

L'esaurimento della funzione ovarica: quando e come indagarla

A. Di Sabatino¹, MC Musacchio¹, R. Orvieto², V. De Leo¹, F. Petraglia¹, G. Morgante¹

¹DIPARTIMENTO DI PEDIATRIA, OSTETRICIA E MEDICINA DELLA RIPRODUZIONE, UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SIENA

²DEPARTMENT OF OBSTETRICS AND GYNECOLOGY, BARZILAI MEDICAL CENTER, ASHKELON, AND BEN GURION UNIVERSITY SCHOOL OF MEDICINE, BEER SHEVA, ISRAEL.

INTRODUZIONE

È ormai noto da tempo che la fertilità femminile diminuisce all'aumentare dell'età. I cambiamenti sociali, come la disponibilità di metodi contraccettivi a partire dagli anni '60 insieme alla crescita economica che ha permesso alle donne una maggiore partecipazione al mondo del lavoro, hanno portato a posticipare l'età della prima gravidanza. Di conseguenza, c'è una proporzione crescente di donne che non riesce a concepire dopo un anno di rapporti non protetti (condizione definita come sterilità) portando le coppie a ricorrere sempre più alle tecniche di procreazione medicalmente assistita (PMA).

La probabilità di non concepire nell'arco di 12 mesi è <5% nelle donne nelle terza decade, mentre sale a circa il 30% in donne sopra i 35 anni e aumenta al 30-50% per le donne che hanno più di 35 anni e che sono in cerca di una gravidanza da ormai molti anni [1].

Il normale processo di invecchiamento riproduttivo varia in modo considerevole nella popolazione femminile, infatti alcune donne possono rimanere fertili fino alla 5° decade di vita, mentre altre affrontano la perdita della naturale fertilità già verso i 35 anni. Questo processo appare determinato dalla graduale diminuzione della quantità e della qualità degli ovociti presenti nei follicoli della corticale ovarica.

È risaputo che ogni donna riceve un patrimonio di follicoli durante la vita fetale. Al quarto mese di sviluppo intrauterino, le ovaie contengono circa 6-7 milioni di ovociti, costituiti da follicoli primordiali; di questi alla nascita, in seguito ad un processo di apoptosi, ne rimarranno solo 1-2 milioni. Durante l'infanzia, la percentuale di follicoli gradualmente si riduce al punto che, al momento del menarca raggiunge la quantità di 300.000-400.000 circa; mentre durante l'età riproduttiva, il declino numerico dei follicoli primordiali segue un modello bifasico: fino a 37 anni di età la deplezione mantiene un ritmo stabile di circa 1.000 follicoli al mese, poi si ha una distinta accelerazione fino alla menopausa, quando il numero dei follicoli residui è inferiore a 1.000 [2].

Con la diminuzione del pool follicolare, anche la qualità oocitaria affronta il suo declino (almeno dopo l'età di 31 anni quando la fertilità diminuisce gradualmente). Si ritiene che la perdita della qualità oocitaria sia dovuta ad un aumento delle non-disgiunzioni meiotiche, che determinano l'aumento del

tasso di aneuploidie nell'embrione in donne con età riproduttiva avanzata [3-5]. Altri meccanismi potrebbero coinvolgere le differenze tra le cellule germinali al momento della loro formazione durante la vita fetale, danni all'ovocita accumulatisi durante la vita della donna o cambiamenti correlati all'età nella qualità della cellule della granulosa che circondano l'ovocita [6,7].

Anche altri fattori, sebbene di minore importanza, sembrano essere coinvolti nella riduzione della fertilità, come l'invecchiamento del tratto riproduttivo e in particolare dell'utero. È stata riportata in letteratura [8] un'alta incidenza di insufficienza della fase luteale agli estremi dell'età riproduttiva. Nello studio di una coppia infertile, inoltre, la frequenza dei rapporti sessuali e l'età del partner maschile assumono altresì un ruolo predittivo [9].

Durante la terza e quarta decade di vita il processo di invecchiamento ovarico rimane per la maggior parte inosservato, infatti è ancora presente una regolarità dei cicli, malgrado siano in atto profondi cambiamenti nel numero e nella qualità dei follicoli. Il primo segno clinico dell'invecchiamento riproduttivo è infatti l'accorciamento della durata del ciclo mestruale di 2-3 giorni come conseguenza dell'accorciamento della fase follicolare a seguito della rapida selezione e maturazione del follicolo dominante. Tale condizione è considerata una diretta conseguenza degli alti livelli plasmatici di ormone follicolo-stimolante (FSH) ed è resa evidente dalla riduzione dei livelli circolanti di inibina B quale espressione di una riduzione del numero dei follicoli pre-antrali.

Studi sulla popolazione hanno dimostrato che la naturale perdita di fertilità (rappresentata dall'età a cui si è avuto l'ultimo figlio senza restrizioni sulla riproduzione) avviene già in media a 41 anni [10] con un range tra i 23-51 anni [11].

