

La fase luteale nella fisiologia e nella abortività: ruolo della secrezione steroidea

Paoletti AM, Perseu M, Batzella E, Cabiddu E, Cornacchia S, D'Alterio M, Fancello P, Indelicato M, Lai MC, Neri M, Marotto MF, Pilloni M, Orrù M, Zedda P, Melis GB
 CLINICA GINECOLOGICA OSTETRICA E DI FISIOPATOLOGIA DELLA RIPRODUZIONE UMANA, DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIRURGICHE, UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CAGLIARI, CAGLIARI, ITALIA

INTRODUZIONE

È ben noto che le modificazioni in senso secretivo dell'endometrio, la sua preparazione all'eventuale impianto e il mantenimento della gravidanza iniziale richiedono la presenza e l'integrità funzionale del corpo luteo (1). Dopo l'ovulazione la sua formazione dal follicolo dominante avviene grazie ad un rimodellamento morfologico e biochimico delle componenti steroidogeniche della struttura follicolare, detto luteinizzazione (2), e ad un attivo processo di invasione vascolare e di angiogenesi (3). Altra peculiarità di tale importante ghiandola endocrina è la sua limitata durata di vita. In assenza di gravidanza, infatti, il corpo luteo si avvia inesorabilmente ad un processo di regressione funzionale e strutturale (luteolisi) che avviene 9-11 giorni dopo l'ovulazione (4).

FINESTRA DI RECETTIVITÀ ENDOMETRIALE

Uno dei fattori critici per il successo dell'impianto dell'embrione è che l'endometrio sia recettivo per la blastocisti. L'endometrio è un tessuto per la maggior parte del tempo refrattario all'impianto. Esiste una finestra di recettività endometriale, cioè un periodo temporalmente limitato nel quale l'endometrio consente l'impianto della blastocisti: la sua durata nella donna è di 3-4 giorni, tra il 3° e il 7° giorno dall'ovulazione. Il numero di gravidanze che esita in aborto varia in relazione al giorno dell'impianto dalla ovulazione; in particolare aumenta a partire dal 9° giorno di impianto. Se l'impianto avviene oltre 8 giorni dall'ovulazione il numero di gravidanze esitate in perdita precoce aumenta in maniera significativa (5,6).

IMPIANTO DELLA BLASTOCISTI

La sequenza di eventi in base ai quali la blastocisti si impianta all'endometrio (apposizione, adesione e invasione dell'endometrio) e vi si annida è un processo complesso che dipende da una serie di eventi endocrini, paracrini e autocrini che avvengono da un lato nell'endometrio, dall'altro nella blastocisti. Nella fase favorevole all'impianto l'endometrio è caratterizzato da un processo di predecidualizzazione con: allargamento delle cellule dello stroma, aumento di vascolarizzazione ed edema dello stroma. Tale processo avviene anche in assenza di embrione e deriva da un processo di attivazione da parte del picco preovulatorio degli estrogeni che favoriscono le cellule epiteliali

e che, nel corso di tutta la fase proliferativa, hanno promosso la sintesi dei recettori del progesterone; quindi, in un endometrio già stimolato, il progesterone permette la decidualizzazione. Molto complesso è l'intervento dei cosiddetti "fattori di impianto" (7). Tra quelli più noti, accanto alla L-Selectina che svolge un ruolo fondamentale nel processo di adesione del trofoblasto alla parete uterina (8), vi sono le integrine, proteine eterodimeriche presenti sulla superficie delle cellule endometriali e soggette a modificazioni durante il ciclo mestruale. Infatti, mentre nella fase medio-luteale sono presenti nell'epitelio ghiandolare le subunità $\alpha 1$ e $\alpha 4$, la subunità $\beta 3$ è presente sia nell'epitelio ghiandolare sia nell'epitelio di superficie. Queste subunità formano parte delle integrine $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$ e $\alpha v\beta 3$, la cui presenza è correlata con la finestra impiantatoria (9). L'integrina $\alpha v\beta 3$ è presente verso il 5°-6° giorno della fase postovulatoria (10) e la localizzazione nella superficie apicale dell'epitelio cellulare indica la sua partecipazione nell'adesione dell'embrione all'endometrio quando inizia il processo di impianto nell'utero (11). Di conseguenza, un'alterazione dell'espressione delle integrine, soprattutto delle integrine $\alpha v\beta 3$ e $\alpha 4\beta 1$, è indicativa di alterata recettività endometriale e di impedimento all'annidamento (12). Alle integrine sono da aggiungere altri fattori di impianto, tra cui (13): il sistema dell'interleuchina, l'osteopontina, il tumor

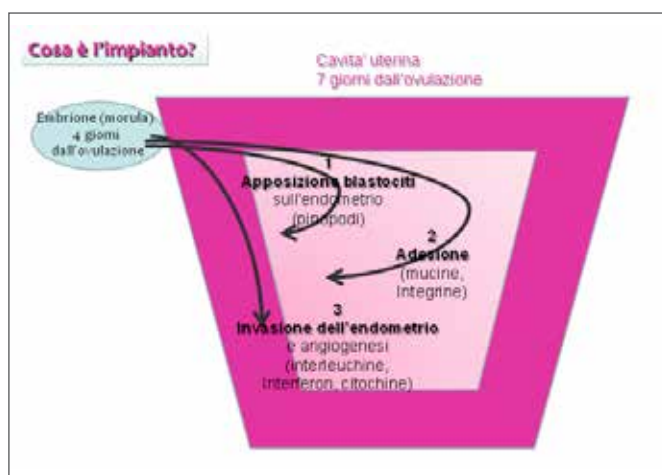


Fig. 1 - Meccanismi alla base dell'impianto della blastocisti polipo peri-ostiale

necrosis factor (TNF), il fattore attivante le piastrine (PAF), le mucine, il fattore di inibizione dei linfociti (LIF) (la cui riduzione indotta da un progestinico può provocare il mancato impianto dell'embrione in utero), il fattore di crescita insulino-simile (IGF-1), il fattore IGF-II e le proteine vettrici correlate (IGFBP), che sono sotto il controllo ormonale e che subiscono variazioni a seguito della somministrazione esogena di estrogeni e progestinici. Dopo la somministrazione della pillola estro progestinica si è infatti evidenziato un aumento del IGFBP e una riduzione del IGF-1, con possibile interferenza con l'annidamento dell'embrione (14), fenomeni legati alla mancata ovulazione ad opera dell'uso dei contraccettivi orali. Tra i fattori di impianto sono infine da segnalare i pinopodi, protrusioni sulla superficie apicale delle cellule epiteliali dell'endometrio, la cui comparsa viene considerata un'importante caratteristica morfologica dell'endometrio nel periodo precedente all'impianto (15).

