



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA
Corso di Laurea Magistrale in Medicina e Chirurgia

DIPARTIMENTO DI SALUTE DELLA DONNA E DEL BAMBINO

Direttore: Prof. Giorgio Perilongo

TESI DI LAUREA

Instillazione intrauterina di gonadotropina corionica umana (hCG)
prima del transfer di blastocisti. Trial multicentrico.

Relatore: Prof.ssa Alessandra Andrisani

Correlatore: Dott. Loris Marin

Laureando: Gian Antonio Brunello

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

1. RIASSUNTO	1
2. INTRODUZIONE.....	3
2.1 INFERTILITA'	3
2.2 FATTORI FEMMINILI DI INFERTILITA'	3
2.3 FATTORI MASCHILI DI INFERTILITA'	5
2.4 ALTRI FATTORI	5
2.5 CONCEPIMENTO E SVILUPPO DELL'EMBRIONE.....	6
2.6 COORDINAZIONE TEMPORALE E FINESTRA D'IMPIANTO	6
2.7 BIOCHIMICA DELLA FINESTRA D'IMPIANTO	7
2.8 ADESIONE E INIZIO DELLA GRAVIDANZA.....	8
2.9 GONADOTROPINA CORIONICA (HCG)	9
2.10 HCG E FINESTRA D'IMPIANTO	10
2.11 ALTRI EFFETTI DELL'HCG.....	10
2.12 TECNICHE DI PROCREAZIONE	11
MEDICALMENTE ASSISTITA	11
2.13 FALLIMENTO RIPETUTO D'IMPIANTO	12
3. MATERIALI E METODI.....	13
3.1 DISEGNO DELLO STUDIO	13
3.2 CRITERI DI INCLUSIONE	13
3.3 CRITERI DI ESCLUSIONE	13
3.4 INSTILLAZIONE INTRAUTERINA HCG	14
3.5 ENPOINT	14
3.6 ANALISI STATISTICA	14
4. RISULTATI	15
5. DISCUSSIONE.....	19
6. CONCLUSIONI.....	22
7. BIBLIOGRAFIA	23

1.RIASSUNTO

Presupposti dello studio

La fase di impianto dell'embrione nell'endometrio materno resta una delle fasi più critiche e limitanti per l'ottenimento della gravidanza, sia in natura che durante i cicli di procreazione medicalmente assistita.

Precedenti studi hanno dimostrato la secrezione di gonadotropina corionica da parte dell'embrione già prima dell'impianto e i suoi effetti paracrini ed autocrini nel favorire l'attecchimento e la placentazione, di conseguenza è stato proposto di instillare questo ormone all'interno dell'utero di pazienti sottoposte a trattamenti di PMA di secondo livello.

Scopo dello studio

Scopo dello studio è di valutare se l'instillazione intrauterina di hCG prima del transfer di embrioni allo stadio di blastocisti sia in grado di aumentare il numero di gravidanze ottenute rispetto al gruppo di controllo.

Sono stati valutati come endpoint primari la Chemical Pregnancy Rate (ChPR), la Clinical Pregnancy Rate (CPR), l'Ongoing Pregnancy Rate e Live Birth Rate (OPR+LBR).

Materiali e metodi

Si tratta di uno studio clinico osservazionale multicentrico condotto presso i centri di procreazione medicalmente assistita dell'Azienda Ospedaliera di

Padova (PD) e del Centro di Medicina di Mestre (VE). Da aprile 2021 a febbraio 2022 108 pazienti hanno soddisfatto i criteri e sono state incluse nello studio. Le pazienti hanno seguito protocolli sia con che senza donazione di gameti, in 52 di queste sono stati instillati tramite catetere 1000 UI di hCG dieci minuti prima del transfer, le restanti 56 hanno eseguito il transfer normalmente senza instillazione.

Risultati

È stato riscontrato un miglioramento statisticamente significativo ($p < 0,05$) nelle pazienti che hanno ricevuto il trattamento rispetto ai controlli in termini di Chemical Pregnancy Rate ($p = 0,03$), mentre non sono risultate differenze in Clinical Pregnancy Rate ($p = 0,09$) e OPR+LBR ($p = 0,19$).

Conclusioni

L'instillazione intrauterina di hCG tramite catetere prima del transfer di blastocisti in pazienti con ripetuti fallimenti di impianto, in protocolli sia con che senza donazione di gameti, aumenta in maniera significativa il tasso di gravidanze biochimiche ottenute, mentre non si evidenziano miglioramenti statisticamente significativi nelle gravidanze cliniche, in corso e nei nati vivi, sebbene sia osservabile un aumento positivo in tal senso.

2. INTRODUZIONE

2.1 INFERTILITA'

La fertilità è la capacità di un organismo di riprodursi trasmettendo alla prole le proprie caratteristiche. L'essere umano, rispetto alle altre specie, si trova ad essere in difetto per natura: il suo indice di fecondità, infatti, ovvero la sua possibilità di concepire per ciclo, è relativamente basso, intorno al 25% (20,42), considerando una coppia ideale di individui giovani e senza problematiche. Ciononostante, nel 80% dei casi la coppia riuscirà ad ottenere la gravidanza entro 1 anno (34). Circa il 15% delle coppie invece, non riesce ad ottenere il concepimento in questo intervallo di tempo, si parla in questo caso di infertilità, definita proprio come l'incapacità di ottenere una gravidanza dopo 12 mesi di rapporti regolari non protetti (34).

Una condizione di infertilità permanente è invece chiamata sterilità (41).

Le cause di infertilità di una coppia possono essere molteplici, secondo la WHO nel 37% delle coppie infertili è presente un fattore femminile ad ostacolare la gravidanza, nel 35% sono presenti sia fattori maschili che femminili mentre nell'8% un solo fattore maschile (26). Nei restanti casi non è identificabile una causa definita, si parla quindi di infertilità idiopatica.

