

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA
SCUOLA DI SCIENZE MEDICHE E FARMACEUTICHE
CORSO DI LAUREA IN MEDICINA E CHIRURGIA



**“Effetti della posticipazione dei trattamenti di
Procreazione Medicalmente Assistita di II livello
sugli outcomes riproduttivi”**

Relatore:

Chia.mo Prof. Angelo Cagnacci

Correlatore:

Prof. Claudia Massarotti

Candidato:

Chiara Peluffo

Anno accademico 2020-2021

INDICE

1. Introduzione	3
1.1 Infertilità	4
1.2 Età e riproduzione	5
1.2.1 Ormone anti-mülleriano	7
1.2.2 Conta dei follicoli antrali	9
1.3 Preservazione della fertilità	11
1.4 Cause di infertilità	12
1.4.1 Fattore maschile	12
1.4.2 Fattore femminile	14
1.4.3 Fattore di coppia.....	19
1.4.4 Infertilità idiopatica.....	19
1.5 Iter diagnostico	20
1.5.1 Fattore tubarico e peritoneale.....	21
1.5.2 Fattore ovulatorio e disturbi del ciclo mestruale	22
1.6 Aspetti psicologici dell'infertilità	25
1.7 Tecniche di riproduzione assistita	26
1.7.1 Legge 40/2004	27
1.7.2 Tecniche di primo livello	29
1.7.3 Tecniche di secondo livello	30
1.7.4 Farmaci e protocolli	34
1.8 Pazienti "poor responders"	38
1.9 PMA e attesa per il trattamento	40
2. "Effetti della posticipazione dei trattamenti di Procreazione Medicalmente Assistita di II livello sugli outcomes riproduttivi"	44
2.1 Obiettivi.....	44
2.2 Materiali e metodi.....	44
2.3 Risultati	47
2.4 Discussione.....	51
2.5 Conclusioni.....	55
Bibliografia	57
Indice delle figure e delle tabelle	65

1. Introduzione

L'infertilità è una condizione molto frequente nella popolazione. Per infertilità si intende il mancato concepimento spontaneo dopo 12 mesi di rapporti non protetti.

È stato stimato che l'infertilità colpisca più di 186 milioni di persone, con una prevalenza tra l'8% e il 12% di tutte le coppie. In alcune regioni, come il sud e il centro dell'Asia, ma anche l'afrika sub-sahariana e l'Europa centro orientale, la prevalenza può raggiungere anche il 30%. (1)

Negli ultimi anni si è assistito non tanto ad un aumento della prevalenza dell'infertilità, ma prevalentemente ad un aumento della richiesta di aiuto medico sia per patologie correlate come l'endometriosi, ma anche per fattori sociali e per fattori ambientali. Tra i fattori sociali possiamo comprendere la ricerca di una prima gravidanza in età avanzata, sia perché da una parte la gravidanza viene ritardata fino al raggiungimento di una stabilità economica e lavorativa, ma anche per una errata concezione della fertilità femminile. Alcuni studi hanno dimostrato che la maggior parte della popolazione non è a conoscenza o non ha ricevuto una corretta informazione sul declino della fertilità femminile con il passare del tempo, credendo erroneamente che la fertilità femminile sia costante durante l'arco della vita fertile della donna.

Questo ritardo nella ricerca di una prima gravidanza spesso è anche associato al pensiero che il ricorrere a tecniche di procreazione medicalmente assistita possa riportare le possibilità di avere un figlio allo stesso livello della popolazione generale di età inferiore, anche se così non è.

Ovviamente la problematica dell'infertilità non è ad esclusivo appannaggio della donna: nel 20-30% dei casi di infertilità si può infatti riconoscere una causa di origine maschile. Bisogna inoltre specificare che la componente maschile dell'infertilità influisce nel 50% dei casi di infertilità di coppia.

L'aumento della prevalenza dell'infertilità, associata all'aumento dell'età materna al momento della ricerca di una prima gravidanza, spiega il motivo di un aumentato ricorso alle tecniche di procreazione medicalmente assistita.

Per procreazione medicalmente assistita si intende un insieme di tecniche mediche, chirurgiche e laboratoristiche che prevedono la manipolazione di gameti maschili e femminili. Sono tecniche finalizzate ad aumentare le possibilità di concepimento. (2)

Durante gli ultimi anni la richiesta di trattamenti di PMA da parte della popolazione generale è cresciuta esponenzialmente, è stato dimostrato infatti che circa il 55% delle coppie infertili o subfertili richiedono un trattamento medico. Di questo 55% solo il 22% riceve successivamente un trattamento.

1.1 Infertilità

L'infertilità è caratterizzata da un mancato concepimento dopo 12 mesi di rapporti non protetti e regolari. È una condizione che comprende situazioni molto diverse da loro, dalla sterilità alla riduzione lieve del potenziale riproduttivo (subfertilità).

Il parametro che viene preso in considerazione inizialmente per parlare di infertilità è il “time to pregnancy”: è molto importante sapere infatti quanto tempo una coppia ha impiegato per raggiungere il concepimento. Un time to pregnancy maggiore di 12 mesi risulta essere patologico: nella popolazione generale la probabilità di ottenere una gravidanza al primo mese è circa del 30%, questa percentuale si riduce gradualmente nei mesi successivi. Si stima che circa il 65% delle coppie concepisca entro i primi 3 mesi, l'80% entro i 6 mesi e il 92% entro i 12 mesi. Nei mesi successivi si può comunque ottenere una gravidanza, ma la probabilità che questo accada è inferiore.

In assenza di un concepimento entro i primi 6 mesi si può parlare di riduzione della fertilità e in alcuni casi si può pensare di attivare precocemente l'iter diagnostico per infertilità, in modo da avviare precocemente queste coppie a trattamenti efficaci. (1)

È una condizione che può essere distinta da un punto di vista descrittivo, sulla base della durata, distinguendo infertilità primitiva e secondaria, ma anche dal punto di vista diagnostico o eziologico e infine dal punto di vista prognostico.

Dal punto di vista descrittivo possiamo definire la durata dell'infertilità dal punto di vista temporale, ma soprattutto possiamo distinguere l'infertilità primitiva, cioè la condizione in cui non si è mai ottenuto il concepimento, e l'infertilità secondaria, cioè un'infertilità insorta dopo una precedente gravidanza, anche esitata in aborto, IVG o gravidanza ectopica, dallo stesso partner o da partner differente.

Per quanto riguarda invece l'infertilità dal punto di vista diagnostico dobbiamo distinguere le cause di infertilità da fattore maschile, che determinano il 35% dei casi, da quelle da fattore femminile, associate ad un altro 35% di casi, e dalle forme da fattore di coppia, responsabili

del 15 % dei casi. Nel restante 15% di casi non si riesce a definire la causa, si parla quindi di infertilità idiopatica. (3, 4)

1.2 Età e riproduzione

L'età è uno dei fattori che impatta fortemente sul potenziale riproduttivo di una coppia, sia sul versante femminile, in maniera più importante, sia su quello maschile, in maniera più lieve.

La donna nasce con un patrimonio di ovociti definito, che va incontro ad un calo lieve già prima della pubertà, seguito poi da un ulteriore calo dovuto alla deplezione follicolare durante l'età fertile, fino alla menopausa. L'età impatta in maniera importante sulla riproduzione, non solo riducendo la possibilità di concepimento, ma anche aumentando il rischio di aborto spontaneo, aumentando il rischio di anomalie cromosomiche e riducendo la percentuale di successo anche attraverso le tecniche di riproduzione medicalmente assistita. Gli ultimi tre punti sono legati al fatto che, con l'avanzare dell'età materna, non solo si riduce la riserva ovarica di ovociti, ma si assiste anche ad un peggioramento della qualità ovocitaria. Il problema in questo caso è il completamento della prima divisione meiotica: gli ovociti presenti a livello ovarico, infatti, dal settimo mese di gestazione circa rimangono bloccati in Profase I fino al momento della pubertà, grazie ad elevati livelli di AMPc. Con la pubertà si assiste al completamento della prima divisione Meiotica e all'inizio della seconda divisione. Lo stimolo che determina il completamento della prima divisione meiotica e la pubertà è il picco di LH, che porta anche all'ovulazione. Si ha quindi il completamento della Meiosi I solo in un ovocita per ogni ciclo mestruale.

La divisione cellulare si blocca nuovamente in Metafase II.

Solo al momento della fecondazione si ha il completamento della seconda divisione meiotica.

Con l'avanzare dell'età materna quindi l'ovocita rimane bloccato in profase I per un tempo maggiore, questo porta ad avere una maggiore probabilità di errori nella disgiunzione finale con un aumentato tasso di aneuploidie e una riduzione del numero di embrioni euploidi, che correlano con una riduzione dei bambini nati vivi e sani. Si riduce quindi la competenza ovocitaria, cioè la capacità dell'ovocita di maturare, fertilizzarsi, svilupparsi in un embrione di buona qualità e dare origine ad un bambino sano. È necessario informare la donna del fatto che, anche in caso di ottenimento di una gravidanza in età avanzata, sia essa spontanea

o ottenuta con tecniche di PMA, si avrà un rischio maggiore di aborto spontaneo o di anomalie cromosomiche. (5)

Questo è il motivo per cui la maternità dovrebbe essere sostenuta e incoraggiata intorno o prima dei trent'anni, informando anche le donne del calo del potenziale riproduttivo a cui si assiste dopo i 32 anni. Un'altra informazione che è importante fornire alle donne è legata al fatto che dopo i 40 anni anche il ricorso a tecniche di procreazione medicalmente assistita porta a basse probabilità di successo.

Nel caso dell'uomo invece si può assistere ad una riduzione della motilità e ad un aumento dello stress ossidativo a carico degli spermatozoi, che tuttavia non riducono eccessivamente la fertilità maschile. Questa, infatti, è prevalentemente alterata da fattori ambientali, come fumo e inquinamento, ma anche da alterazioni congenite come nel caso del criptorchidismo. (6, 7)

La fertilità femminile non dipende solo dall'età ma anche dalla riserva ovarica, cioè il numero residuo di follicoli. In un modello ideale la riserva ovarica si riduce con l'età femminile, raggiungendo livelli critici per la riproduzione dopo i 40 anni. Ci sono tuttavia dei casi in cui la riserva ovarica tende a calare prima dei 35 anni, limite fisiologico dopo il quale si ha solitamente una riduzione della fertilità. Diversi studi inoltre hanno definito che l'età della donna è prevalentemente correlata con la qualità degli ovociti, mentre la riserva ovarica con la quantità. La riserva ovarica non dipende solo dall'età, ma anche dalla genetica e da fattori ambientali. (8)

Tra i fattori ambientali e legati allo stile di vita maggiormente implicati nell'alterazione della fertilità femminile si riconoscono l'obesità, ma anche l'esercizio fisico eccessivo o le infezioni sessualmente trasmesse e il fumo. Inoltre, l'incidenza di miomi uterini e di endometriosi è maggiore nelle donne di età più avanzata.

L'influenza dell'ambiente ad oggi è in studio, ci sono, tuttavia, evidenze del fatto che l'esposizione alla diossina e agli ftalati possa ridurre la riserva ovarica, così come l'esposizione al Bisfenolo A possa alterare lo sviluppo e la maturazione ovocitaria. (8)

La determinazione della riserva ovarica nella popolazione generale non serve solo per valutare la prognosi riproduttiva, ma anche per valutare quale potrebbe essere l'età alla menopausa. Nel caso invece della popolazione subfertile la valutazione della riserva ovarica serve per valutare la prognosi riproduttiva con o senza la terapia e per scegliere la terapia più adatta alla coppia in esame.

L'esame per la riserva ovarica idealmente dovrebbe essere riproducibile, non invasivo, facilmente interpretabile, ad alta specificità e sensibilità e in grado di minimizzare la variabilità nello stesso ciclo mestruale e tra i vari cicli mestruali. (9)

Nel caso della PMA la riserva ovarica viene valutata non solamente per identificare le pazienti “poor-responders” alla terapia, ma anche per individuare le donne con maggiore rischio di iperstimolazione. La sua valutazione serve quindi per modulare la terapia in modo da ottenere la migliore risposta a fronte del minimo rischio.

I due prevalenti test per la valutazione della riserva ovarica sono il dosaggio dell’ormone anti-Mülleriano (AMH) e la conta ecografica dei follicoli antrali. Questi due marcatori hanno un buon valore predittivo e sono superiori alla valutazione del FSH al terzo giorno del ciclo. Tuttavia è stato dimostrato che la misurazione del FSH come marcatore di riserva ovarica è particolarmente efficace nella predizione di una scarsa risposta alla terapia e del fallimento del ciclo di PMA: la specificità per l’identificazione delle poor responders è 45-100% utilizzando un cut off specifico (FSH>10 IU/L). (9)

1.2.1 Ormone anti-mülleriano

È una glicoproteina prodotta dalle cellule della granulosa dei follicoli antrali e dei follicoli primari, ha la funzione di regolare in maniera autocrina e paracrina la maturazione follicolare. All’interno dell’ovaio agisce prevenendo l’esaurimento precoce della riserva ovarica, inibendo la crescita e la selezione di altri follicoli. (10)

Viene dosata a livello ematico in qualsiasi giorno del ciclo, in quanto non è dipendente dalle gonadotropine e viene valutata in riferimento a normogrammi età correlati. Alcuni studi hanno tuttavia dimostrato una variabilità dei livelli di AMH in uno stesso ciclo mestruale con livelli significativamente minori durante la fase luteale, con un pattern di variabilità simile a quello del FSH ipofisario. Tuttavia questo aumento durante la fase luteale è correlato con il reclutamento dei follicoli preantrali per il ciclo successivo e migliora la predittività della successiva risposta ovarica alla stimolazione. (11, 12)

Fisiologicamente si riduce con l’età, indicando il fatto che si va incontro ad una riduzione del numero totale di follicoli antrali e follicoli primari.

È considerato il test di valutazione della riserva ovarica più sensibile, nonostante sia età correlato. Si stima infatti che i valori approssimativi siano 0.5 ng/ml a 45 anni, 1 ng/ml a 40, 1.5 ng/ml a 35 e così via, ritenendo che un valore inferiore a 1 ng/ml prima dei 35 anni sia ridotto, anche se è da correlare comunque con la storia clinica e i fattori ambientali. Dopo la menopausa l’AMH diviene indosabile.

Non esistono solamente condizioni caratterizzate da un declino precoce dell’AMH, ma anche condizioni con un AMH elevato, come nel caso della PCOS e in presenza di tumori a cellule della granulosa dell’adulto.

Nel processo della PMA è molto usato perché correla sia con la riserva ovarica sia al numero di ovociti che potranno essere recuperati a prescindere dall'età della paziente.

Dal punto di vista clinico viene usato per effettuare una previsione dell'età alla menopausa delle donne, ma anche come test di screening generalizzato per la pianificazione riproduttiva.

Nel caso della menopausa si sa che un basso valore di AMH è correlato alla menopausa, tuttavia è difficile definire quale sarà l'età alla menopausa basandosi solo sull'AMH. Studi recenti hanno dimostrato infatti che ogni calo dei livelli di AMH di 0.1 ng/mL è correlato con un aumento del 14% del rischio di menopausa precoce. (13, 14)

Permane tuttavia una difficoltà nella previsione dell'età esatta della menopausa, in quanto la capacità predittiva dell'AMH è minore nei casi di menopausa precoce e tardiva, cioè ai due valori estremi. È quindi un utile test di screening per valutare il rischio di menopausa precoce, ma i suoi valori non sono direttamente correlabili all'età della menopausa. (15)

Bisogna tuttavia specificare che i valori di AMH non sono direttamente proporzionali alla riserva ovarica: quando mi trovo di fronte ad un AMH nella norma non sono in grado di quantificare la riserva ovarica della paziente, mentre un AMH ridotto è un indice di peggioramento della prognosi riproduttiva. Questo è uno dei principali limiti dell'AMH: viene spesso valutato nelle pazienti senza problemi di infertilità e in alcuni casi può risultare ridotto, creando sconforto. I valori di AMH non possono essere utilizzati per definire la probabilità di ottenere un concepimento spontaneo, soprattutto se valutato senza correlazione con la storia clinica e con fattori ambientali come il fumo, i bassi livelli di vitamina D, l'alcol, l'esercizio fisico e l'obesità.

Questo ormone viene anche utilizzato per valutare il danno gonadotossico dopo chemioterapia o radioterapia, permettendo anche di pianificare una eventuale crioconservazione dei gameti, ma anche per valutare la possibilità di effettuare una crioconservazione degli ovociti in previsione di una chirurgia ovarica.

Il dosaggio dell'AMH non è quindi un test di fertilità e non modifica le probabilità di concepimento spontaneo delle donne senza problemi di fertilità.

Per la PMA è stato notato che le pazienti con un basso AMH (0.1 – 1.66 ng/ml) avevano una maggiore probabilità di andare incontro ad una scarsa risposta alla stimolazione. Sempre in questo ambito, un AMH normale non può escludere la donna dai trattamenti, perché con un ulteriore calo del AMH o con un AMH molto ridotto aumenta la percentuale di cicli cancellati e si riduce quindi la possibilità di ottenere una gravidanza anche con queste tecniche. Possiamo quindi distinguere tre situazioni differentemente gestite secondi le linee guida: (9)

- AMH < 0.5 ng/ml: è indicativo di una scarsa risposta ovarica che comporta una raccolta di meno di 4 ovociti. Per queste pazienti servono quindi delle tipologie di stimolazione differenti dalla popolazione generale
- AMH tra 1.0 ng/ml ma inferiore o uguale a 3.5 ng/ml: se è appropriato per l'età predice una normale risposta alla stimolazione.
- AMH > 3.5 ng/ml: aumenta il rischio di sindrome da iperstimolazione ovarica.

Il dosaggio di questo ormone ha comunque dei limiti, il principale dei quali è l'assenza di metodiche di misurazione standardizzate internazionalmente. Si ha anche una variabilità tra i vari laboratori.

Si predilige il dosaggio dell'ormone antimülleriano al dosaggio del FSH perchè il calo del AMH è precedente all'aumento del FSH e permette quindi una valutazione precoce della riduzione della riserva ovarica.

1.2.2 Conta dei follicoli antrali

Si tratta di una valutazione ecografica svolta tra il secondo e il quarto giorno del ciclo, durante la quale si effettua una conta dei follicoli di dimensioni comprese tra i 2 millimetri e i 10 millimetri in tutte le scansioni, escludendo dal conteggio i follicoli la cui dimensione supera i 10 millimetri. È quindi una valutazione indiretta della riserva ovarica.

Viene effettuata tra il secondo e il quarto giorno dall'inizio della mestruazione per ridurre la variabilità intraciclo.

Per questa misurazione viene utilizzata una sonda vaginale con una frequenza minima di 7 MHz e con una risoluzione sufficiente per distinguere le strutture di 2 mm. (9)

La conta ottenuta in ogni donna viene confrontata con dei normogrammi corretti per l'età della paziente.

Per la PMA, una conta dei follicoli antrali elevata costituisce un buon fattore predittivo positivo e ha una correlazione lineare con il numero di ovociti ottenuti, mentre la relazione tra AFC e live birth rate o pregnancy rate è variabile. È quindi un valore che può essere utile per identificare il protocollo di simulazione migliore.

