

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI
FEDERICO II**

Facolta' di Medicina e Chirurgia

**Dottorato di Ricerca in
"Riproduzione Sviluppo e Accrescimento dell'Uomo"**

Anno Accademico 2004-2005

Tesi di Dottorato

**"Identificazioni di nuove variabili predittive di qualità ovocitaria
ed embrionaria nei programmi di procreazione medicalmente
assistita"**

Tutor

Prof. Giuseppe De Placido

Candidato

Dr. Erminia Alviggi

Coordinatore

Prof. Claudio Pignata

INDICE

page

***Capitolo I* Le tecniche di fecondazione assistita e la 3
valutazione morfologica degli zigoti e degli embrioni**

- 1.1 Le tecniche di fecondazione assistita
- 1.2 Valutazione morfologica degli ovociti
- 1.3 Valutazione morfologica degli zigoti e degli embrioni

***Capitolo II* La leptina e le tecniche di fecondazione 17
assistita**

- 2.1 La leptina ed il suo recettore
- 2.2 Effetti endocrino-metabolici della leptina
- 2.3 Leptina e funzione riproduttiva

***Capitolo III* Sezione sperimentale 30**

- 3.1 Principali linee di ricerca
- 3.2 Materiali e Metodi
- 3.3 Principali risultati

Capitolo IV Pubblicazione I

57

De Placido G., Wilding M., Strina I., Alviggi E., Alviggi C., Mollo A., Varicchio MT., Tolino A., Schiattarella C. and Dale B.

High outcome predictability after IVF using a combined score for zygote and embryo morphology and growth rate

Human Reproduction, Vol. 17, No. 9, 2402-2409, September 2002

Capitolo V Pubblicazione II

81

De Placido G., Alviggi C., Mollo A., Strina I., Fiore E., Clarizia R., Wilding M., Alviggi E., Sanna V., Pagano T., and Matarese G.

Intra-follicular leptin concentration as a predictive factor for *in vitro* oocyte fertilization in assisted reproductive techniques

Journal of Endocrinological Investigation (in press)

Capitolo VI Discussione

104

6.1 Sistema di *scoring* combinato: valore predittivo nelle tecniche di fecondazione assistita

6.2 Livelli intrafollicolari di leptina ed *outcome* nelle tecniche di fecondazione assistita

Capitolo I

Le tecniche di fecondazione assistita e la valutazione morfologica degli zigoti e degli embrioni

1.1 Le tecniche di fecondazione assistita

E' consuetudine definire come tecniche di fecondazione assistita una serie di tecniche mediche che tendono ad aiutare o a favorire il processo riproduttivo. La prima bambina concepita in provetta, Louise Brown, nacque in Inghilterra nel 1978 mediante la tecnica IVF-ET (*in vitro Fertilization- Embryo transfer*). Tale tecnica, trasformata in italiano in FIV-ET, per una più facile pronuncia, nacque come tentativo di bypassare l'incontro tra ovocita e spermatozoo quando tale processo non era possibile nelle normali sedi fisiologiche (tube di falloppio). In seguito tale metodica ha trovato altre indicazioni oltre alla impervietà tubarica, come i fattori pelvici (quali l'endometriosi o importanti sindromi aderenziali), i disordini immunologici non risolvibili con terapia medica o nel caso di sterilità idiopatica. Nel tempo le tecniche di fecondazione assistita si sono evolute a tal punto da non riprodurre solo *in vitro* il processo della fecondazione ma a sostituirsi completamente ad esso. Nella ICSI (*intracytoplasmic sperm injection*), mediante apposite apparecchiature, lo spermatozoo viene iniettato direttamente all'interno dell'ovocita. Tale tecnica ha come indicazione principale il fattore maschile severo ma viene anche consigliata nei casi di presenza di anticorpi antispermatozoo,

ripetuti fallimenti di fertilizzazione con la FIV-ET e eiaculazione retrograda. Sia l'esecuzione della FIVET sia dell'ICSI comportano l'induzione dell'ovulazione multipla, preceduta dall'inibizione dell'asse ipotalamo-ipofisario con analoghi del GnRH, al fine di ottenere un numero cospicuo di ovociti da selezionare per la tecnica. Esistono diversi protocolli di stimolazione ovarica che vengono scelti in base alle caratteristiche della paziente. Per le pazienti da cui ci si attende una normale risposta ovarica (età <37 anni, bFSH <9, BMI nella norma) viene comunemente utilizzato il *Long Protocol*: tale protocollo prevede una fase di trattamento con analoghi nel GnRH per la soppressione dell'asse ipotalamo ipofisi ed una fase di induzione della crescita follicolare multipla con la somministrazione di gonadotropine. Nella pazienti per cui è prevista una scarsa risposta ovarica (età > 37 anni; bFSH >9; BMI elevato >29) viene di solito utilizzato lo *short protocol*. In questo caso è prevista la somministrazione concomitante di gonadotropine ed analoghi al fine di potenziare la fase iniziale di stimolazione attraverso la dismissione massiva della quota endogena di Ormone follicolo stimolante (FSH) ed ormone luteinizzante (LH) (*flare up*).

1.2 Valutazione morfologica degli ovociti

Indipendentemente dal tipo di protocollo di stimolazione utilizzato, quando i follicoli raggiungono un diametro all'incirca di 18 mm, con un contemporaneo valore di estradiolo sierico adeguato, si procede con l'aspirazione dei follicoli per via ecografica transvaginale. Gli ovociti prelevati vengono stadiati in base alle caratteristiche morfologiche.

Il grado di maturazione degli ovociti dipende dai valori di estradiolo sierico; maggiori sono i livelli di estradiolo plasmatici tanto più elevato è il numero di ovociti maturi (Schmutzler *et al.*, 1998). In base alla presenza del globulo polare (Metafase II o I) e allo stato della corona radiata è possibile distinguere 4 gradi di maturazione ovocitaria:

Ovociti immaturi: il cumulo ooforo appare ammassato, non filante. La corona radiata appare compatta, addossata alla zona pellucida. Il corpuscolo polare è assente.

Ovociti maturi: il cumulo appare espanso, la corona radiata ha cellule estese. Il globulo polare è presente.

Ovociti postmaturi: il cumulo ooforo appare disperso, granulare, con cellule ammassate. La corona radiata appare espansa con cellule spesso separata dalla zona pellucida. Il globulo polare è presente.

Ovociti ipermaturi (luteinizzati): il cumulo ooforo appare ammassato e scuro. La corona radiata è addensata e scura. Il globulo polare è presente, spesso frammentato.

A questi 4 tipi di ovociti corrisponde una maggiore o minore percentuale di fecondazione. Gli ovociti maturi presentano una percentuale di fecondazione pari al 80% e una maggiore probabilità di dar vita ad una gravidanza (Schmutzler *et al.*, 1998). Nella FIV-ET gli ovociti di migliore qualità, secondo la classificazione riportata, vengono posti a contatto con il seme opportunamente preparato e concentrato.

Nella tecnica ICSI gli ovociti vengono prima denudati dalle cellule del cumulo ooforo e della corona radiata, mediante l'ausilio di

enzimi (ialuronidasi) e meccanicamente, e solo successivamente vengono iniettati con lo spermatozoo.

Il giorno successivo viene effettuato il controllo per valutare l'eventuale avvenuta fertilizzazione. La presenza di due pronuclei associata all'estrusione di due globuli polari è comunemente utilizzata come indice di un'avvenuta corretta fertilizzazione.

In seconda ed in terza giornata, ad intervalli regolari, gli embrioni vengono valutati morfologicamente al fine di selezionare quelli più adatti al trasferimento in utero.

1.3 Valutazione morfologica degli zigoti e degli embrioni

La tendenza nelle tecniche di fecondazione *in vitro*, in Italia ed all'estero, è sempre stata quella di ridurre al minimo il numero di embrioni trasferiti in utero, al fine di diminuire l'eventualità di gravidanze multiple, mantenendo allo stesso tempo le percentuali di gravidanza a livelli accettabili (Coetsier and Dhont, 1998; Pennings, 2000). In accordo con tale tendenza, diverse sono state le strade prese in considerazione, nel corso degli anni, per cercare di incrementare l'affidabilità dei sistemi di valutazione e di coltura degli embrioni. Tra le varie possibili, tecniche come il trasferimento di blastocisti se da un lato rappresentano una garanzia in termine di gravidanza e contemporaneamente permettono di ridurre il rischio di gravidanza multipla, dall'altro richiedono un sistema di coltura complesso, difficile da ottenere *in vitro* (Langley *et al.*,2001). In contrasto con le colture di blastocisti, i sistemi di coltura degli embrioni, fino al secondo o terzo giorno dopo la fertilizzazione, sono relativamente semplici.

Proprio per questo, riuscire ad individuare un sistema di valutazione affidabile degli embrioni da trasferire in seconda o terza giornata, rappresenterebbe un reale beneficio nelle tecniche di fecondazione *in vitro*, in quanto permetterebbe di incrementare le percentuali di successo riducendo il numero di embrioni da trasferire.

Nel protocollo standard di fertilizzazione *in vitro*, gli embrioni più idonei al trasferimento in utero vengono scelti in base ad una valutazione morfologica, due o tre giorni dopo la fecondazione (Edwards et al, 1980; 1984; Cummins et al., 1986; Puissant *et al.*, 1987; Visser and Furie, 1993; Giorgetti *et al.*, 1995; Ziebe *et al.*, 1997; Hu et al.,1998). Tale valutazione morfologica si basa sull'osservazione di parametri quali la presenza o meno di frammenti, la sincronia di divisione e la presenza di uno o più nuclei per cellula. L'osservazione di tali parametri permette di attribuire ad ogni embrione un diverso punteggio di qualità (grado).

Il sistema di valutazione maggiormente utilizzato è il seguente (Fabbri et al.,2001):

Grado I: embrioni con blastomeri di egual misura, assenza di frammenti citoplasmatici o vescicole.

Grado II: embrioni con blastomeri di egual misura; presenza di frammenti citoplasmatici minori o vescicole

Grado III: embrioni con blastomeri di diversa misura, pochi o nessun frammento citoplasmatico

Grado IV: embrioni con blastomeri di egual o diversa misura, frammenti citoplasmatici significativi

Grado V: embrioni con pochi blastomeri di egual misura, grave o completa frammentazione

Figura 1: embrione 8 cellule grado I . I blastomeri appaiono delle stesse dimensioni.. Non sono presenti frammenti citoplasmatici o vescicole.



Figura 2: embrione 4 cellule grado II . I blastomeri appaiono delle stesse dimensioni. Sono presenti frammenti citoplasmatici significativi.



Diversi lavori, presenti in letteratura, suggeriscono che anche la valutazione morfologica degli zigoti può incidere sull'*outcome* nella fertilizzazione *in vitro* (Scott and Smith,1998; Dale *et al.*,1999; Tesarik and Greco 1999; Tesarik *et al.*, 2000; Wittemer *et al.*, 2000). E' stato, ad esempio, possibile ottenere una percentuale di gravidanza del 49.5%, trasferendo solo zigoti di buona qualità; mentre la percentuale ottenuta trasferendo solo embrioni di media qualità è stata del 28% (Scott *et al.*, 2000).

Tesarik and Greco (1999) definiscono come zigoti "ad alta qualità" queglii zigoti che presentano uno specifico allineamento dei nucleoli. Tali autori hanno, anche essi, dimostrato che è possibile

ottenere una percentuale di gravidanza del 50% per gli zigoti con i nucleoli allineanti, valore nettamente in contrasto (9%) con quello ottenuto dagli zigoti in cui l'allineamento non è presente.

Gli stessi autori arrivano alla conclusione che parametri quali l'allineamento dei pronuclei, la morfologia dei nucleoli e la presenza di una zona di citoplasma denominata "flare", sono altamente indicativi delle potenzialità di impianto degli embrioni in utero, nelle tecniche di riproduzione assistita.

Figura 3 : Zigote in cui i pronuclei appaiono allineati al centro della cellula, i nucleoli sono presenti in eguale numero, è visibile la zona *flare*.



Figura 4: zigote in cui i pronuclei non appaiono di egual dimensione, e non risultano allienati al centro della cellula; i nucleoli sono più numerosi in un pronucleo.



