



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA
"TOR VERGATA"**

FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA

DOTTORATO DI RICERCA IN MEDICINA PERINATALE

CICLO DEL CORSO DI DOTTORATO

Titolo della tesi

**ALTERAZIONE DELLA SOTTOPOPOLAZIONE
LINFOCITARIA ENDOMETRIALE IN DONNE CON
SINDROME DELL'OVAIO POLICISTICO E
POLIABORTIVITA'**

Nome e Cognome del dottorando
LUIGI SELVAGGI

A.A. 2009/2010

Docente Guida/Tutor: Prof. Pantaleo Greco

Coordinatore: Prof. Domenico Arduini

INDICE ANALITICO

1	INTRODUZIONE	1
2	Definizione e Diagnosi	2
2.1	Sintomatologia Clinica	9
2.1.1	Obesità	10
2.1.2	Irsutismo	12
2.1.3	Alopecia	13
2.1.4	Acne	14
2.1.5	L'acanthosis nigricans	15
2.2	Criteria ecografici	16
2.3	Parametri biochimici	19
3	Implicazioni cliniche: sindrome metabolica, rischio di carcinoma endometriale, infertilità/sterilità	23
3.1	Sindrome metabolica	23
3.2	Iperplasia endometriale e ca dell'endometrio	31
3.3	Infertilità/Sterilità	33
3.3.1	PCOS ed anovularietà	34
3.3.2	PCOS ed endometrio	38
4	MATERIALI E METODI	44
4.1	Pazienti	44
4.2	Preparazione del tessuto endometriale	46
4.3	Reazione anticorpale e citofluorimetria	47
5	RISULTATI	49
6	DISCUSSIONE	53
7	BIBLIOGRAFIA	61

INDICE DELLE TABELLE

Tabella 1. Criteri proposti per la definizione di PCOS 7

Tabella 2. Sintomi e segni clinici in donne con 15

Tabella 3. Sintesi degli esiti della consensus conference del 2003 circa lo screening sulle malattie metaboliche in donne con PCOS 27

Tabella 4. Criteri per la definizione di sindrome metabolica in donne con PCOS 27

*Tabella 5. Caratteristiche cliniche ed endocrinologiche di donne con PCOS con pattern endometriale secretivo il giorno delle biopsie (Gruppo 1A) e di donne con infertilità idiopatica (Gruppo 2). I valori sono stati in media + SD. * Statisticamente significativo: $p < 0,01$. Non c'è stata alcuna differenza significativa tra le caratteristiche ormonali dei due gruppi.* 51

Tabella 6. -mediane dei valori delle sottopopolazioni linfocitarie ottenuti da endometrio e sangue periferico nei due gruppi di pazienti *Errore. Il segnalibro non è definito.*

Tabella 7. P-valori nominali e corretti, in accordo con la correzione di Bonferroni, ottenuti con il test di Mann-Whitney *Errore. Il segnalibro non è definito.*

INDICE DELLE FIGURE

Figura 1. Figure tipiche ottenute alla citofluorimtria: cellule uNK CD56 + e CD56 bright di un campione di endometrio ottenuto da donne con PCOS (Fig 1A) e da giovani pazienti fertili (Fig 1B) 59

Figura 2. Differenza di percentuale di sottopopolazione linfocitaria in endometrio secretivo avanzato di donne con PCOS e di giovani pazienti controllo. 59

1 INTRODUZIONE

La sindrome dell'ovaio policistico (PCOS) è una condizione eterogenea, la cui fisiopatologia sembra essere multi-fattoriale. Le sue principali caratteristiche sono l'iperandrogenismo e l'aspetto policistico dell'ovaio (1). Le sue principali manifestazioni cliniche sono rappresentate dalle irregolarità mestruali o assenza di mestruazione, infertilità, segni di iperandrogenismo e obesità. Sebbene la PCOS sia il disturbo endocrinologico più comune delle donne in età fertile (2), la sua definizione rimane controversa e gli aspetti della sua fisiopatologia e la storia naturale rimangono sconosciuti. La diagnosi di PCOS è una diagnosi che si effettua dopo aver escluso tutte le altre cause di iperandrogenismo. Inoltre, è un'ipotesi accreditata che alla base della PCOS vi sia un disordine genetico complesso in cui sono coinvolti una varietà di geni che interagiscono con fattori ambientali nel determinare la malattia (3). Studi familiari, infatti, hanno dimostrato la natura ereditabile della PCOS.

2 Definizione e Diagnosi

La definizione e quindi la diagnosi rimangono controverse, causando dibattiti accesi in molti forum scientifici. La difficoltà è legata alle caratteristiche intrinseche della sindrome (4): eterogeneità dei sintomi, variabilità degli stessi nelle diverse fasce di età, sovrapposizione dei criteri diagnostici strumentali e di laboratorio con situazioni fisiologiche e quindi mancanza di cut-off condivisi, utili nella pratica clinica. La confusione riguardo ai suddetti criteri, presente soprattutto fra studiosi americani ed europei, determina una tale eterogeneità delle popolazioni studiate da rendere difficile una progressione ed un confronto nella conoscenza dei processi patogenetici, degli eventuali trattamenti e delle sequele a distanza di questa sindrome. Si possono facilmente registrare queste differenze sfogliando la letteratura.

Storicamente, le ovaie policistiche venivano visualizzate alla laparotomia e successivamente la diagnosi era confermata dall'esame istologico della biopsia (*Stein e Leventhal, 1935*). Il disordine si presentava sin da allora eterogeneo: su 7 pazienti con ovaie policistiche bilaterali e oligo/amenorrea originariamente riportate da *Stein e Leventhal*, 4 erano obese, 5 erano irsute (di cui una con obesità), una era longilinea e con acne.

Attualmente si riconosce che una caratteristica relativamente uniforme della PCOS sembra essere l'eccesso di androgeni (5).

La diagnosi di iperandrogenismo si effettua in base alla presenza o di valori di laboratorio che mettono in evidenza livelli di androgeni sierici aumentati, oppure con l'esame clinico, che metta in evidenza segni di iperandrogenismo, fra i quali il più importante risulta l'irsutismo, anche in presenza di normali livelli di androgeni nel sangue.

Altre due caratteristiche sono spesso considerate fondamentali per la diagnosi ed includono: la disfunzione ovulatoria, spesso ma non sempre associata a disfunzioni mestruali e che affliggono l'80-100% delle pazienti; la morfologia policistica delle ovaie, generalmente evidenziabile all'ultrasonografia e presente nel 70-95% delle donne.

La PCOS è una diagnosi di esclusione: devono essere esclusi tutti quei disordini caratterizzati da eccesso di androgeni o disordini ovulatori con cause chiaramente definite. Questi includono: il deficit della 21-idrossilasi dell'iperplasia surrenalica non-classica (NCAH) che interessa l'1-10% delle donne irsute; la sindrome di Cushing con caratteristiche iperandrogeniche; carcinomi surrenalici e malattia di Cushing che affliggono <1% dei soggetti; neoplasie ovariche ed altre neoplasie surrenaliche androgeno-secerenti, presenti in 1: 300-1000 donne androgenizzate; farmaci anabolici esogeni, la cui prevalenza è sconosciuta, ma che generalmente risultano solo nelle androgenizzazioni minori.

Molti autori escludono anche disordini che possono sfociare in disfunzioni ovulatorie come la disfunzione tiroidea e l'iperprolattinemia o l'amenorrea ipotalamica, la cui prevalenza è dell'ordine dell'1-3%. Sono state poi riportate altre caratteristiche presenti nelle donne con PCOS, che includono l'obesità (nel 30-60% delle pazienti e che dipende dal paese d'origine) (5-9), l'insulino-resistenza e iperinsulinemia (presente nel 50-70%)(10-14), e il rapporto LH: FSH > 2 o 3 (nel 30-50%) (15-20).

Comunque queste caratteristiche non sono state incluse nei criteri diagnostici proposti, visto che entrambe sono presenti in altri disordini oltre che la PCOS.

Sebbene la PCOS non possa essere diagnosticata prima di 2-3 anni dopo del menarca, la condizione origina probabilmente precocemente durante l'infanzia o addirittura la vita fetale.

L'esposizione ad un eccesso di androgeni in utero è stata dimostrata in modelli animali in cui è stata riprodotta una sindrome PCOS simile (59).

Le caratteristiche cliniche e biochimiche della PCOS si potrebbero presentare anche come conseguenza di ipersecrezione di androgeni geneticamente determinata da parte delle ovaie durante l'infanzia precoce o la pubertà (59).

Gli androgeni potrebbero giocare un ruolo nel determinare un'anomala follicologenesi ovarica precoce, che potrebbe, a sua volta, portare ad una funzione anomala delle cellule della teca nella maturazione dei follicoli e, di conseguenza, a cicli anomali di crescita e funzione follicolare (59).

Secondo tale ipotesi risulterebbe un iperandrogenismo tale da 'programmare' l'unità ipotalamo-ipofisi, causando un eccesso di secrezione di LH, un'adiposità preferenzialmente addominale che predispone ad insulino-resistenza. La severità dell'iperinsulinemia e dell'insulino-resistenza sarebbero inoltre influenzati da entrambi i fattori genetici ed ambientali, in modo particolare l'obesità (59). Il carattere ereditario e familiare della PCOS suggerirebbe una forte componente genetica all'origine della sindrome. Ad oggi, sono stati analizzati i geni candidati per la PCOS. Sarebbero coinvolti nella patogenesi della sindrome quelli associati alla sintesi degli ormoni steroidei (CYP11A, CYP17 e i recettori degli androgeni), al metabolismo dei carboidrati (recettori dell'insulina, gene dell'insulina), all'azione delle gonadotropine (il gene follicolinico), e i geni della regione codificante per il complesso di istocompatibilità (60,61).

Gli effetti della PCOS al menarca non sono chiari, ma c'è evidenza di un rischio aumentato di pubertà precoce nelle donne che svilupperanno la PCOS (65,66). Comunque, c'è anche evidenza del contrario, cioè che il menarca avvenga più tardi in queste ragazze (64).

Recentemente, è stato redatto un documento di consensus, che raccogliendo le conclusioni del lavoro di confronto e discussione tra i vari studiosi, stabilisce criteri universalmente adottabili per un iter diagnostico standard, semplice e pratico, di questa complessa sindrome.

Ai criteri proposti per la definizione di PCOS si è arrivati attraverso una conferenza di esperti sponsorizzata dal National Institutes of Health/National Institute of Child Health and Human Development (NIH/NICHD) nell'Aprile del 1990, ed un'altra sponsorizzata dall'European Society for Human Reproduction and Embryology (ESHRE) and the American Society for Reproductive Medicine (ASRM) nel Maggio del 2003 (Tab.1) (21-25).

Tabella 1. Criteri proposti per la definizione di PCOS**NIH, 1990**

Include tutti i seguenti

Iperandrogenismo e/o iperandrogenemia

Oligo-ovulazione

Esclusione di disordini relativi

Amburgo 2002

Donne con uno o più dei seguenti dovrebbero essere sottoposti ad ultrasonografia ovarica

Disturbi mestruali

Irsutismo

Acne

Infertilità anovulatoria

Se l'ultrasonografia dimostra ovaie morfologicamente policistiche, viene allora confermata la diagnosi di ovaie policistiche. Se non sono stati fatti test biochimici aggiuntivi, e se è stato trovato qualcuno dei seguenti parametri anomalo viene fatta diagnosi di PCOS

Testosterone elevato

Indice degli androgeni elevato

Livelli di LH elevati

Glucosio subnormale: rapporto di insulina (< 4.5)

ESHRE/ASRM (Rotterdam), 2003

Include due dei seguenti, in aggiunta all'esclusione dei disordini relativi

Oligo- o anovulazione

Segni clinici e/o biochimici di iperandrogenismo

Ovaie policistiche

Tabella 1. Criteri proposti per la definizione di PCOS**Criteri NIH modificati**

Include tutti i seguenti

Eccesso di androgeni (iperandrogenismo clinico e/o biochimico)

Disfunzione ovarica (oligo-anovulazione e/o ovaie morfologicamente policistiche)

Esclusione di altri eccessi di androgeni o disordini ovulatori

Dopo l'esclusione delle patologie con quadri clinici simili, si conferma una diagnosi di PCOS quando sono presenti almeno 2 criteri sotto-elencati:

- oligoamenorrea e/o anovulazione;
- segni clinici e/o biochimici di iperandrogenismo;
- ecostruttura policistica dell'ovaio.

I criteri diagnostici attualmente applicati nella pratica clinica sono di tre categorie: clinici, ecografici e biochimici.