L'AFC non è invece un predittore efficace di qualità ovocitaria o di qualità embrionaria.

Tra gli svantaggi principali si ha il fatto che è una misurazione operatore dipendente, a cui si aggiunge la carenza di criteri di definizione. L'eventuale futura standardizzazione della conta follicolare potrebbe aumentare l'utilità di questa misura. (11)

Un altro limite di questa misura è legato al fatto che recenti report hanno dimostrato che l'AFC varia anche in base a fattori ambientali o farmacologici: l'utilizzo di alcuni

contraccettivi o il fumo sono correlati con una alterazione dell'AFC, entrambi in senso negativo. (16)

La valutazione più affidabile, con buona ripetibilità intraoperatore e tra i vari operatori, è la misurazione 3D, con l'aggiunta della conta semiautomatica dei follicoli e la valutazione del volume ovarico.

La differenza tra AMH e AFC sta nel fatto che il secondo misura solamente i follicoli antrali, mentre il primo è in grado di valutare sia gli antrali che i pre-antrali, dando una stima più vicina alla realtà della riserva ovarica.

Si possono riscontrare talvolta dei risultati discordanti tra i vari test di riserva ovarica: in questa situazione bisogna ricordare che AMH e AFC sono più sensibili e più specifici nel riconoscere precocemente una ridotta riserva ovarica (DOR).

I marcatori non devono solo definire chi ha una riserva ovarica ridotta, ma anche chi la ha aumentata, come nel caso delle donne giovani, nei casi di ovaio policistico o di ovaio multifollicolare, cioè quelle situazioni che possono diventare problematiche se uso farmaci per indurre l'ovulazione, aumentando il rischio di sindrome da iperstimolazione ovarica.

In presenza di una riduzione della fertilità sono necessarie una diagnosi precoce ma anche una serie di terapie per le possibili cause di infertilità. Nella donna bisogna correggere i disturbi alimentari e le possibili cause di anovularietà, le flogosi genitali, eventuali malattie sistemiche, ma anche le abitudini di vita. Nell'uomo invece ha un peso molto maggiore la correzione delle abitudini di vita, come la cessazione del fumo, alcune attività lavorative e l'esposizione ad alte temperature, come sono importanti la correzione di criptorchidismi, varicocele, traumi, farmaci e flogosi genitali.

Nel caso delle pazienti poor responders, si utilizzano i criteri di Bologna per identificarle, che comprendono (17):

- Almeno due tra le seguenti:
 - o Età materna avanzata, cioè oltre i 40 anni, o qualsiasi fattore di rischio per 'Poor ovarian response' (POR)
 - o Progredita POR, cioè un ciclo di PMA che ha portato alla raccolta di meno di 3 ovociti
 - o Test di riserva ovarica anormale con AFC <5-7 o AMH <0,5-1,1 ng/ml
- Oppure due episodi di POR dopo stimolazione massima.

Queste situazioni non devono essere gestite solo dal ginecologo, ma anche da urologi e chirurghi.

1.3 Conservazione della fertilità

Ad oggi è possibile anche preservare la fertilità: questo, grazie alle nuove tecniche di crioconservazione dei gameti, sta diventando via via più semplice e più comune. La preservazione della fertilità vede, ad oggi, un numero crescente di indicazioni per la sua attuazione, tra queste distinguiamo:

- Indicazioni mediche come il rischio di menopausa iatrogena per chirurgie per endometriosi recidivante o ovarica oppure per ovariectomia profilattica, oppure per i trattamenti oncologici gonadotossici, per malattie autoimmuni con terapia a base di ciclofosfamide, per sclerosi multipla e per le donne con elevato rischio di insufficienza ovarica precoce (POI);
- Crioconservazione di ovociti sovranumerari o di embrioni non trasferiti in caso di PMA;
- Richieste di congelamento senza motivi medici: sono utilizzate per il miglioramento delle tecniche e dei risultati della PMA o per una volontà di cercare una gravidanza in età materna avanzata ad oggi in Italia è effettuata solo in centri privati.

Quali sono i risultati della crioconservazione? È necessario valutare sia la motivazione che ha portato a considerare la crioconservazione sia l'età della donna, in quanto la crioconservazione ha risultati migliori se effettuata prima dei 35 anni, sia in termini di numero di ovociti raccolti che in termini di gravidanze ottenute.

I due fattori che impattano infatti sono il numero di ovociti e l'età. Prima dei 30 anni con un ovocita la probabilità di ottenere una gravidanza è del 7,4%, questa percentuale si riduce con l'età. Per arrivare al 70% di probabilità servono circa 25-30 ovociti sopra i 38 anni.

La preservazione della fertilità è quindi più efficace se effettuata prima dei 36 anni. Tuttavia le donne che crioconservano degli ovociti prima dei 36 anni difficilmente utilizzeranno questi ovociti in futuro per l'elevata probabilità di ottenere un concepimento spontaneo.

L'outcome in termini di gravidanze ottenute con la crioconservazione non dipende solamente dall'età materna, ma dipende anche dalle tecniche di congelamento utilizzate. Un tempo veniva utilizzata prevalentemente la tecnica del "slow freezing", tramite la quale gli ovociti lentamente venivano congelati. Ad oggi si predilige la tecnica della vitrificazione, che

permette la solidificazione delle cellule e dell'ambiente intracellulare senza la formazione di ghiaccio. È una tecnica che ha permesso di ottenere, con ovociti crioconservati, gli stessi risultati ottenuti con cicli a fresco, riducendo la perdita di ovociti per anomalie durante lo scongelamento. La vitrificazione non aumenta nemmeno le complicanze ostetriche o perinatali, aumentate con la tecnica "slow freezing". (18, 19)

1.4 Cause di infertilità

Le varie cause dell'infertilità possono essere raggruppate in quattro categorie cioè le cause dovute a fattore maschile, quelle dovute a fattore femminile, fattore di coppia e infertilità idiopatica.

1.4.1 Fattore maschile

È causa del 35% dei casi di infertilità. Per fattore maschile si intende una qualsiasi modifica a carico del liquido seminale che determini ipofertilità o infertilità. Si possono definire più cause:(20)

- Cause pre-testicolari: sono forme secretorie correlate ad alterazioni a livello ipotalamico o ipofisario, associate quindi ad un quadro di ipogonadismo ipogonadotropo. Sono caratterizzate da un basso livello di testosterone e di gonadotropine e successiva azoospermia. Possono essere distinte in congenite, come nel caso della sindrome di Kallmann, e acquisite, successive a traumi cranici o ad interventi.
- Cause testicolari: sono forme secretorie, determinate da alterazioni di vario grado dei tubuli seminiferi. Sono le più numerose e a loro volta si distinguono in:
 - o Dispermie da cause pregresse, cioè con un fattore eziopatogenetico ben identificabile, congenito o acquisito. In queste forme troviamo ipoplasia testicolare bilaterale, azoospermia o severa oligo-asteno-teratozoospermia, testosterone ridotto ed elevati livelli di gonadotropine. Possono essere suddivise a loro volta in congenite e acquisite.

Tra le alterazioni congenite si hanno:

- Anomalie genetiche, come la sindrome di Klinefelter (XXY), le traslocazioni reciproche e Robertsoniane e le alterazioni che

determinano anomalie di forma degli spermatozoi (spermatozoi con testa a palla per l'assenza dell'acrosoma); (21)

- Microdelezioni del cromosoma Y in corrispondenza della regione in cui si trova il “fattore azoospermico” AZF;
- Criptorchidismo, cioè la mancata discesa di uno o di entrambi i testicoli nel sacco scrotale. Questa situazione si associa a infertilità nell'80% dei casi di criptorchidismo bilaterale e nel 40-50% dei casi di criptorchidismo monolaterale. Inoltre si ha un aumento della prevalenza di infertilità in questi soggetti se l'intervento di orchidopessi viene effettuato dopo i 2 anni di vita;
- Sindrome a sole cellule del Sertoli, caratterizzata da assenza di elementi della linea spermatogenica nei tubuli;
- Sindrome da insensibilità recettoriale agli androgeni parziale, la forma completa è invece caratterizzata da un fenotipo femminile in presenza di un cariotipo XY.

Tra le alterazioni acquisite troviamo:

- Esiti di orchiepididimiti, di torsioni funicolari bilaterali, di traumi e di complicanze di interventi chirurgici;
 - Neoplasie con successiva chemioterapia o radioterapia.
- Dispermie con patologie in atto: sono situazioni in cui la patologia concorre, con varie modalità, ad un quadro di alterazione spermatogenica, generalmente di grado lieve o medio e con profilo ormonale normale. La patologia in questo caso non può essere definita come fattore patogenetico certo ed esclusivo, ma potrebbe concorrere alla genesi dell'infertilità. Tra queste, le principali sono:
- Flogosi e infezioni del tratto genitale come prostatiti, vescicoliti ed epididimiti, di origine batterica (Chlamydia Trachomatis, Mycoplasma Hominis, ecc); (22)
 - Varicocele: in questo caso è stato dimostrato che la chirurgia riparativa è in grado di migliorare, seppur parzialmente, la qualità e la concentrazione degli spermatozoi. A questo si associa anche una riduzione della motilità correlata all'aumento di radicali liberi dell'ossigeno; (23)

- Alterazioni endocrine come la disregolazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-testicolo, iper- e ipotiroidismo, iperprolattinemia e malattie dismetaboliche, tra le quali la prevalente è il diabete mellito;
 - Autoimmunità anti-spermatozoo, dovuta all'incontro tra gli antigeni spermatici e il sistema immunitario;
 - Stress ossidativo, per un aumento della produzione di specie reattive dell'ossigeno o per un'inefficienza del sistema scavenger.
- Dispermie idiopatiche: si hanno alterazioni del seme, ma non sono evidenziabili aspetti eziopatogenetici ben definiti, né clinicamente, né con i presidi diagnostici.
- Cause post-testicolari: sono definite anche escretorie, in questi casi la funzione spermatogenetica è integra, ma nell'eiaculato si ha una condizione di azoospermia, dovuta all'ostruzione o all'agenesia parziale delle vie seminali. Si distinguono in:
 - Congenite: la più comune è l'agenesia congenita bilaterale dei vasi deferenti e dei dotti eiaculatori, dovuta spesso a mutazioni del gene CFTR della fibrosi cistica;
 - Acquisite: possono essere determinate da pregresse infezioni uretrali, con interessamento retrogrado dei dotti eiaculatori o dei dotti deferenti, fino ad un quadro di ostruzione.
- Si possono avere anche disturbi della sessualità e dell'eiaculazione. Nel caso dei disturbi della sessualità comprendiamo la disfunzione erettile e l'eiaculazione precoce, che alterano l'immissione in vagina di gameti maschili. Le alterazioni dell'eiaculazione invece comprendono l'aneiaculazione e l'eiaculazione retrograda in vescica urinaria (determinata da una compromissione dello sfintere uretrale per pregressa chirurgia pelvica o neuropatia).

1.4.2 Fattore femminile

Il fattore femminile determina il 35% dei casi di infertilità. Le cause della riduzione della fertilità femminile possono essere distinte in: (24)

- Disturbi dell'ovulazione, determinano circa il 27% dei quadri di infertilità e comprendono:
 - Amenorrea: questa può avere
 - Cause preovariche: sono definite ipogonadismi ipogonadotropo. Si possono distinguere una amenorrea primaria, quando il menarca non compare entro i 16 anni, e una amenorrea secondaria, quando, dopo

un periodo di presenza di ciclo mestruale, questo si interrompe per più di 3 mesi. Posso distinguere inoltre forme di origine ipotalamica o ipofisaria e forme congenite, come la sindrome di Kallmann (x-linked ma anche autosomica dominante o recessiva), che tuttavia nella donna è meno frequente ed è normalmente associata anche a anosmia, le mutazioni dei geni del GnRH, del FSH o del LH e del gene del KISS peptide e forme acquisite, come forme post-traumatiche, neoplastiche, post-pillola, da esercizio fisico eccessivo, da disturbi del comportamento alimentare

- Cause ovariche, per cui le forme più frequenti sono rappresentate da:
 - Anomalie cromosomiche, tra cui la sindrome di Turner (45, XO). La sindrome di Turner è evidenziabile anche grazie alle caratteristiche fenotipiche specifiche come bassa statura, anomalie cardiache o renali, ipotiroidismo, plica nucale e anomalie oftalmologiche o otologiche. In questo caso specifico la POI è determinata da una assenza della funzione del gene BMP15, localizzato sul cromosoma 15;
 - Sindrome dell'ovaio policistico;
 - Precoce esaurimento della riserva ovarica ovocitaria, definita anche Premature ovarian insufficiency (POI). Questa può anche essere correlata con la sindrome dell'X fragile, causa ereditaria di POI. È una condizione che colpisce meno dell'1% di donne prima dei 40 anni ed è diagnosticabile in caso di valori di FSH elevato in due occasioni differenti. Nel caso della sindrome della X fragile si assiste a POI non solamente nel caso di espansione delle triplette CGG del gene FMR1 (oltre 200 copie), ma anche in presenza di uno stato di premutazione, quando le copie sono tra 55 e 200. Nel caso della sindrome dell'X fragile si ha comunque una associazione tra POI e ritardo mentale severo o autismo.
- Anovulatorietà: può essere presente anche se i cicli mestruali sono regolari. Si ha quindi una condizione di anovulatorietà o di ovulazione incompleta. Tra le cause si hanno:
 - Iperprolattinemia: può derivare da un adenoma ipofisario, ma può anche essere fisiologica durante l'allattamento, durante la gravidanza

e durante periodi di eccessivo stress, fisico o psichico. Si possono riscontrare aumenti della prolattina anche in caso di ipotiroidismo cronico, farmaci ed alterazioni del suo metabolismo;

- Micropolicistosi ovarica o sindrome dell'ovaio policistico: insieme di segni e sintomi correlati a disfunzione ovarica e ad alterazioni del fenotipo. Si classifica in base ai criteri di Rotterdam, con almeno due tra anovularietà, ecografia ovarica che mostra un aspetto policistico e iperandrogenismo. L'eziologia non è nota ma è modulato da iperinsulinemia ed esposizione ad androgeni. Il fenotipo della PCOS è modulato dalla presenza dell'obesità, che inoltre amplifica l'insulino-resistenza tipica della PCOS. Questa sindrome è associata anche ad una minore espressione del gene GDF-9 che porta ad una ridotta della competenza ovocitaria e alterazioni della fertilizzazione embrionaria, con l'ottenimento di un minor numero di embrioni e di embrioni di qualità inferiore; (25)
 - Endometriosi ovarica: non è noto il meccanismo preciso ma sembra alteri il meccanismo ovulatorio. Ulteriori studi hanno dimostrato che l'endometriosi determina una riduzione della riserva ovarica una peggiore qualità ovocitaria. Tutto ciò è legato alla presenza di alterazioni delle cellule della granulosa, come la riduzione dell'espressione dell'aromatasi e l'aumento delle specie reattive dell'ossigeno a livello intracellulare. Gli ovociti delle donne che soffrono di endometriosi sono anche maggiormente correlati con un fallimento delle tecniche di fecondazione in vitro (presentano alterazioni morfologiche e minor contenuto di mitocondri) (26);
 - Luteinizzazione senza rottura del follicolo;
 - Alterazioni ponderali sia in eccesso che in difetto.
- Polimenorrea o oligomenorrea: sono condizioni frequenti, spesso legate ad alterazioni ormonali di origine extraovarica, come l'iperprolattinemia e i distiroidismi, oppure legate allo stress. Possono determinare ipofertilità perché rendono più difficoltosa l'individuazione del periodo ovulatorio.
 - Fattore tubarico: è costituito dalla condizione di ostruzione tubarica bilaterale, che impedisce la progressione dello spermatozoo ma anche dell'ovocita, rendendo nulla la possibilità di incontro tra i due gameti. Si può avere anche una ostruzione monolaterale di una delle due tube, che però riduce solo parzialmente le chances di

concepimento spontaneo. L'ostruzione bilaterale può essere dovuta a condizioni congenite, come i disordini nell'azione ciliare, ma più frequentemente è acquisita ed è dovuta a:

- Malattia infiammatoria pelvica, innescata da malattie sessualmente trasmesse come *Chlamydia Trachomatis*, *Neisseria Gonorrhoeae* e *Mycoplasma Hominis* o da altri microrganismi presenti a livello dei genitali femminili. Nel caso della *Chlamydia Trachomatis* si innesca una risposta infiammatoria a livello tubarico che porta a infiltrati infiammatorio, danno epiteliale, fibrosi sottoepiteliale e infine fibrosi tubarica progressiva, oltre a questo determina anche un danno citotossico diretto a carico della mucosa tubarica;
 - Endometriosi: la proliferazione del tessuto endometriale a livello tubarico, infatti, determina una flogosi locale con fibrosi e occlusione tubarica. In caso di endometriosi e di non completa occlusione tubarica, si ha un aumentato rischio di gravidanza ectopica tubarica in caso di concepimento spontaneo;
 - Alterazione biochimica del microambiente tubarico, che rende problematica la fecondazione.
- Microambiente peritoneale: il fluido peritoneale può essere alterato in caso di malattia infiammatoria pelvica e di endometriosi, questo può compromettere la capacità fecondante degli spermatozoi provenienti dalle tube e dell'ovocita in epoca post-ovulatoria.
- Fattore uterino: le patologie uterine non rappresentano di solito una causa di infertilità, ma riducono le possibilità di impianto embrionario a livello uterino, oltre ad aumentare la probabilità di andare incontro ad aborti spontanei. Queste comprendono:
- Miomi uterini: singoli o multipli, possono essere distinti in intramurali, se si sviluppano nello spessore della parete uterina, possono improntare la cavità uterina, sottosierosi, se sono sviluppati verso la parete esterna dell'utero e non aggettano in cavità, e sottomucosi, che si sviluppano verso la cavità interna, sono la forma che può determinare i problemi maggiori per l'attecchimento e l'evoluzione della gravidanza. La riduzione della probabilità di attecchimento è legata sia alla riduzione di spessore della rima endometriale in corrispondenza del mioma, mentre l'aumentata abortività è legata ad una alterata compliance uterina al momento dell'aumento volumetrico uterino. L'origine dei miomi può essere di tipo ormonale o di tipo genetico per alterazione generica delle cellule muscolari uterine;

- Polipi endometriali: si definisce polipo una crescita iperplastica della mucosa uterina, determinata da una anomala risposta agli stimoli ormonali;
- Malformazioni uterine: sono malformazioni determinate a livello embrionario da una errata fusione dei dotti di Müller o da un loro errato sviluppo. Dai dotti di Müller infatti originano le tube, l'abbozzo utero-vaginale e il terzo prossimale della vagina. Tra queste alterazioni possiamo riconoscere:
 - Utero setto: la cavità uterina si presenta divisa in due, completamente o parzialmente, da un setto fibroso. Si distinguono un utero sub-setto, che in genere non determina alterazioni alla gestazione, parziale o completo;
 - Utero bicorni: la parte superiore dell'utero è divisa in due corni separati, che confluiscono in basso in un collo unico;
 - Utero unicorne: è la malformazione più rara, in sede è presente solo metà dell'utero;
 - Utero didelfo: in questo caso troviamo due uteri completamente distinti, cioè formati da due corni separati.
- Anche patologie sistemiche possono alterare il meccanismo di impianto dell'embrione. Tra queste riscontriamo sepsi, malattia renale severa, diabete non compensato, ipotiroidismo subclinico, alterazione dentarie, celiachia, correlata con un rischio di aborto spontaneo aumentato del 40% oltre a rischi di IUGR e parto prematuro, e bassi livelli di vitamina D serica. Oltre a queste, bisogna anche ricordare le malattie autoimmuni. Il caso specifico dell'ipotiroidismo subclinico è caratterizzato da difficoltà nel concepimento, alterazioni ricorrenti nell'impianto embrionario e aborti spontanei precoci, spesso non tempestivamente riconosciuto per la presenza di autoanticorpi a livelli non patologici. È sempre necessario trattare un eventuale ipotiroidismo controllando il valore del TSH. Nel caso della PMA, i valori ottimali del TSH per iniziare una stimolazione devono essere inferiori a 2,5 mIU/l, in quanto la presenza di livelli elevati di TSH potrebbe essere correlata ad una peggiore fertilizzazione ovocitaria. Diversi studi hanno dimostrato invece che non c'è associazione tra elevati livelli di TSH e aumentato rischio di aborto o riduzione del pregnancy rate. (27, 28)
- Fattore cervicale: sono condizioni patologiche che compromettono la funzione della cervice uterina e alterano la penetrazione dello sperma attraverso il muco cervicale.