2.2 FATTORI FEMMINILI DI INFERTILITA'

L'infertilità femminile nel 25% dei casi è dovuta a disordini di tipo disovulatorio (26) cui consegue una mancata produzione periodica o permanente del gamete femminile. Fra questi disordini la Sindrome dell'Ovaio Policistico rappresenta

oltre l'80% dei casi venendo a essere la principale causa di infertilità in una donna, con una prevalenza nella popolazione femminile dell'8% (13). Fra le altre cause di infertilità disovulatoria è possibile riconoscere l'iperprolattinemia, che provoca una ridotta produzione di GnRH e conseguentemente di gonadotropine e LH in particolare, bloccando l'ovulazione. Questa condizione colpisce fino al 7% delle donne infertili (26). L'amenorrea ipotalamica funzionale (FHA) è un disordine disovulatorio, che può essere secondario ad eccessivo esercizio o disordini dell'alimentazione, in cui livelli eccessivi di cortisolo inibiscono la secrezione di GnRH (4,29). L'invecchiamento anche, è collegato ad un'infertilità di tipo disovulatorio caratterizzata sia da un minor reclutamento di follicoli per ciclo (36), che da una diminuita qualità degli ovociti (7). Quando questo avviene prima dei 40 anni si parla di insufficienza ovarica primaria (POI) (36); la principale causa di POI nella popolazione è la sindrome di Turner (22). Nel 15% delle donne infertili la causa è l'endometriosi (26) ovvero la presenza di tessuto endometriale ectopico al di fuori della cavità uterina.

Le aderenze pelviche e tubariche sono ritenute essere causa di infertilità femminile nel 12% e 11% (26) dei casi rispettivamente, l'eziologia di queste è normalmente riconosciuta nello sviluppo di una malattia infiammatoria pelvica (PID) causata nella maggior parte dei casi da *Chlamydia trachomatis* (36).

Le anomalie uterine contano per l'11% dei casi di infertilità femminile (26), comprendendo sia leiomiomi che le anomalie congenite.

2.3 FATTORI MASCHILI DI INFERTILITA'

Fino al 7% della popolazione maschile mondiale è colpita da infertilità (14). Le cause di infertilità maschile sono suddivise in ormonali o pre-testicolari, testicolari e post-testicolari.

Le cause pre-testicolari comprendono tutte le condizioni di ipogonadismo ipogonadotropo sia congenite che acquisite (tumori, infezioni) che causano una ridotta produzione di gonadotropine a livello ipofisario e più raramente disfunzione erettile e disordini del coito (14).

Le cause post-testicolari comprendono tutte le cause di ostruzione o subostruzione delle vie seminifere congenite, come nel caso dell'assenza congenita dei dotti deferenti nella fibrosi cistica e acquisite, solitamente di carattere infiammatorio/infettivo (14).

Le testicolopatie che possono causare infertilità possono essere primitive, fra le quali spicca soprattutto il criptorchidismo, con una prevalenza alla nascita fra il 2% e il 9% (35,40), o secondarie a traumi, torsioni, farmaci o orchiti.

2.4 ALTRI FATTORI

Oltre alle componenti patologiche che possono andare ad inficiare la fertilità di una coppia, oggi sono sempre più rilevanti i fattori socioeconomici e comportamentali. Un importantissimo fattore è sicuramente l'età della donna. Le coppie iniziano normalmente a cercare un figlio in ritardo rispetto al passato (8, 34, 36), intorno ai trent'anni per la maggior parte, e quindi in ritardo rispetto al picco di fertilità della donna con una ripercussione ormai dimostrata sulla qualità degli ovociti prodotti ad ogni ciclo (7) e sul loro numero (27, 36). Questo fattore

viene spesso ad essere quello maggiormente limitante le possibilità della coppia di ottenere la gravidanza (34).

L'obesità e la grande diffusione di sostanze d'abuso, soprattutto fumo di sigaretta (34, 37) e alcol, sono altri fattori di grande importanza di cui tenere conto (34).

2.5 CONCEPIMENTO E SVILUPPO DELL'EMBRIONE

Una volta avvenuta l'ovulazione, se l'ovocita incontra lo spermatozoo nelle tube, può avvenire la fecondazione. Se questo accade, la nuova cellula formatasi, lo zigote, inizierà attivamente a proliferare diventando morula scendendo lungo la tuba verso l'utero (20), quest'ultimo verso la fine della fase follicolare stimolato dagli estrogeni del follicolo dominante aveva iniziato a subire dei cambiamenti per rendere l'ambiente ospitale all'embrione, prima aumentando lo spessore del suo strato endometriale poi con l'aumento dei livelli di progesterone in corrispondenza dell'ovulazione aumentandone la vascolarizzazione formando una fitta rete vascolare (20). L'embrione giunge nella cavità uterina intorno al sesto giorno dal concepimento (6, 20, 23), in questa fase alcune cellule iniziano a proliferare in modo diverso dalle altre e si forma al suo interno una vescicola piena di fluido, prende così il nome di blastocisti.

2.6 COORDINAZIONE TEMPORALE E FINESTRA D'IMPIANTO

L'impianto dell'embrione nell'endometrio sia in natura che in procreazione medicalmente assistita è la fase più critica e limitante per ottenere una gravidanza, dal 50% al 75% dei casi in cui la gravidanza non avviene vi è stato

un fallimento di impianto (23), nei restanti casi in cui la gravidanza inizia ma non viene portata a termine usualmente la causa è un'aborto precoce o tardivo (38).

