospermia before in vitro fertilization: the impact on sperm microstructure and fertilization potential*. Fertil Steril. 2000;73:24-30.
- Bosch E. *Comment on 'Recombinant LH supplementation to a standard GnRH antagonist protocol in women of 35 years old or older undergoing IVF/ICSI: a randomized controlled multicentre study*. Hum Reprod. 2014 Mar;29(3):636-7.
- Bühler K, Naether OG, Bilger W. *A large, multicentre, observational, post-marketing surveillance study of the 2:1 formulation of follitropin alfa and lutropin alfa in routine clinical practice for assisted reproductive technology*. Reprod Biol Endocrinol. 2014 Jan 14;12:6.
- Caccia P, Angiolini L, Lorenzi R, Zelter E. *Efficient Prion Removal from Gonadotropin Solutions by Nanofiltration Membranes*. BioPharm International. 2011, Volume 24, Issue 12, pp. 36-49.
- Cantineau AE, Cohlen BJ, Heineman MJ. *Ovarian stimulation protocols (anti-oestrogens, gonadotrophins with and without GnRH agonists/antagonists) for intrauterine insemination (IUI) in women with subfertility*. Cochrane Database Syst Rev. 2007 Apr 18;(2):CD005356.

- Capalbo A, Rienzi L, Buccheri M, Maggiulli R, Sapienza F, Romano S, Colamaria S, Iussig B, Giuliani M, Palagiano A, Ubaldi F. *The worldwide frozen embryo reservoir: methodologies to achieve optimal results.* Ann N Y Acad Sci. 2011 Mar;1221:32-9.
- Casano S, Guidetti D, Patriarca A, Pittatore G, Gennarelli G, Revelli A. *MILD ovarian stimulation with GnRH-antagonist vs. long protocol with low dose FSH for non-PCO high responders undergoing IVF: a prospective, randomized study including thawing cycles.* J Assist Reprod Genet. 2012 Dec;29(12):1343-51.
- Chappel SC, Howles C. *Reevaluation of the roles of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in the ovulatory process.* Hum Reprod. 1991 Oct;6(9):1206-12.
- Colacurci N, Monti MG, Fornaro F, Izzo G, Izzo P, Trotta C, Mele D, De Franciscis P. *Recombinant human FSH reduces sperm DNA fragmentation in men with idiopathic oligoasthenoteratozoospermia.* J Androl. 2012 Jul-Aug;33(4):588-93.
- De Klerk C, Macklon NS, Heijnen EM, Eijkemans MJ, Fauser BC, Passchier J, Hunfeld JA. *The psychological impact of IVF failure after two or more cycles of IVF with a mild versus standard treatment strategy.* Hum Reprod. 2007 Sep;22(9):2554-8.
- *ESHRE position statement concerning prion detection in urinary gonadotropin formulations.* Canadian Fertility and Andrology Society (CAFS) Prion Position Statement. <https://www.eshre.eu/Guidelines-and-Legal/ESHRE-Position-Papers.aspx>
- Fábregues F, Iraola A, Casals G, Creus M, Carmona F, Balasch J. *Evaluation of two doses of recombinant human luteinizing hormone supplementation in down-regulated women of advanced reproductive age undergoing follicular stimulation for IVF: a randomized clinical study.* Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2011 Sep;158(1):56-61.
- Fatemi HM, Oberyé J, Popovic-Todorovic B, Witjes H, Mannaerts B, Devroey P. *Corifollitropin alfa in a long GnRh agonist protocol: proof of concept trial.* Fertil. Steril., 2010; 94, 5.
- Ferlin A, Vinanzi C, Selice R, Garolla A, Frigo AC, Foresta C. *Toward a pharmacogenetic approach to male infertility: polymorphism of follicle-stimulating hormone beta-subunit promoter.* Fertil Steril. 2011 Dec;96(6):1344-1349.
- 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.