Si possono riconoscere alterazioni quantitative e qualitative del muco cervicale, definita ostilità cervicale, spesso dovute a infezioni vaginali o cervicali, ma anche alterazioni della giunzione squamo-cellulare congenita (ectopia) o acquisita (ectropion).

- Poliabortività: negli ultimi anni si è assistito ad un aumento dell'incidenza di aborti spontanei. Questo fenomeno è probabilmente legato all'età avanzata della donna, che non determina solo una minore probabilità di concepimento spontaneo per la fisiologica riduzione della riserva ovarica, ma si associa anche ad un maggiore tasso di aborti in relazione ad una più bassa qualità ovocitaria.

Nel calcolo dell'incidenza degli aborti spontanei devono anche essere conteggiate le gravidanze misconosciute, spesso scambiate per un semplice ritardo mestruale.

Nel caso invece di aborto ripetuto (2 episodi) o di aborto ricorrente (più di tre aborti prima della ventesima settimana gestazionale) è necessario ricercare cause anatomiche, genetiche, endocrine, come l'ipotiroidismo, e immunitarie, come accade nel caso della sindrome da anticorpi anti-fosfolipidi e le trombofilie congenite ed acquisite.

1.4.3 Fattore di coppia

Determina il 15% dei casi di infertilità. Comprende vari quadri clinici come i problemi della sessualità di coppia: le disfunzioni sessuali possono essere sia maschili, come nel caso della disfunzione erettile e dell'eiaculazione precoce, sia femminili, come il vaginismo, ma possono avere anche origine psicogena, organica o mista. a determinare una disfunzione erettile vi può essere anche un disagio psicologico legato alla consapevolezza dell'ipofertilità e della necessità di rapporti "a comando" nel periodo ovulatorio della partner. (3)

Tra le problematiche di coppia meno frequenti abbiamo invece l'infertilità psicogena di coppia e l'incompatibilità immunologica, caratterizzata dalla presenza di iso-anticorpi anti-spermatozoo verso il partner.

1.4.4 Infertilità idiopatica

Nel 15% dei casi di infertilità non si riesce a definire una causa, è una diagnosi di esclusione, che è posta in caso di infertilità involontaria che duri da almeno 1 anno, per cui le indagini diagnostiche non hanno evidenziato alcuna causa. Si definisce idiopatica se la pervietà tubarica è dimostrata e si è in presenza di funzione ovulatoria normale e di spermogramma

normale. La sua prevalenza è in calo grazie a test sempre più sofisticate che aumentano la capacità diagnostica.

I fattori che influenzano la prognosi di questo tipo di infertilità sono la durata, con una probabilità di concepimento spontaneo maggiore se l'infertilità ha una durata inferiore ai due anni, e l'età materna, per cui la prognosi è migliore se inferiore ai 35 anni.

Tra i fattori di rischio addizionali associati anche all'infertilità idiopatica si riconoscono anche uno stile di vita sedentario e l'inattività fisica. (29)

I tassi di gravidanza cumulativi sono infatti maggiori in coppie con una durata inferiore dell'infertilità: per ogni ciclo in più si ha una riduzione della probabilità di ottenere una gravidanza del 2%, si tratta quindi del 14.3% annuo circa. Questi tassi sono ritenuti accurati e devono essere considerati nella scelta terapeutica per queste coppie. (30)

Allo stesso modo per ogni anno sopra i 30, si ha una riduzione del 9% del pregnancy rate.

Dal punto di vista della diagnostica, prima di definire l'infertilità idiopatica, vengono svolti molteplici test, dai più comuni come lo spermogramma e la spermocoltura nell'uomo e dosaggio di AMH, conta dei follicoli antrali e pervietà tubarica nella donna, ai più specifici come i test per valutare la reazione acrosomale e la ricerca di ovociti difettivi, la cui prevalenza aumenta con l'avanzare dell'età materna.

Essendo la disponibilità di test diagnostici specifici in costante aumento, ad oggi la prevalenza dell'infertilità idiopatica è in diminuzione. Tuttavia nell'infertilità di coppia sono molteplici i fattori in grado di determinarla e possono essere di complessa identificazione.

1.5 Iter diagnostico

Il primo passaggio per la diagnosi dell'infertilità è sempre l'anamnesi, che deve considerare entrambi i partner, la coppia deve essere considerata come un'unica entità da valutare. Dall'anamnesi iniziale si valuta la presenza di fattori di rischio per infertilità e se sono presenti si indirizza la coppia a centri specialistici. (31)

L'anamnesi femminile deve comprendere l'elenco di eventuali patologie presenti al momento della visita, l'eventuale uso o abuso di sostanze o alcol, l'utilizzo di steroidi o di farmaci. Oltre a questo servono informazioni sul ciclo mestruale (tra cui la regolarità, l'età al menarca, l'eventuale familiarità per menopausa precoce e la possibile storia clinica di amenorrea), su pregresse gravidanze o aborti spontanei, sull'uso di contraccettivi e su pregressi interventi chirurgici sia ginecologici che non. Oltre a questo è necessario

raccogliere informazioni su eventuali patologie familiari come ipertensione, diabete e neoplasie.

L'anamnesi maschile ricalca quella femminile, con informazioni su eventuali patologie, sullo sviluppo puberale, su eventuali problemi da disfunzione erettile o dell'eiaculazione, ma anche su patologie pregresse, su interventi chirurgici pregressi o su patologie presenti nell'abito familiare.

È importante chiedere ad entrambi se hanno mai concepito, anche con altro partner.

Nel caso invece di coppie con anamnesi negativa si eseguono ecografia pelvica, tampone vaginale e cervicale, AMH e conta dei follicoli antrali nella donna e spermioγραμμα, dopo 72 ore di astinenza, ripetuto due volte a distanza di tre mesi, con spermioultura nell'uomo, oltre ad una visita andrologica. Il doppio spermioγραμμα è necessario per la grande variabilità biologica del seme maschile, si valutano comunque numero, concentrazione, motilità, morfologia. La distanza di tre mesi tra i due esami serve perché ad ogni esame si valutano gli spermatozoi prodotti tre mesi prima, per cui solo con questa distanza riesco a evidenziare cambiamento nello spermioγραμμα in seguito a modifiche dello stile di vita o ad esposizione a fattori tossici.

Nel caso di sospetta patologia cromosomica è necessario effettuare anche il cariotipo.

Se sono necessari anche esami avanzati, nell'uomo si valuta la presenza di anticorpi anti-spermatozoo e una eventuale biopsia testicolare, mentre nella donna sono necessari i dosaggi della prolattina e di testosterone e DHEA, la valutazione della funzione tiroidea, una eventuale laparoscopia per valutare la presenza di aderenze pelviche e un'isteroscopia per escludere aderenze o polipi. (32)

1.5.1 Fattore tubarico e peritoneale

Tra i fattori più frequenti nella donna riscontriamo il fattore tubarico e peritoneale. È una situazione che ha un'incidenza del 25-35%. Bisogna ricercare la presenza di aderenze o blocchi nel terzo distale della tuba. Le alterazioni della pervietà tubarica possono essere intrinseche alle tube o estrinseche alle tube. Nel 10% dei casi l'ostruzione è prossimale.

Il test diagnostico ideale per queste condizioni deve valutare la pervietà, la morfologia e la funzionalità delle tube, oltre alla presenza di aderenze o endometriosi pelvica. Questo stesso test deve essere in grado di predire la possibilità di concepimento spontaneo ed eventualmente indicare terapie chirurgiche correttive o il ricorso alla PMA (o alla salpingectomia prima della PMA).

Tuttavia il test ideale non esiste. I test maggiormente utilizzati sono l'isterosalpingografia, la laparoscopia e la sonosalpingografia, anche se hanno scarsa capacità diagnostica.

Nelle pazienti senza comorbidità le linee guida NICE 2013 consigliano l'isterosalpingografia, in quanto è un esame ambulatoriale, senza sedazione, che deve essere effettuato in un ciclo in cui non si abbiano rapporti e in assenza della mestruazione. Si utilizzano dei cateteri per ottenere un'infusione intrauterina di mezzo di contrasto, che successivamente raggiungerà le tube. Dopo l'iniezione di mezzo di contrasto viene eseguita una radiografia.

Con la sonosalpingografia si utilizza un mezzo di contrasto ecografico. Con questa metodica si ottengono risultati meno chiari, nonostante sia una metodica meno costosa, ma anche minimamente invasiva e che non espone la paziente a radiazioni ionizzanti. Può essere utilizzata in prima linea al posto dell'isterosalpingografia o della laparoscopia. (33)

In caso di ostruzione tubarica prossimale si possono avere sia occlusione tubarica che ostruzione da detriti, che, in corso di isterosalpingografia, possono essere rimossi tramite un catetere, eliminando l'ostruzione.

L'unione di isterosalpingografia e sonosalpingografia permette di raggiungere più velocemente una diagnosi, ma anche di creare meno discomfort alla paziente, in quanto si effettua solo un accesso in cavità uterina per iniettare il mezzo di contrasto. (34)

Nonostante le premesse il gold standard è la laparoscopia, che ad oggi è però riservata a pazienti in cui sospetto fortemente una patologia. In assenza di forte sospetto diagnostico la laparoscopia viene utilizzata come seconda linea.

Se si riscontra una dilatazione tubarica all'isterosalpingografia viene eseguita una laparoscopia per cercare di rimuovere la dilatazione con un'emisalpingostomia (se la tuba è troppo danneggiata), oppure per rimuovere la tuba eccessivamente dilatata che creerebbe problemi alla PMA, in quanto si avrebbe una sactosalpinge aperta o idrosalpinge con un accumulo di liquido, che, attraverso un flusso retrogrado verso l'utero, renderebbe più complesso l'attecchimento embrionario. (35)

È necessario ricordare comunque che la gravidanza si può realizzare in qualsiasi fase dell'iter diagnostico e terapeutico e anche dopo il completamento.

1.5.2 Fattore ovulatorio e disturbi del ciclo mestruale

È un fattore di infertilità femminile da indagare entro 12 mesi se è presente amenorrea o una qualsiasi alterazione del ciclo mestruale come polimenorrea o oligomenorrea.

L'amenorrea è un problema ginecologico che non riguarda solo la fertilità. È un'anomala cessazione o una assenza del ciclo mestruale, che si può suddividere in primaria, se si ha assenza del menarca a 14 anni con associata l'assenza dei caratteri sessuali secondari oppure

se si ha assenza del menarca a 16 anni, indipendentemente dai caratteri sessuali secondari, e in secondaria, cioè una situazione in cui si ha l'assenza del ciclo mestruale per 3 flussi o sei mesi.

L'amenorrea è un sintomo unico con molte cause, la diagnosi è quindi fondamentale per definire la giusta terapia. È necessario quindi raccogliere l'anamnesi in maniera completa ed eseguire un dettagliato esame obiettivo. Successivamente si eseguono i dosaggi ormonali, cioè il dosaggio di LH, FSH, estrogeni, androgeni e prolattina. Se questo non basta posso eseguire l'analisi del cariotipo. (36)

Nel caso dell'amenorrea primitiva le cause più frequenti sono una disgenesia ovarica oppure una malformazione uterovaginale, mentre nel caso della secondaria le cause più frequenti sono ipotalamiche oppure legate alla funzione ovarica, come nel caso della PCOS.

L'amenorrea primitiva è di solito una problematica pediatrica, tra le cui cause più comuni si trovano le disgenesie gonadiche, la sindrome di Turner, le anomalie mülleriane, le anomalie congenite della differenziazione sessuale, ma anche cause ipotalamo-ipofisarie e il ritardo costituzionale. (36)

L'indagine genetica in questi casi è la più giustificata, ma una grande importanza la ha anche la diagnostica per immagini, che valuta la presenza o l'assenza delle strutture anatomiche oltre che una loro eventuale alterazione morfologica. Le due metodiche utilizzate sono ecografia e RMN, anche se entrambe hanno dei limiti. I limiti dell'ecografia sono legati al fatto che si ottengono immagini maggiormente dettagliate con la sonda vaginale, che però non è utilizzabile con pazienti che non hanno mai avuto rapporti sessuali. In queste pazienti è necessario utilizzare sonde transaddominali o transperineali, per le quali è necessaria una maggiore esperienza dell'operatore. I limiti della RMN sono invece legati alla minore disponibilità e ai maggiori costi.

La sindrome di Turner è una delle più frequenti cause di amenorrea primitiva, caratterizzata da un utero ipoplasico, un mancato riscontro delle ovaie all'ecografia, mentre la risonanza non permette sempre di vedere le gonadi. (36)

Tra le cause di amenorrea primitiva si ha anche la sindrome di Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser, che colpisce 1:4000 nate ed è caratterizzata da atresia vaginale associata a utero aplasico e rudimentale con ovaie normali e cariotipo 46 XX. Si possono riscontrare anche anomalie renali nel 50% dei casi, anomalie scheletriche o spinali nel 12%, mentre nel 6% dei casi si può avere un endometrio funzionante che provoca ematometra, cioè una raccolta di materiale ematico intrauterino. (36)

Ulteriori possibili cause sono legate alle anomalie uterovaginali ostruttive, come l'ematometrocolpo da imene imperforato, risolvibili o con la rimozione dell'ostruzione o con isterectomia.

L'amenorrea secondaria invece può avere molteplici cause, tra cui anche la gravidanza, che è la principale causa di amenorrea secondaria nella popolazione femminile in età fertile. (36)

L'iter diagnostico prevede inizialmente i dosaggi ormonali di β hCG, FSH, LH, estrogeni, ma anche prolattina e TSH. Se sono tutti nel range di normalità si deve valutare la presenza di alterazioni anatomiche, che sono più frequentemente causa di amenorrea primaria. (37)

Nel caso del TSH, è noto che un ipotiroidismo, con un conseguente aumento del TSH, può determinare irregolarità mestruali fino all'amenorrea. La funzione tiroidea è correlata ad alterazioni del ciclo mestruale sia in caso di ipotiroidismo sia in caso di ipertiroidismo. La presenza di un ipotiroidismo, anche di natura autoimmune, è anche associata ad aumentato rischio di aborto spontaneo e ad aumentata incidenza di complicanze durante la gravidanza. Una alterata funzione tiroidea, ma soprattutto la presenza di autoimmunità contro la tiroide, è correlata anche con una minore percentuale di successo delle tecniche di PMA, in quanto gli autoanticorpi sono in grado di creare un microambiente ostile a livello uterino riducendo le possibilità di impianto dell'embrione. (37)

In presenza di livelli elevati di gonadotropine, si è di fronte a condizioni come disgenesie o agenesie gonadiche, deficit enzimatici e insufficienza ovarica precoce, dovuta a menopausa precoce che sia spontanea, iatrogena o autoimmune. Questa situazione è di complessa gestione medica, perché è un'amenorrea ipergonadotropa, su cui la stimolazione ormonale ha scarso effetto. (36)

Se le gonadotropine sono ridotte, ci si orienta verso amenorree ipofisarie (dovute a tumori, sindromi post-infettive, malattie croniche debilitanti, sindrome di Sheenan o cause disfunzionali). In caso di gonadotropine normali o ridotte invece sono più probabili le cause ipotalamiche come la disfunzione gonadica stress-correlata, oppure un eccesso di attività fisica, disordini alimentari, mentre sono meno frequenti i deficit di GnRH.

Un importante studio sui problemi endocrini dimostra che lo stress e i disturbi alimentari alterano la pulsatilità degli ormoni che regolano il ciclo ovarico. Se la pulsatilità del LH cambia, si ha amenorrea, con alterazione della follicologenesi e della crescita endometriale. L'amenorrea ipotalamo-ipofisaria non è una patologia a rapida insorgenza, ma è di solito preceduta da disturbi minori del ciclo mestruale, cicli anovulatori, sempre più distanziati, fino all'amenorrea. Allo stesso modo, con la risoluzione della causa, anche la ripresa del ciclo mestruale è graduale.

Nel caso invece in cui si abbia un aumento della prolattina, le cause possono essere molteplici, tra cui i farmaci come gli antidepressivi, adenomi ipofisari. Tra i sintomi dell'iperprolattinemia si hanno appunto amenorrea e infertilità.

Un'altra frequente causa di amenorrea secondaria è la sindrome dell'ovaio policistico (PCOS), caratterizzata da obesità, irsutismo, anomalie mestruali, acne e infertilità. A livello ovarico si trova una eccessiva riserva ovarica, cioè un numero di follicoli molto maggiore del normale. I criteri diagnostici comprendono oligo- o anovulazione, segni clinici o biochimici di iperandrogenismo e ovaio policistico all'ecografia non spiegabile altrimenti. L'ovaio si presenta di volume aumentato con un AFC >12, i follicoli hanno una disposizione periferica e si ha una aumentata ecogenicità dello stroma. (25, 36)

L'ecografia può creare dei problemi nella distinzione tra ovaio policistico e ovaio multifollicolare, che non è associato all'alterazione del metabolismo glucidico tipica della PCOS, ma è semplicemente uno stato transitorio associato ad un ovaio "giovane" con ricca riserva ovarica, anche eventualmente associato alle irregolarità mestruali tipiche dell'adolescenza.

In tutti questi casi è necessario avviare ai centri specialistici le coppie con un fattore d'infertilità noto. Si devono informare le coppie che la PMA può aumentare le probabilità di concepimento per ciclo riducendo il Time to pregnancy, ma anche informare della possibilità di crioconservare i gameti di pazienti che possono subire delle terapie con una possibile riduzione del potenziale riproduttivo.

1.6 Aspetti psicologici dell'infertilità

L'infertilità non è una patologia che mette a rischio l'integrità fisica dei singoli pazienti, ma può avere pesanti risvolti psicologici per le coppie. (32)

Il management dell'infertilità è ancora complesso, soprattutto per le grandi difficoltà diagnostiche spesso incontrate ma anche per la frequente carenza di comunicazione tra i due partner.