2.1 Sintomatologia Clinica

I segni clinici derivano da un'esagerata produzione di androgeni. Infatti, le pazienti lamentano, in maniera più o meno marcata, la presenza di acne, seborrea, cute grassa, irsutismo e spesso anche irregolarità mestruali.

In un'ampia serie di donne con PCOS, *Balen et al.* (30) riportavano che su 1871 donne con almeno un sintomo di PCOS (usando i vecchi criteri diagnostici), approssimativamente il 30% aveva un ciclo mestruale regolare, il 50% oligomenorrea e il 20% amenorrea. Di conseguenza, la maggior parte delle donne con PCOS ha un ciclo mestruale anomalo con mestruazioni infrequenti e anovulazione.

Goldzlieher e Green (31) suggerivano che approssimativamente l'85-90% di donne con oligomenorrea, e meno del 30-40% di quelle con amenorrea, avrebbero sviluppato PCOS.

2.1.1 Obesità

L'obesità sembra aumentare l'anovulazione nella PCOS attraverso l'aumento di produzione periferica di estrogeni, l'aumento della produzione pancreatica di insulina che interferendo con l'asse ipotalamo-ipofisi-ovaie provoca un aumento dei livelli di LH, che interferisce con la maturazione follicolare (32). Un aumento di peso può indurre oligo- o amenorrea e una riduzione del peso può ripristinare l'ovulazione e regolarizzare il ciclo (2).

Per quanto riguarda l'obesità, nella maggior parte degli studi il 35-50% di donne con PCOS risulta in sovrappeso ($BMI > 25 \text{ kg/m}^2$) o obesa ($BMI > 27 \text{ kg/m}^2$) (33,34). L'adiposità addominale è comune, con un aumento del rapporto fianco-vita. L'obesità aumenta il rischio di diabete di tipo 2, e meno del 30% di donne obese con PCOS ha insulino-resistenza e inoltre il 7,5% svilupperà un diabete franco a quaranta anni. L'obesità centrale si pensa sia un fattore di rischio significativo che aumenta di 7 volte il rischio di infarto del miocardio in donne con PCOS (36).

Comunque, gli effetti benefici della riduzione del peso sono abbondantemente conosciuti, nel determinare la frequenza di cicli mestruali regolari, reinstaurare l'ovulazione e normalizzare gli indici biochimici, in modo particolare l'insulino-resistenza (2,37).

A causa dell'aumento della prevalenza di insulino-resistenza e diabete di tipo 2 tra le donne obese con PCOS, si richiede un test di tolleranza orale di glucosio per le donne con PCOS obese ($BMI > 27 \text{ kg/m}^2$) (28).

L'associazione obesità e PCOS non è completamente conosciuta, sebbene si conosca che oltre ad un aumento dell'insulina sierica, LH e androgeni, endorfine ipotalamiche e leptine sono tutti aumentati in donne in sovrappeso in anovulazione.

2.1.2 Irsutismo

L'irsutismo nelle donne si descrive come la crescita di peli terminali in un adulto con una cattiva distribuzione. Si presenta comunemente come un eccesso di peli facciali, peli sul torace, tra le mammelle e sul basso addome. L'irsutismo è un fattore familiare e razziale. *Knochenhauer et al.* (29) hanno descritto una prevalenza di score di Ferriman-Gallwey anomalo di almeno 6.8 e 10 in una popolazione femminile selezionata di 8.2, 2.8 e 1.6% in donne bianche e 7.1, 6.1 e 2.1% in donne nere. In quelle con PCOS l'incidenza era maggiore del 70%.

La prevalenza e l'estensione dell'irsutismo è determinata parzialmente dalla razza ed è più comune nelle donne con PCOS di razza nera, più rara nelle donne giapponesi (38). L'irsutismo nelle PCOS è espressione di androgeni in eccesso, prevalentemente diidrotosterone locale. Le papille dermiche esprimono recettori per gli androgeni che influenzano direttamente il numero dei loro follicoli e quindi la loro produzione. Un peso inferiore riduce l'irsutismo (37,36).

Gli androgeni esogeni (come il contraccettivo orale combinato), sopprimono la produzione ovarica di androgeni e lo stimolo della SHBG (sex-hormone binding globulin), quindi riducono la circolazione di testosterone libero.

2.1.3 Alopecia

L'alopecia androgenica viene descritta come una perdita progressiva del pattern di peli terminali che è molto comune negli uomini calvi e molto meno comune nelle donne, sebbene probabilmente sia sottostimata nelle donne con PCOS (26). I requisiti per sviluppare l'alopecia sono una predisposizione familiare alla calvizie e una crescita associata di androgeni circolanti, conseguentemente non tutte le donne con un eccesso di androgeni circolanti, soffrirà di alopecia androgenica. Uno studio recente di 89 donne, di origine etnica mista, con alopecia androgenica ha dimostrato il 67% di incidenza di ovaie policistiche. In particolare il gruppo di donne di controllo aveva ovaie policistiche nel 27% dei casi, valutato in un precedente studio (27). Delle donne con alopecia androgenica, il 21% erano anche irsute, contro il 4% del gruppo di controllo.

2.1.4 Acne

L'acne è un disordine infiammatorio dei follicoli piliferi ed è associato alle ghiandole sebacee e apocrine. Si manifesta in meno di 1-3 donne con PCOS (26,30). Diversamente dall'alopecia androgenica e dall'irsutismo, il problema principale delle donne con acne è un aumento della secrezione di sebo, mentre il livello di androgeni sierico spesso non è aumentato.

2.1.5 L'acanthosis nigricans

L'acanthosis nigricans è un'eruzione mucocutanea che si manifesta più frequentemente nella regione delle ascelle, delle fessure cutanee e sulla nuca del collo.

Si manifesta come un aumento della pigmentazione e papillomatosi. È un marker associato a insulino-resistenza e per compenso aumenta la secrezione di insulina (40).

È abbastanza rappresentata in donne con PCOS nell'1-3% dei casi e si può presentare più comunemente in adolescenti con PCOS (Tab. 2).

Tabella 2. Sintomi e segni clinici in donne con sindrome dell'ovaio policistico				
	Percentuale di frequenza dei sintomi o segni			N. di casi
	Balen et al n=1741(%)	Franks N=300 (%)	Goldzieher et al n=1079 (%)	
<i>Disturbi del ciclo mestruale</i>				
oligomenorrea	47	52	29	547
amenorrea	19	28	51	640
irsutismo	66.2	64	69	819
obesità	38	35	41	600
acne	35	27	-	-
alopecia	6	3	-	-
acanthosis nigricans	3	<1	-	-
Infertilità (primaria/secondaria)	20	42	74	596

2.2 Criteri ecografici

L'aspetto policistico dell'ovaio all'esame ultrasonografico è stato selezionato come uno dei possibili criteri per la diagnosi di PCOS (vedi Tabella 1). In accordo con la letteratura (*Pache et al., 1992; van Santbrink et al., 1997; Jonard et al., 2003*), criteri soddisfacenti per specificità e sensibilità per definire le ovaie come policistiche sono i seguenti: presenza di 12 o più follicoli in entrambe le ovaie della misura di 2-9 mm di diametro, e/o l'aumento del volume ovarico (>10 ml). La distribuzione dei follicoli non dovrebbe essere considerata un criterio valido come pure l'aumento dell'ecogenicità e del volume dello stroma. Sebbene l'aumento del volume stromale sia una caratteristica delle PCO (*Bucket et al., 2003*), è stato visto anche che la misura del volume ovarico è un buon indice per la quantificazione del volume stromale nella pratica clinica (*Dewailly et al., 1994*). Questa definizione non è applicabile a donne che fanno uso di pillola orale contraccettiva, perché il suo uso modifica la morfologia delle ovaie in donne normali e presumibilmente anche in donne con PCO (*Christensen et al., 1997*). Se i criteri sopra descritti sono attribuibili ad un solo un ovaio è ugualmente possibile definire le ovaie come policistiche. Se c'è evidenza di un follicolo dominante (>10 mm) o di un corpo luteo, la scansione dovrebbe essere ripetuta al ciclo successivo.

La presenza di una cisti anomala o ovaie asimmetriche (che possono suggerire la presenza di una cisti omogenea) necessita di ulteriori indagini. Donne che hanno PCOS in assenza di un disordine ovulatorio o iperandrogenismo ('PCO asintomatiche') non dovrebbero essere diagnosticate come PCOS, finchè non vengano acquisite ulteriori informazioni circa la sintomatologia clinica (*Dewailly, 1997*).

L'aspetto policistico delle ovaie si riscontra spesso in donne in preparazione per una stimolazione ovarica per IVF in assenza di altri segni di PCO. Queste ovaie, quando stimolate, si comportano come le ovaie di donne con PCOS ed hanno un rischio aumentato di iperstimolazione e OHSS (*McDougall et al., 1992*).

In aggiunta l'ultrasonografia prevede l'opportunità di eseguire in queste pazienti uno screening per l'iperplasia endometriale.

Dovrebbero essere considerate le seguenti raccomandazioni tecniche:

- E' richiesta un'equipe ecografica esperta;
- Quando possibile, l'approccio transvaginale dovrebbe essere preferito, in modo particolare in donne obese;
- Donne che menstruano regolarmente dovrebbero essere sottoposte a scansione nella fase follicolare precoce (3-5 giorno del ciclo). Donne oligo-/amenorroiche dovrebbero essere sottoposte a scansione random oppure tra il 3-5 giorno dopo l'induzione del ciclo mestruale con progesterone;

-
- Il calcolo del volume ovarico deve essere eseguito usando la formula semplificata del perimetro dell'ellisse ($0.5 \times \text{lunghezza} \times \text{larghezza} \times \text{profondità}$) (*Swanson et al., 1981*);
 - Il numero dei follicoli dovrebbe essere stimato in entrambe le scansioni dell'ovaio: longitudinale e antero-posteriore. La dimensione dei follicoli < 10 mm dovrebbe essere espressa come la media dei diametri misurata nelle due sezioni.

2.3 Parametri biochimici

Molte pazienti con PCOS hanno evidenza di iperandrogenemia, e le osservazioni recenti suggeriscono che i livelli di androgeni circolanti possono anche rappresentare un marker ereditario di eccesso di androgeni (Legro *et al.*, 1998). Comunque, si è anche chiaramente denotato che una certa percentuale di pazienti con PCOS può non presentare un eccesso di androgeni circolanti (Knochenhauer *et al.*, 1988; Pugeat *et al.*, 1993; Balen *et al.*, 1995; Asuncion *et al.*, 2000; Laven *et al.*, 2002).

I limiti nel definire l'eccesso di androgeni attraverso la misura dei livelli di androgeni circolanti è dovuto, in parte, all'inaccuratezza e variabilità dei metodi di misura di laboratorio spesso usati (Rosner *et al.*, 1997; Boots *et al.*, 1998; Vermeulen *et al.*, 1999):

- Ci sono vari tipi di androgeni non tutti valutabili (Rittmaster, 1993);
- Non sono stati stabiliti valori normali per il livello degli androgeni sulla base di popolazioni controllo ben caratterizzate;
- Età ed indice di massa corporea (BMI) non sono stati considerati quando sono stati stabiliti i valori normali per i livelli di androgeni (Moran *et al.*, 1999; Bili *et al.*, 2001);
- Sono presenti pochi dati sulle adolescenti e sulle donne più anziane;

- Gli androgeni sono soppressi più rapidamente rispetto ad altre caratteristiche cliniche da terapie soppressive ormonali e possono rimanere soppressi anche dopo la sospensione di trattamenti ormonali.

A dispetto di queste limitazioni, si è visto che la misura di testosterone libero (T) o l'indice di T libero (free androgen index, FAI) (Vermeulen *et al.*, 1999) risultano i metodi più sensibili per valutare l'iperandrogenemia (Cibula *et al.*, 2000; Imani *et al.*, 2000).

Si è notato che la sola misura del T totale può non essere un marker molto sensibile di eccesso di androgeni. Una piccola frazione di pazienti con PCOS può avere un aumento isolato del deidroepiandrosterone solfato (DHEA-S). Alcuni hanno valutato che la misura del T totale e DHEA-S aveva un significato nella valutazione di pazienti con tumore androgeno-secrente (Meldrum e Abraham, 1979), sebbene dati più recenti suggeriscono che il miglior predittore di queste neoplasie è la manifestazione clinica (Derksen *et al.*, 1994).

Pochi dati sono validi sul valore della misura di androstenedione di routine nelle pazienti iperandrogeniche (Laven *et al.*, 2002), sebbene si sia notato che esso potrebbe essere qualche volta più elevato in pazienti con deficit di 21-idrossilasi NCAH piuttosto che nelle PCOS. Tuttavia, la scarsa quantità di informazioni per l'androstenedione ne ha precluso la sua raccomandazione per la valutazione di routine di iperandrogenemia.