Sebbene il trasferimento degli zigoti possa portare ad un esito positivo, dando percentuali di gravidanza relativamente alte, (Ahuja et al.,1985; Quinn et al.,1990; Smith et al., 1993; Scott and Smith,1998), occorre tener presente che questa metodica risulta essere limitata dal fatto che la qualità embrionaria non può essere esaminata e quindi utilizzata nella scelta degli zigoti da trasferire. Nonostante ciò, il trasferimento di zigoti in assoluto permette di ottenere percentuali di gravidanza comparabili al trasferimento di embrioni pre-impianto (4-8 cellule) (Scott and Smith,1998; Dale et al., 2002). Basandosi su tali evidenze presenti in letteratura, si

evinces che l'analisi morfologica degli zigoti può essere utilizzata per predire lo sviluppo degli embrioni e le loro potenzialità d'impianto.

Bisogna anche considerare che esiste una correlazione tra lo sviluppo degli zigoti e quello degli embrioni benché non sia perfettamente lineare (Ludwing *et al.*,2000; Scott *et al.*,2000); ciò suggerisce che qualsiasi grado di predittività, nelle tecniche fecondazione assistita, viene perso quando lo *score* degli embrioni e quello degli zigoti vengono valutati separatamente (Rjinders and Jansen, 1998). Accanto alla valutazione morfologica degli zigoti e degli embrioni, anche la percentuale di sviluppo dei singoli embrioni (numero di blastomeri) è un parametro che può indicare la potenzialità d'impianto. Racowsky *et al.* (2000) hanno evidenziato percentuali di gravidanza pari al 33% in un gruppo di pazienti i cui embrioni in terza giornata non presentavano otto cellule, contro il 51% di gravidanza di un pazienti che presentavano embrioni ad otto cellule nella stata giornata di osservazione.

Risulta evidente, da quanto riportato in letteratura da diversi anni, che sia possibile incrementare le probabilità di gravidanza nei cicli di fecondazione assistita utilizzando un sistema di *scoring* che tenga conto di diversi variabili quali lo *scoring* degli zigoti, degli embrioni e la velocità di sedimentazione degli embrioni stessi.

Le immagini riportate in questo capitolo sono state tutte ottenute nel laboratorio di fecondazione *in vitro*- centro di *Sterilità ed Infertilità di Coppia* afferente al Dipartimento Universitario di Scienze Ostetriche, Ginecologiche, Urologiche e Medicina della Riproduzione” dell’Università “Federico II” di Napoli.

Ahuja, K.K., Smith, W., Tucker, M. and Craft, I. (1985) Successful pregnancies from the transfer of pronuclear embryos in an outpatient *in vitro* fertilisation program. *Fertil. Steril.*, 44, 181–184.

Coetsier, T. and Dhont, M. (1998) Avoiding multiple pregnancies in in-vitro fertilisation: who's afraid of single embryo transfer? *Hum. Reprod.*, 10, 2663–2670

Edwards, R.G., Steptoe, P.C. and Purdy, J.M. (1980) Establishing full-term human pregnancies using cleaving embryos grown *in vitro*. *Br. J. Obstet. Gynaecol.*, 87, 737–756

Cummins, J.M., Breen, T.M., Harrison, K.L., Shaw, J.M., Wilson, L.M. and Hennessey, J.F. (1986) A formula for scoring human embryo growth rates in *in vitro* fertilisation: its value in predicting pregnancy and in comparison with visual estimates of embryo quality *J. In Vitro Fertil. Embryo Transfer*, 3, 284–295

Dale, B., Fiorentino, A., De Stefano, R., Di Matteo, L., De Simone, M.L., Wilding, M. and Zullo, F. (1999) Activated oocyte transfer (AOT) as a stress-free approach to the treatment of infertility. *Hum. Reprod.*, 14, 1771–1772

Dale, B., Fiorentino A., De Simone, M.L., Di Matteo, L., Scotto di Frega, A., Wilding, M., Fehr, P., Bassan, M., Lo Giudice, C., Maselli, A. *et al.* (2002)

Zygote versus embryo transfer: a prospective randomised multicentre trial. *J. Assist. Reprod. Genet.*

Edwards, R.G., Fishel, S.B., Cohen, J., Fehilly, C.B., Purdy, J.M., Slater, J.M., Steptoe, P.C. and Webster, J.M. (1984) Factors influencing the success of *in vitro* fertilisation for alleviating human infertility. *J. In Vitro Fertil. Embryo Transfer*, 1, 3–23

Fabbri R., Ciotti P.M., Magrini O., Porcu E. (2001) Atlante di ovociti ed embrioni umani Percorsi Editoriali 2001

Giorgetti, C., Terriou, P., Auquier, P., Hans, E., Spach, J.L., Salzmann, J. and Roulier, R. (1995) Embryo score to predict implantation after *in vitro* fertilization: based on 957 single embryo transfers. *Hum. Reprod.*, 10, 2427–2431

Hu, Y., Maxson, W.S., Hoffman, D.I., Ory, S.J., Eager, S., Dupre, J. and Lu, C. (1998) Maximising pregnancy rates and limiting high-order multiple conceptions by determining the optimal number of embryos to transfer based on quality. *Fertil. Steril.*, 69, 650–657

Langley, M.T., Marek, D.M., Gardner, D.K., Doody, K.M. and Doody, K.J. (2001) Extended embryo culture in human assisted reproduction treatments *Hum. Reprod.*, 16, 902–908

Ludwig, M., Schopper, B., Al-Hasani, S. and Diedrich, K. (2000) Clinical use of a pronuclear stage score following intracytoplasmic sperm injection: impact on pregnancy rates under the conditions of the German embryo law *Hum. Reprod.*, 15, 325–329

Pennings, G. (2000) Multiple pregnancies: a test case for the moral quality of assisted reproduction. *Hum. Reprod.*, 15, 2466–2469

Puissant, F., Van Rysselberge, M., Barlow, P., Dewesze, J. and Leroy, F. (1987) Embryo scoring as a prognostic tool in IVF treatment. *Hum. Reprod.*, 2, 705–708

Quinn, P., Stone, B.A. and Marrs, R.P. (1990) Suboptimal laboratory conditions can affect pregnancy outcome after embryo transfer on day 1 or day 2 after insemination *in vitro*. *Fertil. Steril.*, 63, 168–170

Racowsky, C., Jackson, K.V., Cekleniak, N.A., Fox, J.H., Hornstein, M.D. and Ginsberg, E.J. (2000) The number of eight-cell embryos is a key determinant for selecting day 3 or day 5 transfer. *Fertil. Steril.*, 73, 558–564

Rjinders, P. and Jansen, C. (1998) The predictive value of day 3 embryo morphology regarding blastocysts formation, pregnancy and implantation rate after day 5 transfer following in-vitro fertilisation or intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.*, 13, 2869–2873

Schmutzler A.G, Rieckmann O. Sushma V., Kupka M., Montag M., Prietl G., Krebs D., Van der Ven H.H (1998) Ideal oocyte morphology depends on oestradiol concentration. *Hum. Reprod* 13 (*Suppl*): 179

Scott, L.A. and Smith, S. (1998) The successful use of pronuclear embryo transfers the day following oocyte retrieval *Hum. Reprod.*, 13, 1003–1013

Scott, L., Alvero, R., Leondires, M. and Miller, B. (2000) The morphology of human pronuclear embryos is positively related to blastocysts development and implantation. *Hum. Reprod.*, 15, 2394–2403

Scott, L.A. and Smith, S. (1998) The successful use of pronuclear embryo transfers the day following oocyte retrieval *Hum. Reprod.*, 13, 1003–1013

Smith, S., Scott, L. and Hosid, S. (1993) Combined intrauterine triplet and ectopic pregnancy following pronuclear transfer in a patient with elevated serum progesterone during ovulation induction. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 10, 478–480

Tesarik, J. and Greco, E. (1999) The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology *Hum. Reprod.*, 14, 1318–1323.

Tesarik, J., Junca, A.M., Hazout, A., Aubriot, F.X., Nathan, C., Cohen-Bacrie, P. and Dumont-Hassan, M. (2000) Embryos with high implantation potential after intracytoplasmic sperm injection can be recognised by a simple, non-invasive examination of pronuclear morphology *Hum. Reprod.*, 15, 1396–1399.

Visser, D. and Fourie, F. (1993) The applicability of cumulative embryo score selection and quality control in an in-vitro fertilization/embryo transfer programme. *Hum. Reprod.*, 8, 1719–1722

Wittemer, C., Bettahar-Lebugle, K., Ohl, J., Rongieres, C., Nisand, I. and Gerlinger, P. (2000) Zygote evaluation: an efficient tool for embryo selection. *Hum. Reprod.*, 15, 2591–2597

Ziebe, S., Petersen, K., Lindenberg, S. Andersen, A.G., Gabrielsen, A. and Andersen, A.N. (1997) Embryo morphology or cleavage stage: how to select the best embryos for transfer after in-vitro fertilization. *Hum. Reprod.*, 12, 1545–1549

Capitolo II

La leptina: effetti endocrini e riproduttivi

2.1 La leptina ed il suo recettore

La *leptina*, prodotto del gene *ob*, è un piccolo peptide, sintetizzato prevalentemente dagli adipociti, che svolge un ruolo importante nella regolarizzazione del peso corporeo e dell'assunzione di cibo.

Il gene della leptina, sia umano sia murino, è strutturato in tre esoni, a loro volta separati da due introni (Zhang *et al.*, 1994). La regione che codifica l'ormone è contenuta negli esoni 2 e 3; questi sono separati da un introne di circa due kb, localizzato tra i codoni della glutammina-49 e della serina-50 (Isse *et al.*, 1995; Gong *et al.*, 1996). L'esone 1 (26 bp non codificanti), è localizzato approssimativamente a 7,5 kb a monte dell'esone 2. Il promotore del gene della leptina comprende una regione di circa 3 kb (Considine *et al.*, 1995; Isse *et al.*, 1995; Miller *et al.*, 1995; Gong *et al.*, 1996). Il TATA box è localizzato tra -26 e -30 (Considine *et al.*, 1995). Solo le prime 217 bp sono necessarie per l'espressione basale del gene *ob* nel tessuto adiposo. La trascrizione del gene è regolata da varie funzioni ormonali; in particolare, i glucocorticoidi sono in grado di favorire il legame di proteine *enhancer* ai siti di regolazione.

La traduzione della sequenza nucleotidica contenuta nel mRNA della leptina dà origine ad un precursore di 167 aminoacidi. Di qui si verifica la rimozione di una sequenza-segnale di 21 aminoacidi

(Zhang *et al.*, 1994; Ogawa *et al.*, 1995). Pertanto la proteina secreta nel sangue corrisponderà ad una struttura monomerica di 16 kilodalton, non glicosilata, costituita da 146 aminoacidi (Zhang *et al.*, 1994). Indagini con risonanza magnetica hanno mostrato che la struttura della proteina è organizzata in quattro eliche; la lunghezza delle singole eliche ed il *pattern* dei legami disulfidrici suggeriscono che essa appartiene alla famiglia delle citochine ad elica corta (Kline *et al.*, 1997).

L'mRNA del gene *ob* è espresso in grandi quantità negli adipociti, laddove i livelli circolanti di ormone sono proporzionali al numero ed alla grandezza degli stessi. Livelli più bassi sono stati riscontrati nel muscolo cardiaco, nello stomaco, nella placenta, nella mammella e, più di recente, in altri organi, quali le cellule della granulosa ed il trofoblasto (Zachow e Magoffin, 1997; Finn *et al.*, 1998). La leptina viene secreta, nell'uomo, in modo pulsatile, con una media di circa 32 *pulses* in 24 ore (Licinio *et al.*, 1997). È stata inoltre osservata l'esistenza di un ritmo circadiano di secrezione che, analogamente a quanto si osserva per l'ormone stimolante la tiroide (TSH) e la prolattina (PRL), mostra un *nadir* nel corso del giorno ed uno *zenit* durante la notte (Shina *et al.*, 1996).

I recettori della leptina fanno parte della superfamiglia dei recettori per le citochine di classe I. La prima variante recettoriale, la così detta "forma corta" (*ob-Ra*), è stata originariamente identificata nel topo, a livello dei plessi corioidei (Tartaglia *et al.*, 1995; Lynn *et al.*, 1996) del terzo e del quarto ventricolo; essa risultava costituita da un totale di 894 aminoacidi, con una sequenza segnale di secrezione di 22 aminoacidi ed un dominio transmembrana di 23

aminoacidi. Tale forma recettoriale non è stata identificata nella specie umana.