Altro fattore che grava in maniera importante sulla psiche dei pazienti è legato al fatto che, anche con i trattamenti, non si ha una certezza di successo.

Il medico che si occupa del primo colloquio e del successivo counselling deve fornire alla coppia informazioni complete e quanto più dettagliate, sia sulla diagnosi, sia sul possibile

trattamento, ma anche sulle chances di successo del trattamento stesso. È il medico stesso che deve fornire alla coppia le informazioni che ad essa servono per prendere delle decisioni.

1.7 Tecniche di riproduzione assistita

Sono tecniche per il trattamento dell'infertilità di coppia che prevedono l'applicazione di una inseminazione intrauterina (IUI) o di una fecondazione in vitro con trasferimento dell'embrione (FIVET), eventualmente con iniezione intracitoplasmatica dello spermatozoo (ICSI). Sono tecniche che prevedono quindi la manipolazione dei gameti.

In Italia nel 2018 sono stati iniziati 51.086 cicli di PMA, dei quali il 90,8% è arrivato al prelievo ovocitario, di cui il 65,9% si è concluso con il trasferimento degli embrioni in cavità uterina. A quest'ultima percentuale si aggiunge il 16,1% di cicli che si sono conclusi con il congelamento degli embrioni ottenuti per eseguire un transfer in un secondo momento.

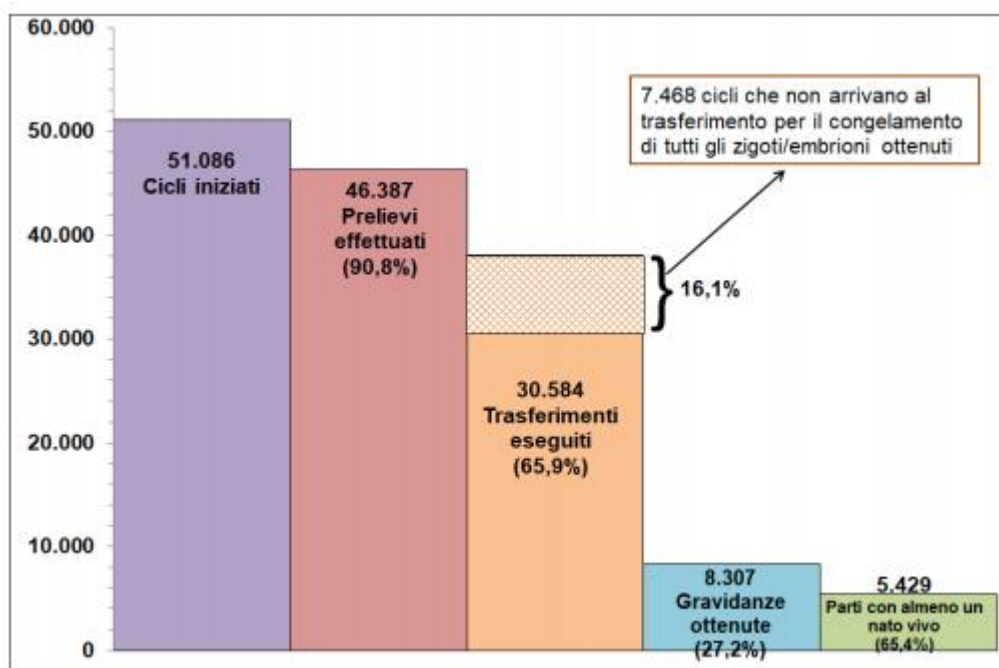


Figura 1 Risultati dei cicli iniziati con tecniche a fresco di II e III livello (FIVET e ICSI) senza donazione di gameti, secondo la fase del ciclo - anno 2018 (% calcolate rispetto alla fase precedente)

Nonostante siano stati eseguiti 30.584 transfer, sono state ottenute solamente 8.307 gravidanze (27,2%), con un numero di parti con almeno un nato vivo pari a 5.429 (65,4% delle gravidanze ottenute).

Anche l'induzione dell'ovulazione è un trattamento effettuato nei centri di PMA. È una terapia medica effettuata nei casi in cui non si ha ovulazione spontanea, come nella PCOS,

nell'oligomenorrea e nelle amenorree ipotalamiche. In questi casi si cerca di stimolare l'ovulazione singola medicalmente.

Nel caso della FIVET e dell'ICSI invece si cerca di stimolare una crescita multifollicolare, in modo da recuperare il maggior numero di ovociti possibile.

Sia per la stimolazione della crescita follicolare, sia per l'induzione dell'ovulazione si utilizzano dei farmaci come il citrato di clomifene e le gonadotropine.

Il citrato di clomifene viene assunto per os per 5 giorni al mese, è un SERM, cioè una molecola ad attività antiestrogenica, che legandosi ai recettori ipotalamici annulla il feedback negativo e aumenta la produzione di LH e FSH.

Le gonadotropine vengono invece utilizzate come iniezione sottocutanea, stimolano direttamente l'ovaio. Il loro primo utilizzo è stato possibile nel 1970, in quanto inizialmente erano di origine urinaria, poi sono state purificate e ad oggi sono ricombinanti.

Tutte le tecniche hanno in comune, oltre alla stimolazione, la necessità di effettuare un monitoraggio della risposta alla terapia. Il monitoraggio avrà degli intervalli di tempo differenti in base alla tecnica di PMA scelta, tuttavia in ogni caso prevede un controllo ecografico della crescita follicolare e endometriale e un dosaggio del 17 β -estradiolo.

1.7.1 Legge 40/2004

È la legge che regola la PMA, è stata smantellata in più punti anche se rimane in vigore l'articolo 4 che definisce l'accesso alle cure, l'indicazione dei vari trattamenti, ma anche la gradualità nel ricorso alle tecniche. Il ricorso alle tecniche è consentito solo quando sia accertata l'impossibilità di rimuovere altrimenti le cause che impediscono la procreazione ed è comunque circoscritto ai casi di sterilità o infertilità inspiegate documentate da un atto medico. (38)

La certificazione dello stato di infertilità può essere effettuata dal medico responsabile del centro o da altri specialisti, come il genetista, il ginecologo e l'endocrinologo con competenze andrologiche.

La legge 40/2004 afferma anche che le tecniche debbano essere applicate con gradualità, partendo dal meno invasivo e procedendo successivamente verso i più invasivi, e per queste tecniche è necessario il consenso informato. Sono inoltre consentite le tecniche di tipo eterologo, dove uno o entrambi i gameti derivano da individui diversi dalla coppia ricevente. Questa è considerata legittima come indicato dalla sentenza 162/2014 della Corte Costituzionale ed è indicata in tutte le situazioni di sterilità comprovata di uno dei due partner, o di entrambi, in cui non si possa disporre dei propri gameti competenti, ma anche

nel caso in cui la partner femminile sia Rh- negativo e gravemente isoimmunizzata con un partner maschile Rh- positivo.

Permangono, tuttavia, il divieto alla donazione degli embrioni, alla sperimentazione sugli embrioni, all'impiego di tecniche di PMA su coppie dello stesso sesso e alla maternità surrogata.

L'articolo 6 afferma inoltre che le modalità con cui modulare la gradualità delle tecniche e le indicazioni cliniche di accesso alla PMA eterologa sono di esclusiva responsabilità del medico e vanno riportate in cartella clinica e motivate.

Per l'accesso alle tecniche di PMA è necessaria la raccolta di un consenso informato per iscritto di entrambi i partner. Lo stesso consenso deve essere firmato anche dal medico responsabile.

Ogni centro di PMA prevede inoltre la possibilità di consulenza per la coppia, ma anche eventualmente la possibilità di un supporto psicologico. L'attività di consulenza deve essere una attività di routine che fornisca alle coppie gli elementi per arrivare ad una decisione informata. La consulenza può essere:

- decisionale, cioè attuata per consentire alla coppia di comprendere le implicazioni che il trattamento potrebbe avere su loro stessi ma anche sui loro familiari;
- di sostegno, per supportare le coppie in momenti di stress e difficoltà, spesso incontrati in questo tipo di percorso;
- genetica, nella previsione di rischio di anomalie genetiche;
- terapeutica, utile per modulare le aspettative delle coppie e aiutarle ad accettare la realtà in particolari situazioni.

Secondo la legge 40/2004 possono accedere a programmi di PMA le coppie maggiorenni di sesso diverso, coniugate o conviventi, in età fertile entrambi viventi. Non si ha quindi un limite precisamente definito dal legislatore, ma il limite di età può variare da centro a centro, indicativamente dai 43 ai 46 anni. La decisione in merito a questo limite è a carico del medico responsabile della struttura ma anche del comitato etico-scientifico della struttura stessa.

Sono necessari anche alcuni accertamenti per poter essere ammessi al programma di PMA che sono stabiliti dalle Linee Guida della Legge 40/2004 e dal Ministero della Sanità con le circolari n.19 del 27/4/1987 e n.17 del 10/4/1992. Oltre a questi accertamenti, effettuati tramite prelievi ematici, possono essere eseguite ulteriori analisi per valutare la presenza di alterazioni del cariotipo, oppure delezioni cromosomiche o mutazioni genetiche, come nel caso della fibrosi cistica, e per valutare la morfologia del canale cervicale e della cavità uterina.

Il partner femminile dovrà eseguire: emogruppo e fattore RH, eventualmente associato al test di Coombs indiretto se si ha un emogruppo RH negativo, emocromo completo, valutazione del profilo sierologico di malattie infettive tra cui anticorpi anti Rosolia, anti Toxoplasma e anti Citomegalovirus (tutti IgG e IgM), HbsAg, HbcAb, HCV, HIV, Tpha e VDRL. Gli esami infettivologici non devono essere ripetuti se già eseguiti nei 3 mesi precedenti rispetto all'inizio delle terapie.

Al secondo o terzo giorno del ciclo mestruale devono essere anche svolti i dosaggi ormonali (LH, FSH, TSH, 17β estradiolo, inibina β , ormone antimülleriano e PRL).

Prima dell'inizio della stimolazione sono necessari gli esiti di Pap test, mammografia o ecografia mammaria, oltre che un eventuale tampone vaginale e cervicale con la ricerca mirata della Chlamydia Trachomatis e del Mycoplasma.

Nel caso in cui la tecnica scelta sia una tecnica di secondo livello sarà necessaria anche l'esecuzione di un ECG, per stabilire la possibilità di sottoporsi ad anestesia ed analgesia.

Il partner maschile dovrà eseguire, come nel caso della donna, emogruppo e RH, profilo sierologico per le malattie infettive, comprendente HbsAg, HbcAg, HCV, Tpha e VDRL, HIV. Oltre a questi saranno necessari spermioγραμμα con spermio coltura, test di capacitazione e Mar test. In casi selezionati verranno anche svolti test di frammentazione del DNA dello spermatozoo, screening delle microdelezioni del cromosoma Y, cariotipo, oltre a dosaggi ormonali di testosterone, FSH, LH ed estradiolo.

È necessario che almeno uno dei due partner esegua inizialmente l'elettroforesi delle emoglobine e lo screening della fibrosi cistica: nel caso si evidenziasse la presenza di una mutazione in uno dei due partner, dovrà essere valutata la presenza di una mutazione a carico dello stesso gene nell'altro.

La legge 40/2004 ha anche stabilito l'istituzione del Registro Nazionale della PMA, gestito dal SSN, che permette di eseguire un censimento sulle attività e sulle prestazioni erogate su tutto il territorio. (39)(40)

1.7.2 Tecniche di primo livello

Comprendono le inseminazioni intracervicali o sopracervicali in cicli naturali o con stimolazione ormonale, associate alle tecniche di preparazione del liquido seminale.

Tra le tecniche di primo livello si ha anche la IUI, per la quale è necessario avere almeno una tuba pervia e un liquido seminale adeguato. In Italia nel 2017 la maggior parte delle IUI è stata effettuata per infertilità inspiegata o ovulatoria.

La donna in questo caso si deve sottoporre ad accertamenti per la valutazione della pervietà tubarica.

La IUI può essere svolta su ciclo spontaneo o su ciclo indotto, per il quale si utilizza spesso il citrato di clomifene, preferito per il costo minore e la somministrazione più semplice.

Anche per la IUI serve un timing preciso, in quanto l'introduzione in utero del liquido seminale capacitato tramite un catetere piccolo e morbido deve essere eseguito al momento dell'ovulazione. Si esegue un monitoraggio seriato della crescita follicolare, seguito o dall'esecuzione domiciliare di stick urinari di LH oppure dalla stimolazione dell'ovulazione tramite iniezione di β hCG.

Il seme può essere preparato tramite un lavaggio semplice, oppure uno swim up, cioè una migrazione attiva degli spermatozoi dal plasma seminale in un terreno di coltura appropriato, indicata in caso di normospermia o dispermia di grado lieve o moderato, oppure ancora tramite separazione per gradiente di densità discontinuo, che consiste nella centrifugazione del plasma seminale su gradienti di densità differenti, gli spermatozoi mobili migrano fino a formare uno strato alla base del tubo di centrifugazione. (41)

La percentuale di successo di questa tecnica è circa del 10%. I cicli sono semplici e possono essere ripetuti fino a 3-4 cicli. Il risultato può essere influenzato dall'età, dalle indicazioni, dal timing dell'inseminazione e dal numero di follicoli.

Secondo le linee guida NICE, le IUI non dovrebbero più essere eseguite, se non ai pazienti HIV+ (per lavare il seme prima del rapporto), ai pazienti con difficoltà sessuologiche o a coppie dello stesso sesso (non in Italia). Queste linee guida riducono le indicazioni e nei casi non compresi è necessario attendere un altro anno di rapporti non protetti che non portano ad una gravidanza. (42)

Le linee guida non sono completamente rispettate, anche se il numero di IUI è in riduzione. Complicanze e risultati sono strettamente legati: si ottengono risultati migliori con più follicoli, il numero ottimale è di due follicoli, con un aumento del successo da 8% a 15%, anche questo porta anche ad un maggiore rischio di gemellarità. Se si generano più di tre follicoli il ciclo va sospeso perché il rischio diventa eccessivo.

L'inseminazione eterologa è una IUI con il seme da donatore, che ad oggi è consentita anche in Italia.

1.7.3 Tecniche di secondo livello

La prima applicazione di una FIVET a livello mondiale è stata nel 1978. Da questa prima tecnica sono successivamente nate delle varianti, anche grazie alle frequenti innovazioni, che ne modificano l'applicazione.

Le due tecniche principali sono la FIVET e l'ICSI, per le quali la parte medica è uguale, cambiano le metodiche di maneggiamento dei gameti. Le indicazioni per la FIVET sono

l'ostruzione tubarica bilaterale, endometriosi, fattore maschile medio, infertilità inspiegata, insuccesso con la IUI.

Per la ICSI le indicazioni invece comprendono un fattore maschile grave o gravissimo, endometriosi, infertilità inspiegata e l'insuccesso con la IUI.

Con la FIVET in laboratorio si posiziona la cellula uovo con le cellule della granulosa e la corona radiata in un ambiente in cui viene poi circondata dagli spermatozoi, uno dei quali penetrerà spontaneamente nella cellula. Con la ICSI invece si utilizza un ovocita denudato: si rimuovono quindi precedentemente la corona radiata e le cellule della granulosa e successivamente si inietta nel citoplasma uno spermatozoo selezionato.

Queste metodiche prevedono diverse fasi, uguali nella FIVET e nell'ICSI, tranne che nella parte del laboratorio.

Queste fasi sono:

- 1- preparatoria: comprende il primo colloquio, con la raccolta dell'anamnesi, lo svolgimento degli esami ematochimici di base, dei dosaggi ormonali, oltre che lo screening per le patologie infettive e la valutazione ecografica della morfologia utero-ovarica;
- 2- Stimolazione ormonale ovarica controllata e successivi monitoraggi ecografici e ormonali;
- 3- Induzione dell'ovulazione;
- 4- Prelievo ovocitario, con contemporanea raccolta e preparazione del liquido seminale;
- 5- Inseminazione o fecondazione;
- 6- Trasferimento degli embrioni in utero, eseguito 2-3 o 5 giorni dopo il prelievo;
- 7- Supporto della fase luteale.

La stimolazione è la parte medica cruciale: questa segue un protocollo di stimolazione che deve essere personalizzato anche in base alla risposta ovarica attesa, che può parzialmente essere predetta sulla base di età femminile, AFC e AMH. La stimolazione è necessaria per ottenere la crescita contemporanea di più follicoli: con un maggiore numero di follicoli ho la possibilità di ottenere un maggiore numero di ovociti, quindi un potenziale maggior numero di embrioni da trasferire sia in caso di ciclo a fresco sia in caso di embryo transfer con embrione congelato.

Di questi follicoli non tutti contengono ovociti, così come non tutti gli ovociti saranno maturi e non tutti i maturi si feconderanno. Oltre a questo non tutti gli ovociti fecondati riusciranno ad impiantarsi.

Il ciclo di stimolazione ha una fase preparatoria, durante la quale devono essere svolti colloqui con la coppia ed esami preparatori, mentre la stimolazione vera e propria inizia con

il primo giorno della mestruazione, che può essere spontanea o regolata tramite pillola estroprogestinica.

L'utilizzo della pillola EP è indicato soprattutto nel caso in cui i cicli mestruali della paziente siano irregolari e quindi imprevedibile: questa situazione infatti deve essere integrata in un contesto ospedaliero in cui si hanno lunghe liste d'attesa e una precisa organizzazione del lavoro. Al contrario, nelle pazienti con cicli mestruali regolari, si può prevedere la data di inizio della mestruazione e programmare preventivamente il giorno di inizio della stimolazione.

Diversi studi, come quello di Barad et al. del 2013, ha definito inoltre che l'utilizzo della contraccezione orale per programmare l'inizio della stimolazione può determinare un peggior risultato in termini di ovociti raccolti. Le pazienti incluse in questo studio erano pazienti giovani, con buona riserva ovarica, che si sottoponevano a cicli di stimolazione ovarica per effettuare un'ovodonazione. Questo studio aveva dimostrato che i contraccettivi orali determinavano la raccolta di un minor numero di ovociti in caso di stimolazione ovarica dopo il loro utilizzo, rispetto a quelli raccolti senza l'utilizzo di contraccettivi orali in donne con riserva e funzione ovarica normali. Determinando una ulteriore soppressione della funzione ovarica, l'utilizzo dei contraccettivi orali dovrebbe quindi essere evitato nelle donne con riserva ovarica ridotta, in quanto potenzialmente in grado non solo di ridurre il numero di ovociti raccolti, ma anche di compromettere il risultato della stimolazione aumentando la probabilità di annullamento del ciclo di stimolazione stesso. (43)

I vari protocolli prevedono la combinazione di farmaci che stimolano la crescita follicolare multipla con un analogo del GnRH, che blocca l'ovulazione spontanea. La stimolazione dura generalmente 12-16 giorni, cioè fino a quando si ottengono follicoli di numero e dimensioni adeguate per indurre l'ovulazione. Il prelievo degli ovociti, o pick up, viene effettuato 36 ore dopo l'induzione dell'ovulazione o in sala operatoria o in ambulatorio chirurgico: si possono utilizzare o una sedazione conscia o un blocco paracervicale.