Sia il solo livello di LH circolante che il rapporto LH/FSH sono significativamente elevati in donne con PCOS quando confrontati con controlli sani (*Fauser et al., 1991; Taylor et al., 1997*). Questo è dovuto ad un aumento dell'ampiezza e frequenza di pulsatilità dell'LH (*Waldstreicher et al., 1988*).

Concentrazioni elevate di LH (circa il 95° percentile del normale) possono essere osservate in circa il 60% delle donne con PCOS (*van Santbrink et al., 1997; Laven et al., 2002*), mentre il rapporto LH/FSH può essere elevato in circa il 95% dei soggetti (*Taylor et al., 1997*) se vengono escluse le donne che hanno avuto una recente ovulazione.

Un elevato rapporto LH/FSH rappresenta un criterio con alta specificità ma bassa sensibilità, dal momento che in meno del 50% delle donne con PCOS ha un valore superiore a 2. Un valore normale di questo rapporto non permette di escludere la diagnosi di questa patologia.

I livelli di LH possono essere influenzati dalla relazione temporale con l'ovulazione, che transitoriamente normalizza l'LH, dal BMI (essendo maggiore in donne PCOS magre) e dal sistema di misurazione usato.

L'azione potenzialmente negativa dell'LH sulla riproduzione umana è fortemente controversa. Alcuni autori hanno suggerito che livelli alti di LH potrebbero aver effetti determinanti sulla maturazione degli ovociti e sulla fecondazione (*Tarlatzis et al., 1995*).

Altri autori hanno escluso un'azione dannosa dell'LH sugli oociti e sulla qualità degli embrioni, o sulla fertilizzazione, impianto e percentuale di gravidanze (Gordon *et al.*, 2001; Mendoza *et al.*, 2002). I livelli di LH endogeno o la somministrazione di LH esogeno non sembrano influire sulla percentuale dei cicli ovulatori o sulla percentuale di gravidanze evolutive da cicli indotti usando ciproterone acetato (Imani *et al.*, 2002) o gonadotropine esogene (Al-Inani *et al.*, 2003; Mulders *et al.*, 2003).

Basandosi sui dati precedentemente menzionati, la commissione ha visto che la misura dei livelli sierici di LH non dovrebbe essere considerata necessaria per la diagnosi clinica di PCOS. I livelli di LH potrebbero essere usati come parametro secondario (specialmente in donne magre con amenorrea, o nell'ambito della ricerca). In aggiunta sono necessari ulteriori dati circa l'evidenza clinica di LH nella PCOS e i potenziali effetti di soppressione di LH con analogo del GnRh o il suo aumento attraverso la somministrazione di LH a diversi stadi di maturazione follicolare.

Infine molti studi sono stati pubblicati negli ultimi anni sull'utilizzo diagnostico del test con GnRH analogo, che dimostra nelle pazienti PCOS un'esagerata produzione di 17-OH-progesterone per una disregolazione della 17-liasi (citocromo p450); non sembra comunque un test altamente specifico ed è sicuramente poco pratico da eseguire.

3 Implicazioni cliniche: sindrome metabolica, rischio di carcinoma endometriale, infertilità/sterilità

3.1 Sindrome metabolica

La PCOS è caratterizzata oltre che dai noti sintomi clinici anche da una serie di problematiche metaboliche che negli ultimi anni sono state ampiamente indagate e sono tuttora oggetto di studio nella letteratura internazionale. Questo rende la PCOS una sindrome con implicazioni sistemiche oltre che sulla sfera riproduttiva.

La PCOS rappresenta un fattore di rischio maggiore di diabete di tipo 2 (28) e diabete gestazionale (41). Recenti studi hanno riportato che su 254 donne in sovrappeso con PCOS, il 31% ha sviluppato intolleranza al glucosio (IGT) e il 7,5% il diabete secondo i criteri WHO. Queste percentuali scendevano invece al 10,3% e 1,5% in donne affette da PCOS con peso normale (28). C'è una crescita stabile nello sviluppo di intolleranza al glucosio e diabete mellito di tipo 2 nel tempo nelle donne con PCOS. *Norman et al* (50) hanno osservato il controllo glicemico di 67 donne con PCOS per oltre 6 anni.

Delle donne normoglicemiche all'inizio dello studio, il 9% ha sviluppato intolleranza al glucosio e l'8% ha sviluppato diabete di tipo 2. Di quelle che hanno sviluppato intolleranza al glucosio all'inizio dello studio, il 54% ha sviluppato diabete di tipo 2 sei anni dopo. Conseguentemente, in vista dell'alta prevalenza di insulino-resistenza (51) e dello sviluppo di intolleranza al glucosio in donne obese con PCOD (28,50), si raccomanda ora un test orale di tolleranza al glucosio e viene eseguito uno screening metabolico per donne con PCOS obese (PCOS > 27 Kg/m²).

L'insulino-resistenza è associata con anomalie riproduttive in donne con PCOS (vedi anche Tabella 3). Migliorando la sensibilità insulinica attraverso entrambi: stile di vita e intervento farmacologico possiamo migliorare questa anomalie.

L'isulino-resistenza, definita come una diminuzione dell'utilizzo di glucosio mediante insulina, si trova comunemente in una popolazione ampia (10-25%) quando vengono eseguiti studi dinamici sofisticati d'azione dell'insulina (*Ferrannini et al., 1997*). Comunque, criteri per selezionare un cut-off anomalo si mostrano variabili. Insulino-resistenza in donne con PCOS non sembra più comune (al di sotto del 50%), in entrambe le donne obese e non-obese (*Dunaif et al., 1989*). La prevalenza di insulino-resistenza in donne con PCOS dipende variamente dalla sensibilità e specificità dei test utilizzati e dalla eterogeneità della PCOS.

Non ci sono attualmente test clinici validi per valutare l'insulino-resistenza nella popolazione generale.

Altre consensus conferences hanno raccomandato anche lo screening per insulino-resistenza in entrambe: la popolazione generale e la popolazione ad alto rischio (*American Diabets Association, 1997*).

Invece, sono stati sviluppati dei criteri per definire la sindrome metabolica, che includono componenti associati con la sindrome da insulino-resistenza, quali l'obesità centripeta, l'ipertensione, l'iperglicemia a colazione e la dislipidemia (Tabella 4) (*Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults, 2001*).

Altri gruppi hanno raccomandato di aggiungere il test da carico orale di glucosio (OGTT) a quei test ematici a colazione e valutare i valori di glucosio a 2 h dopo un carico orale di glucosio di 75 g per l'intolleranza al glucosio [criteri WHO, test di tolleranza al glucosio (IGT) >140-199 mg/dl] (*Bloomgarden, 2003 a,b*).

L'IGT è stata riconosciuta a lungo come il maggior fattore di rischio per diabete (*Norman et al., 2001*), e studi recenti hanno dimostrato che la progressione verso il diabete in individui con IGT può essere ritardata da cambiamenti dello stile di vita e interventi farmacologici (*Buchanan et al., 2002; Knowler et al., 2002*). In aggiunta, l'IGT identifica individui a rischio per eccessiva mortalità, specialmente donne (*Anonymous, 1990; Tominaga et al., 1999*).

Data l'alta prevalenza di IGT e diabete di tipo 2 come diagnosticati dall'OGTT in donne obese con PCOS, è prudente effettuare uno screening con OGTT alle donne obese (BMI>27 kg/m²) con PCOS (*Ehrmann et al., 1990; Legro et al., 1990*). Sono necessari pochi studi di prevalenza delle caratteristiche della sindrome metabolica sia in donne magre che obese con PCOS.

Attualmente i dati a disposizione sono insufficienti per stabilire dei markers di insulino-resistenza e che possano predire la risposta al trattamento (*Mughetti et al., 2000; Imani et al., 2000; Azziz et al., 2001*). Quindi, il ruolo di questi markers nella diagnosi di PCOS, così come nel selezionare trattamenti specifici è incerto. L' esecuzione di test di sensibilità all'insulina risulta di maggiore interesse al fine di studiare:

1. la fisiopatologia della PCOS;
2. giovani adolescenti con una storia combinata di basso peso alla nascita e un eccesso dopo la nascita;
3. i meccanismi di risposta alla terapia;
4. i fenotipi familiari.

Tabella 3. Sintesi degli esiti della consensus conference del 2003 circa lo screening sulle malattie metaboliche in donne con PCOS

1. non è necessario un test di insulino-resistenza per fare diagnosi di PCOS, non sono necessari trattamenti selettivi
2. donne obese con PCOS dovrebbero essere sottoposte a screening per la sindrome metabolica, includendo l'intolleranza glucidica con il test di intolleranza orale al glucosio
3. sono necessari pochi studi in donne non-obese con PCOS per determinare l'utilità di questi test, sebbene essi possano essere considerati utili nel caso ci siano rischi aggiuntivi di insulino-resistenza, come una storia familiare di diabete

Tabella 4. Criteri per la definizione di sindrome metabolica in donne con PCOS

Fattori di rischio	Cut-off
1. obesità addominale (circonferenza vita)	> 88 cm (> 35 dentro)
2. trigliceridi	≥ 150 mg / dl
3. HDL-C	< 50 mg / dl
4. pressione sanguigna	≥ 130 / ≥ 85 mmHg
5. colazione e 2 h glicemia da OGTT	110-126 mg / dl e/o 2 h glicemia 140-199 mg / dl

tre su cinque sono necessari per la sindrome.

HDL-C, alta densità di lipoproteine-colesterolo; OGTT, test di tolleranza orale di glucosio.

Ci sono linee severe di evidenza che suggeriscono che le donne con PCOS hanno anche un aumentato rischio di malattie cardiovascolari (*Dahlgren et al., 1992b*). L'insulino-resistenza è associata ad una suscettibilità maggiore del normale a malattie delle coronarie ed aortiche, e donne con PCOS hanno evidenza di dislipidemia (*Conway et al., 1992; Robinson et al., 1996; Talbott et al., 1998; Legro et al., 2001*) e markers di funzione vascolare anomala (*Talbott et al., 2000; Paradisi et al., 2001; Christian et al., 2003*). Il rischio di patologie cardiovascolari è incerto momentaneamente (*Wild et al., 2002; Legro et al., 2003*). Dati epidemiologici limitati non hanno dimostrato un aumento degli eventi cardiovascolari, ma bisogna tener presenti due fattori: la giovane età degli studi di coorte (circa 55 anni) e la possibilità che nella PCOS siano presenti fattori sconosciuti che proteggono il cuore contro altri fattori di rischio.

Si pensa inoltre che donne con PCOS siano ad aumentato rischio di sviluppare il cancro dell'endometrio per anovulazione cronica con un'incontrastata esposizione dell'endometrio agli estrogeni. Comunque, gli studi epidemiologici che supportano questa ipotesi hanno notevoli limiti (*Hardiman et al., 2003*).

Attualmente, non possono essere tratte delle conclusioni certe, secondo gli esiti della consensus conference sembra che la PCOS sia associata ad un aumentato rischio di diabete di tipo 2.

Il rischio è maggiore in donne con anovulazione con PCO, in soggetti obesi e con una storia familiare di diabete di tipo 2.

Sono necessarie molte ricerche per: valutare i livelli di rischio; identificare i pazienti a rischio; provvedere ad un follow-up longitudinale di coorte di PCOS nei loro 60 anni e oltre; e determinare il posto, il tempo e l'efficacia delle misure interventistiche.

Sebbene molte domande rimangono irrisolte, cambiamenti di stile di vita (dieta ed esercizio fisico) dovrebbero essere incoraggiati fortemente per ridurre il rischio di entrambi: diabete di tipo 2 e malattie cardiovascolari (*Kiddy et al., 1992; Clark et al., 1995; Huber-Buchholtz et al., 1999; Moran et al., 1999, 2003*).

La presenza di obesità e/o insulino resistenza ha importanti implicazioni cliniche in termini di morbilità, dovuta a diabete mellito, dislipidemie, ipertensione e malattie cardiovascolari. Dall'altro lato l'obesità e l'iperinsulinismo potrebbero costituire due principali fattori nello sviluppo dell'anovularietà cronica. La patogenesi dell'anovularietà nella PCOS vede, infatti, un possibile ruolo dell'insulina, oltre che a livello ovarico, anche a livello della secrezione delle gonadotropine.

Questo tipo di relazione è stato ben documentato da Kiddy (52) che ha mostrato una ridotta sensibilità all'insulina in un gruppo di donne PCOS oligomenorriche se paragonate sia ad un gruppo di controllo che a pazienti PCOS con cicli mestruali regolari.