Una seconda variante recettoriale, definita “forma lunga” (*ob-Rb*) in relazione alla presenza di una sequenza intra-citoplasmatica addizionale di 269 aminoacidi, rappresenta la struttura funzionale, in grado di trasdurre il segnale biologico veicolato dall’ormone. Questo recettore presenta una struttura elicoidale simile a quella dell’interleuchina (IL)-6 e mostra modalità di trasduzione analoghe a quelle del recettore per tale citochina (Baumann *et al.*, 1996; Tartaglia, 1997): è quindi contrassegnato dalla presenza di sequenze di trasmissione definite STAT (*signal transducer and activation of transcription*) e di una sequenza di interazione con chinasi di tipo *janus* (JAK). Dopo il legame della leptina al recettore, gli STAT dimerizzano e, traslocando nel nucleo, attivano la trascrizione genica. L’*ob-Rb* è stato clonato nella specie umana a partire da neuroni, utilizzando come sonda il recettore del topo (Tartaglia *et al.*, 1995). Esso è ampiamente diffuso a livello del SNC (Banks *et al.*, 1996; Cioffi *et al.*, 1996) e risulta particolarmente rappresentato nella regione dei nuclei paraventricolare (Schwartz *et al.*, 1996) ed arcuato.

La sequenza aminoacidica del dominio extracellulare del recettore umano è identica per il 78%, laddove quella del dominio intracellulare presenta una omologia del 71% col corrispettivo murino (Tartaglia *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1996).

2.2 Effetti endocrino-metabolici della leptina

La leptina svolge un ruolo regolatorio sul ritmo fame – sazietà, modulando, in funzione dello stato nutrizionale, l'assunzione di cibo e la spesa energetica. Pertanto, il primo filone di ricerca relativo alle interazioni tra leptina e sistema endocrino è stato incentrato sull'asse ipotalamo-ipofisi-surrene. In particolare, esistono dati che dimostrano una significativa correlazione inversa tra livelli di ormone ed increzione di cortisolo, in soggetti magri ed obesi, sia a digiuno sia dopo i pasti (Korbonits *et al.*, 1997); tali riscontri lasciano ipotizzare che la leptina possa sopprimere, a livello del sistema nervoso centrale (SNC), l'attività dell'asse sopra indicato (Licinio *et al.*, 1997). E' stato inoltre dimostrato, nei roditori, come iniezioni sottocutanee di idrocortisone provochino una sensibile diminuzione dell'introito calorico, associata a perdita di peso (Devos *et al.*, 1995). Effetti analoghi sono stati osservati anche nell'uomo, a seguito della somministrazione di idrocortisone, triamcinolone e desametasone (Devenport *et al.*, 1989). Questi effetti sembrano essere riconducibili alla presenza di siti di legame per i glucocorticoidi a livello del promotore del gene *ob* (GRE, *glucocorticoid responding elements*): il legame dei glucocorticoidi a tali siti aumenterebbe la trascrizione del gene e, quindi, la biosintesi di leptina.

La regolazione dell'assunzione di cibo sembra essere inoltre riconducibile ad ulteriori effetti centrali, mediati dalla leptina, a livello delle regioni ipotalamiche deputate alla regolazione del

ritmo fame-sazietà. In particolare, la leptina regola l'espressione ipotalamica di geni *target* di STAT3, quali *c-fos* e *c-jun*, nonché dei geni che codificano per il neuropeptide Y (NPY) ed il *cocaine and amphetamine-regulated transcript* (CART).

I livelli circolanti di leptina sono significativamente più elevati, anche nella specie umana, negli individui di sesso femminile. Tale riscontro è verosimilmente legato alla produzione di estrogeni. Numerosi studi hanno infatti evidenziato come l'incubazione *in vitro* di tessuto adiposo di ratto con estrogeni, si rifletta in un aumento, tempo- e dose-dipendente, della espressione e della secrezione di leptina (Murakami *et al.*, 1995; Kristiansen *et al.*, 1999; Machinal *et al.*, 1999; Sliker *et al.*, 1998). E' interessante sottolineare come tale effetto, nel ratto, sia maggiormente riscontrabile nel tessuto adiposo di animali di sesso femminile: dopo stimolazione con 50 nM di estrogeni, la produzione di leptina mostra un incremento del 75% nelle femmine e del 34% nei maschi, laddove non sono riscontrabili differenze significative nel rilascio di ormone tra i due sessi, in condizioni basali di coltura (Kristiansen *et al.*, 1999). I dati sugli effetti degli estrogeni su adipociti umani *in vitro* sono limitati: analogamente a quanto si osserva nel modello murino, l'estradiolo sembra essere in grado di promuovere la secrezione di leptina *in vitro* da parte di colture di tessuto adiposo. Tale effetto è riscontrabile esclusivamente in colture di adipociti derivanti da individui di sesso femminile (Casabiell *et al.*, 1998). E' interessante sottolineare come, nella specie umana, un maggiore rilascio di leptina da parte di adipociti in coltura derivanti da soggetti femminili, sia riscontrabile anche in condizioni basali, ovverosia in assenza di stimolazione estradiolica

(Casabiell *et al.*, 1998; Pineiro *et al.*, 1999). Sebbene i meccanismi che sono alla base dell'attività dell'estradiolo nella regolazione del rilascio di leptina non siano noti, si ritiene che alcune componenti, quali la presenza di una sequenza consenso dell'elemento responsivo agli estrogeni (Savouret *et al.*, 1994; Kumar e Chambon, 1998) nel promotore del gene *ob* e la presenza di molecole leganti gli estrogeni ad elevata affinità nella frazione citosolica dei diversi tessuti adiposi, giochino un ruolo chiave (Wade e Gray, 1978).

2.3 Leptina e funzione riproduttiva

L'esistenza di un legame tra quantità/distribuzione di tessuto adiposo e sistema riproduttivo è ampiamente riconosciuta (Frisch, 1989). Un'ipotesi interessante è che la leptina rappresenti un segnale periferico, in grado di notificare l'adeguatezza dello stato nutrizionale ai fini dell'espletamento della funzione riproduttiva (Mounzih *et al.*, 1997; Tataranni *et al.*, 1997). A supporto di tale suggestiva ipotesi sono state proposte alcune evidenze ottenute nel modello sperimentale murino. In topi sottoposti a digiuno forzato, la caduta dei livelli plasmatici di leptina coincide con importanti cambiamenti neuroendocrini, che si riflettono in una compromissione della funzione riproduttiva. La somministrazione di leptina esogena in questi animali ripristina la fertilità (Ahima *et al.*, 1997). Anche l'assenza congenita di leptina si associa, nel topo femmina *ob/ob*, ad ipogonadismo centrale ed anovulazione cronica. Tale condizione è revertita dal trattamento con leptina ricombinante, ma non dalla restrizione di cibo. Alcuni autori hanno

ipotizzato, sulla base delle osservazioni nel modello murino, che la relazione tra stato nutrizionale e funzione riproduttiva possa, anche nella donna, essere in parte riconducibile alla produzione di leptina. L'ipotesi di un coinvolgimento della molecola nella regolazione della funzione riproduttiva nella donna nasce in parte anche dal riscontro di fluttuazioni fisiologiche di ormone nelle varie fasi del ciclo mestruale, laddove i livelli circolanti risultano significativamente più bassi all'inizio della fase follicolare (Hardie *et al.*, 1997; Mannucci *et al.*, 1998; Messinis *et al.*, 1998, 1999).

E' interessante osservare come un inadeguato apporto nutrizionale, nell'età adulta, possa riflettersi in anomalie della funzione ovulatoria, verosimilmente riconducibili ad interferenze neuroendocrine con la cinetica di secrezione del *gonadotrophin-releasing hormone* (GnRH), (Foster e Nagatami, 1999). Tuttavia va evidenziato che nei soggetti con concentrazioni ematiche di leptina <3 ng/ml e quantità di tessuto adiposo <15%, l'incidenza di anovulazione cronica risulta significativamente più elevata (Tataranni *et al.*, 1997).

Analogamente, la funzione riproduttiva può risultare compromessa anche in presenza di eccessivo apporto nutrizionale. In donne obese è di frequente riscontro la presenza di una sindrome dell'ovaio policistico (PCOS) in associazione ad una condizione di anovulazione cronica. Anche in questo caso esistono evidenze a favore di un coinvolgimento della leptina nella patogenesi di anomalie della funzione ovarica: in questi soggetti è stato infatti evidenziato un incremento significativo dei livelli circolanti della molecola, verosimilmente correlabile con l'incremento della produzione di androgeni ovarici (Conway e Jacobs, 1997).

Tuttavia, il ruolo svolto dalla leptina nella regolazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-ovaio e le relazioni esistenti tra attività della molecola, increzione di ormone luteinizzante (LH) e concentrazioni di estradiolo restano tuttora oggetto di studio (Licinio *et al.*, 1998).

Alcuni autori hanno recentemente ipotizzato che, oltre a meccanismi centrali (GnRH) dipendenti, la leptina possa mediare effetti periferici, regolando direttamente la funzione degli organi riproduttivi (Zamorano *et al.*, 1997). Evidenze in tal senso derivano dal modello della PCOS: alti livelli di leptina potrebbero contribuire all'infertilità neutralizzando gli effetti sensibilizzanti dell'IGF-1 nei follicoli dominanti (Zachow e Magoffin, 1997).

Studi *in vitro* hanno rilevato alcuni effetti della leptina sulla regolazione della steroidogenesi nell'ovaio. In primo luogo è stata dimostrata l'esistenza di una sotto-popolazione di cellule della granulosa, in grado di produrre ed accumulare leptina e fattori di crescita in corso di follicologenesi. E' interessante osservare che il rilascio di leptina e fattori di crescita da queste cellule sembra essere pulsatile. Recenti studi hanno dimostrato che la leptina, in maniera dose-tempo-dipendente, inibisce la produzione di progesterone, stimolata dalla gonadotropina corionica (hGC), nelle cellule della granulosa luteinizzata umana. Questo effetto inibitorio è evidenziabile solo quando le cellule della granulosa sono coltivate in presenza di insulina ed è verosimilmente riconducibile ad un antagonismo sull'azione della stessa (Brannian *et al.*, 1999). Tali evidenze, nell'insieme, hanno suggerito l'esistenza di un'attività simil-apocrina mediata dalla leptina all'interno del follicolo ovarico umano (Antczak *et al.*, 1997).