IL SISTEMA IMMUNITARIO IN GRAVIDANZA

La gravidanza rappresenta un fenomeno fisiologico unico in natura, consistente nella simbiosi tra individui parzialmente diversi o semi-allo-genici; il feto porta un corredo genetico per metà di derivazione paterna (16). Questo tipo di coesistenza richiede una raffinata e complessa regolazione del sistema immunitario, sia materno che fetale, il cui scopo è ad un tempo quello di garantire un'efficiente protezione contro eventuali infezioni e di consentire, tuttavia, il processo di invasione del tessuto embrionale "estraneo" nel contesto di quello materno evitando che i fisiologici meccanismi di reazione immunitaria materni risultino dannosi per l'embrione. Anni di studi e ricerche hanno solo in parte chiarito le modalità attraverso cui si realizza questo riassetto immunologico. A tutt'oggi, la tolleranza nei confronti del feto da parte del sistema immunitario materno resta un enigma e, per certi aspetti, un vero e proprio paradosso immunologico (17, 18). Il sistema immunitario materno permette l'invasione del trofoblasto,

l'ancoraggio e l'aderenza della placenta all'utero (19,20,21,22). Esistono 2 subsets principali di linfociti T helper CD4+ : Th1 e Th2, caratterizzati da un diverso profilo secretorio di citochine e da diverse funzioni nell'ambito della risposta immunitaria. Le cellule Th1 secernono IFN- γ , TNF- β , IL-2 e TNF- α (pattern di tipo 1). Le citochine di tipo Th1 attivano i macrofagi e sono implicate nelle reazioni cellulo-mediate (immunità cellulare), importanti nella resistenza alle infezioni da patogeni intracellulari e nelle reazioni di citotossicità e di ipersensibilità ritardata. Le cellule Th2 secernono IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 (pattern di tipo 2) e sono maggiormente coinvolte nella produzione anticorpale (immunità umorale) e nella resistenza alle infezioni da patogeni extra-cellulari. Le cellule Th1 e Th2 svolgono attività mutualmente inibitoria. In particolare la IL-10, prodotta dalle cellule Th2, inibisce lo sviluppo delle cellule Th1 agendo sulle cellule presentanti l'antigene, mentre l'IFN- γ , prodotto dalle cellule Th1, previene l'attivazione delle cellule Th2. Questa polarizzazione della risposta immunitaria rappresenta in realtà una eccessiva semplificazione, dal momento che esistono altri pattern di secrezione citochinica che non rientrano in questa schematizzazione (23, 24). A seconda del prevalere dell'uno o dell'altro pattern secretorio (tipo 1 o tipo 2) e della sequenza temporale con cui si realizza questo tipo di polarizzazione, la risposta immunitaria che ne deriva risulta diversamente modulata. Durante la gravidanza risulta potenziata la risposta umorale (tipo 2) mentre è attenuata quella cellulo-mediata (tipo 1) (25-27). Le cellule uNK rappresentano un subset cellulare specializzato e specifico dell'utero, costituendo circa il 70 % della popolazione leucocitaria nel primo trimestre di gravidanza; hanno funzioni NK-simili, ma fenotipo differente. Esprimono infatti meno recettori di attivazione (CD69, HLA-DR, LFA-1 e CD45RA) rispetto alle cellule NK del sangue periferico e più recettori inibitori tra i quali KIR2D, KIR2DL4 (Ig-like) e CD94/NKG2A (lectin-like) (20, 28-35). Le cellule uNK esprimono selettivamente CD9, galectina-1 e glicodelina,

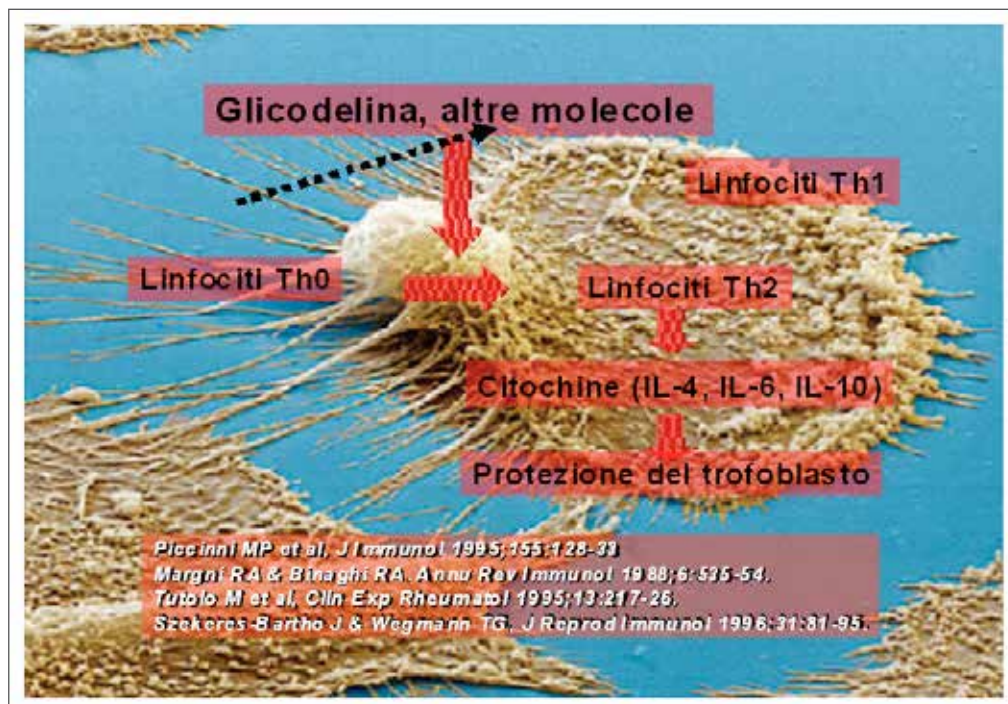


Fig. 2 - Ruolo del sistema immunitario e delle sue citochine nella fase dell'impianto della blastocisti