In effetti, *Velazquez e coll.* mostrano come una terapia con metformina sia capace di ridurre l'insulinoresistenza e di regolarizzare i cicli mestruali nel 96% delle pazienti PCOS.

Un altro elemento di rischio in epoca riproduttiva è rappresentato dalla gravidanza, condizione di fisiologica insulinoresistenza grazie alla quale la madre assicura al feto un adeguato quel glicometabolico, che in queste pazienti determina un ulteriore elemento di stress che condiziona l'instaurarsi di una patologia glucidica sotto forma di diabete gestazionale o ridotta tolleranza. Numerosi studi, in effetti, evidenziano come i soggetti iperinsulinemici siano a rischio per sviluppo di patologia glucidica in gravidanza, mentre tale rischio sarebbe meno rilevante in quelle con normale secrezione insulinemica pregestazionale.

L'associazione tra PCOS e diabete gestazionale è stata poi valutata anche da Holte (53), che ha mostrato una prevalenza di PCOS del 41% in donne che, in una precedente gravidanza avevano sviluppato un diabete gestazionale con un'elevata resistenza periferica all'insulina e/o un'alterata funzionalità pancreatica. Altri studi inoltre hanno mostrato, sempre in questa specifica popolazione, un'amentata prevalenza di ipertensione gestazionale e pre-eclampsia, probabilmente determinata da danni dovuti sempre all'iperinsulinemia con relativo instaurarsi di ipertensione e alterazioni dello sviluppo fetale.

3.2 *Iperplasia endometriale e ca dell'endometrio*

L'iperplasia endometriale riguarda il 35% delle donne con PCOS. Perciò sono soggette ad un maggior rischio di iperplasia endometriale donne che hanno meno di quattro mestruazioni l'anno ed uno spessore endometriale, valutato con l'ultrasonografia, > di 7 mm (65). Il carcinoma endometriale rappresenta l'8% di tutti i cancri delle donne, e perciò sono a maggior rischio donne obese, con diabete di tipo II, e PCOS, di cui quelle associate ad iperinsulinemia. È stata considerata interessante in letteratura la relazione tra iperinsulinemia, iperplasia endometriale e cancro, e sono stati ipotizzati e investigati diversi meccanismi potenziali. I recettori per l'insulina sono presenti nell'endometrio normale (59) e nel cancro dell'endometrio (75), suggerendo un ruolo potenziale dell'iperinsulinemia sulla crescita e sviluppo del carcinoma dell'endometrio.

La ricerca di diverse vie di segnale attivate nelle cellule stromali endometriali umane, suggerisce che l'insulina può avere funzione omeostatica a dosi più basse e può predisporre a proliferazione cellulare a dosi maggiori.

L'insulina stimola la proliferazione cellulare delle linee cellulari di cancro endometriale ER-negative ed ER-positive. Forse, può giocare un ruolo promotore nell'angiogenesi tumorale attraverso l'induzione dell'espressione di fattori crescita vascolari endometriali (VEGF).

L'insulina stimola anche l'espressione di aromatasi e l'attività di enzimi nelle ghiandole endometriali e nello stroma, ed in assenza di E2, stimola direttamente la sintesi di enzimi aromatasici, questo può rappresentare un altro meccanismo per l'aumento di proliferazione cellulare indotto dall'insulina (76). L'insulina può anche promuovere il tumore inibendo l'apoptosi e stimolando la proliferazione cellulare.

3.3 *Infertilità/Sterilità*

L'infertilità in donne affette da PCOS è essenzialmente correlabile ad una condizione di cronica anovularietà e scarsa qualità ovocitaria, tuttavia recenti evidenze sperimentali suggeriscono che tale sindrome provochi alterazioni della crescita e differenziazione dell'endometrio con conseguente deficit di impianto e abortività ricorrente.

3.3.1 PCOS ed anovularietà

La PCOS è caratterizzata dall'alterazione dei network biologici, e probabilmente, la sua insorgenza è legata ad un'iniziale alterazione di uno di questi network che, su soggetti predisposti, si ripercuote a "cascata" sugli altri nuclei del sistema neuroendocrino.

Nella PCOS è ben nota la presenza di un'inappropriata secrezione delle gonadotropine caratterizzata da elevati livelli di LH rispetto ai livelli di FSH inferiori del 30% e un rapporto LH/FSH generalmente aumentato. Da un punto di vista fisiopatologico l'eccessiva produzione di androgeni di origine ovarica è legata ad un aumento della frequenza e dei *pulse* di LH. Il meccanismo della inappropriata secrezione di LH non è ben chiaro. Secondo Yen, l'assenza di esposizione ciclica al progesterone, causata dall'anovulatorietà cronica, determinerebbe un rallentamento della frequenza dei *pulse* di LH. Un'altra interessante ipotesi pone come uno dei fattori determinanti, anche dei relativi bassi livelli di FSH, un'accelerata frequenza del GnRH *generator* o in ultima ipotesi, una modificata sensibilità ipofisaria all'ormone ipotalamico. È stato dimostrato che nelle donne con PCOS, la somministrazione di GnRH determina un'esagerata risposta secretoria di LH.

Al contrario, diversi studi hanno evidenziato che in donne obese con PCOS è stata riscontrata una diminuzione dei *pulse* spontanei o dopo il test di stimolo al GnRH, senza significative modifiche della frequenza.

L'iperstimolazione cronica di LH determina un'aumentata secrezione degli androgeni prodotti a livello ovarico dal compartimento tecale. Tali dati vengono confermati anche da studi in vitro che dimostrano una capacità steroidogenetica del compartimento tecale circa 8-20 volte maggiore del normale (106).

Pertanto, nella steroidogenesi ovarica è stata postulata un'anomala regolazione del citocromo P450, un blocco parziale di alcuni enzimi (aromatasi, 17-idrossilasi e 3 β -idrossideidrogenasi) e la presenza di una 11 β -idrossilasi (enzima normalmente presente solo nel surrene). A tali alterazioni vanno a sommarsi gli stimoli trofici endocrini (LH) e paracrini (asse insulina-IGF) che determinano questa iperattività steroidogenetica dell'ovaio.

Nella PCOS si riscontra a livello follicolare un arresto maturativo, una scarsa densità di cellule della granulosa e una diminuita attività ovulatoria con conseguente ridotta produzione di estradiolo in vivo. Tuttavia, studi in vitro sulle cellule della granulosa, hanno dimostrato un'alta responsività all'FSH e un attivo processo di aromatizzazione. Pertanto, è stata suggerita una scarsa responsività in vivo all'FSH stesso o altri suoi stimolatori (IGF-1).

Per molto tempo si è discusso sull'eventuale alterazione dell'asse ipotalamo-surrene nella PCOS. L'iperandrogenismo di origine surrenalica, escludendo le forme da deficit enzimatici parziali, sembra essere determinato dalla iperfunzione della P450c17 nella zona reticolata della corteccia surrenalica. Questa alterazione è presente in una percentuale di donne con PCOS variabile tra il 20 e il 40% nelle quali vengono riscontrati livelli di DHEAS e 11β -OH androstenedione o risposte esagerate in $17(\text{OH})\text{P}$ dopo test da stimolo con ACTH. Ulteriori studi ipotizzano un coinvolgimento dell'insulina nella steroidogenesi surrenalica: studi dinamici e valutazioni dopo impiego di farmaci ipoinsulinemizzanti dimostrano un'azione sinergica dell'iperinsulinismo con l'ACTH così come accade nell'ovaio. Sulla base di queste considerazioni è stata ipotizzata una teoria secondo la quale nella PCOS ci possa essere un adrenarca esagerato, che prima dell'attivazione dell'ovaio, produrrebbe quantità eccessive di androstenedione per la conversione periferica extraghiandolare (soprattutto a livello del tessuto adiposo) in estrone. Tale situazione determinerebbe da una parte l'invio di "messaggi" non corretti ai centri riproduttivi superiori, dall'altra la comparsa di effetti trofici prematuri dell'asse riproduttivo.

Ci sono dati conflittuali se la qualità dell'ovulo e dell'embrione siano compromessi in donne con PCOS sottoposte a fertilization-embryo transfer (IVF-ET).

L'obesità si è visto essere associata ad una produzione minore di oociti e ad una maggiore richiesta di stimolazione gonadotropinica, oltre che ad un aumento di percentuale di aborti in gruppi con insulino-resistenza, sebbene questo non sia statisticamente significativo. Uno studio più recente sullo stesso gruppo ha dimostrato che l'obesità è un fattore di rischio significativo per aborto spontaneo dopo IVF-ET o iniezione intracitoplasmatica di sperma per infertilità maschile (57).

3.3.2 PCOS ed endometrio

C'è una crescente evidenza che le anomalie endocrinologiche e metaboliche nella PCOS abbiano degli effetti complessi sull'endometrio, contribuendo all'infertilità e ai disordini endometriali osservati nelle donne con questa sindrome. I recettori per gli androgeni e i recettori steroidei coattivatori sono 'over-espressi' nell'endometrio di donne con PCOS.

Anche, biomarkers di ricezione endometriale all'impianto dell'embrione - come $\alpha\beta3$ -integrina e glicodelina- sono diminuiti, ed un'anomala espressione dei recettori estrogenici α (ER α) persiste nella finestra di impianto dell'endometrio in donne con PCOS.

Oltre ad essere responsivo agli ormoni steroidei quali estradiolo, progesterone ed androgeni, l'endometrio è anche un bersaglio per l'insulina, il cui recettore è regolato ciclicamente in donne normo-ovulatorie. In vitro, l'insulina inibisce il normale processo di differenziazione stromale endometriale (decidualizzazione).

Inoltre, insulin-like growth factors (IGFs) e le loro proteine di legame sono presenti in componenti cellulari endometriali. L'iperinsulinemia provoca una down regulation dell'IGFBP-I epatico, con conseguente aumento dell'IGF-I libero in circolo.

Perciò, estrogeni elevati (senza l'effetto di contrasto del progesterone in assenza di ovulazione), iperinsulinemia, elevati livelli di IFG-I libero, androgeni ed obesità tutti contribuiscono alla disfunzione endometriale, infertilità e aumento di percentuale di aborto, in donne con PCOS. Il potenziale meccanismo sottostante questi disordini, specialmente in donne con PCOS, è complesso e richiede ulteriori ricerche transdisciplinari per la loro completa delucidazione. Diverse linee di evidenza supportano l'espressione di un gene anomalo e che la manifestazione clinica del fallimento d'impianto, aborto, iperplasia endometriale e cancro possano essere attribuiti alla iperinsulinemia cronica, iperestrinismo non bilanciato, all'iperandrogenemia, ed agli effetti di membri di fattori di crescita insulino-simili familiari (IGF). Comunque, livelli di E2 moderatamente elevati sono stati ritrovati casualmente in seguito all'aumento della conversione periferica di androstenedione in estrone nel tessuto adiposo. Ed E2 libero e testosterone sono elevati in circolo in una situazione di iperinsulinemia, dovuto in parte alla down-regulation dell'insulina della sex-hormone-binding globulin (SHBG) (62,63).

Perciò, la crescita endometriale e la differenziazione in donne con PCOS sono influenzate dagli androgeni, dall'insulina ed estrogeni non contrastati.

In assenza di ovulazione e degli effetti regolatori degli estrogeni, l'endometrio non va incontro alla trasformazione secretiva ed è continuamente esposto agli effetti stimolatori e mitogenici dell'E2 che possono indurre un'overcrescita endometriale, pattern di sanguinamenti imprevedibili, iperplasia e cancro (64,65).

L'espressione dei recettori degli ormoni steroidei nell'endometrio umano è ciclo-dipendente (60,66). ARs sono espressi nello stroma endometriale e nell'epitelio in donne normo-ovulatorie e decrescono gradualmente dalla fase proliferativa alla fase secretiva (66).

Donne con PCOS dimostrano espressione di AR endometriali elevati se comparate ai controlli normali, in età fertile (67), probabilmente dovuto ad un'ovulazione relativamente infrequente e perciò bassi livelli di progesterone disponibili all'azione sull'endometrio.

Mentre l'anovulazione è una causa ovvia di infertilità in donne con PCOS, ci sono dati emergenti che la recettività endometriale, la qualità degli oociti e il rischio aumentato di aborto contribuiscono all'infertilità nell'ambito dell'induzione dell'ovulazione. La percentuale di aborto riportata è del 30-50% di tutti i concepimenti di donne con PCOS (55,69).

Inoltre, oltre il 30% di donne con aborti ricorrenti è affetto da PCOS (70).