Quindi, è solo quando la caduta del numero dei follicoli porta ad irregolarità mestruali che le donne notano per la prima volta i segni della perdita della fertilità e l'inizio della transizione menopausale, la cui insorgenza si ha solitamente ad un'età media di 46 anni (range 34-54 anni), circa 5 anni prima della menopausa. Quest'ultima, rappresenta il quasi esaurimento del pool follicolare e avviene circa all'età di 51 anni con un range di 40-60 anni, ma talvolta può insorgere anche in donne più giovani (menopausa precoce). La variazione dell'età della menopausa è molto simile nella popolazione e segue una di-

istribuzione Gaussiana con alcune asimmetrie verso le età più giovani [12].

La vera difficoltà nel gestire questa condizione naturale di graduale esaurimento della funzione ovarica e, pertanto, della capacità riproduttiva della donna è da riferire all'assenza di un segnale clinico esterno o di un marker di ridotta o assente fertilità, sebbene la risposta ovarica attualmente abbia un significato prognostico attendibile.

La riserva ovarica viene considerata e attualmente indagata soprattutto in funzione del trattamento delle coppie infertili, ma anche nelle situazioni di riduzione del potenziale riproduttivo di una donna non correlate all'età ma a condizioni patologiche specifiche, quali le malattie neoplastiche.

È semplice comprendere quanto sia importante riuscire ad avere la previsione della reale funzione ovarica di una donna, che consenta al ginecologo di programmare un trattamento o di escludere di avere una gravidanza anche mediante tecniche di PMA. Infatti la probabilità di impianto di un embrione dopo tecniche di fecondazione in vitro (IVF) dipende dallo stato della funzione ovarica della donna; una scarsa risposta alla stimolazione, soprattutto in donne con un test di riserva ovarica anormale, è fortemente premonitrice di poche possibilità di ottenere una gravidanza [13, 14].

Ad oggi, il test per valutare l'esaurimento della funzione ovarica dovrebbe essere in grado di indicare la capacità potenziale di procreazione e il tempo residuo rimanente prima dell'interruzione del processo di follicolo genesi; inoltre, se applicato in particolare a donne che ricorrono a tecniche PMA, il test dovrebbe fornire informazioni sulla reale possibilità di concepire (con o senza trattamento) e portare a termine la gravidanza e sulla quantità di gonadotropine necessaria ad ottenere una buona risposta ovarica in relazione al tipo di tecnica che si intende utilizzare. Risulta, infatti, quanto mai attuale la necessità di individuare un marker di semplice interpretazione, applicabile sia a donna che intendono sottoporsi a tecniche PMA sia alla popolazione fertile in generale. In letteratura si ritrovano numerosi test di riserva ovarica che sono stati proposti nel corso degli anni, per cui è oggi possibile distinguere diverse categorie di test: statici, ecografici e dinamici.

TEST STATICI

Dosaggio dell'ormone follicolo-stimolante

Il dosaggio del livello ematico di FSH eseguito il 3° giorno del ciclo mestruale è l'indice di riserva ovarica più utilizzato attualmente, rappresentando una misura indiretta del numero dei follicoli. Molti studi indicano che l'FSH abbia un valore predittivo se dosato in una popolazione di donne ad alto rischio come quelle che età > 40 anni, con una scarsa risposta dopo stimolazione ovarica e precedenti cicli PMA falliti [15]. Perché quest'ormone abbia un valore predittivo di riserva ovarica, va dosato nel ciclo precedente a quello dell'induzione dell'ovulazione. Il singolo dosaggio in terzo giorno del ciclo mestruale dell'FSH non rappresenta un dato assoluto di riserva ovarica. In realtà, se i valori dovessero risultare molto elevati, andrebbe ridosato al ciclo successivo; le fluttuazioni del suo valore lungo i diversi cicli mestruali, tuttavia, rappresenta ancora un aspetto controverso. Va inoltre tenuto conto che non tutti i laboratori usano gli stessi kit per misurare l'FSH e queste differenze andrebbero prese in considerazione quando si para-

gonano dati provenienti da più centri. Il dosaggio dell'FSH, se combinato ad altri dati come l'età e la conta dei follicoli antrali, potrebbe essere utile nel counselling di donne che rispondono poco alla stimolazione ovarica.

Attualmente, il valore limite di FSH, al di sotto del quale è ancora possibile considerare una certa quota di riserva ovarica, è 20 IU/ml. In letteratura però sono presenti dati contrastanti. In uno studio effettuato su 212 pazienti sottoposte a cicli FIVET, si è visto che donne con FSH \geq 15 IU/ml avevano meno ovociti aspirati e un numero maggiore di cicli cancellati rispetto a donne con livelli più bassi [16]. Anche una meta-analisi del 2006 ha riscontrato che l'FSH basale di donne normo-ovulatorie ha un buon valore predittivo di scarsa risposta solo a livelli molto elevati [17].

Al contrario, un altro studio ha riscontrato che la probabilità di ottenere una gravidanza era due volte superiore in un gruppo di donne con valori di FSH inferiori a 15 IU/l rispetto ad un altro con valori compresi tra 15 e 24,9 IU/l, entrambi sottoposti a PMA [18]; questo risultato, confermato anche da studi successivi [19; 20], potrebbe suggerire l'uso di tale valore come cut-off per questo marker di riserva ovarica.