proteine do-tate di attività immunomodulatoria (36-38). La galectina-1 inibisce la proliferazione e la sopravvivenza delle cellule T, riduce la produzione di TNF α , IL-2, IFN γ da parte di cellule T attivate e la produzione di IL-12 da parte dei macrofagi; la glicodelina induce una "downregulation" dell'attivazione T cellulare, conducendo in ultima analisi ad attivazione del sistema Th2.

LA FUNZIONE LUTEALE E I SUOI FATTORI DI MODULAZIONE

Dopo l'ovulazione un attivo processo di invasione vascolare e di neoangiogenesi trasforma la struttura avascolare del follicolo in quella riccamente vascolarizzata del corpo luteo (1). Dopo l'ovulazione, infatti, alla perdita dell'integrità strutturale della membrana basale, che nel follicolo separa la teca dalla granulosa, segue l'espansione dei capillari della teca nello strato originariamente avascolare della granulosa (39, 40). Dall'attivo processo di proliferazione delle cellule del microcircolo così migrate deriva una ricca rete di capillari che consente sia un adeguato approvvigionamento di substrati per l'intensa steroidogenesi luteale, sia una veloce ed efficiente immissione in circolo del progesterone prodotto.

Alla luce di quanto esposto appare chiaro che i fattori che regolano l'angiogenesi luteale svolgono un ruolo estremamente importante nella funzionalità del corpo luteo.

Conditio sine qua non per l'inizio della neoangiogenesi luteale è il rimodellamento della matrice extracellulare (ECM) perivascolare, essenziale per la migrazione delle cellule endoteliali dai vasi già esistenti. Tale processo di digestione enzimatica della ECM, attivo esclusivamente in fase luteale precoce, è strettamente regolato dall'interazione tra proteasi della famiglia dell'attivatore del plasminogeno (PA), metalloproteinasi della matrice (MMPs) e loro inibitori (1, 41). In particolare, nel corpo luteo in formazione lo stroma, l'endotelio e le cellule steroidogeniche di origine tecale producono MMPs, i cui inibitori tissutali (TIMPs) risultano, invece, fortemente espressi nelle cellule parenchimali derivate dalla granulosa (42).

Alla digestione enzimatica dell'ECM segue la migrazione delle cellule endoteliali, la cui proliferazione porta, quindi, alla formazione di nuovi capillari. In tale processo un ruolo fondamentale è svolto dal Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) (43), glicoproteina in grado di promuovere la migrazione e la proliferazione delle cellule endoteliali del microcircolo e di incrementare la permeabilità vascolare (44, 45).

La sua intensa espressione nel corpo luteo in fase luteale precoce e media e, soprattutto, nella gravidanza iniziale (46) ne suggerisce un ruolo chiave sia nella formazione sia nel mantenimento del corpo luteo qualora avvenga il concepimento (47, 48). In assenza di quest'ultimo, infatti, in fase luteale tardiva i livelli di VEGF subiscono una netta riduzione (46). Nel corpo luteo tale fattore di crescita è prodotto dalle cellule steroidogeniche (49, 50), che, come le cellule endoteliali, ne posseggono anche i recettori (46, 50). Ciò suggerisce, quindi, che il VEGF possa esercitare anche un'azione autocrina di modulazione della steroidogenesi luteale, come dimostrato da preliminari risultati in vitro (51).

Il corpo luteo è l'elemento funzionale protagonista della seconda metà del ciclo ovulatorio. Principali composti steroidei derivanti dal corpo luteo sono gli estrogeni e il pro-

gesterone. Nella produzione di estrogeni la via sintetica preferenziale è quella dei $\Delta 4$ -steroidi, dal pregnenolone attraverso il progesterone, 17- α -OHP, androstenedione e testosterone fino all'estrone ed estradiolo. La secrezione di altri ormoni evidenzia ridotti livelli di gonadotropine, ormai analoghi a quelli della fase follicolare preovulatoria, e ridotte capacità di risposta e sintesi da parte delle cellule gonadotropino-secerenti. In accordo con ciò si ha una riduzione, in ampiezza e frequenza, della pulsatilità in LH e FSH (52). Vi sono evidenze che il progesterone stesso agisca come fattore locale luteo trofico sulle cellule del corpo luteo assieme ad altri fattori autocrini e paracrini, bilanciando le azioni luteo trofiche con quelle luteo litiche (enzimatiche) (53).

Il progesterone agisce sull'endometrio mediante:

- » un'azione antiproliferativa antagonista a quella degli estrogeni (54);
- » una preparazione dell'endometrio adeguata all'impianto embrionale attraverso a) effetti specifici sulle cellule stromali (decidualizzazione); b) modificazioni strutturali e secretive delle cellule epiteliali luminali e ghiandolari dell'endometrio; c) effetti di modificazione strutturale e di portata sul microcircolo endometriale (55);
- » un'azione tocolitica sul miometrio (riduzione dell'attività contrattile) (56);
- » un'azione inibitrice della embriotossicità materna verso il trofoblasto embrionale (57).