Esistono diverse condizioni in donne con abortività ricorrente (con PCOS), che includono livelli elevati di LH e testosterone libero, basso progesterone luteale, e sviluppo endometriale ritardato (71).

Molte di queste caratteristiche si riscontrano frequentemente in donne con PCOS quando vengono trattate per infertilità. Donne con androgeni elevati hanno una percentuale maggiore di deficit di impianto e aumenta la percentuale di aborti se comparate a donne della stessa età, BMI e livelli di insulina (56).

Sono stati riscontrati in donne con PCOS diminuiti livelli di alcuni markers di recettività endometriale quali la glicodelina ed $\alpha\gamma\beta 3$ integrina. Tali molecole sarebbero implicate nella modulazione della risposta immunitaria materna al momento dell'impianto embrionario. In particolare tali molecole sarebbero essenziali per l'immunotolleranza del sistema immunitario materno nei confronti degli antigeni embrionari.

Studi sperimentali in vitro hanno dimostrato che gli androgeni sono in grado di provocare una riduzione della produzione di tali markers da colture cellulari di endometrio (87,88).

Donne con abortività ricorrente hanno bassi livelli sierici di *glicodelina*, un prodotto endometriale (72) ed in biopsie endometriali di donne con PCOS l'espressione di tali markers molecolari di recettività endometriale risulta comunque ridotta, anche quando si ripristina l'ovulazione mediante induzione con clomifene citrato (73,74).

E' stato dimostrato che nell'ambito del tessuto endometriale la produzione dei markers di recettività, glicodelina e galactina-1, sarebbe a carico della componente leucocitaria, in particolare di una particolare sottopopolazione linfocitaria: le cellule uterine Natural Killer (uNK) in cui si è dimostrata una elevata espressione dei geni per tali molecole (78).

Le cellule uNK, chiamate anche grandi linfociti granulati (LGLs), sono fenotipicamente simili alla popolazione dei linfociti CD56+ del sangue periferico ma, cosa importante, sono biologicamente e funzionalmente differenti (78). In particolare, le uNK sono identificate dall'espressione del marker antigenico CD56 ad alta concentrazione (CD56 bright) e dalla mancanza di espressione di altri markers tipici delle NK come il CD16, presente invece sulla maggior parte delle NK del sangue periferico (79). Durante il normale ciclo mestruale c'è un aumento significativo del numero delle cellule uNK durante tutta la fase secretiva (80) e nella fase iniziale della gravidanza quando le uNK comprendono più del 70% dei leucociti endometriali nella decidua del primo trimestre (81). Le uNK giocano chiaramente un ruolo critico nella tolleranza dell'impianto fetale emi-allogenico (82,83,84); infatti nell'endometrio di donne con abortività ripetuta (RPL), paragonate a donne fertili controllo, è stata trovata una percentuale più bassa di NK CD56 bright, ed una percentuale maggiore di NK CD56 dim CD16+ con una maggiore attività citolitica, (85,86).

Mentre ci sono dati sempre maggiori in letteratura che attribuiscono lo scarso potenziale riproduttivo tipico delle donne con PCOS ad un'anomalia nella crescita e differenziazione endometriale, non è stato ancora studiata l'eventuale variazione della percentuale e del fenotipo delle uNK come delle altre sottopopolazioni leucocitarie nell'endometrio di tali pazienti

Scopo dello studio, dunque, è stato valutare attraverso la citofluorimetria la percentuale delle sottopopolazioni leucocitarie nell'endometrio di giovani donne con PCOS. Abbiamo comparato i risultati con quelli ottenuti da giovani donne con cicli normo-ovulatori, senza alcuna anomalia endocrinologia.

4 MATERIALI E METODI

4.1 *Pazienti*

L'endometrio è stato ottenuto da 28 pazienti, di età compresa tra 23-36 anni, con una diagnosi di PCOS (Gruppo 1) e da 6 pazienti, di età compresa tra 30-35 anni, con cicli mestruali normali. La diagnosi di PCOS è stata fatta in accordo con la presenza di almeno 2 dei 3 seguenti disordini (89): oligo- o amenorrea cronica, segni clinici di iperandrogenismo (irsutismo, acne, alopecia) o iperandrogenemia, aspetto policistico delle ovaie all'ultrasonografia (90). Nelle pazienti arruolate l'iperprolattinemia, l'iperplasia surrenalica congenita non classica, la sindrome di Cushing, le neoplasie secernenti androgeni, l'acromegalia così come le malattie tiroidee sono state escluse con appropriati tests diagnostici. È stato ottenuto un consenso informato scritto da tutte le pazienti entrate nello studio che è stato approvato dal comitato etico locale. Nessuna delle pazienti introdotte nello studio aveva assunto il contraccettivo orale o altri farmaci in grado di interferire col ciclo mestruale da almeno 6 mesi prima di iniziare lo studio.

Il terzo giorno del ciclo mestruale le pazienti sono state sottoposte ai seguenti esami: determinazione sierica di FSH, LH ed Estradiolo (E2), ed esame ultrasonografico transvaginale.

È stata eseguita una isteroscopia diagnostica nella fase proliferativa precoce (EP) del ciclo per escludere anomalie uterine o endometriali.

Poi in fase secretiva tardiva (LS) del successivo ciclo mestruale, fra il 22° ed il 26° giorno, le pazienti arruolate sono state sottoposte a isteroscopia con biopsie endometriali multiple, eseguite in diverse sedi della cavità uterina, sotto guida istoscopica attraverso una pinza 5 french introdotta nel canale operativo di un isteroscopio office (Karl Storz, Tuttlingen, Germany). Il giorno in cui è stata effettuata la biopsia endometriale tutte le pazienti sono state sottoposte ad una valutazione sierica dei livelli di progesterone (P). Nelle pazienti del gruppo 1 sono stati valutati anche, testosterone totale (T), E2 e androstenedione.

I livelli sierici di FSH, LH, E2, T, androstenedione e P sono stati determinati mediante chemiluminescenza con specifici kits commerciali (ACS: 180, Bayer, Germany).

4.2 *Preparazione del tessuto endometriale*

Una frazione del campione di endometrio ottenuto da ciascuna paziente è stato imbibito in paraffina per l'esame istologico, eseguito secondo i criteri di Noyes (91), l'altra parte è stata preparata per la citofluorimetria. Il tessuto endometriale è stato lavato ampiamente in PBS in aggiunta a 50 µg/ml di gentamicina prima di tagliarlo con scissore sterile. I linfociti endometriali ottenuti mediante la digestione del tessuto in una soluzione contenente 0,1% di collagenasi di tipo IV e 0.01% di DNase I (entrambi da Sigma-Aldrich) in RPMI 1640 e con incubazione in media per 30 min a 37° C. L'adesione alle piastre di coltura delle cellule della decidua stromale e dei macrofagi è stata ottenuta mediante incubazione per 2 h a 37°C in un incubatore CO₂ umidificato al 5%. I linfociti sono stati poi purificati dalla soluzione che li ricopriva mediante centrifugazione su gradiente di densità (Ficoll-Hypaque; Amersham Biosciences). Per escludere ogni anomalia nel recupero della popolazione dei linfociti, in due casi, abbiamo testato in parallelo (usando frazioni dello stesso campione) anche una procedura differente di isolamento cellulare (80).

4.3 *Reazione anticorpale e citofluorimetria*

Le cellule sono state trattate con i seguenti anticorpi monoclonali (mAbs) coniugati con peridinin chlorophyll protein (Per-CP), florescein isothiocyanate (FITC) o phycoerythrin (PE): anti-CD45 Per-CP (clone 2D1; Becton Dickinson), anti-CD3/CD16+56 FITC/PE (Simul Test; Becton Dickinson), anti CD16 FITC (clone 3G8, Beckman Coulter), anti CD56 PE (clone N901/NKH-1, Beckman Coulter), anti CD4/CD8 FITC/PE (Dual Colour, Becton Dickinson).

La colorazione delle cellule per la citofluorimetria è stata eseguita come già precedentemente descritto (92). In breve, 100µl di sospensione di cellule in RPMI sono stati aggiunti a 5µl di mAb appropriati.

Dopo incubazione per 15 minuti, le cellule sono state lavate, risospese in PBS e acquisite su di un FACSCalibur (Becton Dickinson); l'analisi è stata eseguita almeno su 2000 leucociti (definiti come CD45+ casi) usando CellQuest™ software (Becton Dickinson).

Le cellule NK sono state definite come CD56 bright quando l'intensità media di fluorescenza risultava essere almeno 10^2 al di sopra del background.

I risultati sono stati espressi come media \pm deviazione standard (DS). Le NK CD56 così come le altre sottopopolazioni di linfociti sono stati espressi come percentuale dei leucociti endometriali totali.

L'analisi statistica è stata eseguita mediante il test one-Sample Kolmogorov-Smirnov e il Mann-Whitney test. Un valore di $p < 0.01$ è stato considerato statisticamente significativo.

5 RISULTATI

L'isteroscopia è stata eseguita in tutte le pazienti con successo e le biopsie endometriali sono risultate adeguate in tutti i casi. Il peso medio dei campioni endometriali è risultato pari a 0.35 gr.

Nelle pazienti del gruppo 1 l'esame istologico, eseguito secondo i criteri di Noyes (91), ha confermato un pattern secretivo tardivo in 19 su 28 campioni endometriali (gruppo 1A) ed un pattern proliferativo nei campioni endometriali delle rimanenti 9 pazienti (gruppo 1B).

Le caratteristiche cliniche ed endocrinologiche di entrambi i gruppi di donne sono riportati nella Tabella 5.

L'esame istologico, in accordo con i criteri di Noyes (91), ha confermato un pattern secretivo avanzato in tutti i campioni endometriali di del gruppo controllo (gruppo 2).

In questo studio abbiamo confrontato le percentuali delle sottopopolazioni di linfociti dei campioni di endometrio secretivo delle 19 pazienti del gruppo 1A con quelle delle pazienti del gruppo 2.

All'esame citofluorimetrico, nel gruppo 1A, la percentuale media di cellule CD56+ CD16- e di cellule CD56 bright CD16- è risultata essere significativamente ridotta (mediana e CI: 38% [31, 52.7] vs. 63.7% [57.7, 69]; 17.4% [8, 41.6] vs. 52 % [43, 60]; rispettivamente) mentre la percentuale

media di cellule CD3+ è risultata significativamente aumentata (45% [33.3, 64] vs. 26.1% [21, 32]) se comparata ai controlli.

Nell'ambito della popolazione dei linfociti T, i linfociti CD4+ e CD8+ sono risultati egualmente rappresentati.

Per eseguire l'analisi statistica, in primis abbiamo verificato in entrambi i gruppi che tutte le variabili (CD3+, CD4, CD8, CD56+/CD16-, CD56 brigh/CD16-) fossero normalmente distribuite. A tal fine, abbiamo applicato il test one-Sample Kolmogorov-Smirnov e la significatività è risultata bassa ($P > 0.05$). Di conseguenza abbiamo deciso di usare un test non-parametrico (Mann-Whitney test) per ottenere una differenza statisticamente significativa tra il gruppo 1A e il gruppo 2. I risultati sono riportati nella Tabella 7. Da essi si evince che la percentuale di cellule CD56+/CD16-, CD56 brigh/CD16- è risultata significativamente più bassa nel gruppo 1A rispetto al gruppo 2 mentre la percentuale media di cellule CD3+ è risultata significativamente aumentata nel gruppo 1A.

Infine, per verificare l'adeguatezza del test usato, è stato calcolato il β -error (vedi l'ultima colonna nella tabella 7) attraverso il calcolo del power analysis. I risultati hanno garantito che la probabilità di ottenere falsi negativi era bassa, 34% nel peggiore dei casi. L'analisi dei dati ormonali è stata eseguita nei casi di analisi di sottopopolazione di linfociti. Dopo aver verificato che i dati non fossero normalmente distribuiti (valore $P > 0.05$), abbiamo applicato il test Mann-Whitney riscontrando una differenza

significativa nel valore di progesterone, significativamente più alto nel gruppo controllo rispetto alle pazienti con PCOD del gruppo 1A.

Tabella 5. Caratteristiche cliniche ed endocrinologiche di donne con PCOS con pattern endometriale secretivo il giorno delle biopsie (Gruppo 1A) e di donne controllo (Gruppo 2). I valori sono stati in media + SD. * Statisticamente significativo: $p < 0,01$.