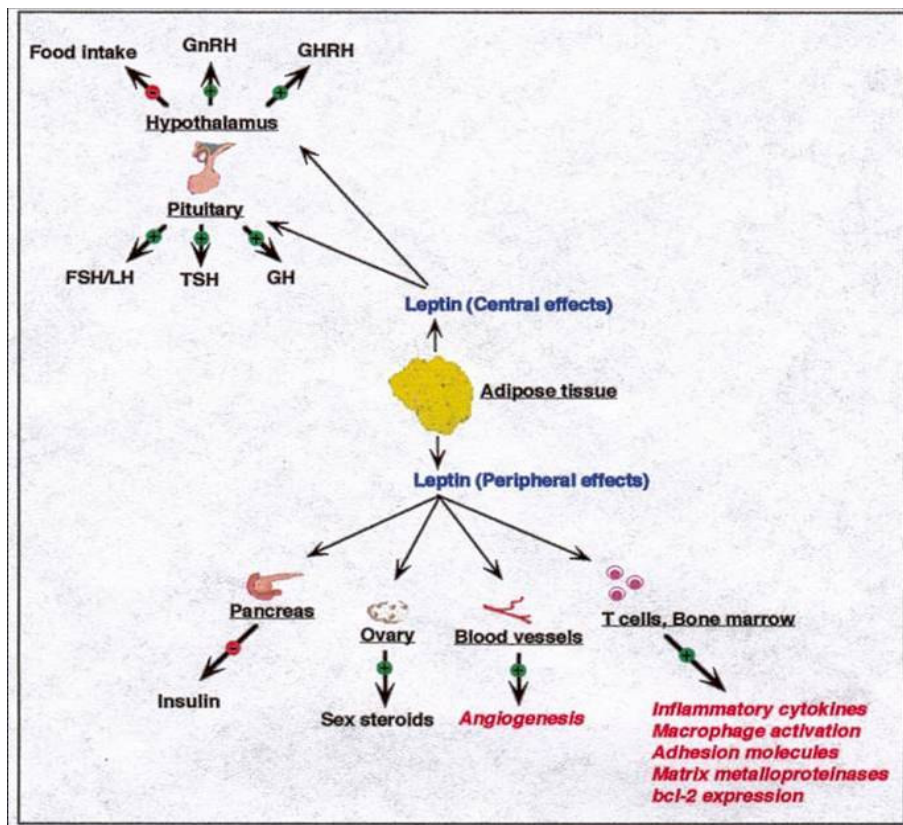


Figura 1: Meccanismo d'azione della leptina

- Ahima RS, Dusahy J, Flier SN et al. (1997) Leptin accelerates the onset of puberty in normal female mice. *J Clin Invest* 99: 391-395.
- Antczak M, Van Blerkom JV. (1997) Oocyte influences on early development: the regulatory proteins leptin and STAT3 are polarized in mouse and human oocytes and differentially distributed within the cells of the preimplantation stage embryo. *Mol Hum Reprod* 3: 1067-1086.
- Banks WA, Kastin AJ, Huang W et al. (1996) Leptin enters in the brain by a saturable system independent of insulin. *Peptides*; 17: 305-311.
- Baumann H, Morella KK, White DW et al. (1996) The full-length leptin receptor has signalling capabilities of interleukin 6-type cytokine receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 8374-8378.
- Brannian JD, Zhao Y, McElroy M. (1999) Leptin inhibits gonadotropin-stimulated granulosa cell progesterone production by antagonizing insulin action. *Hum Reprod* 14: 1445-1448.
- Cioffi JA, Shafer A, Zupancic T et al. (1996) Novel B219/ob receptor isoforms: Possible role of leptin in hematopoiesis and reproduction. *Nat Med* 2: 585-588.
- Schwartz MW, Seeley RJ, Campfield LA et al. 1996a Identification of target of leptin action in rat hypothalamus. *J Clin Invest* 98: 1101-1106.
- Casabiell X, Pineiro W, Peinò R et al. (1998) Gender differences in both spontaneous and stimulated leptin secretion by omental adipose tissue in vitro: dexamethasone and estradiol stimulate leptin release in women but not in men samples. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 2149-2155.
- Chen H, Charlat O, Tartaglia LA et al. (1996) Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor : Identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. *Cell* 84: 491-495.
- Considine RV, Considine EL, Williams CJ et al. (1995) Evidence against either a premature stop codon or the absence of obese gene m-RNA in human obesity. *J Clin Invest* 95: 2986-2988.
- Devos R, Saladin R, Auwerx J and Staels B. (1995) Induction of ob gene expression by corticosteroids, is accompanied by body weight loss and reduced food intake. *J Biol Chem* 270: 15958-15961.
- Devenport L, Knehans A, Sundstrom A and Thomas T. (1989) Corticosterone's dual metabolic actions. *Life Sci* 45: 1389-1396.

- Finn PD, Cunningham MJ, Pau KY et al. (1998) The stimulatory effect of leptin on the neuroendocrine reproductive axis of the monkey. *Endocrinology* 139: 4652-4662.
- Foster, D.L. & Nagatani, S. (1999) Physiological perspectives on leptin as a regulator of reproduction: role in timing puberty. *Biology of Reproduction*, 60, 205-215.
- Gong DW, Bi S, Pratley RE and Weintraub BD. (1996) Genomic structure and promoter analysis of the human obese gene. *J Biol Chem* 271: 3971-3974.
- Hardie L, Trayhurn P, Abramovich D and Fowler P. (1997) Circulating leptin in women: a longitudinal study in the menstrual cycle and during pregnancy. *Clin Endocrinol* 47: 101-106.
- Isse N, Ogawa Y, Tamura N et al. (1995) Structural organization and chromosomal assignment of the human obese gene. *J Biol Chem* 270: 27728-27733.
- Kline Ad, Becker GW, Churgay LM et al. (1997) Leptin is a four-helix bundle: secondary structure by NMR. *FEBS Lett.* 407: 239-242.
- Kristiansen K, Pedersen SB, Richelsen B. (1999) Regulation of leptin by steroid hormones in rat adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 259: 624-630.
- Korbonits L, Trainer PJ, Litle JA et al. (1997) Leptin levels do not change acutely with food administration in normal or obese subjects, but are negatively correlated with pituitary-adrenal activity. *Clin Endocrinol* 46: 751-757.
- Kumar V, Chambon P. (1998) The estrogen receptor binds tightly to its responsive element as a ligand-induced homodimer. *Cell* 55: 145-156.
- Lynn RB, Cao GY, Considine RV et al. (1996) Autoradiographic localization of leptin binding in the choroid plexus of ob/ob and db/db mice. *Biochem Biophys Res Commun* 219: 884-889.
- Licinio J, Mantzoros C, Negrao AB et al. (1997) Human leptin are pulsatile and inversely related to pituitary-adrenal function. *Nat Med* 3: 575-579.
- Machinal F, Dieudonne MN, Leneuve MC et al. (1999) In vivo and in vitro ob gene expression and leptin secretion in rat adipocytes : Evidence for a regional specific regulation by sex steroid hormones. *Endocrinology* 140: 1567-1574.
- Mannucci E, Ognibene A, Becorpi A et al. (1998) Relationship between leptin and oestrogens in healthy women. *Eur J Endocrinol* 139: 198-201.
- Messinis IE, Milingos S, Zikopoulos K et al. (1998) Leptin concentrations in the follicular phase of spontaneous cycles and cycles superovulated with follicle stimulating hormone. *Hum Reprod* 13: 1152-1156.

- Messinis IE, Milingos SD. (1999) Leptin in human reproduction. *Hum Reprod* 5: 52-63.
- Miller SG, De Vos P, Guerre-Millo M et al. (1995) The adipocyte specific transcription factor C/EBP modulates human ob gene expression. *Proc Acad Sci USA* 93: 5507-5511.
- Mounzih K, Liu R, Chehab FF. (1997) Leptin treatment rescues the sterility of genetically obese ob/ob males. *Endocrinology* 138: 1190-1193.
- Murakami T, Iida M, Shima K. (1995) Dexamethasone regulates obese expression in isolated rat adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 214: 5301-5304.
- Ogawa Y, Masuzaki H, Isse N. 1995 Molecular cloning of rat obese cDNA augmented gene expression in genetically obese Zucker fatty (fa/fa) rats. *J Clin Invest* 1996: 1647-1652.
- Pineiro V, Casabiell X, Lage M et al. (1999) Dihydrotestosterone, stanozolol, androstenedione and dehydropiandrosterone sulphate inhibit leptin secretion in female but not in male samples of omental adipose tissue in vitro: Lack effect of testosterone. *J Endocrinol* 160: 425-432.
- Savouret JF, Rauch M, Redeuilh et al. (1994) Interplay between estrogen, progestins, retinoic acid and AP-1 on a single regulatory site in the progesterone receptor gene. *J Biol Chem* 269: 28955-28962.
- Shimizu H, Shimomura Y, Nakanishi et al. (1997) Estrogen increases in vivo leptin production in rats and human subjects. *J Endocrinol* 154: 285-292.
- Shina MK, Ohannesian JP, Heiman ML et al. (1996) Nocturnal rise of leptin in lean, obese and non insulin dependent diabetes mellitus subjects. *J Clin Invest* 97: 1344-1347.
- Sliker LJ, Sloop KW, Surface PL. (1998) Differentiation method-dependent expression of leptin in adipocyte cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 251: 225-229.
- Tartaglia LA, Demski M, Weng X et al. (1995) Identification and expression cloning of the leptin receptor, OB-R. *Cell* 83: 1263-1271
- Conway GS, Jacobs HS. 1997 Leptin: a hormone of reproduction. *Hum Reprod* 12(4): 633-635.
- Tartaglia LA, Demski M, Weng X et al. (1995) Identification and expression cloning of the leptin receptor, OB-R. *Cell* 83: 1263-1271.
- Tataranni PA, Monroe MB, Dueck CA, Traub SA, Nicolson M, Manroe MM, Matt KS, Ravussin E. (1997) Adiposity, plasma leptin concentration and

reproductive function in active and sedentary females. *Int J Obes Relat Metab-Disord* 21(9): 818-821.

Wade GN, Gray JM. (1978) Cytoplasmatic $17\beta[3H]$ estradiol binding in the rat adipose tissue. *Endocrinology* 103: 1695-1701.

Zachow RJ, Magoffin DA. (1997) Direct intra-ovarian effects of leptin: Impairment of the synergistic action of insulin-like growth factor-I on follicle-stimulating hormone-dependent estradiol-17 beta production by rat ovarian granulosa cells. *Endocrinology* 138: 847-850.

Zachow RJ, Magoffin DA. (1997) Direct intra-ovarian effects of leptin: Impairment of the synergistic action of insulin-like growth factor-I on follicle-stimulating hormone-dependent estradiol-17 beta production by rat ovarian granulosa cells. *Endocrinology* 138: 847-850.

Zamorano PL, Maehsh VB, de Sevilla LM et al. (1997) Expression and localization of the leptin receptor in endocrine and neuroendocrine tissues of the rat. *Neuroendocrinology* 65: 223-228.

Zhang Y, Proenca R, Maffei M et al. (1994) Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372: 425-432

Capitolo III Sezione Sperimentale

3.1 Principali obiettivi del lavoro sperimentale

Le probabilità di impianto di ciascun embrione, trasferito nell'ambito di una tecnica di riproduzione assistita, oscillano tra il 10 ed il 15%. Per tale motivo, l'ottenimento di tassi di gravidanza accettabili è restato subordinato, per molti anni, al trasferimento in utero di un numero relativamente elevato di embrioni. Tale approccio, se da un lato si è dimostrato efficace nell'incrementare le probabilità cumulative di concepimento, si associa, dall'altro ad un incremento dell'incidenza di gravidanze multiple, con conseguente aumento dei rischi fetali e materni. Partendo da tali presupposti, la ricerca scientifica nel settore è stata orientata sullo sviluppo di strategie che consentissero di mantenere alte le percentuali di gravidanza pur diminuendo il numero di embrioni trasferiti.

Attualmente, nel protocollo standard di fertilizzazione *in vitro*, gli embrioni più idonei al trasferimento in utero vengono scelti in base ad una valutazione morfologica, due o tre giorni dopo la fecondazione (Edwards et al., 1980). D'altro canto alcuni lavori suggeriscono che anche l'analisi morfologica degli zigoti, dopo la selezione e il trasferimento, può essere indicativa di successo nella fertilizzazione *in vitro* (Scott e Smith, 1998).

Su tali evidenze, note da diversi anni in letteratura, si basano i primi passi del lavoro di ricerca svolto nel corso di dottorato,

avendo come obiettivo quello di elaborare un sistema di *scoring* combinato (*weighted score*) che tenesse conto dello *score* degli embrioni pre-impianto, dello *score* degli zigoti e del numero di blastomeri degli embrioni *pre-transfer*. Il sistema, una volta elaborato, è stato testato mediante un'analisi retrospettiva, al fine di valutare il suo valore predittivo in termini di percentuale di gravidanza e di tasso d'impianto, nelle tecniche di fecondazione assistita.

Il sistema di *scoring* prevede l'acquisizione di differenti punteggi in diverse fasi dello sviluppo embrionario, dallo stadio di zigote a quello *pre-transfer*. Lo *score* cumulativo, che tiene conto dello *score* degli singoli zigoti ed embrioni oltre che del numero di blastomeri, è stato messo in relazione con i tassi di impianto e di gravidanza. I dati ottenuti hanno evidenziato una correlazione significativa tra *score* cumulativo ed i parametri sopra indicati. Tali risultati dimostrano come questo sistema di valutazione possa considerarsi un valido mezzo per incrementare le percentuali di gravidanza riducendo le probabilità di gravidanze multiple.

In una seconda fase del dottorato di ricerca si è cercato di andare a determinare l'esistenza di una eventuale correlazione tra livelli intra-follicolari di leptina, i tassi di fertilizzazione ovocitaria ed il precedentemente testato sistema *scoring* embrionario.