Uno studio di Letterie et al, inoltre, ha evidenziato come le differenti isoforme molecolari di FSH siano il risultato di un processo di glicosilazione che è sotto l'influenza delle variazioni ormonali che si verificano in seguito al ciclo e all'età della paziente. Dopo separazione cromatografica delle isoforme di FSH, gli autori hanno riscontrato una differenza significativa nel range di tra le pazienti poor e normal responder ad un precedente ciclo di stimolazione con gonadotropine. Su questa base, hanno formulato l'ipotesi che le concentrazioni di alcune isoforme di FSH possano interferire in maniera differente con la dinamica follicolare e ridurre la qualità ovocitaria [21].

Perciò anche se l'FSH basale è il marker di riserva ovarica più utilizzato, si sta ponendo l'attenzione ad altri markers come l'inibina B, AMH, AFC e volume ovarico.

Dosaggio dell'estradiolo

Il valore dell'estradiolo basale al terzo giorno del ciclo mestruale, come predittivo di riserva ovarica, è tutt'ora dibattuto. In uno studio iniziale era stato riscontrato che valori di E2 > 60 pg/ml, in associazione a valori normali di FSH, erano in grado di predire un più alto tasso di cancellazione e un minor numero di ovociti aspirati rispetto a livelli più bassi, portando alla conclusione che il dosaggio dell'E2 potesse essere un importante fattore prognostico [22]. Molti altri studi, comunque, non sono riusciti a dimostrare l'applicabilità clinica dell'E2 serico come predittivo di riserva ovarica, e anche studi favorevoli al suo utilizzo per questo scopo non sono stati in grado di dimostrare una correlazione significativa con lo sviluppo follicolare o nel predire l'instaurarsi della gravidanza [23]. È stato anche recentemente dimostrato che i livelli basali di E2 non differiscono in maniera significativa tra pazienti con bassa o normale risposta a cicli PMA [24]. Attualmente non sono disponibili dati riguardo la correlazione tra il valore dell'E2 al terzo giorno e fertilità in cicli spontanei. Dalla nostra esperienza clinica il livello di E2 assume un importante ruolo prognostico se correlato all'FSH: elevati livelli di E2 in associazione ad alti livelli di FSH depongono per una compromessa riserva ovarica ed una scarsa risposta ovarica ad un'eventuale stimolazione per cicli di PMA.

Dosaggio dell'inibina B

L'inibina B è l'ormone prodotto principalmente dalle cellule della granulosa nei follicoli in crescita ed il suo andamento durante il ciclo fa pensare che possa avere un ruolo nello sviluppo follicolare, in quanto offre un quadro immediato della funzione ovarica e della riserva follicolare. Questo marker, può essere un buon indice di riserva ovarica poichè i suoi valori fluttuano durante il ciclo mestruale e risultano significativamente ridotti nelle donne di età superiore a 35 anni. Inoltre, studi longitudinali hanno dimostrato che, sebbene una diminuzione dei livelli inibina B al 3 giorno preceda l'innalzamento dei livelli di FSH nella fase follicolare precoce in pazienti poor responders, quest'ormone correla con l'età solo durante un periodo relativamente breve periodo prima della transizione menopausale [25]. Inoltre i livelli serici di inibina B si abbassano a livelli molto bassi o non rilevabili circa 4 anni prima dell'ultimo ciclo mestruale [26].

Alcuni studi hanno osservato che, quando al terzo giorno del ciclo i valori di inibina B sono minori di 45 pg/ml, la risposta alla stimolazione ovarica nei trattamenti di PMA è ridotta e la percentuale di gravidanza è significativamente più bassa rispetto alle donne con valori di inibina B al terzo giorno maggiori o uguali a 45 pg/ml, in cui sono stati riscontrati valori di estrogeni più elevati e un maggior numero di ovociti [27; 28].

Altri autori, comunque, non hanno prodotto risultati favorevoli all'uso dell'inibina B come marker di riserva ovarica, che quindi necessita di ulteriori approfondimenti.

Dosaggio dell'ormone anti-Mulleriano

Recentemente, l'ormone anti-Mulleriano è stato introdotto nella pratica clinica come nuovo marker di riserva ovarica. L'AMH è una proteina dimerica prodotta dalle cellule della granulosa dei follicoli antrali e pre-antrali, regola la crescita e lo sviluppo dei follicoli ovarici ed è considerato l'indice per eccellenza del reclutamento follicolare [25]. L'arrivo dell'AMH come strumento di screening è relativamente recente, ma presenta vari vantaggi rispetto alla metodiche precedenti. Innanzitutto, sembra che quest'ormone sia il primo marker a cambiare in seguito all'avanzare dell'età e che quindi sia in grado di identificare la diminuzione della funzione ovarica prima delle tecniche tradizionali. Studi longitudinali, infatti, hanno riscontrato che le concentrazioni seriche di AMH, se valutate in donne giovani normo-ovulatorie, diminuiscono nel tempo, mentre altri markers associati all'invecchiamento ovarico non si modificano affatto [29; 25]. È stato notato che i livelli sierici di AMH, testati in un gruppo di 41 donne in due tempi con un intervallo di circa $2,6 \pm 1,7$ anni, diminuiscono in maniera significativa, evidenziando una correlazione negativa tra l'età e i livelli di AMH. Inoltre è stata dimostrata una forte correlazione ($r=0.66$ e $r=0.71$ rispettivamente per il primo e il secondo campione) con l'AFC [30]. A differenza dell'FSH, l'AMH non necessita di un giorno particolare del ciclo in cui essere misurato, in quanto ha una ridotta variabilità nelle sue concentrazioni attraverso il ciclo e tra i vari cicli. Usando un saggio immuno-enzimatico (ELISA) Elgindy et al hanno individuato valori medi di 1.4 ± 1.1 ng/ml, 1.43 ± 1.08 mg/ml e 1.35 ± 1.02 ng/ml rispettivamente in fase follicolare, ovulatoria e luteale [31], corroborando i risultati di studi precedenti e confermando l'assenza di effetto di FSH e LH sulla produzione di AMH.