	<i>Group 1A</i>	<i>Group 2</i>	<i>P-value</i>	<i>P_B-value</i>
Age	28 [24,32]	34.5 [22,47]	1.7×10^{-1}	8.5×10^{-1}
BMI	27 [22,35]	24.5 [20,27]	2.1×10^{-1}	1.05
Length of cycles	39 [35,45]	27.5 [25,28]	0	0*
N° of I trimester miscarriage	0 [0,0]	0 [0,1]	9.7×10^{-1}	4.85
N° pregnancies	0 [0,0]	2 [1,3]	0	0*
P (ng/mL)	7.1 [3.19,12.2]	16.9 [8.53,23.78]	7×10^{-3}	$2.8 \times 10^{-2*}$
A (ng/mL)	3 [1.6,5]	3 [2,3.9]	9.2×10^{-1}	3.7
T (ng/dL)	57.7 [45,87.2]	43.5 [36.4,60]	1.2×10^{-1}	4.8×10^{-1}
E2 (pg/mL)	136 [91,160]	86 [75,217]	6.7×10^{-1}	2.7

Tabella 6

<i>GRUPPO 1A</i> <i>n=19</i> SANGUE PERIFERICO	<i>GROUP 2</i> <i>n= 6</i> SANGUE PERIFERICO	SOTTOPOPOLAZIONI LINFOCITARIE	<i>GRUPPO 1A</i> <i>n=19</i> ENDOMETRIO	<i>GRUPPO 2</i> <i>n=9</i> ENDOMETRIO
71.6 [64.7, 74.3]	72.1 [57.7, 85]	CD3	45 [33.3, 64]	26.1 [21, 32]
40 [37.5, 46]	39 [30.4, 55]	CD4	19.8 [16, 24.6]	11.9 [8.92, 15.3]
18 [16.4, 27]	25.1 [20.4, 45]	CD8	23.5 [14, 37]	21 [17.7, 31]
5.1 [3.4, 7.5]	5.2 [3.3, 14]	CD56+/CD16-	38 [31, 52.7]	63.7 [57.7, 69]
0.7 [0.5, 0.9]	1 [0.45, 1.3]	CD56^{bright}/CD16-	17.4 [8, 41.6]	52.0 [43, 60]

Tabella 7

<i>Gruppo 1A vs</i> <i>Gruppo 2</i>	<i>P-value</i>	<i>P_B-value</i>	<i>Power of test</i>
CD3	3×10^{-3}	$2.7 \times 10^{-2*}$	0.61
CD4	1.5×10^{-2}	1.3×10^{-1}	0.88
CD8	8.7×10^{-1}	7.8	0.99
CD56+16-	0	0*	0.88
CD56 ^{bright} /CD16-	0	0*	0.83

6 DISCUSSIONE

I risultati del presente studio dimostrano che nell'endometrio secretivo di giovani donne affette da PCOS la percentuale di cellule uNK CD56+ CD16- e CD56 bright CD16- è significativamente più bassa (Fig. 1), mentre la percentuale di linfociti endometriali CD3+ risulta significativamente maggiore se confrontata con l'endometrio secretivo di giovani donne normo-ovulatorie (Tab.5, Fig. 2). La PCOS è una comune endocrinopatia caratterizzata da oligoanovulazione ed elevati livelli di androgeni circolanti o evidenza di iperandrogenismo dopo esclusione tutte le altre potenziali cause (89). Inoltre, in donne con PCOS, spesso è presente insulino-resistenza accompagnata da iperinsulinemia. L'infertilità associata a PCOS deriva in parte da anovulazione cronica e scarsa qualità degli oociti, ma molte evidenze sperimentali suggeriscono che le anomalie endocrinologiche e metaboliche (estrogeni cronicamente non contrastati, iperandrogenismo e iperinsulinemia) influenzano negativamente la recettività endometriale e dunque l'impianto embrionario, causando infertilità ed aborti ricorrenti (94,95,96). L'endometrio umano è un tessuto ormono-steroido dipendente la cui componente cellulare e tissutale cresce e si rimodella in risposta ai cambiamenti degli ormoni circolanti in un normale ciclo ovulatorio. Nella fase follicolare dell'endometrio umano

normale prevalgono processi di proliferazione cellulare, replicazione del DNA e rinnovamento tissutale (97).

In particolare l'aumento dei livelli di estradiolo circolanti (E2), come conseguenza della crescita follicolare ovarica chiamata fase 'follicolare' del ciclo, promuove la proliferazione cellulare endometriale e la crescita del tessuto, da circa 2 mm dopo la fase riparativa post-mestruale, a 10-12 mm nel periodo periovulatorio (110).

Uno studio recente sull'espressione genica endometriale ha dimostrato che questa fase del ciclo è principalmente dedicata alla replicazione del DNA, proliferazione cellulare, e rimodellamento tissutale (111). Dopo l'ovulazione, con la produzione di progesterone, l'endometrio viene sottoposto ad una serie di cambiamenti, che includono l'inibizione della proliferazione cellulare, della sintesi di DNA, e dell'attività mitotica cellulare, e l'inizio della differenziazione cellulare, in preparazione all'impianto del prodotto del concepimento. L'inibizione della proliferazione cellulare è dovuta a geni regolati dal progesterone, che provocano una down-regulation dei recettori per gli estrogeni nell'epitelio e l'induzione di enzimi sulfotransferasi di metabolizzazione estrogenica e 17-idrossisteroidodeidrogenasi di tipo 2 (107,108,111), che effettivamente neutralizzano l'azione dell'E2 sull'endometrio.

Inoltre il progesterone esercita un'azione di down-regulation sui recettori degli androgeni (AR) sia dell'epitelio che dello stroma (109).

Sette-dieci giorni dopo l'ovulazione, l'endometrio diventa recettivo all'impianto dell'embrione in un intervallo temporale chiamato 'finestra di impianto'.

Le cellule stromali endometriali sono sottoposte ad un processo di decidualizzazione in risposta al progesterone, processo che è caratterizzato dal cambiamento del citoscheletro (down-regulation dell'actina della muscolatura liscia).

A tale fenomeno intervengono anche la prolattina, una serie di fattori crescita insulino-simili (IGFs), proteine che legano gli IGF (IGFBPs), recettori dell'insulina, relaxina ed altri (111,112).

Il processo di decidualizzazione è importante per regolare l'invasione del trofoblasto e stabilire un environment immunomodulante nello stroma, che dovrebbe permettere l'impianto (59). Parte integrante di tale fenomeno di decidualizzazione è un aumento significativo di cellule uNK (87).

Infatti, il numero di cellule endometriali NK CD56 bright CD16- è basso nella fase proliferativa, ma aumenta considerevolmente dopo l'ovulazione e raggiunge un picco nella fase secretiva (80,87).

Gli ormoni steroidei femminili sembrano regolare il numero delle cellule uNK, soprattutto il progesterone, sembra giocare un ruolo indiretto nella fase secretiva, attraverso la produzione di IL-15, che agisce sia stimolando la proliferazione delle cellule uNK già in loco sia mediante reclutamento e differenziazione delle cellule NK periferiche verso l'utero (85). Un'ulteriore caratteristica del processo di decidualizzazione è il cambiamento del pattern recettoriale endometriale. In particolare la presenza di elevati livelli di recettori per estrogeni di tipo α ($ER\alpha$) e di recettori per il progesterone (PR) nella fase proliferativa è seguita da una caduta dei loro livelli nella fase secretiva sotto l'influenza del progesterone (100, 101). Al contrario i recettori per estrogeni di tipo $\beta 1$ ($ER\beta 1$) mostrano un aumento significativo nella fase secretiva tardiva (102).

Uno studio recente (99) ha dimostrato che le cellule uNK sono prive dell'espressione del recettore $ER\alpha$ e del PR ma esprimono il recettore estrogenico $\beta 1$ ($ER\beta 1$) e il recettore glucocorticoide (GR) suggerendo che estrogeni e glucocorticoidi potrebbero agire direttamente sulle cellule uNK attraverso i recettori specifici $ER\beta 1$ e GR che infatti aumentano in fase secretiva proprio quando le uNK raggiungono il loro picco.

Nelle pazienti con PCOS è stata riportata recentemente in letteratura, la mancanza di una down regulation normale dei recettori degli androgeni e degli estrogeni (AR e $ER\alpha$) nell'endometrio, nella finestra di impianto (103,104,105).

Donne con PCOS esibiscono, nella fase secretiva, un'espressione endometriale di AR ed ER α superiore se comparata a controlli di donne fertili normali probabilmente dovuto a cicli anovulatori e perciò dunque a bassi livelli di progesterone non adeguati ad agire sull'endometrio (94).

Questo suggerisce che, sebbene si verifichi l'ovulazione, l'endometrio non è sottoposto a cambiamenti fisiologici del processo di decidualizzazione come precedentemente descritto, presumibilmente dovuto ad azione inadeguata del progesterone ed una aumentata esposizione all'E2, sebbene la disregolazione dovuta ad elevati livelli di androgeni o di insulina non possa essere esclusa. In accordo, i risultati dei nostri studi hanno confermato un processo di decidualizzazione alterato in donne con PCOS, anche nei casi in cui si sia verificata l'ovulazione, con la mancanza di un fisiologico aumento di cellule u NK CD56+ CD16- e di CD56 bright CD16- in fase secretiva e con una persistenza anomala di un'aumentata proporzione di CD3+ endometriali. La maggiore percentuale di cellule CD3+ con attività citolitica, potrebbe influire sull'invasione trofoblastica e sul successo dell'impianto. A sua volta, la percentuale minore di cellule CD56+ CD16- e di CD56 bright CD16- nell'endometrio secretivo di pazienti PCOS potrebbe spiegare la diminuita secrezione, riportata in letteratura, delle proteine immunomodulatrici come galattina-1 e glicodelina A (87,94) che si riscontra nell'endometrio di donne con PCOS.

Infatti, una analisi recente dell'espressione genica delle cellule NK nella decidua umana riporta una overespressione selettiva di queste molecole con potenziale immunomodulatore da parte delle cellule uNK (78), suggerendo che le cellule uNK contribuiscono, con la secrezione di tali proteine, alla creazione di un ambiente localmente immunosoppressivo di fondamentale importanza per il processo di impianto.

In conclusione il presente studio dimostra una fluttuazione anomala dei linfociti endometriali durante il ciclo mestruale di donne con PCOS supportando l'ipotesi sempre più accreditata in letteratura che lo scarso potenziale riproduttivo con una maggiore percentuale di abortività spontanea osservata in queste pazienti, anche se è ripristinata l'ovulazione, sia dovuta ad anomalie endometriali complesse. Ulteriori ricerche si rendono necessarie per spiegare i meccanismi sottostanti ai disordini endometriali in donne con PCOS.

Figura 1. Figure tipiche ottenute alla citofluorimtria: cellule uNK CD56 + e CD56 bright di un campione di endometrio ottenuto da donne con PCOS (Fig 1A) e da giovani pazienti controllo (Fig 1B)