Il livello degli estrogeni è un fattore importante nel determinare la durata della recettività uterina per l'impianto: valori intorno a 1.5 ng mantengono l'endometrio in una fase pre-recettiva; se si raggiungono valori intorno ai 3 ng si entra in una fase di recettività che si mantiene per circa 120 ore; valori intorno ai 10-25 ng determinano una condizione di refrattarietà uterina (58).

DEFICIT DELLA FASE LUTEALE

È una condizione descritta per la prima volta da Jones JE (59) quale difetto della funzione del corpo luteo che causa infertilità e aborto precoce.

Può essere determinata da diverse cause che modulano la funzione del corpo luteo.

Cause del deficit di fase luteale

1) Alterazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-ovaio

In questa sono stati dimostrati difetti della secrezione pulsatile del LH nel corso della fase follicolare e della fase luteale. Infatti nelle donne con deficit della fase luteale la frequenza delle pulse di LH è più alta nella fase follicolare precoce rispetto ai controlli, ma non aumenta come nei controlli nella tarda fase follicolare (60).

Nelle donne obese si osserva classicamente una riduzione della fertilità legata all'anovulazione cronica associata spesso ad oligomenorrea o ad amenorrea. Diversi studi (61, 62) mostrano che le donne con un BMI >30 presentano un rischio 2,7 volte più elevato di infertilità rispetto alle donne normopeso.

D'altronde, anche un incremento dell'attività fisica e una restrizione dietetica determinano una riduzione dell'energia

necessaria per indurre una secrezione pulsatile delle gonadotropine; si crea un ipoestrogenismo responsabile di irregolarità mestruali (dal deficit della fase luteale ai cicli anovulatori, sino all'amenorrea ipotalamica), di osteoporosi e di incremento del rischio cardiovascolare (63).

Vi è un'alta frequenza di deficit della fase luteale e anovularietà nelle donne che praticano la corsa; da un punto di vista ormonale è stata messa in evidenza un'alterata pulsilità di LH e un ridotto aumento di FSH nella fase di transizione luteo-follicolare (64).

Nelle donne che praticano attività fisica è registrata un'alta prevalenza di disordini mestruali, sia lievi che severi, rispetto alle donne che conducono una vita sedentaria, che per il 95% hanno cicli ovulatori; nel 5% di questo ultimo gruppo di donne si manifesta un deficit della fase luteale, percentuale che sale al 27% nelle donne che praticano attività fisica. In uno studio condotto sulle scimmie Rhesus, sottoposte a 12 giorni di stress psicologico, sono state registrate delle alterazioni mestruali per un periodo superiore a quello in cui sono state effettuate le pratiche stressanti. Il decremento dei valori di LH registrato nel periodo successivo ai giorni di stress suggerisce che le alterazioni del ciclo mestruale possono essere correlate a modificazioni neuroendocrine dell'asse riproduttivo (65).

2) Iperprolattinemia

Questa esercita un'azione a livello di ovaio, asse ipotalamo-ipofisi e altri sistemi. Per quanto riguarda la sua azione a livello ovarico è stato messo in evidenza che:

- in vitro, nelle cellule della granulosa, vi è un'inibizione della secrezione di progesterone se viene aggiunta prolattina ad alte (100 ng/mL), ma non a basse concentrazioni (10-20 ng/mL) (66);
- in cellule luteali della fase medio-luteale, basse dosi di prolattina aumentano la secrezione di progesterone ma non di estradiolo, Hcg-indotte, mentre alte dosi di prolattina inibiscono la secrezione di progesterone ed estradiolo (67);
- a dosi fisiologiche una singola molecola di prolattina lega due recettori di prolattina e facilita la dimerizzazione mentre un eccesso di molecole di prolattina impedisce la dimerizzazione

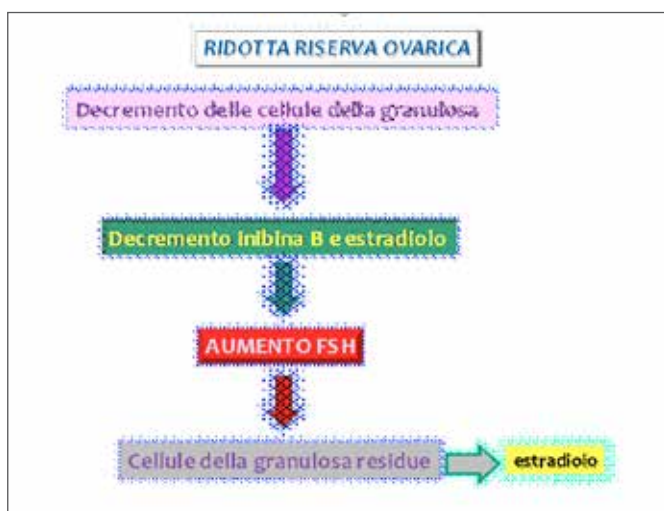


Fig. 3 - Alterazioni della biologia funzionale ovarica che si realizzano nella perimenopausa

e blocca il processo (67);

-l'iperprolattinemia inibisce la secrezione di estradiolo gonadotropine-indotta in follicoli in fase preovulatoria (68-74);

-l'iperprolattinemia determina, inoltre, una riduzione dei recettori per l'LH (75-80).

Pertanto, l'iperprolattinemia è responsabile di un'adeguata fase luteale con conseguente infertilità.

A differenza degli altri ormoni rilasciati dall'ipofisi anteriore, la secrezione di PRL è sottoposta ad un prevalente controllo tonico inibitorio da parte dell'ipotalamo.

Tale azione inibitoria è esercitata dalla dopamina, rilasciata dai neuroni ipotalamici tuberoinfundibolari nei capillari del sistema portale ipotalamo-ipofisario (81-84).