- Figen Turkcapar A, Seckin B, Onalan G, Ozdener T, Batioglu S. *Human Menopausal Gonadotropin versus Recombinant FSH in Polycystic Ovary Syndrome Patients Undergoing In Vitro Fertilization.* Int J Fertil Steril. 2013 Jan;6(4):238-43
- Foresta C. et al. *Evidence for a stimulatory role of follicle-stimulating hormone on the spermatogonial population in adult males.* Fertil Steril. 1998;69:636-42.
- Foresta C. et al. *FSH in the treatment of oligozoospermia.* Mol Cell Endocrinol. 2000;161:89-97.
- Gerli S, Bini V, Favilli A, Di Renzo GC. *Clinical efficacy and cost-effectiveness of HP-human FSH (Fostimon®) versus rFSH (Gonal-F®) in IVF-ICSI cycles: a meta-analysis.* Gynecol Endocrinol. 2013 Jun;29(6):520-9.
- Greb R.R. et al. *A common single nucleotide polymorphism in exon 10 of the human follicle stimulating hormone receptor is a major determinant of length and hormonal dynamics of the menstrual cycle.* J Clin Endocrinol Metab. 2005;90:4866-72.
- Grigorova M, Punab M, Ausmees K, Laan M. *FSHB promoter polymorphism within evolutionary conserved element is associated with serum FSH level in men.* Hum Reprod. 2008 Sep;23(9):2160-6.
- Grigorova M, Punab M, Poolamets O, Kelgo P, Ausmees K, Korrovits P, Vihljajev V, Laan M. *Increased Prevalance of the -211 T allele of follicle stimulating hormone (FSH) beta subunit promoter polymorphism and lower serum FSH in infertile men.* J Clin Endocrinol Metab. 2010 Jan;95(1):100-8.
- Handelsman DJ. *Clinical review: The rationale for banning human chorionic gonadotropin and estrogen blockers in sport.* J Clin Endocrinol Metab. 2006 May;91(5):1646-53.

- Heijnen EM, Eijkemans MJ, De Klerk C, Polinder S, Beckers NG, Klinkert ER, Broekmans FJ, Passchier J, Te Velde ER, Mac-klon NS, Fauser BC. *A mild treatment strategy for in-vitro fertilisation: a randomised non-inferiority trial*. Lancet. 2007 Mar 3;369(9563):743-9.
- 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 May;97(5):1108-14.
- Hoogendoorn B, Coleman SL, Guy CA, Smith SK, O'Donovan MC, Buckland PR. *Functional analysis of polymorphisms in the promoter regions of genes on 22q11*. Hum Mutat. 2004 Jul;24(1):35-42.
- Humaidan P, Bungum M, Bungum L, Yding Andersen C. *Effects of recombinant LH supplementation in women undergoing assisted reproduction with GnRH agonist down-regulation and stimulation with recombinant FSH: an opening study*. Reprod Biomed Online. 2004 Jun;8(6):635-43.
- Humaidan P, Polyzos NP, Alsbjerg B, Erb K, Mikkelsen AL, Elbaek HO, Papanikolaou EG, Andersen CY. *GnRHa trigger and individualized luteal phase HCG support according to ovarian response to stimulation: two prospective randomized controlled multi-centre studies in IVF patients*. Hum Reprod. 2013 Sep;28(9):2511-21.
- Ismail AF, Hesham AI, Salah Z, et al. *A prospective comparative study on IVF outcomes with either purified FSH or human menopausal gonadotrophin in downregulated normogonadotrophic women*. Gynecol Obstet Invest 2002;53(4):220-3.
- Ji J, Liu Y, Tong XH, Luo L, Ma J, Chen Z. *The optimum number of oocytes in IVF treatment: an analysis of 2455 cycles in China*. Hum Reprod. 2013 Oct;28(10):2728-34.
- Knuth U.A., Honigl W., Bals-Pratsch M., Schiecher G., Nieschlag E. *Treatment with human chorionic gonadotropin/human menopausal gonadotropin: a placebo controlled, double blind trial*. J. Clin. Endocrinol. Metab. 65:1081-1087, 1987.
- Kol S, Humaidan P. *GnRH agonist triggering: recent developments*. Reprod Biomed Online. 2013 Mar;26(3):226-30.