Per la riuscita dell'impianto sono necessarie due componenti fondamentali: la blastocisti e l'endometrio in un preciso momento della sua maturazione, chiamato finestra d'impianto, in cui è particolarmente ricettivo. Questo stato di particolare ricettività sembra essere fra il quinto ed il sesto giorno dall'ovulazione (25), proprio nel momento in cui l'embrione dovrebbe fare il suo ingresso nell'utero, risulta chiaro quindi, come sia indispensabile una perfetta coordinazione temporale fra la discesa, la maturazione dell'embrione e l'apertura della finestra di impianto per poter massimizzare la probabilità di sviluppo di una gravidanza.

2.7 BIOCHIMICA DELLA FINESTRA D'IMPIANTO

La finestra di impianto si è osservato essere legata al cambiamento di espressione di determinate molecole; a metà della fase secretiva raggiunge un picco l'espressione del leukemia inhibiting factor (LIF) prodotto dai linfociti T a livello endometriale (24), aumenta l'espressione di Cicloossigenasi 2 (COX2) e aumentano i livelli di Monoamminossidasi (MAO) e di Catecolo O-Metiltransferasi (COMT) (25).

L'espressione di Insulin-like Growth Factor Binding Protein-1 (IGFBP-1), un peptide che svolge una funzione inibente l'invasione del trofoblasto si riduce

(11) e i suoi livelli torneranno a salire intorno al decimo giorno dal picco di LH (16), in corrispondenza della chiusura del periodo ricettivo.

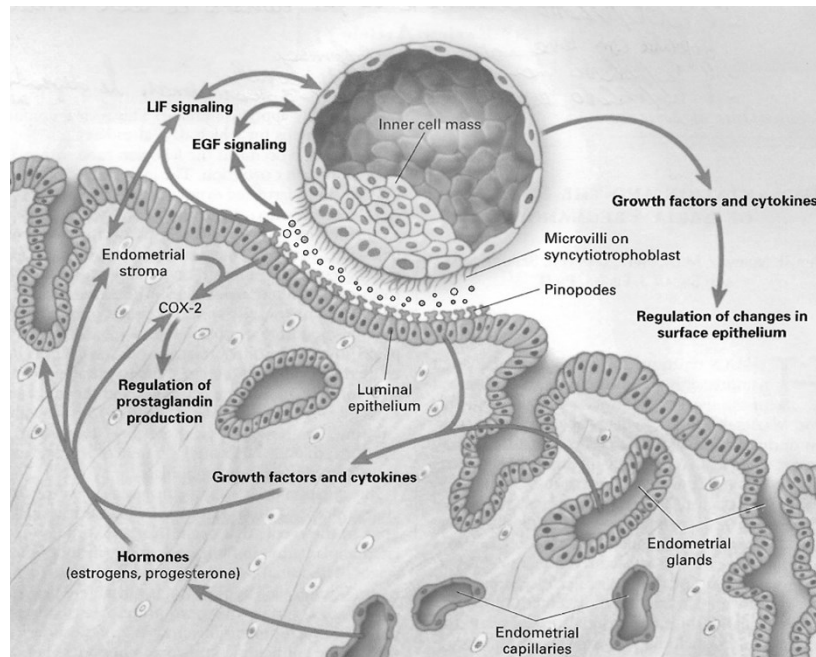
È stato osservato, che un prematuro aumento a livello endometriale di IL-18, un livello basso di IL-15 e un livello basso di angiopoietina-2 siano associati ad un minor tasso di impianto (15). L'espressione di queste molecole sembra essere legata al periodo finestra garantendo una corretta ricettività vascolare e rimodellamento dell'endometrio all'arrivo dell'embrione (15).

2.8 ADESIONE E INIZIO DELLA GRAVIDANZA

Dopo una prima fase di adesione meccanica le cellule del trofoblasto embrionale iniziano a scavare nell'endometrio erodendone lo stroma e i vasi, così facendo formano delle cavità in cui si riversa il sangue uterino della madre che entrando a contatto con le strutture embrionali formerà l'interfaccia attraverso cui avverranno gli scambi di nutrienti fra madre ed embrione (20, 23). Questa invasione è possibile da un lato perché il trofoblasto produce sostanze che permettono il rimodellamento dell'endometrio (23), dall'altro perché la reazione immunitaria della madre contro le cellule dell'embrione è soppressa. Già prima dell'impianto l'embrione produce hCG, che è stato osservato oltre ad avere attività angiogenica intrinseca stimola la produzione di Fattore di Crescita Endoteliale Vascolare (VEGF), Matrice Metalloproteinasi 9 (MMP9) e inibisce l'attività degli Inibitori Tissutali delle Metalloproteinasi (TIMP) endometriali in modo dose e tempo dipendente (16). Oltre alla hCG il trofoblasto produce IL-10, che riduce localmente l'attivazione immunitaria e recluta linfociti a bassa attività citotossica e indoleamina 2-3 diossigenasi (IDO) che degrada il triptofano componente necessaria per l'attivazione dei linfociti T (24).

Se tutti queste componenti si coordinano con successo allora l'impianto dell'embrione avverrà con successo e la fase più critica per l'inizio della gravidanza sarà superata (Figura 1).

Figura 1. Adesione della blastocisti e signalling



2.9 GONADOTROPINA CORIONICA (HCG)

La gonadotropina corionica è una glicoproteina eterodimerica composta da una subunità alfa, comune con FSH e LH, e una subunità beta specifica per questa molecola (9), a questo ormone è classicamente attribuito il ruolo principale di sostenere la gravidanza andando a stimolare il corpo luteo prevenendone la degenerazione (20). In questo modo l'embrione attraverso questa sostanza prodotta dal suo sinciziotrofoblasto (20) è in grado di autosostenere il proprio sviluppo mantenendo alti i livelli di estrogeni e progesterone.

Oggi sono sempre di più le evidenze che la gonadotropina corionica non solo agisca a livello endocrino ma anche locale con azione paracrina direttamente sull'endometrio e autocrina guidando la placentazione stessa (9, 16, 30, 33).