La prolattina è un fattore essenziale nell'indurre e mantenere la lattazione successiva al parto, ma ha anche un ruolo secondario nella regolazione della funzione gonadica, modulando negativamente la secrezione di GnRH, FSH e LH. Nell'ipotalamo l'inibizione PRL-mediata del rilascio di GnRH provoca la perdita della secrezione pulsatile di LH con conseguente assenza di picco preovulatorio. Nell'ovaio la PRL blocca la follicologenesi e inibisce l'attività aromatasica delle cellule della granulosa, causando ipoestrogenismo e anovulazione (85, 81, 82, 86).

L'iperprolattinemia stimola la secrezione di androgeni surrenalici per alterazione dei meccanismi di feed-back a livello ipotalamo-ipofisario. L'iperprolattinemia stimola la produzione di insulina da parte delle cellule β -pancreatiche: la maggiore iniezione di androgeni ovarici e l'associata diminuzione della sex hormone-binding globulin (SHBG), costituiscono il momento centrale della patogenesi della PCOS (87). I farmaci di elezione nel trattamento dell'iperprolattinemia sono gli agonisti dopaminergici che agiscono direttamente a livello ipofisario legando il recettore D2 della dopamina (88-92).

3) Età riproduttiva avanzata

Durante il ciclo mestruale i livelli di inibina A sono elevati durante la fase follicolare tardiva e la fase luteale, mentre la secrezione di inibina B aumenta gradualmente durante la fase medio-follicolare per poi decrescere durante la fase luteale. L'andamento delle inibine deriva da un diverso ruolo fisiologico: mentre l'inibina B, prodotta prevalentemente dalle cellule della granulosa sotto lo stimolo del FSH, sembra essere un marker significativo di crescita follicolare, l'inibina A, secreta prevalentemente dal corpo luteo, sembra svolgere un ruolo di feedback inibitorio sulla sintesi e secrezione ipofisaria di FSH. La perimenopausa è caratterizzata da una graduale diminuzione del numero di follicoli ovarici, indice di ridotta potenzialità riproduttiva. È noto che in questa fase della vita le donne mostrano cicli mestruali irregolari, con un aumento dei livelli sierici di FSH durante la fase follicolare, con livelli di estrogeni e LH normali. Tale aumento è direttamente correlato alla diminuzione della riserva follicolare, con livelli di inibina B ridotti durante la fase follicolare e livelli di FSH elevati ed estradiolo normali. I livelli sierici di inibina B durante la fase follicolare decrescono più rapidamente, mentre quelli di inibina A sono ridotti durante la fase luteale. In donne con menopausa precoce si osservano livelli di inibina A e di inibina B significativamente ridotti (93-103). In uno studio comparativo del 2003 tra donne in età riproduttiva avanzata e donne in età riproduttiva



Fig. 4 - Flow chart per la diagnosi della LPD (Luteal Phase Defect)

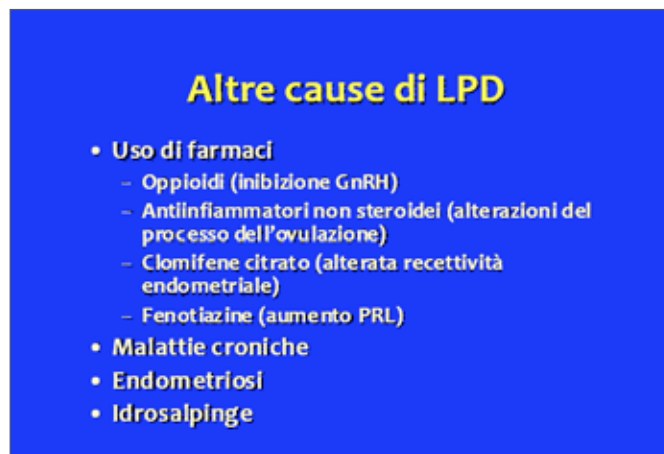


Fig. 5 - Si deve sempre escludere altre cause di LPD

media è stato messo in evidenza:

- » una significativa riduzione del numero di follicoli nel corso della fase follicolare precoce nel primo gruppo di donne;
- » un incremento del diametro follicolare in fase follicolare tardiva statisticamente significativo nello stesso gruppo di donne;
- » una riduzione significativa del diametro follicolare in fase ovulatoria sempre nelle donne in età riproduttiva avanzata.

Un ciclo multi follicolare in donne in età riproduttiva avanzata è caratterizzato da una secrezione di estradiolo elevata, asincrona con il conseguimento della maturità oocitaria, un'aumentata secrezione di FSH e LH per ridotta secrezione ovarica di inibine e steroidi e da una ridotta secrezione di progesterone (104).

Tra le altre cause di deficit della fase luteale ricordiamo:

4) *Uso di farmaci*

come gli oppioidi (per inibizione del GnRH), i farmaci antinfiammatori non steroidei (per alterazione del processo dell'ovulazione), il clomifene citrato (per alterata recettività endometriale) e le fenotiazine (per aumento della prolattina);

5) *Malattie croniche*

6) *Endometriosi*

7) *Idrosalpinge*

Diagnosi del deficit di fase luteale

Nel percorso diagnostico del deficit della fase luteale è importante indagare le diverse cause di deficit della fase luteale ed effettuare uno studio accurato della secrezione del progesterone e dei fattori correlati al suo effetto a livello endometriale. Si può effettuare lo studio dell'endometrio nel corso della fase luteale attraverso:

- » istologia
- » ecografia [il flusso ematico a livello del corpo luteo, misurato mediante il color Doppler, è direttamente correlato con la secrezione di progesterone (105-113); inoltre nella fase medio-luteale l'indice di resistenza delle arterie uterina e ovarica è aumentato (114)]
- » sonoisterografia

Altra metodica è quella della istologia associata a valutazione di marker endometriali, quali le integrine (115).

CONCLUSIONI

Le conoscenze attuali sulla fase luteale rappresentano solo la "punta dell'iceberg" di un universo di modulatori che mediano le interazioni funzionali del corpo luteo. L'ampiamiento delle conoscenze sarà importante per una maggiore comprensione della fase luteale e per migliorare l'outcome riproduttivo sia in gravidanze spontanee che stimolate.