Il pick up avviene tramite l'introduzione di un ago a livello del fornice vaginale posteriore, arrivando all'ovaio e bucando ogni follicolo per aspirare il liquido follicolare e l'eventuale ovocita al suo interno.

Il fulcro della PMA è il laboratorio, in cui si eseguono FIVET e ICSI. Qui subito dopo il pick up si classificano gli ovociti in base alla morfologia. Se presentano il primo globulo polare sono in metafase II quindi maturi e fertilizzabili, se presentano la vescicola germinale sono molto immaturi e sono in profase I, se non hanno nessuno dei due sono in metafase I quindi immaturi.

La preparazione del seme è analoga a quella dell'IUI. (41)

Dopo la fecondazione o l'inseminazione si controlla la fecondazione che sarà evidenziata dalla presenza dei due pronuclei, femminile e maschile. L'inseminazione avviene lo stesso giorno del pick up, al giorno 1 si controlla la fecondazione, nei giorni successivi si valuta la divisione, fino ad arrivare al trasferimento in utero.

La scelta tra FIVET e ICSI viene effettuata in base alla qualità del seme: si predilige la ICSI in caso di grave fattore maschile, con motilità ridotta e con un numero di forme normali inferiore al 4%, al di sotto del quale si evidenzia una fecondazione molto minore in caso di FIVET. La ICSI ad oggi viene utilizzata in una casistica più ampia, anche in assenza di indicazioni come la peggiore qualità del seme, tuttavia, essa è correlata con un peggiore outcome: si ottiene infatti un minore numero di blastocisti e queste sono di peggiore qualità, aumentando il rischio non solo del fallimento del ciclo di stimolazione, ma anche di successivi aborti spontanei e di complicanze durante la gravidanza. Nel caso degli embrioni in clivaggio (giorno 2-3) non sono invece state riscontrate differenze tra FIVET e ICSI. (44) Successivamente, in seconda-terza giornata, cioè allo stadio di 8 cellule con embrioni in clivaggio, o in quinta giornata, cambiando la coltura fino allo stadio di blastocisti, si esegue il transfer degli embrioni. La giornata del transfer è scelta in base al numero di embrioni ottenuti e alla qualità di questi embrioni. Il transfer in quinta giornata permette anche una ulteriore selezione, perché solo la metà degli embrioni arriva allo stadio di blastocisti.

I risultati dipendono dal numero di ovociti recuperati, anche se non tutti quelli raccolti vengono inseminati. Si sceglie di solito un certo numero anche in base alle caratteristiche della coppia. Gli ovociti non inseminati vengono congelati, questi potranno essere utilizzati successivamente dopo scongelamento e sottoposti a ICSI.

Non si trasferiscono mai più di due embrioni per il rischio di gravidanze multigemellari.

Il transfer viene eseguito sotto controllo ecografico senza anestesia.

Dopo il transfer si hanno terapie domiciliari con progesterone o simili per preparare l'endometrio all'impianto: la normale fase luteale è alterata dalle terapie di stimolazione, quindi serve una terapia di supporto per permettere la crescita e la modifica endometriale.

Una ulteriore tecnica che è in continuo sviluppo e che è stata implementata fortemente dal miglioramento delle tecniche di criopreservazione è la FET o frozen embryo transfer: consiste nel trasferimento nella cavità uterina di embrioni precedentemente congelati al termine di un ciclo di stimolazione, conclusosi con un embryo transfer o no. È una tecnica che permette di differire in un secondo momento il transfer degli embrioni in caso di OHSS, ma anche di ridurre il numero di cicli di stimolazione ovarica ed il rischio di gravidanze gemellari. In passato, infatti, ad ogni ciclo di stimolazione ovarica, tutti gli embrioni ottenuti

dovevano essere trasferiti in utero, sia per l'assenza della crioconservazione, sia perché il Legislatore non permetteva di eliminare embrioni in quanto non considerati cellule singole. In passato si prediligeva il ciclo a fresco per un maggiore tasso di gravidanza; successivamente la crioconservazione con congelamento lento è stata sostituita dalla vitrificazione ottenendo con la FET gli stessi risultati ottenuti con un ciclo a fresco. (45)

Il trasferimento degli embrioni precedentemente congelati può essere effettuato sia su ciclo spontaneo, tramite il monitoraggio dell'ovulazione senza utilizzare terapie farmacologiche per preparare l'endometrio, oppure su ciclo medicato. Nel secondo caso si utilizzano estrogeni esogeni per stimolare la crescita lineare dell'endometrio fino al secondo o al terzo giorno dopo l'ovulazione, successivamente è necessaria anche la somministrazione del progesterone per supportare la fase secretiva. Liu et al. nel 2018 hanno dimostrato che il migliore implantation rate si ottiene con un endometrio di spessore uguale o superiore a 8 millimetri: il raggiungimento di questo spessore diviene più complesso con l'aumento dell'età materna. (46)

Lo spessore endometriale viene controllato attraverso ecografie transvaginali seriate sia in caso di ciclo spontaneo sia in caso di ciclo medicato: la visualizzazione all'ecografia di un endometrio trilaminare con outerline e midline iperecogene e una innerline ipoecogena è un fattore predittivo positivo per il successo di impianto. In presenza di un endometrio omogeneamente iperecogeno o senza differenze di ecogenicità si ha un valore predittivo negativo di gravidanza del 90,5%. (47)

1.7.4 Farmaci e protocolli

I farmaci comprendono le gonadotropine, gli analoghi del GnRH e i farmaci per l'induzione dell'ovulazione.

Tra le gonadotropine si utilizza generalmente il FSH, anche se esistono delle formulazioni all'interno delle quali si ha una combinazione tra FSH e LH. Tra questi troviamo:

- FSH menopausali: un tempo erano ottenute tramite purificazione delle urine delle donne in età menopausale, nelle quali la concentrazione di FSH era molto elevata;
- FSH ricombinanti, cioè di sintesi, comprendono:
 - Follitropina alfa, il cui nome commerciale è "Gonal F". Si hanno anche delle gonadotropine similari alla follitropina alfa, cioè "Bemfol" e "Ovaleap". È stato dimostrato che in termini di ovociti recuperati, tasso di gravidanza e tasso di nascita non si hanno differenze significative tra la follitropina alfa e gli analoghi. (48)
 - Follitropina beta o "Puregon"

- Follitropina delta o “Rekovel”
- Corifollitropina alfa o “Elonva”. Si utilizza in associazione ad un antagonista del GnRH
- LH ricombinante o lutropina alfa, il cui nome commerciale è “Luveris”
- Combinazioni di FSH e LH, umana o ricombinante:
 - Menotropina: è una preparazione altamente purificata di FSH e LH, con rapporto 1:1, estratta da urine di donne in età menopausale. Il suo nome commerciale è “Meropur”.
 - Follitropina alfa + lutropina alfa o “Pergoveris”. È indicato nelle donne adulte con grave insufficienza di LH e FSH.

La scelta della gonadotropina da utilizzare è dettata dalle necessità della singola paziente, ma anche dal dosaggio necessario, dalla durata del trattamento e dalla disponibilità delle risorse economiche per il SSN e per le pazienti.

È stata dimostrata una relativa maggiore potenza della follitropina beta rispetto alla follitropina alfa, in quanto, a parità di durata della stimolazione, la prima ha permesso il raggiungimento di livelli di estrogeni significativamente maggiori rispetto alla seconda con una dose di farmaco inferiore. I livelli di estrogeni sono direttamente proporzionali al numero di follicoli in crescita. Non è stata dimostrata tuttavia una differenza nel tasso di gravidanze ottenute. (49)

I farmaci che bloccano l'ovulazione invece sono necessari perché l'utilizzo delle gonadotropine, con la conseguente crescita di molti follicoli, aumenta il rischio di avere un picco di LH precoce che determina l'ovulazione della paziente. Il blocco dell'ovulazione è necessario perché serve una coordinazione precisa tra il momento dell'ovulazione e il pick up ovocitario. Per questo motivo si utilizzano dei farmaci che determinano una soppressione ipotalamo ipofisaria:

- Agonisti del GnRH: determinano uno stimolo iniziale a cui segue una soppressione della funzione ipofisaria, per cui la loro somministrazione deve iniziare una settimana prima rispetto a quando è necessaria l'azione di blocco;
- Antagonisti del GnRH: la loro somministrazione inizia a stimolazione già iniziata. Sono farmaci che determinano immediatamente il blocco dell'ipofisi.

La scelta tra i due deriva dal tipo di protocollo, in quanto la diversa combinazione e la diversa somministrazione sono fondamentali per la scelta del protocollo stesso.

Si hanno infine i farmaci che inducono l'ovulazione: si tratta di gonadotropine corioniche umane (hcg), prodotte normalmente dalla placenta durante la gravidanza. Hanno una struttura molto simile al LH, vengono somministrate per via intramuscolo o sottocutanea

quando si hanno almeno 2-3 follicoli di dimensioni superiori di 18 millimetri. A 36 ore dall'iniezione avviene l'ovulazione: nel caso della FIVET o dell'ICSI è necessario che il pick up avvenga prima di queste 36 ore (circa a 34). La somministrazione di questa molecola è necessaria affinché gli ovociti completino la loro maturazione.

In alcuni casi, se si ha un elevato rischio di sindrome da iperstimolazione e se l'inibizione dell'ovulazione è stata eseguita con un antagonista del GnRH, si può utilizzare un analogo del GnRH sfruttando la fase iniziale di flare up tipica di questi farmaci. Questo determina un picco endogeno di LH, che induce l'ovulazione. In questi casi si predilige l'agonista del GnRH anche per la più breve emivita e la stimolazione più breve.

Il protocollo viene scelto sulla base della riserva ovarica della paziente, della causa dell'infertilità, considerando lo stato di salute generale. L'obiettivo di ogni protocollo non è solamente quello di recuperare il maggior numero di ovociti possibile, ma anche di evitare il rischio di iperstimolazione. Per la decisione quindi devono essere valutati i livelli basali di FSH, l'età della paziente, il BMI, l'AFC e gli eventuali polimorfismi genetici.

Nel caso dei protocolli con l'agonista del GnRH, possiamo suddividerli in corti, ultracorti, lunghi e ultralunghi.

I protocolli ultracorti prevedono la somministrazione dell'analogo dal secondo o dal terzo giorno del ciclo mestruale insieme alle gonadotropine. Si utilizza soprattutto nelle donne 'poor responders' o nelle donne con scarsa riserva ovarica.

I protocolli corti prevedono una somministrazione dell'agonista entro il terzo giorno del ciclo mestruale e le gonadotropine vengono iniziate due giorni dopo l'inizio dell'agonista. È utilizzato nelle donne con discreta riserva ovarica oppure con PCOS. L'induzione viene sempre eseguita con HCG quando si hanno almeno 2-3 follicoli di dimensione 17-18 millimetri.

I protocolli lunghi prevedono invece la somministrazione dell'agonista del GnRH nella fase luteale del ciclo precedente, dal ventunesimo giorno. Le gonadotropine vengono iniziate quando gli estrogeni sono inferiori a 50 pg/ml (circa dopo 15 giorni dall'inizio del trattamento). Sono i protocolli più utilizzati. È un protocollo con un breve flare up quindi abbastanza aggressivo, si ha un elevato rischio di iperstimolazione quindi è opportuno utilizzarlo solamente nelle poor responders. In questi è stata notata un "live birth rate" maggiore se si associava all'agonista la gonadotropina menopausale purificata, rispetto ai tassi ottenuti con la follitropina ricombinante. Tuttavia la stimolazione risulta essere più efficace se vengono utilizzate le follitropine ricombinanti o le follitropine urinarie di derivazione umana. (50)

Nei protocolli ultralunghi invece si inizia l'agonista nei due cicli precedenti rispetto a quello in cui verrà poi eseguito il pick up. È utilizzato in pazienti con endometriosi o adenomiosi. L'altra tipologia di protocollo che può essere utilizzato è il protocollo con l'antagonista del GnRH. Questi possono essere fissi o flessibili. Prevedono la somministrazione delle gonadotropine dal secondo o terzo giorno del ciclo mestruale. Nei protocolli fissi l'antagonista deve essere iniziato il quinto giorno, mentre in quelli flessibili l'antagonista viene iniziato solo quando si è in presenza di un follicolo che si sta selezionando (dimensioni maggiori di 14 mm) o in presenza di estradiolo >200 pg/ml oppure endometrio più spesso di 6,5 mm. L'induzione dell'ovulazione in questo caso può essere eseguita sia con HCG sia con agonisti del GnRH. Sono protocolli maggiormente utilizzati nelle pazienti con sindrome dell'ovaio policistico (PCOS), per il minor rischio di iperstimolazione.

Gli antagonisti del GnRH sono associati con una minore durata del trattamento, con un minore rischio di iperstimolazione e assenza di eventi avversi da ipoestrogenismo. Non si ha differenza invece nei risultati: la probabilità di avere una nascita al termine del ciclo è simile tra protocolli con agonista e con antagonista. Alcuni autori raccomandano l'utilizzo dell'antagonista per le pazienti per cui si prevede una normale risposta ovarica.

È stato anche notato, tuttavia, che nelle pazienti sottoposte a cicli lunghi o ultralunghi si aveva una maggiore incidenza di deflessione dell'umore nella settimana che precedeva la stimolazione. Questo non può essere però solamente correlato con la riduzione degli estrogeni tipica di questa fase, ma deve essere associato anche allo stress psicologico a cui sono sottoposte le pazienti. Si ha anche un risvolto positivo per questa situazione in quanto uno studio su 151 pazienti ha dimostrato che maggiori livelli di stress al basale erano correlati con tassi di gravidanza, nascite al termine e peso alla nascita, così come lo stress percepito durante la stimolazione era significativamente correlato con il numero di ovociti raccolti e fertilizzati. (51, 52)

La terapia di stimolazione deve essere quindi individualizzata, cercando di massimizzare le probabilità di gravidanza e cercando di eliminare il rischio di iperstimolazione. La personalizzazione della terapia deve essere basata sulla predizione della risposta ovarica della singola donna, utilizzando fattori come AMH e AFC. (53)

Le pazienti poor responders costituiscono una categoria a parte. Sono pazienti che presentano una riserva ovarica di partenza già ridotta e che rispondono poco, in termini di quantità e qualità di ovociti recuperati al pick up, alla stimolazione stessa. In queste pazienti è stato tuttavia notato che non si ha un cambiamento nei tassi di gravidanza clinica o biochimica o di aborti spontanei se si utilizza un protocollo di stimolazione intermedia o un protocollo di stimolazione convenzionale. Ciò che cambia nei due diversi approcci sono la

durata della stimolazione, che è minore nella stimolazione intermedia, e il quantitativo di follitropina utilizzato. (54)

1.8 Pazienti “poor responders”

Le pazienti poor responder sono pazienti che, in seguito ad una stimolazione ovarica massimale, ottengono un numero di ovociti molto inferiore all’atteso.

Sono pazienti che devono essere individuate e valutate prima di procedere alla stimolazione ovarica, in quanto una stimolazione standard spesso comporta un annullamento del ciclo di PMA per una insufficiente risposta ovarica.

Per identificare queste pazienti sono stati definiti dei criteri prognostici, che tuttavia sono in costante evoluzione. L’identificazione è necessaria in quanto permette al clinico di modulare la stimolazione, in modo da ottenere migliori risultati in termini di numero di ovociti raccolti e di pregnancy rate, ma anche per aumentare la compliance della paziente e ridurre i costi.

In queste donne, l’utilizzo di una stimolazione con dosi standard porta infatti ad una scarsa risposta, con livelli estrogenici ridotti, minor numero di ovociti raccolti e una peggiore prognosi riproduttiva.

Il criterio più utilizzato tutt’oggi ma anche più datato è il Criterio di Bologna, mentre il più recente viene definito Classificazione di Poseidon.

Entrambe le classificazioni utilizzano i più comuni test di riserva ovarica per stratificare la prognosi delle pazienti, ai quali vengono associati anche l’età materna e la risposta ottenuta con precedenti stimolazioni.

Il criterio di Bologna definisce una paziente poor responders in presenza di due o più tra i tre seguenti items: età materna superiore ai 40 anni, un test di riserva ovarica alterato per età ($AFC < 5-7$ o $AMH > 0.5-1.1$ ng/ml) e una pregressa scarsa risposta alla stimolazione ovarica, con la raccolta di meno di tre ovociti. Il criterio di Bologna comprende anche nelle poor responders donne che hanno avuto una scarsa risposta ovarica in due stimolazioni precedenti, anche in assenza degli altri due items. È la classificazione utilizzata ad oggi anche dall’ESHRE (Società Europea per la Riproduzione Umana e l’Embriologia). (17)

La presenza di eterogeneità di alcune caratteristiche biologiche e cliniche delle varie pazienti ha portato alla revisione dei criteri classificativi, fino alla classificazione di Poseidon. Questa permette di identificare pazienti che hanno caratteristiche più omogenee. (55)

La classificazione di Poseidon stratifica le pazienti in quattro gruppi:

- Gruppo 1: età inferiore a 35 anni con riserva ovarica adeguata, ma una precedente scarsa risposta ovarica alla stimolazione, con un numero di ovociti recuperati inferiore a 9;
- Gruppo 2: età superiore o uguale a 35 anni, con test di riserva ovarica adeguati e scarsa risposta ovarica ad una precedente stimolazione (meno di 9 ovociti ottenuti);
- Gruppo 3: età inferiore a 35 anni, in presenza di test di riserva ovarica alterati, tra cui AFC < 5 oppure AMH < 1,2 ng/ml;
- Gruppo 4: età superiore o uguale a 35 anni e test che evidenziano una riserva ovarica ridotta (AFC < 5 e AMH < 1,2 ng/ml).

I due esami prevalentemente utilizzati per valutare la riserva ovarica sono AMH e AFC, ai quali può essere associato anche il FSH, misurato in seconda o terza giornata del ciclo mestruale, che tuttavia, insieme all'estradiolo, è solamente un marker indiretto, scarsamente sensibile e specifico.

AMH e AFC sono le due indagini cardine, il primo ha una minore variabilità inter- ed intra-ciclo rispetto al secondo, ma sono due valori correlati tra loro in pazienti con diminuita riserva ovarica. La comparazione diretta tra AFC e AMH serico ha dimostrato una capacità simile nel predire la risposta ovarica alla stimolazione e il numero di ovociti successivamente recuperati. (56)

Oltre a tutto questo, deve essere presa in considerazione anche l'età materna: in presenza di test di riserva ovarica simili e di risposta alla stimolazione simile, è stato dimostrato che le donne di età inferiore presentano un tasso di impianto, di gravidanza e di nascita superiore rispetto alle donne di età più avanzata. Questo è facilmente spiegabile dal fatto che l'età materna condiziona non solo la riserva ovarica residua ma anche la qualità ovocitaria.

In queste pazienti possono essere utilizzati sia i protocolli con agonisti del GnRH che con gli antagonisti del GnRH, con risultati simili in termini di risposta alla stimolazione, tasso di gravidanza e tasso di nascita. Le due stimolazioni differiscono tuttavia in termini di costo e di compliance: con gli agonisti si ottengono una compliance maggiore e una riduzione dei costi.