- Kolibianakis EM, Papanikolaou EG, Tournaye H, Camus M, Van Steirteghem AC, Devroey P. *Triggering final oocyte maturation using different doses of human chorionic gonadotropin: a randomized pilot study in patients with polycystic ovary syndrome treated with gonadotropin-releasing hormone antagonists and recombinant follicle-stimulating hormone*. Fertil Steril. 2007 Nov;88(5):1382-8.
- König TE1, van der Houwen LE, Overbeek A, Hendriks ML, Beutler-Beemsterboer SN, Kuchenbecker WK, Renckens CN, Bernardus RE, Schats R, Homburg R, Hompes PG, Lambalk CB. *Recombinant LH supplementation to a standard GnRH antagonist protocol in women of 35 years or older undergoing IVF/ICSI: a randomized controlled multicentre study*. Hum Reprod. 2013 Oct;28(10):2804-12.
- La Marca A, Sunkara SK. *Individualization of controlled ovarian stimulation in IVF using ovarian reserve markers: from theory to practice*. Hum Reprod Update. 2014 Jan-Feb;20(1): 124-40.
- La Marca A, Ferraretti AP, Palermo R, Ubaldi FM. *The use of ovarian reserve markers in IVF clinical practice: a national consensus*. Gynecol Endocrinol. 2016 Jan;32(1):1-5.
- Lehert P, Schertz JC, Ezcurra D. *Recombinant human follicle-stimulating hormone produces more oocytes with a lower total dose per cycle in assisted reproductive technologies compared with highly purified human menopausal gonadotrophin: a meta-analysis*. Reprod Biol Endocrinol. 2010 Sep 16;8:112.
- Lockwood G, Cometti B, Bogstad J, Erb K, De Geyter C, Urbancsek J, Trevisan S, Pocate- Cheriet K, de Ziegler D. *A randomized controlled trial comparing the efficacy and safety of two HMG preparations gaining their LH bioactivity from different HCG sources*. Reprod Biomed Online. 2017 Jul;35(1):17-27.
- Matorras R, Osuna C, Exposito A, Crisol L, Pijoan JI. *Recombinant FSH versus highly purified FSH in intrauterine insemination: systematic review and metanalysis*. Fertil Steril. 2011 May; 95(6):1937-42.



- Matorras R., Perez C., Corcostegui B. *Treatment of the male with follicle-stimulating hormone in intrauterine insemination with husband's spermatozoa: a randomized study.* Human Reprod. 12:24-28, 1997.
- Matsumoto A.M. et al. *Stimulation of sperm production by human luteinizing hormone in gonadotropin-suppressed normal men.* J Clin Endocrinol Metab. 1984;59:882-7.
- Mochtar MH, Danhof NA, Ayeleke RO, Van der Veen F, van Wely M. *Recombinant luteinizing hormone (rLH) and recombinant follicle stimulating hormone (rFSH) for ovarian stimulation in IVF/ICSI cycles.* Cochrane Database of Systematic Reviews 2017 May 24, Issue 5. Art. No.: CD005070.
- Musters AM, van Wely M, Mastenbroek S, Kaaijk EM, Repping S, van der Veen F, Mochtar MH. *The effect of recombinant LH on embryo quality: a randomized controlled trial in women with poor ovarian reserve.* Hum Reprod. 2012 Jan;27(1):244-50.
- Pengo M. et al. *FSH receptor gene polymorphisms in fertile and infertile Italian men.* Reprod Biomed Online. 2006;13:795-800.
- Perez Mayorga M. et al. *Ovarian response to follicle-stimulating hormone (FSH) stimulation depends on the FSH receptor genotype.* J Clin Endocrinol Metab. 2000;85:3365-9.
- Polyzos NP, Corona R, Van De Vijver A, Blockeel C, Drakopoulos P, Vloeberghs V, De Vos M, Camus M, Humaidan P, Tournaire H. *Corifollitropin alfa followed by hpHMG in GnRH agonist protocols. Two prospective feasibility study in poor ovarian responders.* Gynaecological Endocrinology, 2015, 31(11):885-90.