Da diversi anni in letteratura è stata confermata la presenza di leptina in differenti tessuti coinvolti nel processo riproduttivo e si sono accumulate numerose evidenze suggestive di un coinvolgimento locale della molecola nelle dinamiche follicolari. Nonostante ciò, le correlazioni esistenti con la produzione di ormoni ipofisari ed ovarici resta, ancora oggi, oggetto di studio

(Messinis *et al.*, 1999). In tale contesto, alcuni autori hanno impiegato il modello sperimentale, *in vivo*, rappresentato dalle tecniche di procreazione medicalmente assistita (PMA). Tali metodiche sono precedute da una fase di iperstimolazione ovarica controllata (IOC), basata sulla somministrazione di gonadotropine esogene: l'obiettivo è costituito dall'ottenimento di una crescita follicolare multipla mediante il superamento delle dinamiche che sono alla base della selezione del follicolo dominante. La somministrazione di gonadotropine esogene si riflette, sotto il profilo endocrino, nella produzione e nel rilascio di estradiolo (E_2) da parte delle cellule della granulosa presenti nei differenti follicoli in accrescimento. Pertanto, i livelli sierici di tale ormone possono subire un incremento considerevole (anche di venti volte) in un intervallo di tempo relativamente limitato (10-15 giorni). Parallelamente all'incremento dei livelli sierici di E_2 , nelle fasi più avanzate della IOC, è possibile registrare un aumento delle concentrazioni ematiche di progesterone (P_4): l'entità e la repentinità delle variazioni ormonali in corso di IOC rendono, dunque, tale modello un contesto ideale per valutare la correlazione tra andamento dei livelli sierici di steroidi ovarici e di leptina. Le prime esperienze in tal senso sono state recentemente proposte da Bützow *et al.* (1999): gli autori hanno evidenziato come l'incremento dei livelli sierici di leptina, in corso di IOC, sia proporzionale alla percentuale di grasso corporeo e correlato positivamente alla produzione di P_4 . Al contrario, nonostante il considerevole incremento registrabile in corso di trattamento, non sembra esservi alcuna correlazione con i livelli sierici di estradiolo. E' interessante sottolineare come, in tale studio, si evidenziasse

una correlazione negativa, significativa, tra incremento percentuale (confronto tra rilevazioni effettuate ad inizio trattamento ed al giorno del prelievo ovocitario) dei livelli sierici di leptina, in corso di stimolazione, ed esito della risposta ovarica alle gonadotropine esogene, in termini di numero medio di ovociti recuperati. Tali evidenze sono suggestive di un ruolo di modulazione della risposta ovarica alle gonadotropine mediato dalla molecola. In tale ottica, gli autori ipotizzavano che essa fosse coinvolta nei meccanismi che sono alla base della resistenza ovarica alle gonadotropine esogene frequentemente osservata nei soggetti obesi.

Studi successivi (Messinis *et al.*, 1999; Mantzoros *et al.*, 2000) sono stati finalizzati a valutare eventuali correlazioni tra concentrazioni di leptina nei fluidi follicolari (recuperati al momento del prelievo ovocitario) e *outcome* dei cicli di fecondazione *in vitro*. I dati che emergono da tali sperimentazioni sembrano supportare l'ipotesi di una correlazione inversa tra livelli intra-follicolari di ormone e tassi di gravidanza, sia in pazienti normali sia in donne affette da PCOS (Mantzoros *et al.*, 2000).

Nonostante la disponibilità di dati relativi alla produzione intrafollicolare di leptina in corso di IOC, non sono presenti in letteratura evidenze dirette relative all'impatto delle concentrazioni della molecola sulla qualità ovocitaria/embrionaria. In tale contesto va considerato che, se da un lato i tassi di fertilizzazione possono essere considerati indirettamente rappresentativi della qualità ovocitaria, non esistono tuttora criteri obiettivi ed universalmente condivisi, relativi alla definizione della qualità embrionaria. Nella pratica clinica, la selezione degli embrioni più adatti al trasferimento viene basata su valutazioni morfo-funzionali; in

particolare si considerano la velocità e la sincronia di segmentazione, la percentuale di cellule contrassegnate da singolo nucleo e l'entità di eventuali frammentazioni. Pertanto, sono stati recentemente sviluppati dei sistemi di *scoring* (Lan *et al.*, 2003) finalizzati ad ottimizzare la predittività dei criteri classici. Tali sistemi, come già illustrato precedentemente, sono stati recentemente integrati ed ulteriormente sviluppati presso il nostro laboratorio. L'obiettivo dello studio longitudinale osservazionale (*natural design*), svolto nel corso del dottorato di ricerca, è stato quello di valutare possibili relazioni tra produzione intrafollicolare di leptina e "qualità" sia ovocitaria, intesa come tassi di fertilizzazione, sia embrionaria, valutata sulla base del precedentemente testato sistema di *scoring*.

Dall'elaborazione dei dati ottenuti, si evince che la concentrazione intrafollicolare di leptina ha un alto valore predittivo positivo sulle percentuali di fertilizzazione. Al contrario, non è stata evidenziata alcuna correlazione significativa tra livelli intrafollicolari dell'ormone e punteggi attribuibili ai singoli embrioni. Tali risultati lasciano ipotizzare che la produzione di leptina possano riflettersi in un miglioramento della qualità ovocitaria. Altre variabili sembrano essere coinvolte nelle fasi successive di sviluppo embrionario. Tale evidenza presenta numerose potenzialità applicative soprattutto dopo la legge in vigore in Italia dal 10 Marzo 2004. Tale legge impedisce che vengano utilizzati più di 3 ovociti per paziente al fine di non ottenere un numero superiore a 3 embrioni da trasferire. I dati emersi dalla sperimentazione suggeriscono come la selezione dei 3 ovociti per paziente potrebbe essere basata non solo sulla valutazione di parametri morfologici,

ma anche su quella di variabili biochimiche intra-follicolari, quali le concentrazioni di leptina.

3.2 Materiali e Metodi

3.2.1 Identificazione di un sistema di *scoring* combinato per la selezione degli embrioni

Selezione pazienti

Nel tentativo di andare a determinare l'eventuale relazione esistente tra lo *scoring* di embrioni e zigoti e *outcome* nelle tecniche di fecondazione assistita, sono state analizzati in maniera retrospettiva 154 pazienti trattate presso il Centro di Sterilità di Coppia dell'Università "Federico II" di Napoli. Le pazienti da includere nello studio, sono state valutate prendendo in considerazione l'età, l'indice di massa corporea ed il protocollo di stimolazione. Pazienti che presentavano diagnosi di endometriosi o ovario micropolicistico sono state escluse, in quanto è probabile che tali patologie possano influire sulla qualità di ovociti ed embrioni. Tutte le pazienti sono state trattate con la tecnica ICSI (*intracytoplasmic sperm injection*) indipendentemente dalla qualità del seme, al fine di garantire una percentuale di fertilizzazione ottimale. Le pazienti sono state sottoposte ad induzione della superovulazione con protocollo standard, basato sulla soppressione dell'asse ipotalamo-ipofisi mediante l'antagonista del GnRH Triptorelina (Decapeptyl; Ipsen, Italia) seguita dalla stimolazione

ovarica con FSH ricombinante (Gonal-F, Serono, Italia). La stimolazione ovarica è stata eseguita di volta in volta in base al quadro clinico di ogni singola paziente. La crescita follicolare è stata monitorata mediante la valutazione sierica del β -estradiolo e mediante ecografia.

L'ovulazione è stata indotta utilizzando 10.000 UI di gonadotropina corionica umana (Profasi HP 5000) quando almeno due follicoli avevano un diametro superiore ai 18 mm e quando la concentrazione di β -estradiolo corrispondeva al numero di follicoli.

Il prelievo ovocitario è stato effettuato 34 ore dopo la somministrazione del Profasi.

Il complesso cumulo-ovocita è stato separato dal liquido follicolare e trasferito in gocce sott'olio di *Flushing medium*. Successivamente si è effettuata la decoronizzazione degli ovociti e la ICSI.

La qualità degli zigoti è stata eseguita 20-24 ore dopo la fertilizzazione. Gli embrioni sono stati poi successivamente posti in coltura per due giorni/ tre giorni e lo *score* eseguito ogni 24 ore.

Valutazione delle percentuali di fertilizzazione post-inseminazione in vitro:

Come nelle procedure standard di fecondazione in vitro, il controllo della fertilizzazione è stato eseguito tra le 20- 24 ore dopo l'inseminazione. La presenza di due pronuclei associata all'estrusione di due globuli polari è stata utilizzata come indice di un'avvenuta corretta fertilizzazione.

Ad ogni zigote è stato attribuito un punteggio considerando i seguenti parametri: la posizione dei pronuclei rispetto al citoplasma, la posizione e numero di nucleoli e la morfologia del citoplasma. Il massimo punteggio cumulativo ottenibile per ogni singolo embrione è stato stabilito come pari a 15. In dettaglio, sono stati valutati come massimo punteggio, pari a 5, la presenza di due pronuclei di eguale grandezza al centro del citoplasma, un numero uguale di nucleoli ed orientati verso il centro, la presenza della zona di citoplasma “flare” (una zona di citoplasma denso attorno ai nucleoli) ben visibile (Scott and Smith, 1998; Tesarik and Greco, 1999; Wittemer *et al.*,2000 ; Scott *et al.*, 2000).

Valutazione morfologica degli embrioni allo stadio di 2 (giorno +2) e 8 cellule (giorno +3)

Gli embrioni sono stati valutati morfologicamente considerando la sincronia di divisione, la presenza di uno o più nuclei nelle diverse cellule e la percentuale di frammenti. Anche in questo caso il punteggio massimo per singolo embrione è stato stabilito come pari a 15. Sono stati considerati come massimo punteggio, pari a 5, gli embrioni che presentavano rispettivamente una divisione sincrona, un nucleo per cellula e nessun frammento (Edwards *et al.*, 1980;1984; Cummins *et al.*, 1986; Puissant *et al.*, 1987; Visser and Furie 1993; Giorgetti *et al.*,1995; Ziebe *et al.*,1997; Hu *et al.*,1998; Desai *et al.*,2000; Hardarson *et al.*,2001 Van Royen *et al.*, 2001).

Il *weighted score* è stato calcolato mediante la seguente formula: (*score* dell’embrione x numero di blastomeri) x *score* dello zigote. Il rationale di tale formula si basa sul tentativo di bilanciare la

qualità dell'embrione, la percentuale di sviluppo intesa come numero di blastomeri presenti e la qualità dello zigote.

Tale formula porta ad un punteggio massimo di 900 punti per gli embrioni di "alta qualità" in seconda giornata e 1800 per gli embrioni di "alta qualità" in terza giornata.

Solitamente gli embrioni sono stati trasferiti in utero 40-64 ore dopo la microiniezione. Sono stati trasferiti gli embrioni che hanno presentato il massimo punteggio ottenuto addizionando quello degli embrioni e quello degli zigoti. Nel caso in cui due o più embrioni risultavano avere lo stesso punteggio cumulativo e nel caso in cui si sia resa necessaria una scelta, sono stati tenuti in maggior conto, progressivamente, il numero di blastomeri, la morfologia il giorno del transfer e la morfologia degli zigoti.

Gli embrioni trasferiti per singola paziente sono stati divisi, successivamente, in tre gruppi prendendo in considerazione il punteggio medio ottenuto. Nel gruppo 1 sono stati inseriti gli embrioni che avevano un punteggio medio superiore o uguale a 14. Nel gruppo 2 sono stati inseriti gli embrioni che presentavano un punteggio medio compreso tra 10 e 14. Nel terzo gruppo sono stati inseriti gli embrioni che presentavano un punteggio medio inferiore a 10. I tre gruppi di embrioni sono stati valutati anche considerando il numero di blastomeri presenti. Definendo come "sviluppo standard" di un embrione, la presenza di almeno 2 blastomeri in seconda giornata e di 5 in terza, gli embrioni del gruppo 1, che presentavano un valore medio di almeno 4 blastomeri in seconda giornata e 7 in terza, sono stati catalogati come a "sviluppo rapido". Gli embrioni del 2 gruppo, che presentavano da 2 a 3 blastomeri in seconda giornata e da 4 a 7 in

terza, sono stati catalogati come a “normale sviluppo”. Mentre gli embrioni del gruppo 3 che presentavano meno di 2 blastomeri in seconda giornata e meno di 4 in terza, sono stati classificati come a “lento sviluppo” .