2.10 HCG E FINESTRA D'IMPIANTO

Come precedentemente osservato la coordinazione temporale fra utero ed embrione è fondamentale per la riuscita dell'impianto, a livello endometriale hCG si è dimostrata in grado di ridurre i livelli di IGFBP-1 (16), proteina la cui espressione è legata alla chiusura della finestra, prolungando verosimilmente il periodo ricettivo. Sempre a livello dell'endometrio hCG stimola la produzione di VEGF, LIF e MMP9 e riduce l'attività dei TIMP, favorendo in questo modo il rimodellamento tissutale e vascolare necessari per la placentazione (16).

2.11 ALTRI EFFETTI DELL'HCG

Le cellule dell'embrione appartengono ad un individuo diverso dalla madre e per questo motivo è necessario che si sviluppi una tolleranza immunologica per permettere la gravidanza, hCG sembra svolgere un ruolo importante anche in questo senso, oltre a stimolare le cellule natural killer che favoriscono l'impianto (15) agisce sui linfociti richiamando cellule Treg dall'organismo responsabili del controllo della risposta immunitaria (30, 33), stimola la produzione di Il-10 eIDO che riducono la capacità di proliferazione delle cellule T (33) e aumenta l'espressione di Fas-Ligando (FasL), da un lato favorendo il rimodellamento endometriale dall'altro spegnendo ulteriormente la risposta immunitaria (33).

Un adeguato innalzamento dei livelli di hCG ad inizio gravidanza si è visto stimolare la produzione di cellule Breg (30) legate alla produzione di anticorpi protettivi per la gravidanza stessa ed inibire la produzione di linfociti B-B1 (30) legati allo sviluppo di complicanze gravidiche come la preeclampsia (30).

2.12 TECNICHE DI PROCREAZIONE MEDICALMENTE ASSISTITA

Oggi il 2-4% di tutte le gravidanze è ottenuto tramite tecniche di procreazione medicalmente assistita (3), tuttavia, è stato osservato che rispetto alle 3000 coppie per milione di abitanti che beneficerebbero di queste procedure, sono solo 477 i cicli effettuati per milione di abitanti, ponendo la disponibilità delle tecniche di PMA <20% dell'effettivo fabbisogno (3).

Le tecniche di PMA si distinguono in tecniche di primo e di secondo livello: alla prima categoria appartiene la procedura di inseminazione intrauterina, che consiste nell'iniezione tramite catetere del liquido seminale capacitato direttamente in utero durante un ciclo con blanda stimolazione di gonadotropine e induzione dell'ovulazione tramite hCG, i cicli di IUI hanno dimostrato un'efficacia del 12% nell'ottenere una gravidanza clinica e un delivery rate dell'8% (3).

I trattamenti di secondo livello sono i trattamenti di FIVET/ICSI in cui, dopo stimolazione ovarica intensa, vengono prelevati il maggior numero di ovociti possibile per via transvaginale con sonda ecoguidata, questi vengono poi messi in coltura col liquido seminale del partner oppure il singolo spermatozoo viene iniettato all'interno dell'ovocita, gli embrioni così ottenuti vengono direttamente trasferiti tramite catetere in utero. Il trasferimento può avvenire a fresco oppure

gli embrioni possono essere congelati per essere trasferiti in un secondo momento, questo avviene normalmente se c'è un sovrannumero di embrioni prodotti o se c'è il rischio che si sviluppi una sindrome da iperstimolazione ovarica. I cicli di FIVET a fresco hanno mostrato avere una Pregnancy e Delivery Rate rispettivamente del 24% e 17%, i cicli di ICSI 26% e 19% mentre i cicli da scongelamento dell'embrione 30% e 21% (3) per donne sotto i 40 anni. Durante i trattamenti di secondo livello il rischio globale di OHSS è dello 0,5% mentre il rischio di gravidanza gemellare è del 19% (3).

2.13 FALLIMENTO RIPETUTO D'IMPIANTO

Fino al 75% dei casi di fallimento è dovuto a mancanza di impianto dell'embrione nell'endometrio (23), se dopo tre cicli di trasferimento di embrioni di buona qualità non si è ottenuto un impianto si parla di Repeated Implantation Failure (RIF) (5) ed è raccomandabile eseguire ulteriori accertamenti prima di proseguire. È sempre consigliabile eseguire un'isteroscopia (HSC), nel 27% dei casi di RIF, infatti, sono presenti alterazioni non evidenziate prima dell'inizio del trattamento (5).

La diagnostica preimpianto (PGS) per selezionare embrioni senza anomalie cromosomiche ha dimostrato in alcuni studi di produrre beneficio (32), sebbene si tratti di una metodica non accessibile a molti centri, è stata osservata effettivamente, nei casi di RIF, una maggiore frequenza di anomalie cromosomiche rispetto ai controlli (54% contro 36%) (18).

3. MATERIALI E METODI

3.1 DISEGNO DELLO STUDIO

Si tratta di uno studio osservazionale multicentrico condotto presso i centri di procreazione medicalmente assistita dell'Azienda Ospedaliera di Padova (PD) e del Centro di Medicina di Mestre (VE). Da aprile 2021 a febbraio 2022, 108 pazienti che hanno seguito protocolli di fecondazione sia con che senza donazione di gameti sono state reclutate per lo studio.

3.2 CRITERI DI INCLUSIONE

Criteri necessari per l'inclusione nello studio erano: l'esser già state sottoposte ad almeno due protocolli FIVET/ICSI con transfer di blastocisti con esito negativo, eseguire un transfer di blastocisti da scongelamento in protocollo di fecondazione sia con che senza donazione di gameti, l'aver dato il consenso alla partecipazione allo studio.

3.3 CRITERI DI ESCLUSIONE

Criteri di esclusione dalla partecipazione allo studio per le pazienti erano la presenza di anomalie uterine (malformazioni, miomi improntanti la cavità uterina), l'essere affette da endometriosi e l'aver un Body Mass Index (BMI) patologico $<18 \text{ kg/m}^2$ o $>30 \text{ kg/m}^2$.