{BIBLIOGRAFIA}

1. Duncan WC. The human corpus luteum: remodelling during luteolysis and maternal recognition of pregnancy. *Rev Reprod* 2000; 5:12-17
2. Smith MF et al. Mechanisms associated with corpus luteum development. *J Anim Sci* 1994;72:1857-1872
3. Fraser HM, Lunn SF. Regulation and manipulation of angiogenesis in the primate corpus luteum. *Reproduction* 2001;121:355-362
4. Speroff L et al, 1994 *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*. V ed ed. Baltimore: Williams & Wilkins
5. Hertig AT et al, Thirty-four fertilized human ova, good, bad and indifferent, recovered from 210 women of known fertility; a study of biologic wastage in early human pregnancy. *Pediatrics* 1959 Jan;23(1 Part 2):202-211
6. Allen J Wilcox et al, Time of implantation of the conceptus and loss of pregnancy. *N Engl J Med* 1999;340:1796-1799
7. Kimber SJ, Spanswick C, Blastocyst implantation: the adhesion cascade, *Cell & Devel. Biol.* 2000;11:72-92
8. Genbacev OD et al, Trophoblast L-Selectin - Mediated Adhesion at the Maternal - Fetal Interface. *Science* 2003;299:405-407
9. Lessey BA et al. Further Characterization of Endometrial Integrins during the Menstrual Cycle and in Pregnancy. *Fertil Steril* 1994;62: 497-506

10. Lessey BA et al. Integrin Adhesion Molecules in the Human Endometrium. Correlation with the Normal and Abnormal Menstrual Cycle. *J Clin Invest* 1992;90:188-195
11. Tabibzadeh S. Patterns of Expression of Integrin Molecules in Human Endometrium throughout the Menstrual Cycle. *Human Reprod* 1992;7: 876-882
12. Somkuti SG et al. The Effect of Oral Contraceptive Pills on Markers of Endometrial Receptivity. *Fertil Steril* 1996;65:484-488
13. Tabibzadeh S. Molecular control of the implantation window. *Hum Reprod Update* 1998;4:465-471
14. Westwood M et al. Hormonal regulation of circulating Insulin-like Growth Factor-Binding Protein-I phosphorylation status. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:3520-3527
15. Yen SSC et al. *Endocrinologia della riproduzione. Fisiologia, fisiopatologia e aspetti clinici*, Roma: Verduci, 2004: 258
16. Kamasmerer U et al. Immunology of human endometrium. *Immunobiology* 2004;209:569-574
17. Thellin O et al. Tolerance to the foeto-placental 'graft': ten ways to support a child for nine months. *Curr Opin Immunol* 2000; 12:731-737
18. Erlebacher A. Why isn't the fetus rejected? *Curr Opin Immunol* 2001;13:590-593
19. Nishino E et al. Trophoblast-derived interleukin-6 (IL-6) regulates human chorionic gonadotropin release through IL-6 receptor on human trophoblasts. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;74:184-190
20. De Moraes Pinto ML et al. Placental transfer and maternally acquired neonatal IgG immunity in human immunodeficiency virus infection. *Immunology* 1996;90:87-90
21. Roth I et al. Human placental cytotrophoblasts produce the immunosuppressive cytokine interleukin 10. *J Exp Med* 1996;184:539-548
22. Saito S et al. Expression of Fas ligand in murine ovary. *Biochem Res Commun* 1997;231:429-434
23. Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets. *Immunol Today* 1996;17:138-146
24. Coffman RL, Romagnani S. *Redirection of Th1 and Th2 responses*. Springer, Berlin, 1999
25. Ragupathy R. Pregnancy: success and failure within the Th1/Th2/Th3 paradigm. *Sem Immunol* 2001;13:219-227
26. Lin H et al. Synthesis of T helper 2-type cytokines at the maternal-fetal interface. *J Immunol* 1993; 151:4562-4573
27. Wegmann TG et al. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunol Today* 1993;14:353-356
28. Solderstrom K et al. CD94/NKG2 is the predominant inhibitory receptor involved in the recognition of HLA-G by decidual and peripheral blood NK cells. *J Immunol* 1997;159:1072-1075
29. Dosiou C, Giudice LC. Natural killer cells in pregnancy and recurrent pregnancy loss: endocrine and immunologic perspectives. *Endocr Rev* 2005;26:44-62
30. Kodama T et al. Characteristic changes of large granular lymphocytes that strongly express CD56 in endometrium during menstrual cycle and early pregnancy. *Hum Reprod* 1998;13:1036-1043
31. Ponte M et al. Inhibitory receptors sensing HLA-G1 molecules in pregnancy: deciduas-associated natural killer cells express LIR-1 and CD94/NKG2A and acquire p49, an HLA-G1-specific receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 5674-5679
32. Hiby SE et al. Human uterine NK cells have a similar repertoire of killer inhibitory and activatory receptors to those found in blood, as demonstrated by RT-PCR and sequencing. *Mol Immunol* 1997;34:419-430
33. Verma S et al. Expression of killer cell inhibitory receptors on human uterine natural killer cells. *Eur J Immunol* 1997;27:979-983
34. Davis DM et al. The transmembrane sequence of human histocompatibility leucocyte antigen (HLA)-C as a determinant in inhibition of a subset of natural killer cells. *J Exp Med* 1999;189:1265-1274
35. Rajagopalan S, Long EO. A human histocompatibility leucocyte antigen (HLA)-G-specific receptor expressed on all natural killer cells. *J Exp Med* 1999;189:1093-1100
36. King A et al. HLA-E is expressed on trophoblast and interacts with CD94/NKG2 receptors on decidual NK cells. *Eur J Immunol* 2000;30:1623-1631
37. Saito S. Cytokine network at the feto-maternal interface. *J Reprod Immunol* 2000;47:87-103
38. Koopman La et al. Human decidual natural killer cells are a unique NK cell subset with immunomodulatory. *J Exp Med* 2003;198:1201-1212
39. Reynolds LP et al. Angiogenesis in the corpus luteum. *Endocrine* 2000;12:1-9
40. Stouffer RL et al. Regulation and action of angiogenic factors in the primate ovary. *Arch Med Res* 2001;32:567-575
41. Ny T et al. Matrix remodeling in the ovary: regulation and functional role of the plasminogen activator and matrix metalloproteinase systems. *Mol Cell Endocrinol* 2002; 187:29-38
42. Duncan WC et al. The effect of luteal "rescue" on the expression and localization of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in the human corpus luteum. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:2470-2478
43. Ferrara N et al. Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis. *Nat Med* 4:336-340
44. Ferrara N, Davis-Smyth T, 1997 The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 1998;18:4-25
45. Stacker SA, Achen MG. The vascular endothelial growth factor family: signalling for vascular development. *Growth Factors* 1999;17:1-11
46. Sugino N et al. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in the human corpus luteum during the menstrual cycle and in early pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:3919-3924