Allo stesso modo Tsepelidis et al hanno ottenuto valori medi di 2.4 ± 1.1 ng/ml lungo tutto il ciclo mestruale in donne normo-ovulatorie [32]. La riproducibilità tra i cicli è stata dimostrata da Fanchin, che ha studiato l'andamento dell'AMH in donne subfertili di età compresa tra i 20 e i 40 anni e ha dimostrato minori variazioni nei livelli serici tra cicli consecutivi rispetto a quelli riscontrati con l'FSH, l'inibina B e l'estradiolo, in aggiunta all'AFC. In questo studio è stata riscontrata una correlazione positiva tra la risposta all'induzione dell'ovulazione e l'iniziale AFC, ma questo marker è risultato essere più suscettibile alle variazioni tra i cicli [33]. Dal momento che i GnRH non hanno effetto sui livelli di AMH, questo può essere misurato attraverso il ciclo in pazienti pretrattati con questi medicinali.

Studi recenti hanno orientativamente indicato valori di riferimento per l'ormone anti-Mulleriano. Tremellen et al hanno costruito una curva per l'AMH e hanno dimostrato che l'ormone diminuisce dopo i 30 anni di età, un fatto non osservato con la stessa intensità per l'FSH, che aumenta in maniera più subdola. Hanno anche riscontrato una significativa differenza nei livelli medi di AMH tra le poor e good responders (≤ 4 e ≥ 8 di ovociti aspirati rispettivamente). Valutando il valore predittivo della scarsa risposta, gli autori hanno riscontrato 80% sensibilità e 85% specificità, con valori predittivo positivo e negativo di 67% e 92% rispettivamente, per un cut-off di 8,1 pmol/L e concludono che l'AMH è più sensibile rispetto ad altri marker [34]. Considerando invece come cut-off il valore di 0.25 pg/ml, la sensibilità dell'AMH è del 98% e la specificità è del 90.9% con un valore predittivo positivo e negativo rispettivamente di 96,8% e 76.9% [24]. La Marca et al ha ratificato l'uso dell'AMH come predittore di scarsa risposta dimostrando l'80% di sensibilità e il 93 % di specificità in cicli PMA quando è considerata una soglia di 0,75 ng/ml [35]. La stessa conclusione è stata raggiunta con soglie più elevate [36]. Attualmente l'unico limite all'impiego dell'AMH nella valutazione routinaria della riserva ovarica in donne da sottoporre a PMA è la mancanza effettiva di valori di riferimento e di cut-off standardizzati, anche eventualmente associati sia alla conta follicolare che ad altri marker, come l'FSH basale.

TEST ECOGRAFICI

Conta dei follicoli antrali

Negli ultimi tempi, l'attenzione è stata rivolta ad altri possibili markers di riserva ovarica, da considerare isolatamente o in associazione agli altri.

Numerosi autori hanno associato un minore numero di follicoli all'invecchiamento ovarico [37; 25]. La conta dei follicoli antrali all'ecografia prima dello stimolo esogeno con gonadotropine è considerato essere un buon predittore di risposta ai cicli PMA, riflettendo il patrimonio follicolare ovarico. Uno studio prospettico che valutava 120 candidate per il primo ciclo di IVF ha concluso che l'AFC è il marker basale di riserva ovarica più affidabile nel predire la scarsa risposta [38]. Dato confermato da una successiva meta analisi sulla capacità dell'AFC di predire l'outcome dei programmi di fertilizzazione in vitro ha dimostrato che l'AFC risulta quasi più accurato e meglio realizzabile rispetto al dosaggio dell'FSH basale [39].