- Poseidon Group (Patient-Oriented Strategies Encompassing Individualized Oocyte Number), Alviggi C, Andersen CY, Buehler K, Conforti A, De Placido G, Esteves SC, Fischer R, Galliano D, Polyzos NP, Sunkara SK, Ubaldi FM, Humaidan P. *A new more detailed stratification of low responders to ovarian stimulation: from a poor ovarian response to a low prognosis concept.* Fertil Steril. 2016 Jun;105(6):1452-3.
- Ruvolo G, Roccheri MC, Brucculeri AM, Longobardi S, Cittadini E, Bosco L. *Lower sperm DNA fragmentation after r-FSH administration in functional hypogonadotropic hypogonadism.* J Assist Reprod Genet. 2013 Apr;30(4):497-503.
- Simoni M. et al. *Mutational analysis of the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor in normal and infertile men: identification and characterization of two discrete FSH receptor isoforms.* J Clin Endocrinol Metab. 1999;84:751-5.
- Stenman UH, Hotakainen K, Alfthan H. *Gonadotropins in doping: pharmacological basis and detection of illicit use.* Br J Pharmacol. 2008 Jun;154(3):569-83.
- Sunkara SK, Rittenberg V, Raine-Fenning N, Bhattacharya S, Zamora J, Coomarasamy A. *Association between the number of eggs and live birth in IVF treatment: an analysis of 400 135 treatment cycles.* Hum Reprod. 2011 Jul;26(7):1768-74.
- Tarlatzis BC, Kolibianakis EM. *GnRH agonists vs antagonists.* Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol. 2007 Feb;21(1):57-65.
- Tennant F. *Human chorionic gonadotropin in pain treatment.* Prac Pain Manag. 2009; 9:25-27.
- Trew GH, Brown AP, Gillard S, Blackmore S, Clewlow C, O'Donohoe P, Wasiak R. *In vitro fertilisation with recombinant follicle stimulating hormone requires less IU usage compared with highly purified human menopausal gonadotrophin: results from a European retrospective observational chart review.* Reprod Biol Endocrinol. 2010 Nov 8;8:137.
- Vaiarelli A1, Venturella R, Vizziello D, Bulletti F, Ubaldi FM. *Dual ovarian stimulation and random start in assisted reproductive technologies: from ovarian biology to clinical application.* Curr Opin Obstet Gynecol. 2017 Jun;29(3):153-159.
- Van Dorsselaer A, Carapito C, Delalande F, et al. *Detection of prion protein in urine-derived injectable fertility products by a targeted proteomic approach.* PLoS One 2011;6(3):e17815
- Van Wely M, Kwan I, Burt AL, Thomas J, Vail A, Van der Veen F, Al-Inany HG. *Recombinant versus urinary gonadotrophin for ovarian stimulation in assisted reproductive technology cycles.* Cochrane Database of Systematic Reviews 2011, Issue 2. Art. No.: CD005354.



- Xiao JS, Su CM, Zeng XT. *Comparisons of GnRH antagonist versus GnRH agonist protocol in supposed normal ovarian responders undergoing IVF: a systematic review and meta- analysis*. PLoS One. 2014 Sep 12;9(9).
- Xiong Y, Bu Z, Dai W, Zhang M, Bao X, Sun Y. *Recombinant luteinizing hormone supplementation in women undergoing in vitro fertilization/ intracytoplasmic sperm injection with gonadotropin releasing hormone antagonist protocol: a systematic review and meta- analysis*. Reprod Biol Endocrinol. 2014 Nov 24;12:109.
- Yen M, Ewald MB. *Toxicity of weight loss agents*. J Med Toxicol. 2012 Jun;8(2): 145-52.
- Youssef MAFM, Al-Inany HG, Aboulghar M, Mansour R, Abou-Setta AM. *Recombinant versus urinary human chorionic gonadotrophin for final oocyte maturation triggering in IVF and ICSI cycles*. Cochrane Database of Systematic Reviews 2011, Issue 4. Art. No.:CD003719.