47. Fraser HM et al. Suppression of luteal angiogenesis in the primate after neutralization of vascular endothelial growth factor. *Endocrinology* 2000;141:995-1000
48. Dickson SE et al. Mid-luteal angiogenesis and function in the primate is dependent on vascular endothelial growth factor. *J Endocrinol* 2001;168:409-416
49. Wulff C et al. Angiogenesis in the human corpus luteum: localization and changes in angiopoietins, tie-2, and vascular endothelial growth factor messenger ribonucleic acid. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:4302-4309
50. Endo T et al. Cyclic changes in expression of mRNA of vascular endothelial growth factor, its receptors Flt-1 and KDR/Flk-1, and Ets-1 in human corpora lutea. *Fertil Steril* 2001;76:762-768
51. Apa R et al. 2005 Effect of Insulin-like Growth Factor (IGF)-I and -II on Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in human luteal cells. 12 ed.
52. Strauss III JF and Williams CJ. chapter 8, Yen and Jaffès *Reproductive Endocrinology*, 5th Edition, 2004
53. Stouffer RL. Progesterone as a mediator of gonadotrophin action in the corpus luteum: beyond steroidogenesis, *Hum Reprod Update* 2003;9:99-117
54. Lobo, RA. The role of progestins in hormone replacement therapy. *Am J Obstet Gynecol* 1992;166:1997-2004.
55. Navot D et al. Artificially induced endometrial cycles and establishment of pregnancies in the absence of ovaries. *N Engl J Med* 1986;314:806-811.
56. Bulletti C et al. Electromechanical activities of human uteri during extra-corporeal perfusion with ovarian steroids. *Hum Reprod* 1993;8:1558-1563
57. Choi BC et al. Progesterone inhibits in vitro embryotoxic Th1 cytokine production to trophoblast in women with recurrent pregnancy loss. *Hum Reprod* 2000;15(Suppl. 1):46-59
58. Wen-ge Ma et al. Estrogen is a critical determinant that specifies the duration of the window of uterine receptivity for implantation. *PNAS* 2003;100:2963-2968
59. Jones GES. Some newer aspects of the management of infertility. *JAMA* 1949; 141:1123-1129
60. Souler MR et al. Morphological and endocrinological studies on follicular development during the human menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 1989;69:813-820
61. Lake JK et al. Women's reproductive health: the role of body mass index in early and adult life. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1997;21:432-438.
62. Rich-Edwards JW et al. Adolescent body mass index and infertility caused by ovulatory disorder. *Am J Obstet Gynecol* 1994;171:171-177
63. De Souza MJ. Menstrual disturbances in athletes: a focus on luteal phase defects. *Med Sci Sports Exerc* 2003 ;35:1553-1563
64. De Souza MJ et al. High frequency of luteal phase deficiency and anovulation in recreational women runners: Blunted elevation in follicle stimulating hormone observed during luteal follicular transition. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:4220-4232
65. Xiao E et al. Stress and the menstrual cycle: short- and long-term response to a five-day endotoxin challenge during the luteal phase in the rhesus monkey. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:2232-2237
66. McNatty KP et al. Changes in the concentration of pituitary and steroid hormones in the follicular fluid of human graafian follicles throughout the menstrual cycle. *J Endocrinol* 1975;64:555-571
67. Alila HW et al. Effects of prolactin on steroidogenesis by human cells in culture. *Fertil Steril* 1987;47:947-955
68. Wang C et al. Prolactin inhibition of estrogen production by cultured rat granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol*. 1980;20:135-144
69. Dorrington JH and Goer Langton RE. Antigonadal action of prolactin. *Endocrinology* 1982;110:1701-1707
70. Uilenbroek JT et al. A possible direct effect of prolactin on follicular activity. *Biol Reprod* 1982;27:1119-1125
71. Wang C and Chang V, Divergent effects of prolactin on estrogen and progesterone production by granulosa cells of rat Graafian follicles. *Endocrinology* 1982;110:1085-1093
72. Uilenbroek JT and van der Linden R, Effects of prolactin on follicular oestradiol production in the rat. *J Endocrinol* 1984;102:245-250
73. Kalison B et al. Contrasting effects of prolactin on luteal and follicular steroidogenesis. *J Endocrinol* 1985;104:241-250
74. Fortune JE. Bovine theca and granulosa cells interact to promote androgen production. *Biol Reprod* 1986;35:292-299
75. Adashi EY and Resnick CE. 11 β -hydroxylase deficiency in hyperandrogenism. *Fertil Steril* 1987;48:131-139
76. Demura R et al. Prolactin Directly Inhibits Basal as well as Gonadotropin-Stimulated Secretion of Progesterone and 17 β -Estradiol in the Human Ovary. *J Clin Endocrinol Metab* 1982;54:1246-1250
77. Arafah BM et al. Immediate recovery of pituitary function after transsphenoidal resection of pituitary macroadenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 1981;52:91-94
78. Crouch AM et al. Obesity and oligomenorrhea are associated with hyperandrogenism independent of hirsutism. *J Clin Endocrinol Metab* 1976;43:1398-1401
79. Simon JA et al. Effects of Prolactin and Estrogen Deficiency in Amenorrhic Bone Loss. *J Clin Endocrinol Metab* 1988;66:811-814
80. Reinhalle A et al. Effect of Prolactin on the Expression of Luteinizing Hormone Receptors during Cell Differentiation in Cultured Rat Granulosa Cells. *Fertil Steril* 1988;49:432-436
81. Asa SL and Ezzat S. The pathogenesis of pituitary tumours. *Nat Rev Cancer* 2002; 2:836-849
82. Molitch ME. Medical management of prolactin-secreting pituitary adenomas. *Pituitary* 2002;5:55-65