Valutazione delle percentuali di gravidanza:

Le pazienti, 15 giorni dopo il transfer, hanno effettuato il dosaggio dei livelli sierici della frazione β della gonadotropina corionica (β -HCG). Valori di β -HCG > 60UI/l sono state considerati come valore positivo. Le percentuali di gravidanza sono state calcolate come numero di gravidanze sul numero totale di pazienti che hanno effettuato il transfer.

Valutazione percentuale di impianto:

La percentuale di impianto è stata calcolata mediante l'osservazione del battito fetale, ecograficamente, 8 settimane dopo l'istaurarsi della gravidanza.

3.2.2 Valutazione della relazione tra leptina intrafollicolare ed *outcome* nelle tecniche di fecondazione assistita

Selezione delle pazienti

Sono state esaminate pazienti sottoposte al loro primo ciclo di riproduzione assistita, ovvero a fecondazione *in vitro* e trasferimento di embrioni (FIVET) o iniezione intra-citoplasmatica dello spermatozoo (ICSI), presso il *Centro di Sterilità di Coppia*

dell'Università "Federico II" di Napoli. Sono state arruolate soltanto donne eumenorroiche (cicli ogni 24-35 giorni con una variabilità intra-individuale di ± 3 giorni) e con evidenza isteroscopica di una normale cavità uterina. Inoltre, al fine di ottenere una popolazione di studio adeguatamente omogenea anche sotto il profilo del trattamento farmacologico, si è ritenuto necessario selezionare esclusivamente pazienti in cui la iperstimolazione ovarica controllata (IOC) fosse stata eseguita con l'associazione di analoghi del GnRH (GnRH-a), secondo la modalità definita "protocollo lungo" ed FSH ricombinante (rFSH). Infine, sono state oggetto di studio esclusivamente donne con un "normale" profilo di risposta alla IOC (recupero di almeno 4 ovociti e riscontro di un picco estradiolico ematico >1500 pg/ml) e il cui partner maschile presentasse una concentrazione di spermatozoi > 5 mil/ml .

Le pazienti sono state sottoposte ad esami di laboratorio ed indagini strumentali finalizzati alla identificazione di eventuali condizioni patologiche di carattere metabolico, autoimmune, genetico e infettivo.

Sono stati adottati i seguenti criteri di esclusione:

- elevate concentrazioni basali (rilevate al 3° giorno di almeno un ciclo mestruale spontaneo nell'arco dei 3 mesi antecedenti l'arruolamento) di FSH (bFSH >10 UI/l);
- età > 36 anni;
- indice di massa corporea [BMI (*body mass index*) = peso (kg)/altezza (m²)] >25 ;

- evidenza biochimica e/o ultrasonografica (USG) di sindrome dell'ovaio policistico (PCOS);
- stadio III-IV dell'endometriosi, in accordo con la classificazione dell'*American Society for Reproductive Medicine* (precedentemente *American Fertility Society*) rivisitata nel 1985 (rAFS, 1985);
- disordini di carattere autoimmunitario, tiroideo o cromosomico;
- presenza di un unico ovaio.

Sono state escluse tutte quelle donne che pur rispettando i criteri di inclusione sopra esposti, avevano un partner maschile che presentasse una delle seguenti caratteristiche: età >40 anni, BMI > 28 kg/m², alterazioni autoimmuni, cromosomiche o metaboliche, evidenze di mutazioni della fibrosi cistica, microdelezioni del cromosoma Y (l'analisi delle regioni AZFa, AZFb, AZFc sono state richieste solo quando la concentrazione di spermatozoi risultava essere < 7 mil/ml come richiesto dalle linee guida del EMQN).

Procedure di riproduzione assistita e campionamento fluidi follicolari

Il *GnRH-a long protocol* è stato eseguito secondo le seguenti modalità (De Placido *et al.*, 2001): il GnRH-a *Triptorelina* (Decapeptyl 3.75 mg *depot*, Ipsen S.p.A., Milano, Italia) è stato somministrato al primo giorno del ciclo mestruale. Dopo 15 giorni, le pazienti sono state sottoposte a esami laboratoristici ed ecografici finalizzati a valutare lo stato di soppressione dell'asse ipotalamo-ipofisi-ovaio: in presenza di livelli sierici di estradiolo (E₂) ≤40

pg/ml e di un riscontro ecografico contrassegnato da uno spessore endometriale ≤ 5 mm e da assenza di follicoli ovarici, si è ritenuto che sussistessero le condizioni adatte ad intraprendere la fase di somministrazione di gonadotropine esogene. Quindi, una dose giornaliera di 150-300 UI di rFSH (Gonal-F, Serono Pharma, Roma, Italia) è stata somministrata per via sottocutanea, in base all'età, al BMI ed ai dati anamnestici di ciascuna delle pazienti. Al quinto giorno di stimolazione, sono stati misurati i livelli sierici di E_2 : in presenza di concentrazioni >160 pg/ml, la dose giornaliera di rFSH è stata ridotta di 75 UI. A partire dall'8° giorno si è proceduto, a giorni alterni e sino sono alla somministrazione della gonadotropina umana corionica (hCG), alla valutazione congiunta delle concentrazioni sieriche di E_2 e della crescita follicolare, al fine di personalizzare il dosaggio di rFSH. La dose ovulatoria (10.000 UI i.m.) di hCG (Profasi; Serono Pharma, Roma, Italia) è stata somministrata in presenza di almeno 3 follicoli di diametro medio superiore a 17 mm. Gli ovociti sono stati recuperati tramite aspirazione eco-guidata, per via trans-vaginale, dopo 35 ore dall'iniezione di hCG in condizioni standard, ovvero tra le 08.00 e le 10.00, dopo un minimo di 12 ed un massimo di 14 ore di digiuno. In tale contesto si è proceduto al prelievo ed al campionamento dei fluidi follicolari. Una corretta valutazione delle concentrazioni di leptina di un singolo follicolo richiede che il fluido in esso contenuto non sia contaminato da materiale proveniente da altri follicoli. Se consideriamo, nell'ambito del sistema di aspirazione a pressione negativa, il "volume morto" rappresentato dal lume dell'ago e dal tubo di connessione, comprendiamo come il primo materiale raccolto in ciascuna

provetta rappresenti il residuo, contenuto in tale volume, del fluido follicolare aspirato immediatamente prima. Pertanto, l'analisi dei livelli intrafollicolari della molecola può essere eseguita in maniera sufficientemente accurata (senza *biases* rilevanti) soltanto considerando il primo follicolo aspirato in ciascuna paziente. Inoltre, bisogna considerare come le probabilità di recupero dell'ovocita per ciascun follicolo siano, per motivazioni tecniche, di circa il 50-70%. Dal momento che la presente sperimentazione è stata finalizzata a valutare correlazioni tra livelli intrafollicolari di leptina e qualità ovocitaria, sono stati analizzati esclusivamente i fluidi follicolari in cui fosse stato rinvenuto l'ovocita. Prima di aspirarne il contenuto, si è sistematicamente provveduto a rilevare le dimensioni di ciascun follicolo. I fluidi follicolari sono stati immediatamente centrifugati per 5 minuti a 2000 rpm; si è proceduto quindi al recupero del soprannatante che è stato conservato in congelatore a -80°C per essere sottoposto, entro due mesi dal campionamento, a dosaggio immunoenzimatico.

Il singolo ovocita derivante, da ciascun follicolo esaminato per leptina, è stato quindi sottoposto alla procedura di fertilizzazione *in vitro* con procedure standard. A 16-18 ore dalla inseminazione si è provveduto alla verifica della fertilizzazione. Gli embrioni derivanti dagli ovociti fertilizzati sono stati sottoposti ai sistemi di *scoring* precedentemente illustrati, allo stadio di zigote ed al giorno +2 di coltura.

Tutte le pazienti hanno praticato la supplementazione della fase luteale con progesterone (Prontogest; AMSA s.r.l., Roma, Italia) 50 mg/*die* i.m., dal giorno del prelievo ovocitario.

Il *transfer* embrionario è stato effettuato dopo 48-72 ore dallo stesso.

Dosaggi ormonali

I livelli intrafollicolari di leptina sono stati misurati mediante metodica immunoenzimatica (*Human Leptin ELISA, American Laboratories Products Company, Windham, NH, USA*). La sensibilità del test (*detection limit*), definita come la più bassa concentrazione significativamente differente dallo 0 con una probabilità del 95%, è risultata pari a 0,07 ng/ml. I coefficienti di variazione (CV) intra- ed inter-saggio sono stati <8%. Le concentrazioni sieriche di E₂ ed LH sono state misurate usando tecniche di dosaggio enzimatico a fluorescenza (ELFA) (*Vidas estradiol II e Vidas LH, rispettivamente, BioMérieux sa, Lione, Francia*). La sensibilità del test (*detection limit*) è risultata pari a 0,04 pg/ml per l'E₂ e a 0,08 UI/l per l'LH. I CV intra- ed inter-saggio sono risultati <7% per entrambi gli ormoni. L'FSH sierico è stato determinato con metodica immunofluorimetrica (*Amerlite FSH assay, Amersham International plc, Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK*). Il *detection limit* è risultato pari a 0,4 UI/l. I CV intra- ed inter-saggio sono risultati <8%.

Analisi statistica

I risultati sono stati riportati come media \pm SD. I dati sono stati analizzati con Statistica per Windows, versione 5.1 (*Stat. Soft. Inc., Tulsa, Usa*) e SPSS 11.5 (*SPSS Inc., Chicago, USA*). L'analisi di varianza (ANOVA) a una via ed il Mann-Whitney *U*-test sono stati

impiegati per valutare le differenze tra gruppi relative a variabili continue, con distribuzione normale e non, rispettivamente. La relazione tra variabili continue è stata valutata con l'elaborazione del coefficiente di correlazione di Pearson, mediante l'esecuzione di analisi di regressione lineare. Modelli di regressione multipla sono stati utilizzati per determinare l'associazione tra le variabili multiple continue e le variabili continue dipendenti. La *Receiving operating characteristics curve* (ROC) è stata elaborata al fine di identificare, per variabili continue, i valori di *cut-off* contrassegnati da maggiore predittività nei confronti di singoli parametri di *outcome*.

Un valore di $P < 0,05$ è stato considerato statisticamente significativo.

3.3 Principali risultati

3.3.1 Relazione tra lo score degli zigoti e degli embrioni

Il sistema di *scoring* messo a punto nella prima fase del dottorato di ricerca è stato utilizzato per analizzare la relazione tra la morfologia degli zigoti e quella degli embrioni. Si è, inoltre, tentato di valutare se lo *score* combinato o *weighted score* potesse essere predittivo dell'*outcome* dei cicli di fecondazione assistita, in termini di percentuale di gravidanza e tassi d'impianto. La formazione degli zigoti *in vitro* e il successivo sviluppo in embrioni è stata eseguita, ad intervalli regolari, fino al giorno 2

(40-41 h) o 3 (64-65 h) dopo il recupero degli ovociti. La valutazione morfologica giornaliera degli embrioni ha rivelato che lo *score* embrionario risulta essere altamente variabile e non è stata riscontrata nessuna correlazione con lo *score* degli zigoti corrispondenti. Infatti, il 18% (211/1171) degli zigoti “di alta qualità” con uno *score* >14 ha formato embrioni di “bassa qualità” con uno *score* <10 nel giorno del transfer. In eguale modo il 15% (176/1171) degli zigoti con uno *score* < 10 ha formato embrioni con uno *score* >14.

Inoltre è risultato evidente che lo *score* degli embrioni frequentemente cambia nei giorni di coltura quando è necessario lo slittamento del transfer in terza giornata piuttosto che in seconda.

Mediante una retta di regressione lineare, si è potuto valutare l'esistenza di una correlazione tra gli zigoti e gli embrioni in seconda ed in terza giornata di coltura, confermando i dati riportati in letteratura (Ludwing ed al., 2000). Tuttavia non essendo tale relazione perfetta, è facile concludere che lo *score* degli zigoti non può essere usato per stimare il successivo *score* degli embrioni.