Nelle donne di età superiore a 35 anni spesso la compliance al trattamento è ridotta non solamente per l'attesa di una scarsa risposta ovarica, ma anche per le grandi difficoltà psicologiche che devono essere attraversate. Queste pazienti, infatti, durante le prime sedute di counselling devono essere informate del fatto che la PMA nel loro caso non avrà lo stesso outcome e le stesse probabilità di successo che si hanno in donne più giovani. Questo fattore, unito al carico psicologico determinato dalle terapie sia sulla coppia che sulla donna stessa, può ridurre la compliance al trattamento. (57)

Il supporto alle coppie deve essere fornito attraverso informazioni chiare e comprensibili, senza alimentare false speranze che potrebbero ridurre la compliance delle coppie in eventuali cicli svolti dopo un insuccesso.

Dall'altro lato, un ulteriore fattore importante è il costo delle terapie: la modulazione del trattamento sulla base dei fattori prognostici e della possibile scarsa risposta ovarica permette anche di ottenere migliori risultati precocemente, riducendo il numero di cicli di stimolazione e di conseguenza il costo. Alcuni studi a riguardo hanno dimostrato che i protocolli di stimolazione individualizzati, basati sui test di riserva ovarica, hanno dimostrato migliori outcome clinici, riducendo sia l'incidenza di complicanze sia la spesa sostenuta. (58)

Nonostante le caratteristiche per definire una paziente "poor responder" comprendano sia l'età materna avanzata, cioè superiore a 35 anni, sia la riserva ovarica ridotta, la prognosi riproduttiva di queste pazienti deve essere differenziata. Si distinguono, infatti, due situazioni agli estremi opposti: da una parte le donne di età inferiore a 35 anni con livelli di AMH ridotti per età e dall'altra donne di età avanzata con valori di AMH normali per età oppure lievemente ridotti. Lo studio di Zhang, Bingqian et al. del 2019 ha dimostrato che, nonostante si ottenga una maggiore risposta ovarica alla stimolazione nelle donne di età >35 anni con AMH normale, si evidenziano un Clinical pregnancy rate e un Live birth rate significativamente maggiori nelle donne di età <35 anni e riserva ovarica ridotta. Questo è determinato dalla qualità ovocitaria, che decresce con l'avanzare dell'età femminile, portando non solo ad una riduzione del tasso di impianto degli embrioni, ma anche ad un aumentato rischio di aborto spontaneo, di malformazioni fetali e di complicanze ostetriche. (5, 59)

1.9 PMA e attesa per il trattamento

Se, da un lato, le tecniche di primo livello non prevedono una lista d'attesa, nel caso delle tecniche di secondo livello è prevista una lista d'attesa per accedere alla PMA.

Le tempistiche di attesa variano in base alla regione italiana in cui si vuole effettuare la stimolazione, ma variano anche in maniera importante tra cliniche private e cliniche pubbliche, con liste d'attesa praticamente azzerate nel privato. In Italia l'attesa media per il primo colloquio è di circa tre mesi con differenze tra nord, centro e sud Italia, ma anche con differenze interregionali, mentre l'attesa per iniziare l'iter di stimolazione è di circa cinque

mesi. L'attesa è maggiore al sud rispetto che al nord Italia; al nord è minore in Valle d'Aosta, con due mesi di attesa per accedere al primo colloquio e nessuna attesa per la stimolazione, mentre è maggiore in Veneto, con 15 mesi di attesa solo per il primo colloquio.

Nelle pazienti "Poor responders" il problema della posticipazione al trattamento è legato sia alla riduzione della riserva ovarica, sia alla necessità di porre attenzione al limite di età per poter iniziare il trattamento.

Valutando il Live Birth Rate in donne che hanno atteso un anno prima di eseguire almeno un ciclo di PMA e in donne che invece hanno eseguito subito la stimolazione, è stato dimostrato che si aveva un Live Birth Rate leggermente maggiore nelle donne immediatamente sottoposte a PMA rispetto a quello ottenuto con un atteggiamento attendista. La possibilità di ottenere una gravidanza e una nascita al termine della stessa è legato all'età materna: attendendo uno o due anni prima di iniziare la stimolazione si va incontro ad una riduzione della possibilità di concepimento. La riduzione del Live Birth Rate non sembra invece correlato alla causa alla base dell'infertilità. (60)

Durante l'attesa per la stimolazione, tuttavia, non è escluso che si possa ottenere una gravidanza spontaneamente: la probabilità di ottenere una gravidanza spontanea differisce in base all'età della donna, con una probabilità inferiore in età più avanzata, e alla diagnosi alla base dell'infertilità. La prognosi a lungo termine per le pazienti è quindi strettamente correlata all'età: la possibilità di concepire spontaneamente dopo i 40 anni decresce del 40% per ogni anno atteso, mentre il calo è solo del 4% nelle donne con meno di 35 anni. (61, 62)

Per pazienti le pazienti "poor responders" una attesa di 12 mesi al trattamento non comporta un aumento della probabilità di ottenere un concepimento spontaneo rispetto alla probabilità di ottenere una gravidanza con un trattamento immediato, soprattutto con diagnosi di infertilità grave determinata da fattore tubarico, grave fattore maschile o infertilità idiopatica, quindi è necessario iniziare la stimolazione il prima possibile per incrementare le possibilità di successo. Al contrario, in caso di riduzione lieve del potenziale fertile di una coppia (subfertilità), si ha un aumento della probabilità di concepimento spontaneo: se la riduzione della fertilità è associata ad un fattore femminile, spesso si ottiene una gravidanza entro i primi tre mesi di attesa, mentre se la causa è determinata da un fattore maschile lieve l'attesa è leggermente maggiore, ma si ha comunque una buona probabilità di ottenere un concepimento spontaneo. (63)

Dal marzo 2020, a causa della pandemia da Sars Cov2, le liste d'attesa per il trattamento sono state prolungate enormemente: nella fase iniziale della pandemia, con l'intento di contenere la diffusione del virus, sono stati sospesi e posticipati tutti i trattamenti non urgenti, compresa l'attività dei centri di PMA, ritenuta non essenziale, bloccando sia i cicli

di primo livello che quelli di secondo livello. Era permessa esclusivamente la conclusione delle terapie delle pazienti che avevano già iniziato la stimolazione ovarica oppure di pazienti che necessitavano di una stimolazione urgente con criopreservazione dei gameti. Quest'ultima indicazione è necessaria per includere nel trattamento urgente le pazienti oncologiche, che devono essere sottoposte a radioterapia pelvica o a chemioterapia gonadotossica. La ripresa delle attività dei centri di PMA è stata permessa non solamente dalla discesa della curva di contagio e dall'utilizzo dei DPI, ma anche dall'avvento della telemedicina che ha permesso una riduzione dei contatti tra pazienti e personale sanitario almeno per quello che concerne i primi colloqui, oltre che una riduzione dell'affollamento delle sale d'attesa. (64)

La telemedicina, in un contesto di sospensione delle attività sanitarie non ritenute urgenti o essenziali, è uno strumento che ha permesso di proseguire con l'attività clinica da remoto: non è stata utilizzata solamente per la PMA, ma è stata impiegata in molteplici discipline mediche. Nel campo della riproduzione è stata enormemente utilizzata per i colloqui informativi con le coppie, permettendo una riduzione dello stress sulla coppia, una riduzione dei costi per gli spostamenti e una maggiore soddisfazione dei pazienti, con un minore rischio di drop out dal trattamento. Caratteristica importante di questo strumento è legata al fatto che, essendo la parte informativa registrata e liberamente accessibile, in caso di incompleta comprensione di alcuni dettagli, si ha la possibilità di riascoltare le informazioni inizialmente fornite, senza dover necessariamente attendere un secondo colloquio. (65)

La necessità di riprendere l'attività nei centri di PMA è ovviamente maggiore per le pazienti con prognosi riproduttiva infausta, sia perché la posticipazione del trattamento potrebbe comportare una ulteriore riduzione della riserva ovarica, oltre che un lento ma progressivo peggioramento della qualità ovocitaria, ma anche perché l'attesa è associata ad una scarsa possibilità di concepimento spontaneo. Grazie alla classificazione di Poseidon è stato possibile identificare gruppi di pazienti da sottoporre al trattamento al momento della ripresa dell'attività: le pazienti da trattare con maggiore urgenza sono le pazienti del gruppo 3 e 4, cioè pazienti con riserva ovarica ridotta, considerando comunque che la qualità ovocitaria sarà probabilmente migliore nel gruppo 3, che comprende donne con meno di 35 anni, rispetto al gruppo 4, con donne con più di 35 anni. (66)

Al momento della ripresa, per stabilire nuovamente un ordine di priorità per l'accesso al trattamento, si valutano l'età femminile, la durata dell'infertilità e la causa di infertilità, in quanto l'infertilità idiopatica si associa ad una maggiore chance di concepire spontaneamente durante il periodo di attesa per il trattamento, mentre altre cause, come il fattore tubarico, non hanno questo vantaggio. È necessario inoltre notare che una ulteriore

posticipazione del trattamento in donne di età avanzata, che non hanno concepito spontaneamente durante il periodo di attesa, determina una ulteriore riduzione della possibilità cumulativa di ottenere una gravidanza. Lo studio di Bhattacharya, Siladitya et al. ha, infatti, dimostrato che la posticipazione del trattamento di 6 o 12 mesi non dovrebbe avere effetti sull'outcome finale, cioè sul Live Birth Rate. Questo studio si basa su tre modelli predittivi precedentemente sviluppati e validati, che stimano la probabilità di ottenere una nascita al termine di un ciclo completo di PMA di secondo livello, la probabilità di ottenere una gravidanza spontanea e il possibile effetto di una posticipazione del trattamento di 6 o 12 mesi sull'effetto finale. Si stima quindi che le differenze del Live Birth Rate non siano determinate da una differenza di outcome dei cicli di PMA, anche se ritardati, ma da una maggiore o minore probabilità di ottenere un concepimento spontaneo durante l'attesa, che varia in base alla causa dell'infertilità. I dati ottenuti devono tuttavia essere confermati da studi prospettici, nonostante i modelli predittivi utilizzati siano validati. (67)

Ulteriori dati sull'effetto della posticipazione dei trattamenti sono raccolti nello studio di Romanski, Phillip A et al. pubblicato nel Maggio del 2020: sono stati confrontati gli outcome di cicli di stimolazione nelle pazienti con ridotta riserva ovarica confrontando i cicli definiti immediati, cioè con una attesa inferiore a 90 giorni, con i cicli posticipati fino a 180 giorni. Nonostante la ridotta riserva ovarica delle pazienti incluse nello studio (AMH <1,1 ng/ml), che potrebbe far pensare alla necessità di un trattamento urgente, non sono state evidenziate differenze nel Pregnancy Rate, nel Live Birth Rate e nella percentuale di aborti spontanei e gravidanze biochimiche nei due gruppi. (68)

Non sono, ad oggi, presenti studi che valutino il reale effetto di una posticipazione al trattamento superiore ai 6 mesi.

2. “Effetti della posticipazione dei trattamenti di Procreazione Medicalmente Assistita di II livello sugli outcomes riproduttivi”

2.1 Obiettivi

A causa della recente pandemia da Sars-Cov2, si è posta maggiore attenzione a quali siano gli effetti di una posticipazione dei trattamenti non ritenuti urgenti, tra cui i trattamenti di Procreazione Medicalmente Assistita di secondo livello. (64)

Grazie a recenti studi, è stato possibile evidenziare che posticipare il trattamento fino a 180 giorni non determina alcuna modifica all'outcome riproduttivo. (68)

Con il protrarsi dell'emergenza, nonostante la graduale ripresa dell'attività dei centri di PMA, l'attesa delle pazienti si è protratta anche oltre i 6 mesi, lasciando quindi spazio a incertezze sugli effetti che ciò potrebbe avere sui risultati stessi.

Nel nostro studio abbiamo voluto indagare l'effetto della posticipazione del trattamento oltre i sei mesi, ma non oltre i 12 mesi. Questo è stato fatto valutando gli outcomes riproduttivi per ciclo iniziato, per transfer eseguito e per gravidanza delle pazienti che sono state sottoposte ad un primo trattamento tra 7 e 12 mesi dopo il primo colloquio e confrontandoli con quelli delle pazienti che hanno eseguito un primo trattamento entro i 6 mesi dal primo colloquio, permettendo quindi un raffronto con pazienti sulle quali l'attesa non ha influito sull'outcome riproduttivo.

Abbiamo posto la nostra attenzione anche su un sottogruppo specifico di donne, cioè le pazienti “poor responders” con indici di riserva ovarica ridotta ($AMH < 1,2$ ng/ml, classificazione di Poseidon). Anche per queste pazienti è stato fatto un confronto tra risultati ottenuti con attesa fino a 6 mesi e con attesa tra 7 e 12 mesi. (55)

Lo studio, unito alla rivalutazione dei dati, potrebbe quindi permettere una migliore comprensione degli effetti della posticipazione del trattamento oltre i 6 mesi.

2.2 Materiali e metodi

Il database è stato analizzato in maniera retrospettiva includendo tutte le pazienti sottoposte ad un primo ciclo di stimolazione ovarica controllata per sottoporsi a FIVET o ICSI presso il nostro centro tra Gennaio 2015 e Marzo 2021. Tutte le pazienti incluse hanno rilasciato,

al momento del trattamento, il consenso informato scritto per all'analisi dei dati a scopo di ricerca. Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico della Regione Liguria (n. 0087/19). Da un totale di 2213 cicli di stimolazione ovarica svolti nel periodo di riferimento, sono stati selezionati tutti i primi cicli di stimolazione di II livello a fresco svolti entro 12 mesi dal primo colloquio, per un totale 501 cicli. Il tempo di attesa dal primo colloquio era la principale variabile presa in esame, il campione selezionato è stato, per questo, diviso in due sottogruppi in base all'attesa tra primo colloquio e trattamento tra 0 e 6 mesi (N=364) e tra 7 e 12 mesi (N=137).

Sono state successivamente selezionate le pazienti con marker di riserva ovarica ridotta (AMH < 1,2 ng/ml) e suddivise in base all'attesa tra primo colloquio e trattamento 0-6 e 7-12 mesi (rispettivamente N= 156 e N=49)

Il protocollo di stimolazione ovarica è stato deciso dagli stessi medici in base alle caratteristiche delle pazienti: sono stati utilizzati sia protocolli lunghi con agonisti del GnRh sia protocolli corti con antagonisti del GnRH.

Nel protocollo lungo, la soppressione ipofisaria è stata ottenuta con somministrazione giornaliera di Triptorelina 0,1 mg/ml (Decapeptyl, IPSES, Francia) iniziando nella fase medio-luteale del ciclo precedente alla stimolazione. Nel protocollo corto, la decisione di iniziare l'antagonista del GnRh (Ganirelix 0,25 mg; Orgalutran, MSD, Germania) è stata basata sulla misurazione di Estradiolo serico (E2) e sulla dimensione del follicolo dominante all'ultrasonografia transvaginale (USG-TV).

Le ovaie sono state stimolate con FSH ricombinante (rFSH, Gonal-F, Merk, Germania, o Puregon, MSD, Germania) o con Gonadotropine Menopausali umane (hMG, Meropur, Ferring, Italia). La dose giornaliera di gonadotropine e le eventuali correzioni sono state decise in accordo alle caratteristiche individuali e alla risposta individuale alla stimolazione. L'ovulazione è stata indotta con Gonadotropina Corionica ricombinante 250 mcg (rCG; Ovitrelle, Merk) con almeno un follicolo di diametro pari a 18 millimetri e livelli appropriati di E2.

Il pickup ovocitario eco-guidato è stato svolto 35-36 ore dopo. Gli ovociti sono stati inseminati con ICSI o FIVET. Dopo 2 o 3 giorni di coltura in vitro, è stato eseguito il trasferimento in utero di uno o due embrioni sotto guida ecografica, utilizzando un catetere morbido (Sydney IVF Embryo Transfer Catheter, Cook Medical, Bloomington, IN).

La fase luteale è stata supportata con gel di progesterone intravaginale 8% (Crinone, Merk). Quattordici giorni dopo il pickup ovocitario, la paziente è stata sottoposta alla misurazione di hCG serico per accertare la gravidanza, successivamente confermata ecograficamente

dopo 2 settimane. La supplementazione di Progesterone è stata continuata fino a 8 settimane di gravidanza. Tutte le gravidanze ottenute sono state seguite fino al parto.

Gli ovociti sono stati osservati per 16-18 ore dopo l'inseminazione e gli ovociti fertilizzati sono stati posti in coltura singola dal giorno 1 al giorno 2-3 in Sydney IVF Cleavage medium (Cook Medical), in atmosfera umidificata con CO₂ 6%, O₂ 5% utilizzando in incubatore standard (Galaxy 48 R incubator; New Brunswick Scientific, Edison, NJ). Al giorno 2-3, gli embrioni sono stati classificati morfologicamente utilizzando il corrente Consensus System (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011), combinando il numero e la dimensione dei blastomeri, il grado di frammentazione e il tasso di clivaggio.

L'AMH serico è stato misurato dal laboratorio del nostro Ospedale tramite il by Roche Elecsys AMH system, range: 0.01–23 ng/ml, repeatability 1.0–1.6% CV 0.055–19.0 ng/mL (Elecsys, Roche Diagnostic, IN).

La gravidanza clinica è stata definita come la presenza di almeno un embrione intrauterino con attività cardiaca identificabile a 6 settimane di gestazione.

Pregnancy Rate (PR), Live Birth Rate (LBR), Abortion Rate (AR) e tasso di cicli interrotti prima dell'embryo transfer sono stati calcolati per ciclo iniziato. Sono stati calcolati inoltre Pregnancy Rate e Live Birth Rate per Transfer eseguito e Abortion Rate e Live Birth Rate per gravidanza iniziata.

Analisi dei dati: la popolazione è stata inizialmente descritta attraverso le prevalenti caratteristiche delle pazienti. Le variabili continue sono espresse come media e variazione standard, le variabili categoriche come numero assoluto e percentuali. Le variabili continue sono state correlate utilizzando il test di Mann-Whitney, mentre il χ^2 test è stato utilizzato per le variabili categoriche.

Gli Odds ratio (95% CI) tra i gruppi con posticipazione del trattamento tra 0 e 6 mesi e tra 7 e 12 mesi sono stati calcolati tramite regressione logistica. Le variabili valutate comprendono: tempo intercorso tra la prima visita e il primo trattamento, espresso in mesi (variabile continua), età femminile (anni, variabile continua), AMH (ng/ml, variabile continua), cicli interrotti prima del pickup o senza ovociti al pickup (variabile categorica), numero di ovociti recuperati e di ovociti maturi (variabile continua), tecnica di inseminazione (variabile categorica), embryo transfer annullati (variabile categorica), giorno del ET (variabile categorica) e numero di embrioni trasferiti (variabile categorica). Le variabili incluse nell'analisi multivariata sono state l'età al primo accesso, AMH al primo accesso, tecnica utilizzata (FIVET o ICSI) e giorno dell'embryo transfer, ad eccezione dell'outcome "ciclo interrotto prima dell'embryo transfer", corretto solo per età e AMH.

L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando R free software, versione 3.6.2 (<https://www.R-project.org/>). Un p-value <0,05 è stato considerato statisticamente significativo.