3.4 INSTILLAZIONE INTRAUTERINA HCG

52 pazienti hanno ricevuto dieci minuti prima del transfer 1000 UI di hCG intrauterino tramite catetere, 36 di queste durante un protocollo di fecondazione con donazione di gameti.

56 pazienti hanno eseguito il transfer routinariamente senza instillazione di hCG, 24 di queste durante un protocollo di fecondazione con donazione di gameti.

3.5 ENPOINT

Gli endpoint considerati per lo studio sono:

-Chemical Pregnancy Rate (ChPR) considerato come valori sierici di bhCG > 5mIU/ml

-Clinical Pregnancy Rate (CPR) considerato come presenza dell'attività cardiaca embrionale rilevata all'esame ecografico

-Ongoing Pregnancy Rate e Live Birth Rate (OPR+LBR) definite come gravidanza oltre la 20 settimana di gestazione e consegna alla madre di un neonato vitale.

3.6 ANALISI STATISTICA

L'analisi statistica dei dati è stata eseguita usando il programma STATA (versione 14), le variabili continue sono state riportate come media +/- deviazione standard, mentre le variabili dicotomiche qualitative come frequenze e percentuali.

Le caratteristiche continue sono state confrontate utilizzando il test di Wilcoxon-Mann-Whitney per variabili a distribuzione non normale.

Il numero di embrioni trasferiti per ciclo e gli outcome di gravidanza sono stati confrontati attraverso il test del chi quadrato con intervallo di confidenza al 95%.

4. RISULTATI

Sono state prese in considerazione e confrontate le caratteristiche basali delle due popolazioni (Tabella I): sono risultate differenze significative ($p < 0,05$) nell'età al congelamento degli embrioni ($29,16 \pm 3,86$ vs $32,82 \pm 3,15$; $p < 0,001$), nell'età al momento dell'esecuzione del transfer dell'embrione ($39,88 \pm 5,48$ vs $37,80 \pm 5,17$; $p = 0,03$).

Non sono risultate differenze statisticamente significative ($p > 0,05$) nel BMI ($23,15 \pm 2,66$ vs $22,29 \pm 2,75$; $p = 0,08$) e nel numero di fallimenti precedenti ($2,71 \pm 1,05$ vs $2,44 \pm 0,78$; $p = 0,08$).

Non sono state tenute in considerazione ai fini dello studio la conta dei follicoli antrali e il valore dell'ormone anti-mulleriano in quanto non è possibile paragonare la riserva ovarica fra pazienti di cicli di fecondazione omologa ed eterologa.

Tabella I. Caratteristiche basali e demografiche delle pazienti

Caratteristica	CASI	CONTROLLI	P value
Età al congelamento	29,16+/-3,86	32,82+/-3,15	<0,001
Età al transfer	39,88+/-5,48	37,80+/-5,17	0,03
BMI	23,15+/-2,66	22,29+/-2,75	0,08
N precedenti fallimenti	2,71+/-1,05	2,44+/-0,78	0,08

Per quanto riguarda le pazienti durante il trattamento sono state tenute in considerazione la durata della stimolazione con estrogeni (14,34+/-1,79 vs 14,71+/-1,95; $p=0,29$) e lo spessore endometriale (8,89+/-1,13 vs 8,76+/-1,12; $p=0,62$) che non sono risultate statisticamente differenti ($p>0,05$).

Tabella II. Caratteristiche delle pazienti durante il trattamento di decongelamento

	CASI	CONTROLLI	P value
Durata preparazione in giorni	14,34+/-1,79	14,71+/-1,95	0,29
Spessore endometriale	8,89+/-1,13	8,76+/-1,12	0,62

Ad ogni ciclo di FIVET/ICSI nel 90,4% delle volte nel gruppo che ha ricevuto l'hCG prima del transfer e nell'83,9% nel gruppo di controllo è stata trasferita una sola blastocisti con una differenza non statisticamente significativa fra i gruppi ($p>0,05$) (Tabella III).

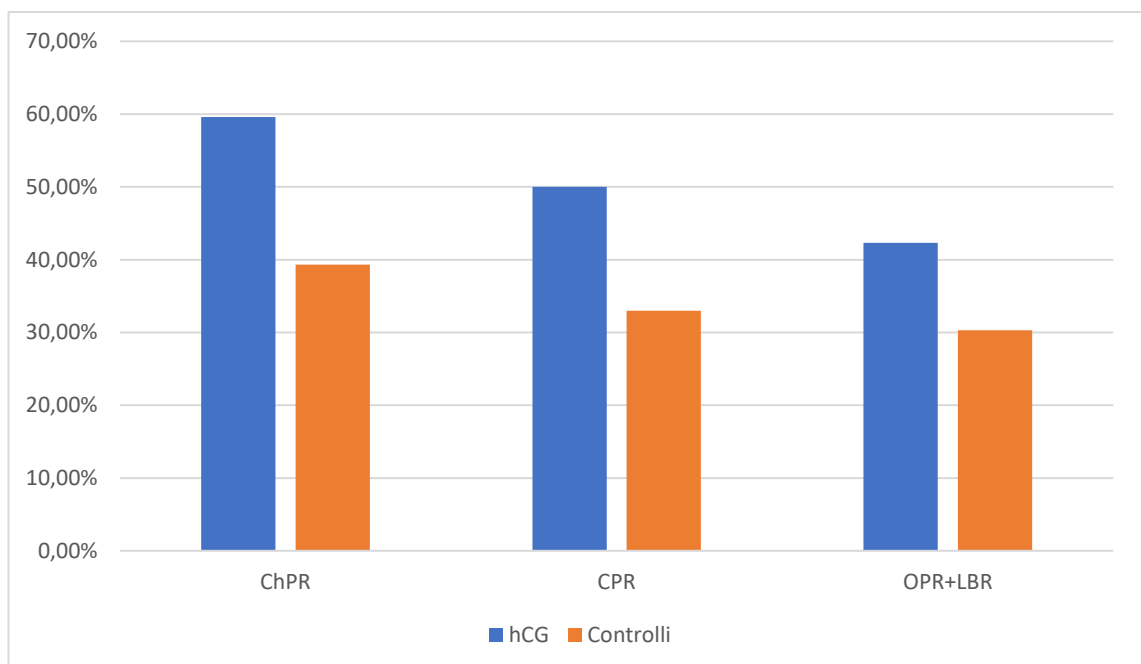
Tabella III. Numero di embrioni trasferiti per trattamento