3.3.2 Il Transfer di zigoti o di embrioni ad alta qualità incrementa le percentuali di gravidanza in IVF?

Nello studio sono stati inclusi 154 cicli di fecondazione assistita per un totale di 551 embrioni trasferiti in seconda o in terza giornata dopo aver determinato lo *score* degli zigoti e degli embrioni. Tali valori sono stati analizzati in maniera retrospettiva.

Negli anni precedenti, non prendendo in considerazione lo *score* degli zigoti nella selezione degli embrioni da trasferire, le

percentuali di gravidanza e d'impianto, presso il nostro centro, sono state rispettivamente del 37.4 % e del 16.5% (182 pazienti trattate da gennaio 1998 a gennaio 1999, età media 33.2 ± 8.4 , media embrioni trasferiti 3.5 ± 1.3). Tali valori sono stati considerati come valore di riferimento per permettere di valutare l'effettivo livello di accuratezza del nuovo sistema di *scoring* messo appunto in questo studio. Quando lo *score* degli zigoti è stato considerato in modo indipendente, è stata trovata una bassa correlazione tra qualità e valore predittivo. Gli embrioni derivanti dal gruppo 1, una volta trasferiti, hanno dato 25/59 gravidanze (42.4%) con una percentuale d'impianto 13.2% (media 3.4 ± 1.1 embrioni trasferiti). Gli embrioni derivati dal gruppo 2 hanno dato 40/89 gravidanze (44.9%) con una percentuale d'impianto simile a quella ottenuta per il gruppo 1 (media 3.5 ± 1.6 embrioni trasferiti. Figura3 Tabella II). Il gruppo 3 ha dato risultati deludenti con una sola gravidanza (percentuale di gravidanza 16.7%, percentuale d'impianto 7.1%, 3.4 ± 0.5 embrioni trasferiti).

Risultati simili sono stati ottenuti andando a considerare, questa volta, lo *score* degli embrioni in maniera indipendente; è stata trovata, infatti, una bassa correlazione tra *score* e valore predittivo. Quando sono stati trasferiti gli embrioni del gruppo 1, 19/48 pazienti hanno riportato gravidanze (39.6%) con una percentuale d'impianto di 14.9% (3.6 ± 0.7 embrioni trasferiti). Il transfer degli embrioni del gruppo 2 ha ottenuto come risultato 46/88 gravidanze (52.3%) ed una percentuale d'impianto di 15.4% (3.3 ± 0.8 embrioni trasferiti). Anche in questo caso il gruppo 3 ha ottenuto una sola gravidanza (percentuale di gravidanza 5.5%, percentuale d'impianto 4%; 3.2 ± 0.5 embrioni trasferiti). In seguito all'analisi

dei risultati ottenuti, possiamo giungere alla conclusione che la selezione degli zigoti e degli embrioni da trasferire, basandosi solo sulla morfologia degli stessi, presi singolarmente, ha un basso valore predittivo nei cicli di fecondazione *in vitro*. I dati riportati fino ad ora, in ogni caso, non escludono l'eventualità che il sistema di valutazione degli embrioni, combinato con quello degli zigoti, possa avere un maggiore valore predittivo di quelli che si basano su una singola valutazione (Scott *et al.*;2000). Si è quindi deciso di andare ad indagare tale ipotesi andando a valutare, in maniera retrospettiva, lo *score* cumulativo di zigoti ed embrioni trasferiti. In questo caso, il trasferimento del gruppo 1 ha portato a 15/38 gravidanze (39.5%) con una percentuale di impianto di 13.0% (3.5 ± 1.1 embrioni trasferiti).

Nel gruppo 2 sono state ottenute 50/ 103 gravidanze (48.5%) con una percentuale d'impianto di 15.5% (3.4 ± 0.4 embrioni trasferiti). Nel caso del gruppo 3, è stata ottenuta una sola gravidanza (7.7%) con una percentuale d'impianto di 5.3% (3.6 ± 1.0 embrioni trasferiti). Nel loro insieme, tali dati suggeriscono che l'analisi morfologica, sia dei singoli embrioni e zigoti sia quella combinata degli stessi, quando viene considerata da sola, è relativamente non accurata nel predire le percentuali di successo.

Nelle pazienti prese in esame, gli embrioni non sono mai stati trasferiti allo stadio di zigote, ed è stato valutato sempre sia lo *score* degli zigoti che degli embrioni.

Per andare a valutare se la qualità dello zigote potesse avere valore predittivo nelle tecniche di fecondazione assistita, sono stati analizzati gli embrioni derivanti da un determinato gruppo di zigoti.

Andando ad esaminare gli embrioni anche di alta qualità derivanti da zigoti di bassa qualità, così come previsto, solo una paziente ha riportato una gravidanza; ciò suggerisce che gli zigoti di bassa qualità sono predittivi di insuccesso, anche quando la qualità degli embrioni è elevata. Nel caso contrario, quando gli embrioni derivavano da zigoti di alta qualità sono state ottenute 18 gravidanze (5,5%) e lo *score* degli zigoti in queste pazienti era di 31.2 ± 0.8 (76 embrioni). Anche in questo caso, lo *score* degli zigoti di buona qualità non ha avuto un valore predittivo.

3.3.3 Il numero di blastomeri degli embrioni insieme alla analisi morfologica può essere predittiva?

I risultati ottenuti indicano che poche informazioni predittive sui tassi di impianto e sulle percentuali di gravidanza possono essere ottenute dall'analisi morfologica semplice degli zigoti e degli embrioni umani.

Basandosi su dati riportati in letteratura (Edwards et al., 1984; Cummins ed al., 1986) si è cercato di valutare anche l'influenza che il tasso di sviluppo, inteso come numero di blastomeri nel giorno di osservazione, degli embrioni coltivati *in vitro* potesse avere sulle percentuali di gravidanza.

Le gravidanze, totali riportate nel gruppo di pazienti incluse nello studio, sono state ottenute da embrioni trasferiti in seconda giornata (40-41 ore dopo l'ICSI) che presentavano 3.44 ± 1.25 blastomeri (117 embrioni in 32 pazienti) mentre gli embrioni (183 embrioni in 55 pazienti) che non hanno dato vita a gravidanze presentano 2.96 ± 1.20 blastomeri (t-test a due code $p=0.001$). Il

numero di blastomeri degli embrioni che hanno dato gravidanze, nei transfer in terza giornata (60-61 ore dopo l'ICSI), è notevolmente più alto del numero di blastomeri degli embrioni che non hanno dato gravidanze (6.04 ± 1.57 blastomeri; 128 embrioni; di 34 pazienti contro 5.06 ± 2.07 blastomeri in 123 embrioni di 33 pazienti; t-test a due code $p < 0.001$). Gli embrioni da trasferire sono stati selezionati tenendo conto sia del numero di blastomeri sia dell'analisi morfologica. Calcolando il *weighted score* per i gruppi di embrioni trasferiti ed andando a valutare le percentuali di gravidanza, è stata invece trovata una forte correlazione tra i due, confermando quanto riportato da precedenti autori (Racowsky *et al.*, 2000; Scott *et al.*, 2000).

Il *weighted score* è stato anche calcolato in base anche al giorno di coltura. Il *weighted score* determinato in seconda giornata è caratterizzato da una bassa correlazione con la percentuale di gravidanza e la percentuale d'impianto. Il gruppo di embrioni indicato come 1 ha riportato 17/34 gravidanze (50%) con una percentuale di impianto pari a 11.9% (media 3.4 ± 0.8 embrioni trasferiti). Il gruppo 2 ha riportato 7/21 gravidanze (33.3%) con una percentuale d'impianto (13.3%) non significativamente differente dal gruppo 1 (3.1 ± 0.4 embrioni trasferiti). Il gruppo 3 ha riportato 6/24 gravidanze (25%) con una percentuale d'impianto di 10.4% (3.5 ± 0.5 embrioni trasferiti figura 3), risultato che non è significativamente più basso di quello ottenuto per il gruppo 2.

In contrasto il *weighted score* calcolato in terza giornata è caratterizzato da una forte correlazione con la percentuale d'impianto e percentuale di gravidanza. Gli embrioni del gruppo

1 in terza giornata hanno dato vita a 20/28 gravidanze (71.4%) con una percentuale d'impianto di 24.5% (3.5 ± 0.8 embrioni trasferiti). Il gruppo 2 ha riportato 14/31 gravidanze (45.2%) ed una percentuale d'impianto di 13.4% (3.5 ± 0.5 embrioni trasferiti). Il gruppo 3 ha riportato solo 2 gravidanze in 16 casi (percentuale di gravidanza di 12.5 e d'impianto 4.2%; 3.7 ± 0.9 embrioni trasferiti).

Tali dati suggeriscono che lo *score* combinato, che tiene conto sia del numero di blastomeri sia dello *score* degli embrioni e degli zigoti, ha un alto valore predittivo sull'*outcome* nei cicli di fecondazione assistita.

Tuttavia bisogna in ogni caso valutare che, in alcuni casi, alle pazienti sono stati trasferiti sia embrioni di alta qualità che embrioni di bassa qualità. Per andare a valutare l'impatto che il trasferimento degli embrioni di alta qualità può aver avuto sulle percentuali di gravidanza, 107 pazienti sono state divise in gruppi, in base al numero di embrioni di alta qualità presenti. Quando non erano presenti embrioni di alta qualità, il gruppo è stato indicato come gruppo 0, quando tutti e 4 gli embrioni trasferiti erano di alta qualità il gruppo è stato indicato come gruppo 4.

Nel gruppo 0 sono state ottenute 8 gravidanze su un totale di 24 pazienti (33.3%) ma la percentuale d'impianto è risultata molto bassa (9.4%). Nel gruppo 4, invece, sono state ottenute 7 gravidanze in 8 pazienti (percentuale di gravidanza del 75%) con una percentuale d'impianto del 28.71%. Tali dati dimostrano che gli embrioni definiti come di alta qualità mediante *weighted score* presentano una probabilità d'impianto superiore a quelli definiti come di bassa qualità.

Un altro parametro che può in qualche modo influenzare il concepimento nelle tecniche di fecondazione assistita è l'età materna. I dati ottenuti nel nostro studio confermano quanto noto da diverso tempo. Infatti, le pazienti con età <30 anni hanno riportato una percentuale di gravidanza > 60%. Quando l'età materna era >40 anni, la percentuale di gravidanza riportata è scesa al di sotto del 20%. Confrontando l'età materna e lo *score* degli embrioni, è evidente che l'età materna non influisce direttamente su di esso, lasciando supporre che la riduzione delle percentuali di gravidanza e di impianto sia dovuta ad altri fattori, quali ad esempio le condizioni dell'utero.

3.3.4 Correlazione tra i livelli intrafollicolari di leptina e BMI

Per determinare un eventuale correlazione tra i livelli intrafollicolari di leptina e percentuali di gravidanza, sono state arruolate inizialmente 40 pazienti; tuttavia le valutazioni conclusive sono state eseguite nelle 37 donne in cui è stato possibile eseguire un dosaggio dei livelli di leptina in almeno un follicolo contrassegnato dalla presenza di un ovocita maturo (metafase II divisione meiotica). Due delle 37 coppie sono state scartate in quanto, il giorno del prelievo ovocitario, la concentrazione di liquido seminale è risultata inferiore a 5 mil/ml. In 12 delle 35 pazienti di partenza è stato possibile reclutare un ovocita per ovaio. Di questo gruppo, solo in 3 tutti è stato possibile riscontrare una corretta avvenuta fertilizzazione in tutti e due gli ovociti iniettati (presenza di due pronuclei). In due pazienti nessuno dei due ovociti è andato incontro a fertilizzazione mentre

in 7 solo in un ovocita dei due iniziali. In conclusione sono stati utilizzati per lo studio 47 ovociti di partenza. Al fine di evidenziare eventuali relazioni tra livelli di leptina e qualità ovocitaria, si è inizialmente suddivisa la popolazione di studio in due sottogruppi: nel gruppo A sono state inclusi 25 ovociti (provenienti da 22 pazienti) con evidenza di fertilizzazione. Gli ovociti (provenienti da 20 pazienti) con evidenza di non avvenuta fertilizzazione hanno costituito il gruppo B ($n = 22$). Le pazienti che presentavano un solo ovocita fertilizzato sono state incluse in tutti e due i gruppi. Le caratteristiche demografiche, antropometriche ed ormonali, nonché le indicazioni per la tecnica di PMA, sono risultati sovrapponibili nei due gruppi di ovociti corrispondenti ai due gruppi di pazienti. E' possibile individuare una significativa correlazione positiva tra i livelli sierici di leptina e il BMI in quelle pazienti che hanno presentato almeno un ovocita fertilizzato ($r = 0.4$, $p < 0.05$). In contrasto, quando i livelli sierici di leptina vengono confrontati con il BMI, tale correlazione si perde sia considerando il gruppo di pazienti nel loro insieme sia separatamente ([FF leptina contro BMI in tutte le pazienti: $r = -0.1$; $p = 0.5$; FF leptina contro BMI gruppo A: $r = 0.3$, $p = 0.2$; FF leptina contro BMI gruppo B: $r = -0.3$, $p = 0.2$).