2.3 Risultati

Il campione selezionato e suddiviso nei due gruppi in esame (trattamento entro 6 mesi vs trattamento oltre 6 mesi) è risultato omogeneo per le principali caratteristiche demografiche e cliniche prese in considerazione (età, AMH, ma anche caratteristiche del ciclo di stimolazione ovarica controllata, vedi Tabella 1).

È stata dimostrata una differenza statisticamente significativa tra i due gruppi nel tempo intercorso tra prima visita e primo trattamento, con una attesa media in mesi di 3.2 ± 2.0 vs 8.6 ± 1.5 ($p < 0.001$).

Nei due gruppi non è stata rilevata una differenza statisticamente significativa né nella percentuale di cicli interrotti prima del pickup o che non recuperavano ovociti al pickup, né nel numero di ovociti recuperati e di ovociti maturi (MII), oltre che nell'utilizzo delle tecniche di fertilizzazione, per le quali in entrambi i gruppi si evidenziano circa 70% di ICSI e 30% di FIVET.

Il 18.7% degli embryo transfer (ET) è stato annullato nel primo gruppo in esame (meno di sei mesi), con un 23% nel secondo gruppo: sebbene possa sembrare una differenza rilevante, non è risultata statisticamente significativa. L'embryo transfer è stato eseguito prevalentemente in giornata 2-3 con embrioni in stato di clivaggio, mentre il trasferimento in giornata 5-6 è stato meno utilizzato.

Tabella 1 - Caratteristiche demografiche e cliniche della popolazione in esame

	Trattamento entro 6 mesi N= 364	Trattamento oltre 6 mesi N= 137	p- value
Tempo intercorso tra prima visita e primo trattamento, mesi	3.2 ± 2.0	8.6 ± 1.5	<0.001
Età partner femminile, anni	36.0 ± 4.5	36.1 ± 4.7	NS
AMH, ng/ml	2.2 ± 2.3	2.6 ± 2.8	NS
Cicli interrotti prima del pick up oppure no ovociti al pick up, n. (%)	34 (9.3)	11 (8)	NS
Ovociti recuperati, n.	9.3 ± 7.3	9.4 ± 6.6	NS
Ovociti maturi MII, n.	7.3 ± 5.1	7.6 ± 5.0	NS
ICSI, n. (%)	229 (69.4)	89 (70.6)	NS
FIVET, n. (%)	101 (30.6)	37 (29.4)	NS
ET annullati, n. (%)	68 (18.7)	29 (23.0)	NS
ET day 2-3, n. (%)	213 (81.3)	82 (84.5)	NS
ET day 5-6, n. (%)	49 (18.7)	15 (15.5)	NS
Numero embrioni trasferiti, n.	1.6 ± 0.5	1.7 ± 0.6	NS

I dati continui sono espressi come media + deviazione standard e comparati tramite test di Mann-Whitney; i dati categorici come numero assoluto e percentuale e comparati tramite χ^2 test.

Valutando gli outcomes riproduttivi su tutto il campione sono stati analizzati i dati per ciclo iniziato, per embryo transfer eseguito e per gravidanza iniziata.

Per ciclo iniziato non si evidenziano differenze statisticamente rilevanti né in termini di Ciclo interrotto prima dell'embryo transfer (OR 1,16, CI 95% 0.74-1.80), né in termini di Pregnancy Rate (PR) (OR 1.32, CI 95% 0.8-2.17), Abortion Rate (AR) (OR 1.78, CI 95% 0.76-3.97) e Live Birth Rate (LBR) (OR 0.81, CI 95% 0.42-1.48).

Sono sovrapponibili statisticamente anche i risultati dei due gruppi in studio per quanto riguarda Pregnancy Rate e Live Birth Rate per embryo transfer eseguito e di Abortion Rate e Live Birth Rate per gravidanza iniziata (vedi Tabella 2).

Tabella 2 - Outcomes riproduttivi su tutto il campione al primo accesso

Outcome	Trattamento entro 6 mesi N= 364	Trattamento oltre 6 mesi N= 137
Per ciclo iniziato:		
Ciclo interrotto prima dell'embryo transfer	102 (28) 1.00 (ref)	40 (29) 1.16 (0.74-1.80)
Pregnancy rate	86 (24) 1.00 (ref)	40 (29) 1.32 (0.80-2.17)
Abortion rate	17 (5) 1.00 (ref)	11 (8) 1.78 (0.76-3.97)
Live birth rate	69 (19) 1.00 (ref)	29 (21) 0.81 (0.42-1.48)
Per embryo transfer eseguito:		
Pregnancy rate	86 (33) 1.00 (ref)	40 (41) 1.35 (0.82-2.23)
Live birth rate	69 (26) 1.00 (ref)	29 (30) 1.11 (0.64-1.91)
Per gravidanza iniziata:		
Abortion rate	17 (20) 1.00 (ref)	11 (27) 1.32 (0.51-3.38)
Live birth rate	69 (80) 1.00 (ref)	29 (73) 0.75 (0.29-1.97)

I dati sono espressi come numero assoluto (%) e OR (95% C.I.)

Gli OR (95% C.I.) sono calcolati tramite regressione logistica, adjusted per età al primo accesso, AMH al primo accesso, tecnica usata (FIVET vs. ICSI) e giorno dell'embryo transfer, con l'eccezione dell'outcome "ciclo interrotto prima dell'embryo transfer", adjusted solo per età e AMH.

Selezionando un sottogruppo di pazienti caratterizzate da AMH < 1,2 ng/ml non si evidenziano differenze negli outcomes riproduttivi presi in considerazione precedentemente, con risultati sovrapponibili in termini di Cicli interrotti prima del transfer, Pregnancy Rate, Live Birth Rate, Abortion Rate. Si può notare come la percentuale di cicli interrotti prima del pick up oppure senza ovociti raccolti al pick up sia maggiore nel sottogruppo di pazienti con ridotta riserva ovarica (28-29% nel totale delle pazienti e 39.7-46.9% nel gruppo delle pazienti con ridotta riserva ovarica vedi Tabella 3).

Si evidenziava una differenza tra le percentuali di LBR dei due gruppi: al calcolo dell'OR e dell'indice di confidenza questa differenza non risultava statisticamente significativa (OR 1.11, CI 95% 0.64-1.91).

Tabella 3 - Outcomes riproduttivi in pazienti con ridotta riserva ovarica al primo accesso

Outcome	Trattamento entro 6 mesi N= 156	Trattamento oltre 6 mesi N= 49
Per ciclo iniziato:		
Ciclo interrotto prima dell'embryo transfer	62 (39.7) 1.00 (ref)	23 (46.9) 1.29 (0.64-2.59)
Pregnancy rate	22 (14.1) 1.00 (ref)	8 (16.3) 1.54 (0.58-3.85)
Live birth rate	16 (10.3) 1.00 (ref)	6 (12.2) 1.67 (0.54-4.72)
Per embryo transfer:		
Pregnancy rate	22 (23.4) 1.00 (ref)	8 (30.7) 1.35 (0.82-2.22)
Live birth rate	16 (17) 1.00 (ref)	6 (23.1) 1.11 (0.64-1.91)
Per gravidanza iniziata:		
Abortion rate	6 (27.3) 1.00 (ref)	2 (25.0) 0.88 * (0.10-5.26)
Live birth rate	16 (72.7) 1.00 (ref)	6 (75.0) 1.12 * (0.19-9.14)

I dati sono espressi come numero assoluto (%) e OR (95% C.I.)

Gli OR (95% C.I.) sono calcolati tramite regressione logistica, adjusted per età al primo accesso, AMH al primo accesso, tecnica usata (FIVET vs. ICSI) e giorno dell'embryo transfer, con l'eccezione dell'outcome "ciclo interrotto prima dell'embryo transfer", adjusted solo per età e AMH.

* dati non pesati (unadjusted)

2.4 Discussione

Dalle caratteristiche demografiche e cliniche del campione preso in esame si può evidenziare come non ci siano differenze statisticamente significative nella popolazione esaminata, tuttavia le caratteristiche proprie dei cicli di stimolazione ovarica a cui sono state sottoposte le pazienti offrono la possibilità di effettuare alcune considerazioni.

Le cause che hanno portato allo stop dei cicli di stimolazione sono ascrivibili nella maggior parte dei casi ad una inadeguata risposta ovarica alla stimolazione controllata, che ha portato ad una risposta monofollicolare oppure ad una assente risposta alla stimolazione ovarica. L'assenza di risposta alla stimolazione ovarica può essere determinata da un errore nella scelta della terapia o del dosaggio della terapia, ma è frequentemente correlata ad una ridotta riserva ovarica. La riserva ovarica è rappresentata in questo caso dai valori di AMH cioè da un indicatore indiretto del numero di ovociti ancora presenti a livello ovarico. In questo caso i valori medi dei due gruppi in studio sono sovrapponibili.

La tecnica di fecondazione vede contrapposti il 70% di cicli effettuati con la ICSI e 30% effettuati con la FIVET, in linea con quanto effettuato a livello nazionale e registrato nel Registro Italiano per la PMA: la scelta tra le due tecniche è legata alla gravità del fattore maschile diagnosticato. Si predilige la ICSI in caso di fattore maschile grave o gravissimo, in quanto è stato dimostrato che l'utilizzo di ICSI in assenza di fattore maschile non migliora la prognosi riproduttiva, ma è correlato con una peggiore qualità della blastocisti. (40, 44)

Le cause di annullamento dell'embryo transfer invece sono leggermente più eterogenee: la maggior parte degli annullamenti sono dovuti alla mancata fecondazione ovocitaria, più frequente nelle donne in età più avanzata per una peggiore qualità dell'ovocita, mentre in un minor numero di casi sono determinati dall'elevato rischio di iperstimolazione, nelle donne con buona riserva ovarica, da un endometrio non idoneo al transfer oppure alla necessità di effettuare trattamenti chirurgici per rimuovere miomi o altre anomalie che alterano la morfologia della cavità uterina.

La maggior parte degli embryo transfer sono stati eseguiti con l'embrione in clivaggio (giornata 2-3): il maggiore numero di transfer in seconda o terza giornata potrebbe spiegare una minore Pregnancy Rate e una minore Live Birth Rate rispetto alle Pregnancy Rate e Live Birth Rate evidenziate con transfer in quinta o sesta giornata, se calcolate sul totale degli embryo transfer eseguiti, legate prevalentemente alle minori chances di impianto degli embrioni in clivaggio rispetto alla blastocisti. Calcolando, infatti, i due rate rispetto al numero di cicli iniziati, non si evidenzia una differenza significativa: con un maggiore

periodo di incubazione e di osservazione, infatti, alcuni embrioni arrestano la loro crescita tra il giorno 3 e il giorno 5, arrivando quindi all'embryo transfer in meno casi.

Il numero di embrioni trasferiti in entrambe le popolazioni segue la corrente pratica clinica del Single Embryo Transfer: si ha una tendenza sempre maggiore ad eseguire il trasferimento in utero di un solo embrione e comunque di non più di due embrioni, così da ridurre il rischio di gravidanza gemellare e delle complicanze correlate.

Bisogna inoltre ricordare che nessuno degli embrioni trasferiti in utero in questo studio è stato sottoposto a PGD o PGS, quindi non siamo a conoscenza di eventuali alterazioni cromosomiche prima del transfer stesso. Questo potrebbe influire sia sull'abortion rate, per eventuali aborti dovuti alle anomalie cromosomiche, sia sul pregnancy rate, perché potenzialmente in grado di inficiare l'impianto in cavità uterina.

Sebbene non siano evidenti delle differenze nell'outcome riproduttivo delle donne che hanno effettuato il trattamento entro 0-6 mesi e le donne che lo hanno effettuato tra 7 e 12 mesi, bisogna ricordare che i vari fattori che potrebbero influire su questi dati si comportano in maniera diversa.

Età avanzata e riserva ovarica ridotta hanno effetti diversi sulla riproduzione, ma, nonostante l'attesa, nelle pazienti non si ha una differenza significativa dell'outcome.

L'effetto della ridotta riserva ovarica sulla PMA è correlato con una minore risposta alla stimolazione ovarica controllata e con un minor numero di ovociti raccolti al pick up, ma anche con un maggior numero di cicli interrotti prima del pick up o che non hanno portato al recupero di ovociti maturi.

Spesso i cicli interrotti non vengono utilizzati per il calcolo del Live Birth Rate, ma questo viene calcolato utilizzando i nati vivi al termine di una gravidanza ottenuta con PMA rapportati al numero di embryo transfer eseguiti. Tuttavia, il calcolo del Live Birth Rate su ciclo iniziato è molto importante sia per creare le giuste aspettative nelle pazienti, sia per valutare i cicli interrotti, in modo da comprendere le ragioni per cui la paziente non ha risposto alla terapia, anche in caso di riserva ovarica normale per età e per storia clinica, e modulare e calibrare nella maniera migliore la terapia per un eventuale secondo ciclo.

È in questo punto che subentra in maniera preponderante l'esperienza del clinico: se si ha di fronte una paziente con indici di riserva ovarica ridotti e che ha risposto alla stimolazione sviluppando un solo follicolo il comportamento sarà differente rispetto a quello che si terrebbe con una paziente con buona riserva ovarica e un solo follicolo sviluppato. Nel primo caso probabilmente il ciclo verrebbe continuato, nonostante le scarse possibilità di successo, mentre nel secondo caso si potrebbe convertire il ciclo a PMA di primo livello (IUI) oppure si andrebbe incontro alla sospensione della stimolazione. (53, 58)

Effetto diverso sull'outcome riproduttivo è quello che ha l'età femminile, è cioè un effetto qualitativo e non quantitativo: una donna di età avanzata potrebbe avere una buona riserva ovarica, con un numero più che sufficiente di ovociti recuperati al pick up, tuttavia, il blocco in profase I porta ad un peggioramento qualitativo tempo dipendente. Gli ovociti recuperati in queste donne spesso saranno immaturi, cioè non in meiosi II, spesso non si fertilizzeranno oppure l'embrione non si svilupperà dopo la fertilizzazione, oppure ancora avranno un minore tasso d'impianto o un maggiore tasso di abortività. La stessa considerazione può essere fatta in caso di pazienti con ridotta riserva ovarica, per cui anche con un numero molto ridotto di ovociti recuperati al pick up, una donna di età inferiore ai 35 anni avrebbe maggiori possibilità di ottenere una gravidanza e una nascita al termine della stessa rispetto ad una donna di età superiore a 35 anni. (5)

Inoltre si può vedere come non si abbia una modifica dell'abortion rate tra campione totale e pazienti con ridotta riserva ovarica: le pazienti con ridotta riserva ovarica, infatti, hanno una alterazione quantitativa del numero di ovociti, mentre sono le alterazioni qualitative, come quelle che sopraggiungono con l'avanzare dell'età femminile, che determinano un aumento dell'abortion rate. Un'attesa superiore ai sei mesi non sembra quindi essere correlata nemmeno ad un peggioramento della qualità dell'ovocita tale da determinare una differenza statisticamente significativa dell'abortion rate.

Nel caso delle pazienti con indici di riserva ovarica ridotti, il fatto di non riscontrare differenze né nel Pregnancy Rate, né nel Live Birth Rate tra il gruppo che ha atteso meno di sei mesi e il gruppo che ha atteso più di sei mesi ci rassicura: queste sono pazienti con una scarsa prognosi riproduttiva, che venivano e vengono sottoposte a trattamenti di PMA nel più breve tempo possibile, per evitare appunto una ulteriore riduzione della riserva ovarica. Nelle pazienti con AMH < 1,2 ng/ml, rispetto al campione completo, riscontriamo una maggiore percentuale di cicli interrotti prima dell'embryo transfer: è un dato coerente con l'atteso, ma non subisce effetti negativi dalla posticipazione del trattamento. Si evidenzia cioè una differenza di percentuale relativa con il campione preso in esame inizialmente, ma non si hanno differenze significative dell'outcome tra le pazienti con ridotta riserva ovarica che hanno eseguito il trattamento entro sei mesi e le pazienti che lo hanno eseguito oltre i 6 mesi di attesa.

I dati raccolti confermano quindi che una posticipazione del trattamento non abbia effetti sull'outcome della PMA e che nemmeno le pazienti con ridotti indici di riserva ovarica risentano di questa ulteriore attesa. Il campione in studio, per quanto esiguo, è omogeneo per le caratteristiche valutate e questo ci ha permesso di confrontare i due gruppi di pazienti.

Nel gruppo preso in esame è stato incluso esclusivamente il primo ciclo di stimolazione svolto dalle pazienti, non abbiamo quindi dati relativi all'effetto che l'attesa potrebbe avere su un ciclo segmentato.

Il fatto che la posticipazione del trattamento sembrerebbe non avere effetti sull'outcome della PMA di secondo livello ci permette non solo di rassicurare le pazienti sul fatto che l'assenza di trattamenti e il successivo ritardo del trattamento alla ripresa delle attività, dovuti alla pandemia da Sars-Cov2, non abbiano inciso negativamente sul percorso della coppia, ma anche, in un'ottica più generale, di poter ritardare per periodi ragionevoli di tempo il trattamento senza danneggiare l'outcome. Questo ci permetterebbe quindi, in caso di alterazioni anatomiche della cavità uterina, come miomi o setti intrauterini, oppure in caso di altre patologie concomitanti, di trattarle senza compromettere il risultato finale.

Nel caso delle pazienti con ridotta riserva ovarica questi dati ci aiutano a comprendere come, nonostante sia consigliato un trattamento nel breve termine per evitare un ulteriore declino della riserva ovarica, sia possibile ritardare il trattamento di qualche mese per eventuali condizioni patologiche concomitanti. In queste pazienti un fattore importante è anche il fattore psicologico, per cui spesso, allungando l'attesa, si crea un discomfort psicologico alla paziente stessa, che sarà la prima a richiedere di anticipare le terapie.

Sarà necessario, in futuro, valutare quali possono essere gli effetti della posticipazione del trattamento non solo sui primi cicli a fresco, ma anche sugli eventuali transfer di embrioni congelati, ma anche quale effetto potrebbe avere una attesa superiore ai 12 mesi sull'outcome riproduttivo delle pazienti.

L'inclusione nella statistica dei risultati ottenuti con materiale congelato ottenuto nel primo ciclo di stimolazione permetterebbe quindi di valutare il Cumulative Live Birth Rate delle pazienti trattate e l'eventuale effetto che una attesa superiore ai sei mesi potrebbe avere su di esso.

2.5 Conclusioni

La posticipazione del trattamento di 7-12 mesi dal primo colloquio non sembra quindi influire sui risultati del primo ciclo di PMA di secondo livello a fresco: non si osservano infatti differenze negli outcomes analizzati (cicli sospesi, PR, LBR e AR per ciclo iniziato, PR e LBR per embryo transfer eseguito e LBR e AR per gravidanza iniziata) tra le due coorti né nel campione completo né nel sottogruppo di pazienti con ridotta riserva ovarica. I dati ci rassicurano quindi escludendo la presenza di effetti peggiorativi sugli esiti della PMA di secondo livello in caso di attesa prolungata rispetto ai 180 giorni riportati in altri studi.

In futuro, ampliando la casistica in esame, si potrebbero valutare gli effetti di una attesa per il trattamento superiore ai 12 mesi, valutando anche l'effetto che questa potrebbe avere sia sui cicli a fresco che sui cicli effettuati con materiale congelato.