	CASI	CONTROLLI	P value
1 embrione trasferito	90,4%	83,9%	0,31
2 embrioni trasferiti	9,6%	16,1%	

Gli endpoint dello studio (Tabella IV) hanno mostrato una differenza statisticamente significativa ($p<0,05$) in positivo nella percentuale di gravidanze biochimiche ottenute nel gruppo hCG rispetto ai controlli, rispettivamente il 59,6% contro il 39,3% ($p=0,03$) mentre non sono risultate statisticamente differenti le percentuali di gravidanza clinica (50% vs 33,3%, $p=0,09$) e di gravidanze in corso e nascite di neonato vitale (42,3% vs 30,3%, $p=0,19$).

Tabella IV. Outcome di gravidanza

		CASI	CONTROLLI	P value
Chemical pregnancy rate	+	59,6%	39,3%	0,03
	-	40,4%	60,7%	
Clinical Pregnancy Rate	+	50%	33,9%	0,09
	-	50%	66,1%	
Ongoing Pregnancy Rate e Live Birth Rate	+	42,3%	30,3%	0,19
	-	57,7%	69,7%	

Figura 2. Rappresentazione grafica degli endpoint primari.

5. DISCUSSIONE

La gonadotropina corionica è sicuramente una delle principali attrici ed artefici della buona riuscita della gravidanza, con i suoi effetti autocrini paracrini ed endocrini permette all'embrione di impiantarsi nell'endometrio, non solo inducendo modificazioni strutturali (9), ma anche a livello molecolare (15, 16, 30, 33), regola il processo di placentazione (9), induce e favorisce una tolleranza immunologica a livello dell'interfaccia fra madre e feto (30, 33) con azione regolatoria sul sistema immunitario materno, permette all'embrione di autosostenersi stimolando il corpo luteo (20).

Sulla base di queste informazioni si poggia il razionale che ha ispirato l'esecuzione di studi in ambito di Procreazione Medicalmente Assistita con l'obiettivo di osservare se questi effetti benefici prodotti in vitro trovassero poi riscontro effettivo nella pratica clinica.

Come già descritto l'impianto dell'embrione nell'endometrio risulta essere, specie in PMA, il momento più critico e limitante (23), potendo portare da subito al fallimento del ciclo terapeutico.

Il nostro studio ha considerato 108 pazienti sottoposte a protocolli di FIVET/ICSI da congelamento, sia con che senza donazione di gameti. Nonostante la differenza statistica evidenziata la media delle età al congelamento è <35 anni per entrambi i gruppi.

Tutte le pazienti avevano avuto almeno due precedenti fallimenti in cicli in cui erano state trasferite blastocisti, avevano BMI compreso fra 18 e 30 e non presentavano né anomalie uterine né endometriosi.

A 52 pazienti sono state instillate 1000 UI di hCG tramite catetere sterile dieci minuti prima del transfer, alle altre 58 il transfer è stato eseguito normalmente senza instillazione.

Lo studio ha mostrato un significativo aumento ($p < 0,05$) del ChPR ($p = 0,03$), non sono emerse invece differenze significative per quanto riguarda gli altri due endpoint, CPR ($p = 0,09$) e OPR+DR ($p = 0,19$).

Precedenti studi su embrioni in stadio di clivaggio (1, 17, 21) avevano dimostrato aumenti statisticamente significativi in ChPR, CPR, OPR e LBR rispetto ai controlli instillando 500 UI di hCG prima del transfer, in particolare Mansour et al. hanno osservato che ne 100 UI ne 200 UI portavano a significative differenze di outcome, mentre queste erano osservabili a dosaggi superiori (500 UI). Anche Aaleyasin et al. e Navali et al. hanno osservato miglioramenti statisticamente significativi in termini di outcome instillando 500 UI di hCG prima del transfer. Contrapposto a questi lo studio di Dehgani et al. (10) eseguito sia instillando 500 UI che 1000 UI di hCG in transfer di embrioni in stadio di clivaggio non ha invece dimostrato differenze significative rispetto ai controlli che non avevano ricevuto alcun trattamento, lo stesso autore tuttavia riconosce il limite della bassa numerosità della popolazione dello studio.

Studi Randomizzati Controllati eseguiti su transfer di blastocisti (12, 19, 39) come questo studio, non hanno evidenziato differenze significative di outcome rispetto ai controlli. Diversamente dal presente studio, Wirleitner et al. hanno trasferito gli embrioni a fresco invece che da congelamento, Hong et al. invece

hanno utilizzato 500 UI di hCG e non 1000 UI prima del transfer, sia a fresco che da congelamento.

Mostajeran et al. hanno instillato 700 UI di hCG dieci minuti prima del transfer a fresco della blastocisti, osservando un miglioramento nel tasso di gravidanze ottenute rispetto al controllo, seppur non statisticamente significativo.

Differentemente dai precedenti studi con transfer di blastocisti (12, 19, 39) il presente studio ha osservato che in donne con ripetuti fallimenti di impianto, l'instillazione di hCG intrauterina è in grado di aumentare in maniera statisticamente significativa il numero di gravidanze biochimiche ottenute, in maniera simile a quanto era stato osservato per gli studi sugli embrioni in fase di clivaggio (1, 17, 21).