83. Bevan JS et al. Dopamine agonists and pituitary tumor shrinkage. *Endocr Rev* 1992;13:220-240
84. Jaber M et al. Dopamine receptors and brain function. *Neuropharmacology* 1996;35:1503-1519
85. Schlechte J et al. The natural history of untreated hyperprolactinemia: a prospective analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 1989; 68:412-418
86. Serri O et al. Diagnosis and management of hyperprolactinemia. *CMAJ* 2003; 169:575-581
87. Meuris et al. Immunocytochemical localization of prolactin-like immunoreactivity in rat pancreatic islets. *Endocrinology* 1983;112:2221-2223
88. Verhelst J and Abs R. Hyperprolactinemia: pathophysiology and management. *Treat Endocrinol* 2003;2:23-32
89. Schlechte J. Prolactinoma. *N Engl J Med* 2003;349:2035-2041
90. Molitch ME. Medical management of prolactin-secreting pituitary adenomas. *Pituitary* 2002;5:55-65
91. Bevan JS et al. Dopamine agonists and pituitary tumor shrinkage. *Endocr Rev* 1992;13:220-240
92. Fioretti P et al. 1983 International Symposium on Therapy of Reproductive Disorders with dopaminergic drugs (edited by Fioretti and Melis), Excerpta Medica
93. Luisi S et al. Inhibins in female and male reproductive physiology: role in gametogenesis, conception, implantation and early pregnancy. *Human Repr Update* 2005;11:123-135
94. Schneyer AL et al. Dynamic changes in the intrafollicular inhibin/activin/follistatin axis during human follicular development: relationship to circulating hormone concentrations. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:3319-3330
95. Reis FM et al. High concentrations of inhibin A and inhibin B in ovarian serous cystadenoma: relationship with oestradiol and nitric oxide metabolites. *Mol Hum Reprod* 2000;6:1079-1083
96. Sehested A et al. Serum Inhibin A and Inhibin B in healthy prepubertal, pubertal, and adolescent girls and adult women: relation to age, stage of puberty, menstrual cycle, Follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, and estradiol levels. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:1634-1640
97. Kline J et al. Predictors of antral follicle count during the reproductive years. *Hum Reprod* 2005;20:2179-2189
98. Danforth DR et al. Dimeric inhibin: a direct marker of ovarian aging. *Fertil Steril* 1998;70:119-123
99. Petraglia F et al. Low levels of serum inhibin A and inhibin B in women with hypergonadotropic amenorrhea and evidence of high levels of activin A in women with hypothalamic amenorrhea. *Fertil Steril* 1998;70:907-912
100. Seifer DB et al. Day 3 serum inhibin-B is predictive of assisted reproductive technologies outcome. *Fertil Steril* 1997;67:110-114
101. Hendriks DJ et al. Repeated clomiphene citrate challenge testing in the prediction of outcome in IVF: a comparison with basal markers for ovarian reserve. *Hum Reprod* 2005;20:163-169
102. Eldar-Geva T et al. Relationship between serum inhibin A and B and ovarian follicle development after a daily fixed dose administration of recombinant follicle-stimulating hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:607-613
103. Creus M et al. Day 3 serum inhibin B and FSH and age as predictors of assisted reproduction treatment outcome. *Hum Reprod* 2000;15:2341-2346
104. Santoro N et al. Impaired folliculogenesis and ovulation in older reproductive aged women. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:5502-5509
105. Kupesic S and Kurjak A. The assessment of normal and abnormal luteal function by transvaginal color Doppler sonography. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1997;72:83-87
106. Miyazaki T et al. Three-dimensional ultrasonography in the first trimester of human pregnancy. *Hum Reprod* 1998;13:2836-2841
107. Ottander U et al. Intraovarian blood flow measured with color Doppler ultrasonography inversely correlates with vascular density in the human corpus luteum of the menstrual cycle. *Fertil Steril* 2004;81:154-159
108. Tamura H et al. RJ Melatonin and the ovary: Physiological and pathophysiological implications. *Fertil Steril* 2008;90:2334-2339
109. Alcazar JL et al. Corpus luteum blood flow in abnormal early pregnancy. *J Ultrasound Med* 1996;15:645-649
110. Bourne TH et al. Ultrasound studies of vascular and morphologic changes in the human corpus luteum during the menstrual cycle. *Fertil Steril* 1996;65:753-758
111. Glock JL and Brumsted JR. Prognostic significance of morphologic changes of the corpus luteum by transvaginal ultrasound in early pregnancy monitoring. *Fertil Steril* 1996;64:500-504
112. Kalogirou D et al. Transvaginal Doppler ultrasound with color flow imaging in the diagnosis of luteal phase defect (LPD). *Clin Exp Obstet Gynecol* 1997;24:95-97
113. Merce LT et al. Ultrasound markers of implantation. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2001;18:505-510
114. Jain KA. Sonographic spectrum of hemorrhagic ovarian cysts. *J Ultrasound Med* 2002;21:879-886
115. Lessey BA et al. Use of integrins to date the endometrium. *Fertil Steril* 2000;73:779-787