Bibliografia

1. Gnoth C, Godehardt E, Frank-Herrmann P, Friol K, Tigges J, Freundl G. Definition and prevalence of subfertility and infertility. *Hum Reprod Oxf Engl* 2005;20:1144–1147.
2. A. Borini; F. M. Ubaldi. *Medicina della Riproduzione umana*. 2010.
3. Tamrakar SR, Bastakoti R. Determinants of Infertility in Couples. *J Nepal Health Res Counc* 2019;17:85–89.
4. Chu KY, Patel P, Ramasamy R. Consideration of gender differences in infertility evaluation. *Curr Opin Urol* 2019;29:267–271.
5. Liu K, Case A, REPRODUCTIVE ENDOCRINOLOGY AND INFERTILITY COMMITTEE. Advanced reproductive age and fertility. *J Obstet Gynaecol Can JOGC* *J Obstet Gynecol Can JOGC* 2011;33:1165–1175.
6. Virtanen HE, Jørgensen N, Toppari J. Semen quality in the 21st century. *Nat Rev Urol* 2017;14:120–130.
7. Ilacqua A, Izzo G, Emerenziani GP, Baldari C, Aversa A. Lifestyle and fertility: the influence of stress and quality of life on male fertility. *Reprod Biol Endocrinol RBE* 2018;16:115.
8. Hart RJ. Physiological Aspects of Female Fertility: Role of the Environment, Modern Lifestyle, and Genetics. *Physiol Rev* 2016;96:873–909.
9. Tal R, Seifer DB. Ovarian reserve testing: a user's guide. *Am J Obstet Gynecol* 2017;217:129–140.
10. Visser JA, Themmen APN. Anti-Müllerian hormone and folliculogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 2005;234:81–86.

11. Fleming R, Seifer DB, Frattarelli JL, Ruman J. Assessing ovarian response: antral follicle count versus anti-Müllerian hormone. *Reprod Biomed Online* 2015;31:486–496.
12. Deb S, Campbell BK, Clewes JS, Pincott-Allen C, Raine-Fenning NJ. Intracycle variation in number of antral follicles stratified by size and in endocrine markers of ovarian reserve in women with normal ovulatory menstrual cycles. *Ultrasound Obstet Gynecol Off J Int Soc Ultrasound Obstet Gynecol* 2013;41:216–222.
13. Shrikhande L, Shrikhande B, Shrikhande A. AMH and Its Clinical Implications. *J Obstet Gynaecol India* 2020;70:337–341.
14. Bertone-Johnson ER, Manson JE, Purdue-Smithe AC, Steiner AZ, Eliassen AH, Hankinson SE, Rosner BA, Whitcomb BW. Anti-Müllerian hormone levels and incidence of early natural menopause in a prospective study. *Hum Reprod* 2018;33:1175–1182.
15. Depmann M, Eijkemans MJC, Broer SL, Tehrani FR, Solaymani-Dodaran M, Azizi F, Lambalk CB, Randolph JF, Harlow SD, Freeman EW, Sammel MD, Verschuren WMM, van der Schouw YT, Mol BW, Broekmans FJM. Does AMH Relate to Timing of Menopause? Results of an Individual Patient Data Meta-Analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 2018;103:3593–3600.
16. Technical and performance characteristics of anti-Müllerian hormone and antral follicle count as biomarkers of ovarian response | Human Reproduction Update | Oxford Academic. at <<https://academic.oup.com/humupd/article/21/6/698/627870>>.
17. Ferraretti AP, La Marca A, Fauser BCJM, 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 Oxf Engl* 2011;26:1616–1624.
18. Argyle CE, Harper JC, Davies MC. Oocyte cryopreservation: where are we now? *Hum Reprod Update* 2016;22:440–449.

19. Gunnala V, Schattman G. Oocyte vitrification for elective fertility preservation: the past, present, and future. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2017;29:59–63.
20. Quaderni del Ministero della Salute. Criteri di appropriatezza strutturale, tecnologica e clinica nella prevenzione, diagnosi e cura delle patologie andrologiche. 2012;
21. Krausz C, Escamilla AR, Chianese C. Genetics of male infertility: from research to clinic. *Reprod Camb Engl* 2015;150:R159-174.
22. La Vignera S, Condorelli RA, Vicari E, Salmeri M, Morgia G, Favilla V, Cimino S, Calogero AE. Microbiological investigation in male infertility: a practical overview. *J Med Microbiol* 2014;63:1–14.
23. Ficarra V, Cerruto MA, Liguori G, Mazzoni G, Minucci S, Tracia A, Gentile V. Treatment of varicocele in subfertile men: The Cochrane Review--a contrary opinion. *Eur Urol* 2006;49:258–263.
24. Ginecologia e ostetricia - Pescetto Giuseppe, De Cecco Luigi, SEU, 9788865151358 |.
25. Moghetti P, Carmina E, De Leo V, Lanzone A, Orio F, Pasquali R, Toscano V. How to manage the reproductive issues of PCOS: a 2015 integrated endocrinological and gynecological consensus statement of the Italian Society of Endocrinology. *J Endocrinol Invest* 2015;38:1025–1037.
26. Sanchez AM, Vanni VS, Bartiromo L, Papaleo E, Zilberberg E, Candiani M, Orvieto R, Viganò P. Is the oocyte quality affected by endometriosis? A review of the literature. *J Ovarian Res* 2017;10:43.
27. Cramer DW, Sluss PM, Powers RD, McShane P, Ginsburgs ES, Hornstein MD, Vitonis AF, Barbieri RL. Serum prolactin and TSH in an in vitro fertilization population: is there a link between fertilization and thyroid function? *J Assist Reprod Genet* 2003;20:210–215.

28. Jin L, Wang M, Yue J, Zhu G-J, Zhang B. Association between TSH Level and Pregnancy Outcomes in Euthyroid Women Undergoing IVF/ICSI: A Retrospective Study and Meta-analysis. *Curr Med Sci* 2019;39:631–637.
29. Foucaut A-M, Faure C, Julia C, Czernichow S, Levy R, Dupont C, for the ALIFERT collaborative group. Sedentary behavior, physical inactivity and body composition in relation to idiopathic infertility among men and women. In: Drevet JR, editor. *PLOS ONE* 2019;14:e0210770.
30. Collins JA, Burrows EA, Wilan AR. The prognosis for live birth among untreated infertile couples. *Fertil Steril* 1995;64:22–28.
31. 33. FC (coordinatore) et al. *Il percorso clinico-diagnostico della coppia infertile*. Coop. Libreria Editrice Università di Padova; 2011.
32. Kamel RM. Management of the infertile couple: an evidence-based protocol. *Reprod Biol Endocrinol RBE* 2010;8:21.
33. Malik B, Patil S, Boricha BG, Kurkal N, Choudhry M. A comparative study of the efficacy of sonosalpingography and hysterosalpingogram to test the tubal patency in all women with primary and secondary infertility. *Ultrasound Q* 2014;30:139–143.
34. De Felice C, De Feuce C, Porfiri LM, Savelli S, Alfano G, Pace S, Manganaro L, Vestri AR, Vesteri AR, Drudi FM. Infertility in women: combined sonohysterography and hysterosalpingography in the evaluation of the uterine cavity. *Ultraschall Med Stuttg Ger 1980* 2009;30:52–57.
35. Clinical application of operative hysteroscopy in treatment of complex hydrosalpinx prior to IVF. at <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4515239/>>.
36. Klein DA, Paradise SL, Reeder RM. Amenorrhea: A Systematic Approach to Diagnosis and Management. *Am Fam Physician* 2019;100:39–48.
37. Unuane D, Velkeniers B. Impact of thyroid disease on fertility and assisted conception. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2020;34:101378.

38. L 40/2004. at <<https://www.camera.it/parlam/leggi/040401.htm>>.
39. Chi siamo - ISS. at <<https://www.iss.it/rpma>>.
40. C_17_pubblicazioni_3023_allegato.pdf. at
<http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_3023_allegato.pdf>.
41. Boomsma CM, Cohlen BJ, Farquhar C. Semen preparation techniques for intrauterine insemination. *Cochrane Database Syst Rev* 2019;doi:10.1002/14651858.CD004507.pub4.
42. Recommendations | Fertility problems: assessment and treatment | Guidance | NICE. at <<https://www.nice.org.uk/guidance/cg156/chapter/Recommendations>>.
43. Dh B, A K, H K, A W, N G. Does hormonal contraception prior to in vitro fertilization (IVF) negatively affect oocyte yields? A pilot study. *Reprod Biol Endocrinol RBE* 2013;11:.
44. Stimpfel M, Jancar N, Vrtacnik-Bokal E, Virant-Klun I. Conventional IVF improves blastocyst rate and quality compared to ICSI when used in patients with mild or moderate teratozoospermia. *Syst Biol Reprod Med* 2019;65:458–464.
45. Paulson RJ. Introduction: Frozen 2: an update on cryopreserved embryo transfer in the era of vitrification. *Fertil Steril* 2020;113:239–240.
46. Liu KE, Hartman M, Hartman A, Luo Z-C, Mahutte N. The impact of a thin endometrial lining on fresh and frozen-thaw IVF outcomes: an analysis of over 40 000 embryo transfers. *Hum Reprod Oxf Engl* 2018;33:1883–1888.
47. Gonen Y, Casper RF. Prediction of implantation by the sonographic appearance of the endometrium during controlled ovarian stimulation for in vitro fertilization (IVF). *J Vitro Fertil Embryo Transf IVF* 1990;7:146–152.
48. Hoy SM. XM17 Follitropin Alfa (Ovaleap®): A Review in Reproductive Endocrine Disorders. *BioDrugs Clin Immunother Biopharm Gene Ther* 2016;30:379–386.

49. Orvieto R, Nahum R, Rabinson J, Ashkenazi J, Anteby EY, Meltzer S. Follitropin-alpha (Gonal-F) versus follitropin-beta (Puregon) in controlled ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization: is there any difference? *Fertil Steril* 2009;91:1522–1525.
50. Pacchiarotti A, Selman H, Valeri C, Napoletano S, Sbracia M, Antonini G, Biagiotti G, Pacchiarotti A. Ovarian Stimulation Protocol in IVF: An Up-to-Date Review of the Literature. *Curr Pharm Biotechnol* 2016;17:303–315.
51. Devroey P, Aboulghar M, Garcia-Velasco J, Griesinger G, Humaidan P, Kolibianakis E, Ledger W, Tomás C, Fauser BCJM. Improving the patient's experience of IVF/ICSI: a proposal for an ovarian stimulation protocol with GnRH antagonist co-treatment. *Hum Reprod Oxf Engl* 2009;24:764–774.
52. The concerns during assisted reproductive technologies (CART) scale and pregnancy outcomes - Fertility and Sterility. at <[https://www.fertstert.org/article/S0015-0282\(03\)03095-4/fulltext](https://www.fertstert.org/article/S0015-0282(03)03095-4/fulltext)>.
53. La Marca A, Sunkara SK. Individualization of controlled ovarian stimulation in IVF using ovarian reserve markers: from theory to practice. *Hum Reprod Update* 2014;20:124–140.
54. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Electronic address: ASRM@asrm.org. Comparison of pregnancy rates for poor responders using IVF with mild ovarian stimulation versus conventional IVF: a guideline. *Fertil Steril* 2018;109:993–999.
55. Humaidan P, Alviggi C, Fischer R, Esteves SC. The novel POSEIDON stratification of 'Low prognosis patients in Assisted Reproductive Technology' and its proposed marker of successful outcome. *F1000Research* 2016;5:.
56. Barbakadze L, Kristesashvili J, Khonelidze N, Tsagareishvili G. The correlations of anti-mullerian hormone, follicle-stimulating hormone and antral follicle count in different age groups of infertile women. *Int J Fertil Steril* 2015;8:393–398.

57. Domar A, Gordon K, Garcia-Velasco J, La Marca A, Barriere P, Beligotti F. Understanding the perceptions of and emotional barriers to infertility treatment: a survey in four European countries. *Hum Reprod Oxf Engl* 2012;27:1073–1079.
58. Yates AP, Rustamov O, Roberts SA, Lim HYN, Pemberton PW, Smith A, Nardo LG. Anti-Mullerian hormone-tailored stimulation protocols improve outcomes whilst reducing adverse effects and costs of IVF. *Hum Reprod Oxf Engl* 2011;26:2353–2362.
59. Zhang B, Meng Y, Jiang X, Liu C, Zhang H, Cui L, Chen Z-J. IVF outcomes of women with discrepancies between age and serum anti-Müllerian hormone levels. *Reprod Biol Endocrinol* 2019;17:58.
60. Eijkemans MJC, Kersten FAM, Lintsen AME, Hunault CC, Bouwmans CAM, Roijen LH, Habbema JDF, Braat DDM. Cost-effectiveness of ‘immediate IVF’ versus ‘delayed IVF’: a prospective study. *Hum Reprod* 2017;32:999–1008.
61. Horne G, Farrell C, Pease EHE, Brison DR, Falconer DA, Lieberman BA. Waiting for in vitro fertilization treatment: spontaneous and ART live births. *Hum Fertil Camb Engl* 2003;6:116–121.
62. Malchau SS, Henningsen AA, Loft A, Rasmussen S, Forman J, Nyboe Andersen A, Pinborg A. The long-term prognosis for live birth in couples initiating fertility treatments. *Hum Reprod Oxf Engl* 2017;32:1439–1449.
63. Evers JL, de Haas HW, Land JA, Dumoulin JC, Dunselman GA. Treatment-independent pregnancy rate in patients with severe reproductive disorders. *Hum Reprod Oxf Engl* 1998;13:1206–1209.
64. Gemmell LC, Williams Z, Forman EJ. Considerations on the restriction of Assisted Reproductive Technology (ART) due to COVID-19. *Semin Perinatol* 2020;44:151288.
65. Karavani G, Chill HH, Meirman C, Dior UP, Ben-Meir A. Communication with fertility patients during the COVID-19 pandemic- let’s talk about it. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2021;260:154–158.

66. Alviggi C, Esteves SC, Orvieto R, Conforti A, La Marca A, Fischer R, Andersen CY, Bühler K, Sunkara SK, Polyzos NP, Strina I, Carbone L, Bento FC, Galliano D, Yarali H, Vuong LN, Grynberg M, Drakopoulos P, Xavier P, Llacer J, Neuspiller F, Horton M, Roque M, Papanikolaou E, Banker M, Dahan MH, Foong S, Tournaye H, Blockeel C, *et al.* COVID-19 and assisted reproductive technology services: repercussions for patients and proposal for individualized clinical management. *Reprod Biol Endocrinol* 2020;18:45.
67. Bhattacharya S, Maheshwari A, Ratna MB, van Eekelen R, Mol BW, McLernon DJ. Prioritizing IVF treatment in the post-COVID 19 era: a predictive modelling study based on UK national data. *Hum Reprod* 2021;36:666–675.
68. Romanski PA, Bortoletto P, Rosenwaks Z, Schattman GL. Delay in IVF treatment up to 180 days does not affect pregnancy outcomes in women with diminished ovarian reserve. *Hum Reprod* 2020;35:1630–1636.

Indice delle figure e delle tabelle

Figura 1 Risultati dei cicli iniziati con tecniche a fresco di II e III livello (FIVET e ICSI) senza donazione di gameti, secondo la fase del ciclo - anno 2018 (% calcolate rispetto alla fase precedente)	26
Tabella 1 - Caratteristiche demografiche e cliniche della popolazione in esame	48
Tabella 2 - Outcomes riproduttivi su tutto il campione al primo accesso	49
Tabella 3 - Outcomes riproduttivi in pazienti con ridotta riserva ovarica al primo accesso	50

“Pensate al futuro che vi aspetta, pensate a quello che potete fare e non temete niente.”

Rita Levi Montalcini

Ringraziamenti

Desidero ringraziare i professori che mi hanno aiutata in questo percorso, il Professor Cagnacci, la Prof.ssa Massarotti, la Dott.ssa Anserini e tutto il team di lavoro del Centro FRU dell’Ospedale San Martino. Porterò sempre con me gli insegnamenti e le opportunità che mi hanno dato.

Un grazie speciale va alla mia correlatrice, la Prof.ssa Claudia Massarotti, per il lavoro che svolge ogni giorno con grande professionalità e passione, per esserci sempre stata e per avermi dato un supporto fondamentale per completare questo percorso.

Voglio ringraziare la mia famiglia perché, nonostante il mio carattere a volte acido e scontroso, mi ha sempre supportata e sopportata: mia madre, per la pazienza che ha avuto con me in questo percorso e per avere contribuito ai “riti scaramantici” prima degli esami, mio padre, per l’interesse che mi ha sempre trasmesso verso la medicina, a mio fratello, il “piccolo” di casa, in grado di infondermi tranquillità anche nei peggiori momenti di ansia. Ad entrambi i miei genitori va un grazie particolare per avermi permesso di seguire la mia strada, per non avermi mai messo limiti e per avermi supportato in tutte le mie scelte, anche quelle che magari a loro sembravano sbagliate, insegnandomi cosa è la libertà.

Un grazie va ai miei nonni: a Nuccia, l’unica presente al mio fianco, per il costante supporto e per aver tenuto duro per esserci oggi, a Caterina, mai al mio fianco ma sempre presente in me, a Vito, nonno dal cuore granata, come lo stetoscopio che porto con me, ad Aurelio, per avermi insegnato quali errori non fare nella vita.

Grazie alla mia famiglia, sia quella vicina che quella lontana, che ha creduto in me quando nemmeno io ci credevo, per aver fatto il tifo in maniera silenziosa e costante, in primis a mio Zio Luca, che in questo contesto si è guadagnato il titolo di Capo Ultras familiare, per non aver mai dubitato che questo primo traguardo potesse arrivare. Un grazie va anche a Serena, con i suoi “cugina ti posso chiamare un secondo?” che regolarmente diventava un’ora.

Grazie a Luca, per essere al mio fianco, supportandomi e sopportandomi (anche se dobbiamo ancora capire chi sopporta chi), per portare nella mia vita qualche sfumatura di colore in più anche quando tutto sembra buio.

A Harry e a Baffo, parte a quattro zampe insostituibile della famiglia, senza i quali non sarei la stessa, per l’amore che solo un animale può darti nella vita, anche se non è al tuo fianco.

Voglio ringraziare anche i miei amici, sempre presenti in questi 6 anni con cene improvvisate o organizzate e rimandate mille volte, per incontri volanti dopo tanto tempo senza vedersi, per le domande a cui spesso non sapevo rispondere, per l’allegria e la spensieratezza che mi trasmettete ogni volta, siete stati fondamentali. Grazie ad Ari, compagna di banco del liceo e amica insostituibile. Grazie a Giulia, Chiara, Elisa, Arianna, Anna, Chiara ed Elena per le pause caffè tra le lezioni, i pranzi a base di insalate scionate o panini al volo, le corse dal tirocinio alle aule e verso la stazione, per aver reso questo percorso più leggero.

Un grazie speciale è per Raffaella, per avermi insegnato che la passione è ciò che guida questo mestiere, per essere un’amica e non un tutor.

Infine grazie ai pazienti che ho incontrato, per avermi insegnato a vedere il mondo sotto una luce diversa.

Grazie