Scheffer et al hanno valutato i markers di riserva ovarica e hanno riscontrato la superiorità dell'AFC (diametro 2-10mm) paragonandolo sia ai markers biochimici come l'E2, l'inibina

B e FSH, che al volume ovarico, sebbene un forte correlazione sia stabilita tra tutti questi [40]. Secondo un altro studio l'AFC può identificare l'89% dei pazienti che sono poor responders prima dell'induzione dell'ovulazione con gn esogene e, malgrado un bassa specificità del 39%, gli autori hanno rilevato una associazione significativa con il numero di ovociti ottenuti e la probabilità di un gravidanza biochimica [41]. Sebbene il suo valore non sia universalmente riconosciuto, alcuni studi hanno dimostrato correlazioni significative con i classici markers usati [42] e l'AMH, con differenze significative in donne con una risposta normale e quelle con scarsa risposta alla stimolo con gonadotropine. In un studio, in cui è stato considerato l'AFC fino a 10 mm di diametro, sono state riscontrate differenze significative tra i due gruppi (rispettivamente 10.1 ± 3 e 5.7 ± 1.0) [17]. Una particolare attenzione va posta ai piccoli follicoli antrali, i quali, come l'AFC totale, si è visto che diminuiscono significativamente di numero con l'aumentare dell'età, mentre il pool dei follicoli più grandi rimane praticamente immutato fino a circa 45 anni [42]. Klinkert et al hanno dimostrato che la frequenza di una risposta normale alla stimolazione era significativamente più elevata nelle pazienti con $AFC \geq 5$ U con un diametro di 5 mm o inferiore, e era associata un tasso di gravidanza più alto [43]. Anche un altro studio ha evidenziato una correlazione significativa dei follicoli con diametro fino a 6 mm con tutti i test endocrini di riserva ovarica, in contrasto con quello che si rilevava con i follicoli più grandi, che correlavano solo con il volume ovarico e l'inibina B [42].

Gli svantaggi dell'AFC comprendono il fatto che è un esame operatore dipendente ed può subire variazioni da un ciclo ad un altro; inoltre va considerato che offre informazioni sul numero dei follicoli e non di ovociti, né sulla loro qualità, che è invece più direttamente correlata all'outcome della gravidanza. In realtà, questo dato assume valore se associato ad informazioni riguardanti anche il volume ovarico; sembra, infatti, che una somma del volume delle due ovaie superiore a 6 cm³ e la somma dei follicoli antrali ≥ 7 rappresenti un ottimo indice di riserva ovarica [44]. Alcuni studi, tuttavia, considerano comunque la conta follicolare come il test di prima scelta nello studio rivolto ad accertare una diminuita riserva ovarica [45].

Misurazione del volume ovarico

La misurazione ecografica del volume ovarico è considerata un buon marker predittivo nei confronti di infertilità, così come un precoce e specifico indicatore dell'invecchiamento ovarico; uno studio trasversale ha infatti evidenziato che il volume ovarico inizia a diminuire con l'età, ma non prima dei 35 anni [46]. In una recente review è stato riscontrato che questo marker ha uno scarso valore predittivo di risposta alla stimolazione per IVF [17]. Comunque in letteratura sono presenti dati contrastanti. Mentre alcuni studi dimostrano la presenza di una correlazione tra la riduzione delle misure ovariche, l'aumento dell'età e gli elevati livelli di FSH [47], altri non rilevano differenze significative in donne sopra i 37 anni con una normale o scarsa risposta alla stimolazione ovarica (valori medi di 4.1 0.66 e 3.36 0.71, rispettivamente) [31]. Inoltre vari studi hanno dimostrato che l'AFC e l'AMH superano la misurazione del volume ovarico nel predire la risposta dopo iperstimolazione per IVF [48,44]. Non di meno, il volume ovarico può avere un valore predittivo positivo se associato al dosaggio dell'FSH basale o all'AFC.

TEST DINAMICI

Consistono nel testare determinati markers nel plasma di una donna prima e dopo stimolazione con clomifene/FSH/ gonadotropine. Tutti i test dinamici sono molto costosi, invasivi ed associati ad effetti avversi.

Test di stimolazione con il clomifene citrato (CCCT)

Il test di stimolazione con clomifene citrato è stato uno dei primi metodi utilizzati per valutare la funzione ovarica. Questo test consiste nella somministrazione di 100 mg del clomifene citrato nei giorni 5-9 e nella misurazione dei livelli basali (giorni 2-3) di FSH, LH e E2 e poi nei giorni 9-11. Una risposta anormale è data da un incremento significativo dell'FSH nei giorni 9-11.

La fisiologica spiegazione del test si basa sulla proprietà del clomifene di antagonizzare i recettori per gli estrogeni a livello ipofisario, simulando una temporanea deplezione estrogenica, con un incremento compensatorio dell'FSH e dei follicoli. Nei pazienti con una buona riserva ovarica il reclutamento dovrebbe avvenire con successo producendo E2 e riducendo di nuovo i livelli di FSH, mentre nelle pazienti con riserva ovarica compromessa, il reclutamento follicolare dovrebbe fallire malgrado l'elevazione dell'FSH, con una minore produzione di E2 e una più lenta riduzione dell'FSH.

Comunque, è stato visto che questo test non è migliore del semplice dosaggio dell'FSH nel predire una scarsa risposta o una gravidanza [49] e, come per altri markers di riserva ovarica, al momento le opinioni riguardo il suo uso sono controverse.

Test di stimolazione con l'FSH esogeno (EFORT)

Prevede la somministrazione di 300 UI di FSH al terzo giorno del ciclo e il dosaggio dell'FSH basale, dell'E2 e dell'inibina B e della risposta 24 ore dopo dell'E2 e dell'inibina B. Un esito positivo dovrebbe significare una buona risposta alla stimolazione ovarica.