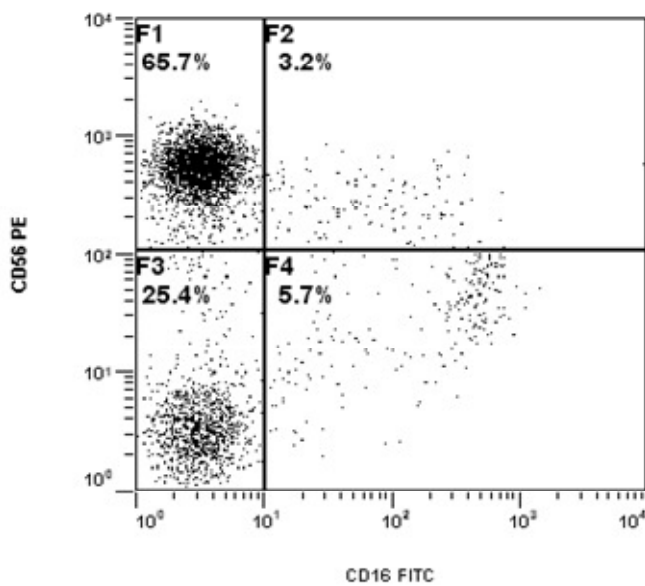
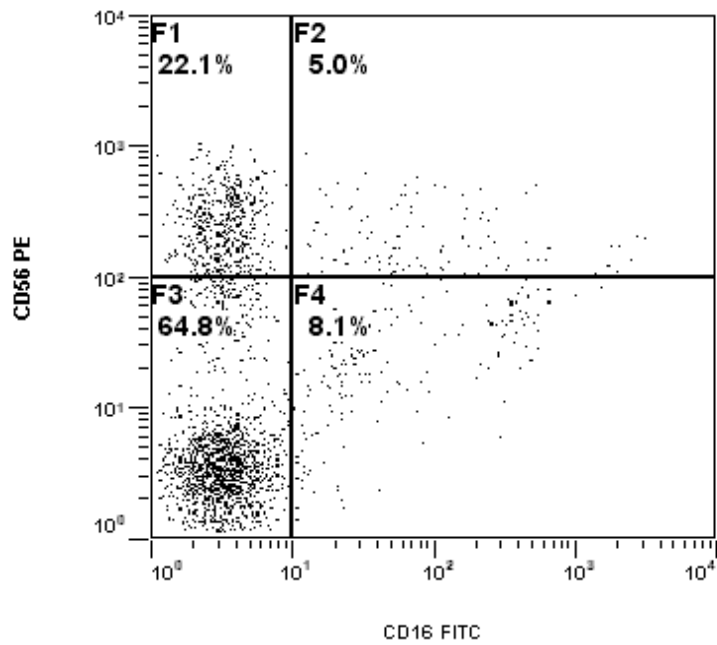
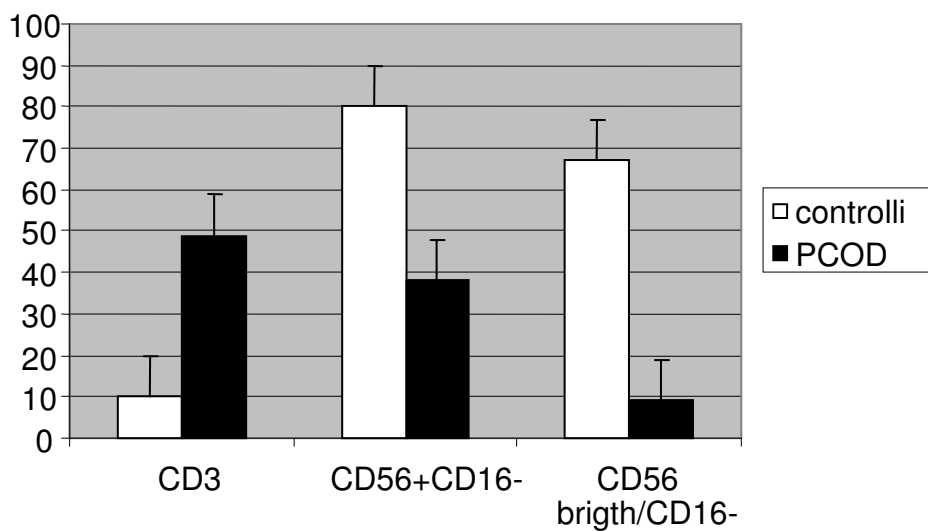


Figura 2. Differenza di percentuale di sottopopolazione linfocitaria in endometrio secretivo avanzato di donne con PCOS e di giovani pazienti controllo.



7 BIBLIOGRAFIA

1. Laven JS, Imani B, Eijkemans MJ & Fauser BC. New approach to polycystic ovary syndrome and other forms of anovulatory infertility. *Obstetrics and Gynecology Survey* 2002; 57: 755-767
2. Norman RJ, Davies MJ, Lord J & Moran LJ. The Role of lifestyle modification in polycystic ovary syndrome. *Trends in Endocrinology and metabolism* 2002; 13: 251-257
3. King RA, Rotter JI & Motulsky AG. *The Genetic Basis of Common Diseases*. 2nd edn. New York: Oxford University Press; 2002
4. Franks S. *Polycystic ovary syndrome: a changing perspective*. *Clin Endocrinol* 1989; 31:87-120
5. Azziz R. Androgen excess is the key element in the polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility* 2003; 80: 252-254
6. Legro RS, Kusanman AR & Dunaif A. Prevalence and predictors of dyslipidemia in women with polycystic ovary syndrome. *The American Journal of Medicine* 2001; 111: 607-613
7. Carmina E, Legro RS, Stamets K et al. Difference in body weight between American and Italian women with polycystic ovary syndrome: influence of the diet. *Human Reproduction* 2003; 18: 2289-2293

8. Azziz R, Sanchez LA, Knochenhauer ES et al. Androgen excess in women : experience with over 1000 consecutive patients. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2004; 89: 453-462
9. Hahn S., tan S, Elsenbruch S et al. Clinical and Biochemical characterization of women with polycystic ovary syndrome in north Rhine-Westphalia. *Hormone and Metabolic Research* 2005; 37: 438-444
10. Dunaif A, Segal KR, Futterweit W & Dobrjansky A. profound peripheral insulin resistance, independent of obesity, in polycystic ovary syndrome. *Diabetes* 1989; 38: 1165-1174
11. Legro RS, Kunselman AR, Dodson WC & Dunaif A. Prevalence and predictors of risk for type 2 diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in polycystic ovary syndrome: a prospective, controlled study in 254 affected women. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1999; 84: 165-169
12. Carmina E & lobo RA. Use of fasting blood to assess the prevalence of insulin resistance in women with polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility* 2005; 82: 661-665
13. DeUgarte CM, Bartolucci AA & Azziz R. Prevalence of insulin resistance in the polycystic ovary syndrome using the homeostasis model assessment. *Fertility and Sterility* 2005; 82: 1454-1460

14. Goodarzi MO & Korenman SG. The importance of insulin resistance in the polycystic ovary syndrome *Fertility and Sterility* 2003; 80: 255-258
15. Rebar R, Judd HL, Yen SSC et al. Characterization of the inappropriate gonadotropin secretion in polycystic ovary syndrome. *Journal of Clinical Investigation* 1976; 57: 1320-1329
16. Conway GS, Honour JW & Jacobs HS. Heterogeneity of the polycystic ovary syndrome: clinical, endocrine and ultrasound features in 556 patients. *Clinical Endocrinology (Oxford)* 1989; 30: 459-470
17. Antilla L, Ding Y-Q, Ruutiainen K et al. Clinical features and circulating gonadotropin, insulin, and androgen interactions in women with polycystic ovarian disease. *Fertility and Sterility* 1991; 55: 1057-1061
18. van Santbrink EJ, Hop WC & Fauser BC. Classification of normogonadotropic infertility: polycystic ovaries diagnosed by ultrasound versus endocrine characteristics of polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility* 1997; 67: 452-458
19. Arroyo A, Laughlin GA, Morales AJ & Yen SS. Inappropriate gonadotropin secretion in polycystic ovary syndrome: influence of adiposity. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1997; 82: 3728-3733

20. Taylor AE, McCourt B, Martin KA et al. Determinants of abnormal gonadotropin secretion in clinically defined women with polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility* 199; 82: 2248-2256
21. Zawadzki JK & Dunaif A. Diagnostic criteria for polycystic ovary syndrome: towards a rational approach. In Dunaif A, Givens JR, Haseltine FP & Merriam GR (eds.) *Polycystic Ovary Syndrome*. Boston: Blackwell Scientific Publications; 1992, pp. 377-384.
22. Homburg R. What is polycystic ovarian syndrome? A proposal for a consensus on the definition and diagnosis of polycystic ovarian syndrome. *Human Reproduction* 2002; 17: 2495-2499
23. The rotterdam ESHRE/ASRM-sponsored PCOS Consensus Workshop Group. Revised 2003 consensus on diagnosis criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). *Human Reproduction* 2004; 81: 19-25.
24. The rotterdam ESHRE/ASRM-sponsored PCOS Consensus Workshop Group. Revised 2003 consensus on diagnosis criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). *Human Reproduction* 2004; 19: 41-47.
25. Azziz R. Diagnostic criteria for polycystic ovary syndrome: a reappraisal. *Fertility and Sterility* 2005; 83:1343-1346.

26. Franks S. Polycystic ovary syndrome: a changing perspective. *Clinical Endocrinology (Oxford)* 1989; 31: 87-120
27. Cela E, Robertson C, Rush K, et al. Prevalence of polycystic ovaries in woman with androgenic alopecia. *European Journal of Endocrinology* 2003; 149: 439-442
28. Legro RS, Kunesman AR & Dunaif A. Prevalence and predictors of risk for type 2 diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in polycystic ovary syndrome: a prospective, controlled study in 254 affected women. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1999; 84: 165-169
29. Knochenhauer ES, Key TJ, Kahsar-Miller M, et al. prevalence of polycystic ovary syndrome in unselected black and white women of the southeastern United States: a prospective study. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1998; 83: 319-322
30. Balen AH, Conway GS, Kaltsas G, et al. Polycystic ovary syndrome: the spectrum of the disorder in 1741 patients. *Human Reproduction* 1995; 10: 2107-2111
31. Goldzieher JW & Green JA. The polycystic ovary.I. Clinical and histologic features. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1962; 22: 325-338

32. Norman RJ & Clark AM. Lifestyle factors in aetiology and management. In Kovacs GT (ed.) *Polycystic Ovary Syndrome*. Cambridge: Cambridge University Press, 2000
33. Kiddy DS, Sharp PS, White DM, et al. differences in clinical and endocrine features between obese and non-obese subjects with polycystic ovary syndrome: an analysis of 263 consecutive cases. *Clinical Endocrinology (Oxford)* 1990; 32: 213-220
34. Gambineri A, Pelusi C, Vicennati V, et al. Obesità and the polycystic ovary syndrome. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders* 2002; 26: 883-896
35. Rebuffe -Scrive M, Cullberg G, Lundberg PA, et al. Anthropometric variables and metabolism in polycystic ovarian disease. *Hormonal and Metabolic Research* 1989; 21: 391-397
36. Dahlgreen E, Janson PO, Johansson S, et al. Polycystic ovary syndrome and risk for myocardial infarction. Evaluated from a risk factor model based on a prospective population study of women. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica* 1992; 71: 599-604
37. Kiddy DS, Hamilton-Fairley D, Bush A, et al. Improvement in endocrine and ovarian function during dietary treatment of obese women with polycystic ovary syndrome. *Clinical Endocrinology (Oxford)* 1992; 36: 105-111

38. Carmina E, Koyama T, Chang L, et al. Does ethnicity influence the prevalence of adrenal hyperandrogenism and insulin resistance in polycystic ovary syndrome? *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 1992; 167: 1807-1812
39. Piacquadio DJ, Rad FS, Spellam MC & Hollenbach KA. Obesity and female androgenic alopecia: a cause and effect? *Journal of American Academy Dermatology* 1994; 30: 1028-1030
40. Schwartz RA, Acanthosis nigricans. *Journal of American Academy Dermatology* 1994; 4(4): 310-315
41. Lesser KB & Garcia FA. Association between polycystic ovary syndrome and glucose intolerance during pregnancy. *Journal of Maternal-Fetal Medicine* 1997; 6: 303-307
42. Abbott DH, Dumesic DA & Franks S. Developmental origin of polycystic ovary syndrome: a hypothesis. *Journal of Endocrinology* 2002; 174: 1-5
43. Franks S, Gharani N, Waterworth D, et al. The genetic basis of polycystic ovary syndrome. *Human Reproduction* 1997; 12: 2641-2648
44. Urbanek M, Legro RS, Driscoll DA, et al. Thirty-seven candidate genes for polycystic ovary syndrome: strongest evidence for linkage is with follistatin. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 1999; 96: 8573-8578

45. Cresswell JL, Barker DJ, Osmond C, et al. Fetal growth, length of gestation, and polycystic ovaries in adult life. *Lancet* 1997; 350: 1131-1135
46. Michelmore K, Ong K, Mason S, et al. Clinical features in women with polycystic ovaries: relationships to insuline sensitivity, insulin gene VNTR and birth weight. *Clinical Endocrinology (Oxford)* 2001; 55: 439-446
47. Sadrzadeh S, Klip WA, Broekmans FJ, et al. Birth weight and age at menarche in patients with polycystic ovary syndrome or diminished ovarian reserve, in a retrospective cohort. *Human Reproduction* 2003; 18: 2225-2230
48. Ibanez L, Potau N, Marcos MV & Zegher F. Adrenal hyperandrogenism in adolescent girls with a history of low birthweight and precocious pubarche. *Clinical Endocrinology (Oxford)* 2000; 53: 523-527
49. Rosenfield RL, Ghai K, Ehrmann DA & Barnes RB. Diagnosis of polycystic ovary syndrome in adolescence: comparison of adolescent and adult hyperandrogenism. *Journal of Paediatric Endocrinology and Metabolism* 2000; 13: 1285-1289