È possibile osservare inoltre rispetto ai controlli anche un aumento positivo nei restanti outcome primari: gravidanze cliniche, in corso e nati vivi. Sebbene non in maniera significativa dal punto di vista statistico, questo dato lascia supporre che la gonadotropina corionica possa in studi futuri dimostrare un'azione benefica definitiva anche in termini di CPR, OPR e LBR.

Va considerata infine la differenza di età fra i due campioni evidenziata prima, la media dell'età al congelamento era < 35 anni per entrambi i gruppi perciò si può ipotizzare una qualità ovocitaria buona e comparabile (7), allo stesso tempo l'età al transfer risulta maggiore nei casi rispetto ai controlli; quindi, tenendo conto che le donne nei casi possano aver avuto una diminuzione nei tassi di impianto dovuta all'età a causa della ridotta recettività endometriale (28),

possiamo presupporre che a maggior ragione l'utilizzo di hCG intrauterino possa andare a migliorare il tasso di gravidanze ottenute.

6. CONCLUSIONI

L'instillazione intrauterina di hCG tramite catetere prima del transfer di blastocisti in pazienti con ripetuti fallimenti di impianto, che hanno seguito protocolli di fecondazione sia con che senza donazione di gameti, aumenta in maniera significativa il tasso di gravidanze biochimiche ottenute, mentre non si evidenziano miglioramenti statisticamente significativi nelle gravidanze cliniche, in corso e nei nati vivi, sebbene sia osservabile un aumento positivo in tal senso.

7. BIBLIOGRAFIA

- 1) Aaleyasin A, Aghahosseini M, Rashidi M, Safdarian L, Sarvi F, Najmi Z, Mobasser A, Amoozgar B. In vitro fertilization outcome following embryo transfer with or without preinstillation of human chorionic gonadotropin into the uterine cavity: a randomized controlled trial. *Gynecol Obstet Invest.* 2015;79(3):201-5.

- 2) Abdallah KS, Makhlof A, Badran E, El-Nashar IM, Al-Hussaini TK, Farghaly T, Mohamed HS, Mol BW, Abdelmagied AM. Intrauterine injection of HCG before embryo transfer: a parallel, double-blind randomized trial. *Reprod Biomed Online.* 2021 Oct;43(4):663-669.

- 3) Adamson GD, de Mouzon J, Chambers GM, Zegers-Hochschild F, Mansour R, Ishihara O, Banker M, Dyer S. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology: world report on assisted reproductive technology, 2011. *Fertil Steril.* 2018 Nov;110(6):1067-1080.

- 4) Ackerman KE, Patel KT, Guereca G, Pierce L, Herzog DB, Misra M. Cortisol secretory parameters in young exercisers in relation to LH secretion and bone parameters. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2013 Jan;78(1):114-9.

- 5) Bashiri A, Halper KI, Orvieto R. Recurrent Implantation Failure-update overview on etiology, diagnosis, treatment and future directions. *Reprod Biol Endocrinol.* 2018 Dec 5;16(1):121
- 6) Bourgain C, Devroey P. Histologic and functional aspects of the endometrium in the implantatory phase. *Gynecol Obstet Invest.* 2007;64(3):131-3.
- 7) Broekmans FJ, Soules MR, Fauser BC. Ovarian aging: mechanisms and clinical consequences. *Endocr Rev.* 2009 Aug;30(5):465-93.
- 8) Chandra A, Copen CE, Stephen EH. Infertility and impaired fecundity in the United States, 1982-2010: data from the National Survey of Family Growth. *Natl Health Stat Report.* 2013 Aug 14;(67):1-18, 1 p following 19.
- 9) Cole LA. hCG, the wonder of today's science. *Reprod Biol Endocrinol.* 2012 Mar 28;10:24.
- 10) Dehghani Firouzabadi R, Janati S, Razi MH. The effect of intrauterine human chorionic gonadotropin injection before embryo transfer on the implantation and pregnancy rate in infertile patients: A randomized clinical trial. *Int J Reprod Biomed.* 2016 Oct;14(10):657-664.

- 11) Giudice LC, Mark SP, Irwin JC. Paracrine actions of insulin-like growth factors and IGF binding protein-1 in non-pregnant human endometrium and at the decidual-trophoblast interface. *J Reprod Immunol.* 1998 Aug;39(1-2):133-48.

- 12) Hong KH, Forman EJ, Werner MD, Upham KM, Gumeny CL, Winslow AD, Kim TJ, Scott RT Jr. Endometrial infusion of human chorionic gonadotropin at the time of blastocyst embryo transfer does not impact clinical outcomes: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Fertil Steril.* 2014 Dec;102(6):1591-5.e2.

- 13) Hull MG. Epidemiology of infertility and polycystic ovarian disease: endocrinological and demographic studies. *Gynecol Endocrinol.* 1987 Sep;1(3):235-45.

- 14) Krausz C. Male infertility: pathogenesis and clinical diagnosis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2011 Apr;25(2):271-85.

- 15) Lédée N, Dubanchet S, Oger P, Meynant C, Lombroso R, Ville Y, Chaouat G. Uterine receptivity and cytokines: new concepts and new applications. *Gynecol Obstet Invest.* 2007;64(3):138-43.

- 16) Licht P, Fluhr H, Neuwinger J, Wallwiener D, Wildt L. Is human chorionic gonadotropin directly involved in the regulation of human implantation? *Mol Cell Endocrinol.* 2007 Apr 15;269(1-2):85-92.

- 17) Mansour R, Tawab N, Kamal O, El-Faissal Y, Serour A, Aboulghar M, Serour G. Intrauterine injection of human chorionic gonadotropin before embryo transfer significantly improves the implantation and pregnancy rates in in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection: a prospective randomized study. *Fertil Steril.* 2011 Dec;96(6):1370-1374.e1.