In un primo studio è stato riscontrato che i livelli di E2 e inibina B dopo EFORT hanno un valore predittivo per il numero dei follicoli ottenuti dopo stimolazione migliore rispetto al CCCT, che non si è dimostrato superiore ai dosaggi ormonali basali [50]. In seguito è stato valutato l'EFORT anche in relazione alla predizione della scarsa risposta ovarica ed è stato visto che la sensibilità, in donne di età tra i 18 e i 39 anni, era buona con un'area sotto la curva di 0.86 [51]. Attualmente comunque sono necessari ulteriori studi per decretare questa stimolazione come un test per valutare la riserva ovarica.

Test di stimolazione con i GnRH agonisti (GAST)

Questo test valuta il cambiamento delle concentrazioni plasmatiche dell'E2 nei giorni 2 e 3 dopo la somministrazione di una dose sopra fisiologica degli agonisti del GnRH. Un rapido incremento dei livelli plasmatici dell'E2 è associato ad una buona risposta ovarica. Comunque l'uso di GAST come test per valutare la funzione ovarica è ancora in discussione. In uno studio del 2005 era stato visto che, in 57 donne candidate per IVF, il test non era superiore al dosaggio dell'inibina B o all'AFC, indicando la necessità di ulteriori ricerche [39]. Inoltre l'uso del GAST comporta elevati costi e i rischi correlati ad una stimolazione esogena, senza il reale intento di cercare una gravidanza.

Mentre CCT è stato già ampiamente testato sia su una popolazione di donne sottoposte a programmi di PMA che in una di donne normalmente fertili, l'EFORT e il GAST non sono mai studiati al di fuori dalla popolazione di donne sottoposte a PMA; i risultati, pertanto, non possono essere estrapolati ed usati per predire il potenziale di fertilità nella popolazione generale.

CONCLUSIONI

I test attualmente a disposizione per la valutazione della riserva ovarica non hanno ancora raggiunto un sicuro potere predittivo tale da giustificare l'uso routinario nella pratica clinica. Quasi tutti test riescono a fornire un dato quantitativo di riserva ovarica, ma nessuno garantisce informazioni precise sulla qualità degli ovociti; i campioni presi in esame per testare la loro validità, inoltre, sono stati quasi sempre prelevati da donne inserite in programmi di PMA e quindi non esiste un controllo su donne normalmente fertili. Questi test di riserva ovarica, poi, non sembrano fornire indicazioni predittive sulla possibilità di gravidanza dopo PMA e, pertanto, ad oggi, non rappresentano uno strumento prognostico sicuro. Nonostante siano stati pensati molti test per valutare l'invecchiamento biologico e funzionale dell'ovaio, non bisogna dimenticare che la riserva ovarica può modificarsi nel tempo e che tale modifica può essere causata da fattori sia infiammatori che autoimmuni.

Nei programmi di PMA è comunque fondamentale considerare che se gli indici di riserva ovarica risultano alterati, la percentuale di successo diminuisce ed è quindi corretto informare le pazienti prima che si sottopongano a programmi di stimolazione ovarica, delle scarse possibilità di ottenere una gravidanza. Prospettive future di ricerca sono rivolte all'analisi di fattori genetici coinvolti nella menopausa precoce e nel processo di invecchiamento riproduttivo, ma non è possibile prevedere quando sarà disponibile un test che dia informazioni certe sullo stato di salute riproduttiva e che ci possa far fare previsioni di durata. L'impatto dell'età sul tratto riproduttivo femminile è significativo. La fertilità inizia a declinare verso i 30 anni e si riduce drasticamente dopo i 35-40 anni, precedendo la menopausa definitiva di almeno 10 anni. È evidente che l'età della donna resta un fattore predittivo importante ed indipendente; compito del ginecologo è sicuramente quello di tenerne conto nella valutazione e nel counselling di una coppia infertile. La ricerca clinica deve proseguire i suoi studi al fine di individuare dei markers accurati e validi che permettano l'identificazione di quelle donne giovani che più facilmente potrebbero non rispondere ai trattamenti più adeguati alle donne di età più avanzata, nel rispetto di un buon equilibrio costo/beneficio in particolare per la donna che non venga sottoposta a cicli di stimolazione per PMA inutili.