50. Norman RJ, Masters L, Milner CR, et al. Relative risk of conversion from normoglycaemia to impaired glucose tolerance or non-insulin dependent diabetes mellitus in polycystic ovarian syndrome. *Human Reproduction* 2001; 16: 1995-1998
51. Chang RJ, Nakamura RM, Judd HL & Kaplan SA. Insulin resistance in nonobese patients with polycystic ovarian disease. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1983; 57: 356-359
52. Kiddy RD, Gelding SW, Willis D, Bithi Ananthan S, Bush A, Johnston DG, Franfs S. The relationship of insulin insensivity and mestrual pattern in women with hyperandrogenism and polycystic ovaries. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1993; 39: 351-355
53. Holte J, Gennarelli G, Wide L, Lithell H. High prevalence of polycystic ovaries and associated clinical, endocrine, and metabolic feature in women with previous gestational diabetes mellitus. *J Clin Endocrinil Metab* 1998; 83: 1143-1150
54. Knochenhauer ES, Key TJ, Kahsar-Miller M et al. Prevalence of the polycystic ovary syndrome in unselected black and white women of the southeastern United States: a prospective study. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1998; 83: 3078-3082

55. Balen AH, Tan SL, MacDougall J & Jacobs HS. Miscarriage rates following in-vitro fertilization are increased in women with polycystic ovaries and reduced by pituitary desensitization with buserelin. *Human Reproduction (Oxford, England)* 1993; 8: 959-964
56. Okon MA, Laird SM, Tuckerman EM & Li TC. Serum androgen levels in women who have recurrent miscarriages and their correlation with markers of endometrial function. *Fertility and Sterility* 1998; 69: 682-690
57. Fedorcsak P, Storeng R, Dale PO, Tanbo T & Abyholm T. Obesity is a risk factor for early pregnancy loss after IVF or ICSI. *Acta obstetricia et Gynecologica Scandinavica* 2000; 79: 43-48
58. Niwa K, Imai A, Hashimoto M et al. A case-control study of uterine endometrial cancer of pre- and postmenopausal women. *Oncology Reports* 2000; 7: 89-93
59. Talbi S, Hamilton AE, Vo KC et al. Molecular phenotyping of human endometrium distinguishes menstrual cycle phases and underlying biological processes in normo-ovulatory women. *Endocrinology* 2006; 147: 1097-1121
60. Hess A, Nayak N & Giudice LC. Cyclic changes in primate oviduct and endometrium. In Knobil E & Neill JD (eds.) *The physiology of reproduction*. San Diego: Academic Press, 2005

61. Venturoli S, Porcu E, Fabbri R et al. Episodic pulsatile secretion of FSH, LH, prolactin, oestradiol, oestrone, and LH circadian variations in polycystic ovary syndrome. *Clinical Endocrinology* 1988; 28: 93–107
62. Nestler JE, Powers LP, Matt DW et al. A direct effect of hyperinsulinemia on serum sex hormone-binding globulin levels in obese women with the polycystic ovary syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1991; 72: 83–89
63. Robinson S, Kiddy D, Gelding SV et al. The relationship of insulin insensitivity to menstrual pattern in women with hyperandrogenism and polycystic ovaries. *Clinical Endocrinology* 1993; 39: 351–355
64. Elliott JL, Hosford SL, Demopoulos RI et al. Endometrial adenocarcinoma and polycystic ovary syndrome: risk factors, management, and prognosis. *Southern Medical Journal* 2001; 94: 529–531
65. Cheung AP. Ultrasound and menstrual history in predicting endometrial hyperplasia in polycystic ovary syndrome. *Obstetrics and Gynecology* 2001; 98: 325–331

66. Mertens HJ, Heineman MJ, Theunissen PH et al. Androgen, estrogen and progesterone receptor expression in the human uterus during the menstrual cycle. *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology* 2001; 98: 58–65
67. Apparao KB, Lovely LP, Gui Yet al. Elevated endometrial androgen receptor expression in women with polycystic ovarian syndrome. *Biology of Reproduction* 2002; 66: 297–304
68. Lathi RB, Hess AP, Tulac S et al. Dose-dependent insulin regulation of insulin-like growth factor binding protein-1 in human endometrial stromal cells is mediated by distinct signaling pathways. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2005; 90: 1599–1606
69. Sagle M, Bishop K, Ridley N et al. Recurrent early miscarriage and polycystic ovaries. *BMJ (Clinical research ed.)* 1988; 297: 1027–1028
70. Nestler JE, Stovall D, Akhter N et al. Strategies for the use of insulin-sensitizing drugs to treat infertility in women with polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility* 2002; 77: 209–215
71. Dosiou C & Giudice LC. Natural killer cells in pregnancy and recurrent pregnancy loss: endocrine and immunologic perspectives. *Endocrine Reviews* 2005; 26: 44–62

72. Bolton AE, Pockley AG, Clough KJ et al. Identification of placental protein 14 as an immunosuppressive factor in human reproduction. *Lancet* 1987; 1: 593–595
73. Gonzalez RR, Palomino A, Vantman Det al. Abnormal pattern of integrin expression at the implantation window in endometrium from fertile women treated with clomiphene citrate and users of intrauterine device. *Early Pregnancy* 2001; 5: 132–143
74. Jakubowicz DJ, Seppala M, Jakubowicz S et al. Insulin reduction with metformin increases luteal phase serum glycodelin and insulin-like growth factor-binding protein 1 concentrations and enhances uterine vascularity and blood flow in the polycystic ovary syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2001; 86: 1126–1133
75. Nagamani M, Stuart CA, Dunhardt PA & Doherty MG. Specific binding sites for insulin and insulin-like growth factor I in human endometrial cancer. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 1991; 165: 1865–1871
76. Randolph Jr. JF, Kipersztok S, Ayers JW et al. The effect of insulin on aromatase activity in isolated human endometrial glands and stroma. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 1987; 157: 1534–1539.

77. King A, Loke Y-W, Chaouat G. NK cells and reproduction. *Immunol Today* 1997; 18: 64-6.
78. Koopman LA, Kopcow HD, Rybalov B, Boyson JE, Orange JS, Schatz F, Masch R, Lockwood CJ, Schachter AD, Park PJ, Strominger JL. Human decidual natural killer cells are a unique NK cell subset with immunomodulatory potential. *J Exp Med* 2003; 198: 1201-12.
79. Saito S. Cytokine network at the feto-maternal interface. *J Reprod Immunol* 2000; 47:87-103
80. Flynn L, Byrne B, Carton J, Kelehan P, O'Herlihy C, O'Farrelly C. Menstrual cycle dependent fluctuations in NK and T-lymphocyte subsets from non-pregnant human endometrium. *Am J Reprod Immunol* 2000; 43: 209-17
81. Bulmer JN, Morrison L, Longfellow M, Ritson A, Pace D. Granulated lymphocytes in human endometrium: histochemical and immunohistochemical studies. *Hum Reprod* 1991; 6:791-8.
82. Mincheva-Nilsson L, Kling M, Hammarstrom S, Nagaeva O, Sundqvist KG, Hammarstrom ML, Baranov V. Gamma delta T cells of human early pregnancy decidua: evidence for local proliferation, phenotypic heterogeneity, and extrathymic differentiation. *J Immunol* 1997;159:3266-77.

83. Streilein JW, Wegmann TG. Immunologic privilege in the eye and the fetus. *Immunol Today* 1987; 8:362-8.
84. Carosella ED, Dausset J, Kirzenbaum M. HLA-G revisited. *Science* 1996; 17:407-9.
85. Dosiou C, Giudice LC. Natural killer cells in pregnancy and recurrent pregnancy loss: endocrine and immunologic perspectives. *Endocr Rev* 2005; 26 :44-62.
86. Quenby S, Bates M, Doig T, Brewster J, Lewis- Jones DI, Jhonson PM, Vince G. Preimplantation endometrial leukocytes in women with recurrent miscarriage. *Hum Reprod* 1999; 14:2386-91.
87. Tuckerman EM, Okon MA, Li TC, Laird SM Do androgens have a direct effect on endometrial function? An in vitro study. *Fertil Steril* 2000; 74: 771-9.
88. Okon MA, Laird SM, Tuckerman EM, Li TC. Serum androgen levels in women who have recurrent miscarriages and their correlation with markers of endometrial function. *Fertil Steril* 1998; 69: 682-90.
89. The Rotterdam ESHRE/ ASRM - sponsored PCOS consensus workshop group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long- term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). *Hum Reprod* 2004; 19: 41-7.

90. Balen AH, Laven JSE, Tan SL, Dewailly D. Ultrasound assesment of the polycystic ovary: international consensus definitions. *Hum Reprod Update* 2003; 9: 505-14.
91. Noyes RW, Haman JO. Dating the endometrial biopsy. *Fertil Steril* 1953; 4: 504-17.
92. Norris S, Collis C, Doherty DG, Smith F, McEntee G, Traynor O, Nolan N, Hegarty J, O'Farrelly C. Resident humane Hepatic lymphocytes are phenotypically different from circulating lymphocytes. *J Hepatol* 1998; 28:84-90.
93. Matteo MG, Greco P, Rosenberg P, Mestice A, Baldini D, Falagario T, Martino V, Santodirocco M, Massenzio F., Castellana L, Specchia G, Liso A. *Ferti Steril* 2007
94. Giudice L C. Endometrium in PCOS: implantation and predisposition to endocrine CA. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 2006; 20: 235-44.
95. Balen HA, Tan SL, MacDougall J, Jacobs HS. Miscarriage rates following in-vitro fertilization are increased in women with polycystic ovaries and reduced by pituitary desensitization with buserelin. *Hum Reprod* 1993; 8: 959-64.20.
96. Fedorcsak P, Storeng R, Dale PO, Tanbo T, Abyholm T. Obesità is a risk factor for early pregnancy loss after IVF or ICSI. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2000; 79: 43-8.

97. Talbi S, Hamilton AE, Vo KC et al. Molecular phenotyping of human endometrium distinguishes menstrual cycles phases and underlying biological processes in normo-ovulatory women. *Endocrinology* 2006; 147: 1097- 1121.
98. Kitaya K, Yasuda J, Nakayama T, Fushiki S, Honjo H. Effect of female sex steroids on human endometrial CD16neg CD56 bright natural killer cells. *Fertil Steril* 2003; 79: 730-34.
99. Henderson TA, Saunders F TK, Moffet-King A, Groome NP, Critchley HOD. Steroid receptor expression in uterine natural killer cells. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2003; 88:440-9.
100. Clarke CL, Sutherland RL Progesterin regulation of cellular proliferation. *Endocr Rev* 1990; 11: 266-301.
101. Chauchereau A, Savouret JF, Milgrom E. Control of biosynthesis and post-transcriptional modification of the progesterone receptor. *Biol Reprod* 1992; 46, 174-7.
102. Critchely HO, Hendeerson TA, Kelly RW, Scobie GS, Evans LR, Groome NP, Saunders PT. Wild-type estrogen receptor (ER α 1) and the splice variant (ER α cx/ α 2) are both expressed within the human endometrium throughout the normal menstrual cycle. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2002; 87, 5265-73.

103. Apparao KB, Lovely LP, Gui Y et al. Elevated endometrial androgen receptor expression in women with polycystic ovarian syndrome. *Biol Reprod* 2002; 66: 297-304.
104. Villavicencio A, Bacallao K, Avellaira C, Gabler F, Fuentes A, Vega M . Androgen and estrogen receptors and co-regulators levels in endometria from patients with polycystic ovarian syndrome with and without endometrial hyperplasia. *Gynecologic Oncology* 2006; 103: 307-14.
105. Gregory CW, Wilson EM, Apparao KBC et al. Steroid receptor co-activator expression throughout the menstrual cycle in normal and abnormal endometrium. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2002; 87: 2960-66.
106. Gilling-Smith C, Willis D, Beard R. et al. Hypersecretion of androstenedione by isolated thecal cells from polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol Metab* 1994, 79:1158.
107. Gurside E, Gusberg SB & Tseng L. Estradiol binding and metabolism in human endometrial hyperplasia and adenocarcinoma. *The Journal of Steroid Biochemistry* 1976; 7: 891-896.
108. Falany JL & Falany CN. Regulation of estrogen sulfotransferase in human endometrial adenocarcinoma cells by progesterone. *Endocrinology* 1996; 137: 1395-1401.

-
109. Slayden OD, Nayak NR, Burton KA et al. Progesterone antagonists increase androgen receptor expression in the rhesus macaque and human endometrium. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2001; 86: 2668–2679.
 110. Giudice LC. Elucidating endometrial function in the post-genomic era. *Human Reproduction Update* 2003; 9: 223–235.
 111. Talbi S, Hamilton AE, Vo KC et al. Molecular phenotyping of human endometrium distinguishes menstrual cycle phases and underlying biological processes in normo-ovulatory women. *Endocrinology* 2006; 147: 1097–1121.
 112. Hess A, Nayak N & Giudice LC. Cyclic changes in primate oviduct and endometrium. In Knobil E & Neill JD (eds.) *The physiology of reproduction*. San Diego: Academic Press, 2005.