- 18) Margalioth EJ, Ben-Chetrit A, Gal M, Eldar-Geva T. Investigation and treatment of repeated implantation failure following IVF-ET. *Hum Reprod.* 2006 Dec;21(12):3036-43.

- 19) Mostajeran F, Godazandeh F, Ahmadi SM, Movahedi M, Jabalamelian SA. Effect of intrauterine injection of human chorionic gonadotropin before embryo transfer on pregnancy rate: A prospective randomized study. *J Res Med Sci.* 2017 Jan 27;22:6.

- 20) Mozzanega B: *Da vita a vita. Viaggio alla scoperta della riproduzione umana*, Gregoriana libreria editrice, 2002

- 21) Navali N, Gassemzadeh A, Farzadi L, Abdollahi S, Nouri M, Hamdi K, Mallah F, Jalilvand F. Intrauterine administration of hCG immediately after oocyte retrieval and the outcome of ICSI: a randomized controlled trial. *Hum Reprod.* 2016 Nov;31(11):2520-2526.
- 22) Nelson LM. Clinical practice. Primary ovarian insufficiency. *N Engl J Med.* 2009 Feb 05;360(6):606-14.
- 23) Norwitz ER, Schust DJ, Fisher SJ. Implantation and the survival of early pregnancy. *N Engl J Med.* 2001 Nov 8;345(19):1400-8.
- 24) Okun N, Sierra S; GENETICS COMMITTEE; SPECIAL CONTRIBUTORS. Pregnancy outcomes after assisted human reproduction. *J Obstet Gynaecol Can.* 2014 Jan;36(1):64-83.
- 25) Psychoyos A. Uterine receptivity for nidation. *Ann NY Acad Sci.* 1986; 476:36-42.
- 26) Report of a WHO Scientific Group. Recent advances in medically assisted conception. *World Health Organ Tech Rep Ser.* 1992;820:1-111.

- 27) Richardson SJ, Senikas V, Nelson JF. Follicular depletion during the menopausal transition: evidence for accelerated loss and ultimate exhaustion. *J Clin Endocrinol Metab.* 1987 Dec;65(6):1231-7.
- 28) Rosenwaks Z, Davis OK, Damario MA. The role of maternal age in assisted reproduction. *Hum Reprod.* 1995 Oct;10 Suppl 1:165-73.
- 29) Santoro N, Filicori M, Crowley WF. Hypogonadotropic disorders in men and women: diagnosis and therapy with pulsatile gonadotropin-releasing hormone. *Endocr Rev.* 1986 Feb;7(1):11-23.
- 30) Schumacher A. Human Chorionic Gonadotropin as a Pivotal Endocrine Immune Regulator Initiating and Preserving Fetal Tolerance. *Int J Mol Sci.* 2017 Oct 17;18(10):2166.
- 31) Scott RT Jr, Upham KM, Forman EJ, Hong KH, Scott KL, Taylor D, Tao X, Treff NR. Blastocyst biopsy with comprehensive chromosome screening and fresh embryo transfer significantly increases in vitro fertilization implantation and delivery rates: a randomized controlled trial. *Fertil Steril.* 2013 Sep;100(3):697-703

- 32) Tan H, Hu S; Qiongyu, Chen Y, Jin L, Wu C. The Effect of Intrauterine Administration of Human Chorionic Gonadotropin (hCG) Before Embryo Transfer During Assisted Reproductive Cycles: a Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Geburtshilfe Frauenheilkd.* 2019 Jul;79(7):713-722.
- 33) Tsampalas M, Gridelet V, Berndt S, Foidart JM, Geenen V, Perrier d'Hauterive S. Human chorionic gonadotropin: a hormone with immunological and angiogenic properties. *J Reprod Immunol.* 2010 May;85(1):93-8.
- 34) Vander Borcht M, Wyns C. Fertility and infertility: Definition and epidemiology. *Clin Biochem.* 2018 Dec;62:2-10.
- 35) Villumsen AL & Zachau-Christiansen B. Spontaneous alterations in position of the testes. *Archives of Disease in Childhood* 1966; 41: 198–200
- 36) Walker MH, Tobler KJ. Female Infertility. [Updated 2021 Dec 28]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan

- 37) Westhoff C, Murphy P, Heller D. Predictors of ovarian follicle number. *Fertil Steril*. 2000 Oct;74(4):624-8.
- 38) Wilcox AJ, Weinberg CR, O'Connor JF, Baird DD, Schlatterer JP, Canfield RE, Armstrong EG, Nisula BC. Incidence of early loss of pregnancy. *N Engl J Med*. 1988 Jul 28;319(4):189-94.
- 39) Wirleitner B, Schuff M, Vanderzwalmen P et al. Intrauterine administration of human chorionic gonadotropin does not improve pregnancy and live birth rates independently of blastocyst quality: a randomised prospective study. *Reprod Biol Endocrinol* 2015; 13: 70
- 40) Wohlfahrt-Veje C, Boisen KA, Boas M, Damgaard IN et al. Acquired cryptorchidism is frequent in infancy and childhood. *International Journal of Andrology* 2009; 32: 423–428
- 41) Zegers-Hochschild F, Adamson GD, Dyer S, Racowsky C, de Mouzon J, Sokol R, Rienzi L, Sunde A, Schmidt L, Cooke ID, Simpson JL, van der Poel S. The International Glossary on Infertility and Fertility Care, 2017. *Fertil Steril*. 2017 Sep;108(3):393-406.

- 42) Zinaman MJ, Clegg ED, Brown CC, O'Connor J, Selevan SG. Estimates of human fertility and pregnancy loss. *Fertil Steril*. 1996 Mar;65(3):503-9.