{BIBLIOGRAFIA}

1. Evers JL. Female subfertility. *Lancet* 2002;360:151-159
2. Broekmans FJ, Knauff EAH, te Velde ER, Macklon NS, Fauser BC. Female reproductive ageing: current knowledge and future trends. *Trends Endocrinol Metab* 2007;18:58-65
3. Kuliev A, Cieslak J, Verlinsky Y. Frequency and distribution of chromosome abnormalities in human oocytes. *Cytogenet Genome Res* 2005;11:193-198
4. Pellestor F, Anahory T, Hamamah S. Effect of maternal age on the frequency of cytogenetic abnormalities in human oocytes. *Cytogenet Genome Res* 2005;111:206-212
5. Hunt PA, Hassold TJ. Human female meiosis: what makes a good egg go bad? *Trends Genet* 2008;24:86-93
6. te Velde ER, Pearson PL. 2002 The variability of female reproductive ageing. *Hum Reprod Update* 8:141-154
7. Warburton D. 2005 Biological aging and the etiology of aneuploidy. *Cytogenet Genome Res* 111:266-272
8. Ahmed Ebbiary NA, Lenton EA, Cooke ID. Hypothalamic-pituitary ageing: progressive increase in FSH and LH concentrations throughout the reproductive life in regularly menstruating women. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1994 Aug;41(2):199-206.
9. ESHRE Capri Workshop Group. Fertility and ageing. *Hum Reprod Update* 2005;3:261-276
10. Broekmans FJ, Faddy MJ, Scheffer G, te Velde ER. Antral follicle counts are related to age at natural fertility loss and age at menopause. *Menopause* 2004; 11:607-614
11. Bouchard G. Family reproduction in new rural areas: outline of a North American model. *Can Hist Rev* 1994;75:475-510
12. Lawlor DA, Ebrahim S, Smith GD. The association of socio-economic position across the life course and age at menopause: the British Women's Heart and Health Study. *BJOG* 2003; 110:1078-1087
13. Lawson, R. et al. Poor response to ovulation induction is a stronger predictor of early menopause than elevated basal FSH: a life table analysis. *Hum. Reprod.* 2003;18, 527-533
14. Klinkert, E.R. et al. A poor response in the first in vitro fertilization cycle is not necessarily related to a poor prognosis in subsequent cycles. *Fertil. Steril.* 2004;81, 1247-1253
15. Barnhart K, Osheroff J. We are overinterpreting the predictive value of serum follicle-stimulating hormones levels. *Fertil Steril* 1999;72:8-9
16. Ashrafi M, Madani T, Tehranian AS, Malekzadeh F. Follicle stimulating hormone as a predictor of ovarian response in women undergoing controlled ovarian hyperstimulation for IVF. *Int J Gynaecol Obstet* 2005;91:53-7.
17. Broekmans FJ, Kwee J, Hendriks DJ, Mol BW, Lambalk CB. A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome. *Hum Reprod Update* 2006;12:685-718.
18. Scott RT, Leonardi MR, Hofmann GE, Illions EH, Neal GS, Navot D. A prospective evaluation of clomiphene citrate challenge test screening of the general infertility population. *Obstet Gynecol* 1993;82(4, Part 1):539-44.

19. van der Steeg JW, Steures P, Eijkemans MJC, Habbema JDF, Hompes PGA, Broekmans FJ, et al. Predictive value and clinical impact of basal follicle-stimulating hormone in subfertile, ovulatory women. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:2163–8.
20. Luna M, Grunfeld L, Mukherjee T, Sandler B, Copperman AB. Moderately elevated levels of basal follicle-stimulating hormone in young patients predict low ovarian response, but should not be used to disqualify patients from attempting in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2007;87:782–7.
21. Letterie GS, Lee JS, Padmanabhan V. Assessment of ovarian reserve by using the follicle-stimulating hormone isoform distribution pattern to predict the outcome of in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2006;86:1547–9
22. Evers JL, Slaats P, Land JA, Dumoulin JC, Dunselman GA. Elevated levels of basal estradiol-17beta predict poor response in patients with normal basal levels of follicle-stimulating hormone undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1998;69:1010–4.
23. Frattarelli JL, Bergh PA, Drews MR, Sharara FI, Scott RT. Evaluation of basal estradiol levels in assisted reproductive technology cycles. *Fertil Steril* 2000;74:518–24.
24. Fiçicioglu C, Kutlu T, Baglam E, Bakacak Z. Early follicular antimüllerian hormone as an indicator of ovarian reserve. *Fertil Steril* 2006;85:592–6.
25. van Rooij JA, Broekmans FJ, Scheffer GJ, et al. Serum antimüllerian hormone levels best reflect the reproductive decline with age in normal women with proven fertility: a longitudinal study. *Fertil Steril* 2005;83:979–87.
26. Sowers MR, Eyvazzadeh AD, McConnell D, et al. Anti-müllerian hormone and inhibin B in the definition of ovarian aging and the menopause transition. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:3478–83
27. Seifer DB, Lambert Messerlian G, Hogan JW, Gardiner AC, Blazar AS, Berk CA. Day 3 serum inhibin-B is predictive of assisted reproductive technologies outcome. *Fertil Steril* 1997; 67:110–4.
28. Luisi S, Palumbo M, calonaci F et al. Serum inhibin B correlates with successful ovulation in infertile womwn. *J Assist Reprod Genet* 2003;20:241–247.
29. Themmen APN. Anti-Müllerian hormone: its role in follicular growth initiation and survival and as an ovarian reserve marker. *J Natl Cancer Inst.* 2005;34:18–21.
30. de Vet A, Laven JS, de Jong FH, ThemmenAP, Fauser BC. Antimüllerian hormone serum levels: a putativemarker for ovarian aging. *Fertil Steril* 2002;77:357–62.
31. Elgindy EA, El-Haieg DO, El-Sebaey A. Anti-Müllerian hormone: correlation of early follicular, ovulatory and midluteal levels with ovarian response and cycle outcome in intracytoplasmic sperm injection patients. *Fertil Steril* 2007;89:1670–6.
32. Tselipidis S, Devreker F, Demeestere I, Flahaut A, Gervy C, Englert Y. Stable serum levels of anti-Müllerian hormone during the menstrual cycle: a prospective study in normo-ovulatory women. *Hum Reprod* 2007;22:1837–40.
33. Fanchin R, Taieb J, Lozano DHM, Ducot B, Frydman R, Bouyer J. High reproducibility of serum anti-Müllerian hormone measurements suggests a multi-staged follicular secretion and strengthens its role in the assessment of ovarian follicular status. *Hum Reprod* 2005;20:923–7.
34. Tremellen KP, Kolo M, Gilmore A, Lekamge DN. Anti-Müllerian hormone as a marker of ovarian reserve. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2005;45:20–4.
35. La Marca A, Giulini S, Tirelli A, Bertucci E, Marsella T, Xella S, et al. Anti-Müllerian hormone measurement on any day of the menstrual cycle strongly predicts ovarian response in assisted reproductive technology. *Hum Reprod* 2007;22:766–71.
36. Gnoth C, Schuring AN, Friol K, Tigges J, Mallmann P, Godehardt E. Relevance of anti-Müllerian hormone measurement in a routine IVF program. *Hum Reprod* 2008;23:1359–65
37. Ng EH, Yeung WS, Fong DY et al. Effects on age on hormonal ultrasound markers of ovarian reserve in Chinese women with proven fertility. *Hum Reprod* 2003;18:2169–2174.
38. Bancsi LFJMM, Broekmans FJM, Eijkemans MJC, de Jong FH, Habbema JDF, te Velde ER. Predictors of poor ovarian response in in vitro fertilization: a prospective study comparing basal markers of ovarian reserve. *Fertil Steril* 2002;77:328–36.
39. Hendricks DJ, Mol BW, Bancsi LF et al. Antral follicle count in the prediction of poor ovarian response and pregnancy after in vitro fertilization: a meta-analysis and comparison with basal follicle-stimulating hormone level. *Fertil Steril* 2005;83:291–301.
40. Scheffer GJ, Broekmans FJM, Looman CWN, Blankenstein M, Fauser BCJM, de Jong FH, et al. The number of antral follicles in normal women with proven fertility is the best reflection of reproductive age. *Hum Reprod* 2003;18:700–6.
41. Muttukrishna S, McGarrigle H, Wakim R, Khadum I, Ranieri DM, Serhal P. Antral follicle count, anti-Müllerian hormone and inhibin B: predictors of ovarian response in assisted reproductive technology? *BJOG* 2005;112:1384–90.
42. Haadsma ML, Bukman A, Groen H, Roeloffzen EMA, Groenewoud ER, Heinema MJ, et al. The number of small antral follicles (2–6 mm) determines the outcome of endocrine ovarian reserve tests in a subfertile population. *Hum Reprod* 2007; 22:1925–31.
43. Klinkert ER, Broekmans FJ, Looman CW, Habbema JD, te Velde ER. The antral follicle count is a better marker than basal folliclestimulating hormone for the selection of older patients with acceptable pregnancy prospects after in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2005;83:811–4.
44. Hendriks DJ, Kwee J, Mol BW et al. Ultrasonography as a tool for the prediction of outcome in IVF patients: a comparative meta-analysis of ovarian volume and antral follicle count. *Fertil Steril* 2007;87:764–765.

45. Kupesic S, Kurjak A, Bjelos D et al. three-dimensional ultrasonographic ovarian measurements and in vitro fertilization outcome are related to age. *Fertil Steril* 2003;79:190-197.
46. Pavlik EJ, DePriest PD, Gallion HH, et al. Ovarian volume related to age. *Gynecol Oncol* 2000;77:410-2.
47. Bowen S, Norian J, Santoro N, Pal L. Simple tools for assessment of ovarian reserve (OR): individual ovarian dimensions are reliable predictors of OR. *Fertil Steril* 2007;88:390-5.
48. Jayaprakasan K, Campbell B, Hopkisson J, Johnson I, Raine-Fenning N. A prospective, comparative analysis of anti-Mullerian hormone, inhibin-B, and three-dimensional ultrasound determinants of ovarian reserve in the prediction of poor response to controlled ovarian stimulation. *Fertil Steril* 2008.
49. Ragni G, Chiaffarino F, Scarduelli C, Bonetti S, Nicolosi AE, Arnoldi M, Somigliana E. The clomiphene citrate challenge test (CCCT) in women with elevated basal FSH: biological significance and predictive value. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2008;141:44-48
50. Kwee J, Elting MW, Schats R, Bezemer PD, Lambalk CB, Schoemaker J. Comparison of endocrine tests with respect to their predictive value on the outcome of ovarian hyperstimulation in IVF treatment: results of a prospective randomized study. *Hum Reprod* 2003;18:1422-7.
51. Kwee J, Schats R, McDonnell J, Schoemaker J, Lambalk CB. The clomiphene citrate challenge test versus the exogenous folliclestimulating hormone ovarian reserve test as a single test for identification of low responders and hyperresponders to in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2006;85:1714-22.