3.3.5 Correlazione tra livelli intrafollicolari di leptina e fertilizzazione ovocitaria

I livelli medi di leptina intrafollicolare sono risultati significativamente più elevati nel gruppo A rispetto al gruppo B (26.0 ± 6.1 versus 15.3 ± 10.6 ng/ml, $p < 0.01$). Benché non sia

stata evidenziata una correlazione tra i livelli di leptina intrafollicolari e BMI nella popolazione totale di pazienti, la differenza della concentrazione media di leptina intrafollicolare nei due gruppi è stata in ogni caso controllata secondo questi parametri: il rapporto tra la concentrazione di leptina e BMI risulta significativamente più alta nel gruppo A (1.2 ± 0.3 contro 0.7 ± 0.5 , $p < 0.05$). Al contrario, le dimensioni follicolari medie sono risultate sovrapponibili tra i due gruppi (gruppo A 21.4 ± 3.4 mm; gruppo B 21.0 ± 5.1 mm, $p = 0.5$). Analogamente, nell'intera popolazione di studio, non è stata evidenziata alcuna relazione significativa tra livelli di leptina e dimensioni medie follicolari ($r = 0.2$; $p = 0.1$).

Quando viene creato un modello di regressione logistico, con una procedura "stepwise" al fine di individuare la variabile con maggiore valore predittivo sulla fertilizzazione degli ovociti, tale risulta essere la concentrazione intrafollicolare di leptina (Wald = 7.3, $p < 0.001$). Il rapporto concentrazione di leptina intrafollicolare/BMI è stato escluso da questa analisi, a causa di una evidente colinearità con la concentrazione di leptina stessa.

Al fine di individuare un livello di cut-off della concentrazione intracitoplasmatica di leptina che permettesse di discriminare, nel corso di una tecnica di fecondazione assistita, gli ovociti con un buon potenziale di successo da quelli a cattiva prognosi, abbiamo creato una curva ROC. L'area al di sotto della curva (AUC) è di 0.81 e il valore di cut-off di 20.25 ng/mL. Sulla base di tale valore, sono stati identificati due ulteriori sottogruppi di pazienti/follicoli: il gruppo 1 (27 ovociti da 21 pazienti), costituito da soggetti con

livelli intrafollicolari di leptina più elevati (>20.25 pg/ml) ed il gruppo 2 (20 ovociti da 19 pazienti), composto da individui con concentrazioni di leptina ≤ 20.25 pg/ml. Delle 12 pazienti per cui è stato possibile recuperare due ovociti, uno per ovaio, 5 hanno dato vita a risultati discordanti, avendo un ovocita con livelli superiori al cut-off ed uno livelli inferiori. Come in precedenza, le pazienti sono state incluse in tutti e due i gruppi. Anche in questo caso le caratteristiche di base sono risultate simili nei due sottogruppi (Tabella 3). I tassi di fertilizzazione si sono rivelati significativamente più elevati nelle pazienti del gruppo 1 rispetto al gruppo 2 (85.7% contro 16.7%, $p = 0,001$). Le dimensioni follicolari medie si sono rivelate simili nei due gruppi (21.7 ± 5.3 contro 23.1 ± 3.8 ; $p = 0,08$)

3.3.6 Livelli intrafollicolari di leptina e qualità embrionaria

Nell'ambito della popolazione di studio, è stato possibile monitorare l'evoluzione *in vitro* di un totale di 15 ovociti fertilizzati. Sono state quindi valutate le possibili relazioni tra le concentrazioni di leptina rilevate nei follicoli di origine e lo *score* attribuito agli embrioni allo stadio di zigote e a 48 ore (giorno +2 rispetto alla inseminazione) di coltura *in vitro*. In entrambi i casi non sono state evidenziate correlazioni significative (analisi di regressione lineare leptina – *score* zigote: $r = -0.01$; $p = 0.6$; analisi di regressione lineare leptina – *score* embrione giorno +2: $r = 0,1$; $p = 0,6$). Analogamente, non si sono osservate correlazioni significative né tra livelli di leptina e numero di blastomeri al giorno +2 ($r = 0,4$; $p = 0,07$), né tantomeno tra concentrazioni della

molecola e punteggio embrionario cumulativo (*weighted score*) ($r = 0,3; p = 0,25$).

Capitolo IV Pubblicazione I

High outcome predictability after IVF using a combined score for zygote and embryo morphology and growth rate

Giuseppe De Placido¹, Martin Wilding^{1,2}, Ida Strina¹, Erminia Alviggi¹, Carlo Alviggi¹, Antonio Mollo¹, Maria Teresa Varicchio¹, Achille Tolino¹, Cristina Schiattarella¹ and Brian Dale²

Area Funzionale di Medicina della Riproduzione, Università degli Studi `Federico II', Naples and ² Centre for Reproductive Biology, Clinica Villa del Sole, Naples, Italy

Human Reproduction, Vol. 17, No. 9, 2402-2409, September 2002

The current trend in human IVF protocols is to reduce the number of embryos transferred into the uterus in order to eliminate multiple pregnancies while maintaining singleton pregnancy rates at acceptable levels (Coetsier and Dhont, 1998; Pennings, 2000). Ways of achieving this lie in increasing the reliability of embryo analysis and culture systems. Techniques such as blastocyst transfer have been of assistance (Gardner *et al.*, 1998; Gardner and Schoolcraft, 1999), although blastocyst culture still requires relatively specialized culture systems and is affected by the loss of a percentage of embryos cultured *in vitro* (Langley *et al.*, 2001). The culture of embryos to day 2 or 3 after fertilization, in contrast to blastocyst culture, is relatively simple. A reliable method of analysis of these embryos could then be highly beneficial in IVF protocols. The selection of human embryos for replacement into the uterus during cycles of IVF depends currently on the examination of embryo morphology on day 2 or 3 post-fertilization (Edwards *et al.*, 1980, 1984; Cummins *et al.*, 1986; Puissant *et al.*, 1987; Visser and Fourie, 1993; Giorgetti *et al.*, 1995; Ziebe *et al.*, 1997; Hu *et al.*, 1998*). However, extended

culture of this material has been shown to be unnecessary in many cases (Scott and Smith, 1998; Dale *et al.*, 1999; Tesarik and Greco, 1999; Tesarik *et al.*, 2000; Wittemer *et al.*, 2000). Recent reports have suggested that an examination of the morphology of human zygotes can predict the outcome of IVF (Scott and Smith, 1998; Tesarik and Greco, 1999; Scott *et al.*, 2000; Tesarik *et al.*, 2000). For example, a pregnancy rate of 49.5% was achieved after the transfer of top quality zygotes, as opposed to 28% after the transfer of medium quality material (Scott *et al.*, 2000). Furthermore, a specific pattern of nucleolar alignment has been suggested to indicate high quality, as demonstrated by a pregnancy rate of 50% for zygotes with aligned nucleoli versus a pregnancy rate of only 9% in cases where this was absent (Tesarik and Greco, 1999). These authors therefore suggested that pronuclear alignment, morphology of nucleoli and presence of the 'cytoplasmic flare' was highly indicative of implantation potential after IVF or ICSI. Although the transfer of human zygotes is successful (Ahuja *et al.*, 1985; Quinn *et al.*, 1990; Smith *et al.*, 1993; Scott and Smith, 1998), the technique is limited in that embryo quality cannot be examined and therefore considered in the selection of material for transfer. Despite this negative factor, the transfer of human zygotes in general gives pregnancy rates comparable to the transfer of human preimplantation embryos (Scott and Smith, 1998; Dale *et al.*, 2002). These data suggest that the morphological analysis of zygotes can be used as a tool to predict further embryo development and the potential for implantation. Although a correlation between zygote and embryo morphology has been shown to exist (Ludwig *et al.*, 2000; Scott *et al.*, 2000), the correlation is not perfect, suggesting that some degree of predictability is lost when using either zygote or embryo morphology alone (also see Rjinders and Jansen, 1998). Furthermore, the developmental rate of embryos has been suggested to be indicative of implantation potential (Edwards *et al.*, 1984; Cummins *et al.*, 1986; Racowsky *et al.*, 2000). One group (Racowsky *et al.* 2000) for example showed that a pregnancy rate of 33% where no 8-cell embryos were observed on day 3 rose to 51% in cases where patients had three or more 8-cell embryos

on this day. In the present study, the utility of individual scoring systems, or a combination of the systems, was examined for predicting IVF outcome.

Materials and methods

Patients

Patients attending the IVF clinic for IVF protocols were prepared using standard controlled ovarian stimulation protocols including down-regulation of the pituitary gland with a GnRH agonist (Decapeptyl; Ipsen, Italy) followed by ovarian stimulation with exogenous FSH (Gonal-F; Serono, Italy). A single member of the medical staff co-ordinated all stimulation protocols, thereby ensuring standardization of the stimulation protocols. Oocyte retrieval was performed 36 h after the administration of 10 000 UI hCG when two or three follicles of 18–20 mm diameter were observed by ultrasound examination, and blood 17 β -estradiol levels reached 150–200 pg/ml per follicle over 18 mm diameter. As the Italian State finances the IVF centre in Naples, patients are not required to pay for IVF treatment, and oocytes are routinely treated by ICSI to guarantee optimal fertilization rates. A single team of biologists co-ordinated all procedures, thereby ensuring that both culture protocols and embryo assessment were standardized. Oocytes were processed for ICSI using commercial IVF medium (Medicult, Copenhagen, Denmark) pre-equilibrated to 37°C and 5% CO₂. Zygote quality was scored 16–20 h after ICSI. Embryo quality was assessed at 40–41 h after insemination on day 2, and at 64–65 h after insemination on day 3. Embryos were transferred on the second or third day after oocyte retrieval. Embryos were selected for transfer by the following criteria in order of importance: number of blastomeres and embryo morphological score on day of transfer and then zygote score. The establishment of a pregnancy was considered as a positive β -hCG test >60 IU/l at 14 days after embryo transfer. The implantation rate was calculated by the observation of fetal heart-beats after ultrasound analysis, 8 weeks after the establishment of pregnancy.

Study design

The zygote scoring system was developed based on previously published methods (Figure 1A). Briefly, three parameters were considered. First, the position of the pronuclei in relation to the cytoplasm was analysed, considering two opposed pronuclei of equal size in the centre of the cytoplasm to indicate optimal morphology (Sadowy *et al.*, 1998; Scott and Smith, 1998; Tesarik and Greco, 1999; Scott *et al.*, 2000; Wittemer *et al.*, 2000) [Figure 1A(i) and Table I]. Second, the morphology and orientation of nucleoli was scored, equal numbers of nucleoli opposed in the zygote centre considered top quality (Scott and Smith, 1998*; Tesarik and Greco, 1999*; Scott *et al.*, 2000* ; Wittemer *et al.*, 2000*) [Figure 1A(ii) and Table I]. Third, the presence of a 'cytoplasmic flare' (a dense area of cytoplasm aggregated around the pronuclei) was considered indicative of high implantation potential and therefore awarded a score of 5 points (Scott and Smith, 1998; Tesarik and Greco, 1999; Wittemer *et al.*, 2000; Scott *et al.*, 2000) [Figure 1A(iii) and Table I]. In addition, a system for scoring embryos was developed (Figure 1B). Again, three parameters were scored. First, blastomere volume and synchrony of cleavage was assessed (Edwards *et al.*, 1980, 1984; Cummins *et al.*, 1986; Puissant *et al.*, 1987; Visser and Fourie, 1993; Giorgetti *et al.*, 1995; Ziebe *et al.*, 1997; Hu *et al.*, 1998; Desai *et al.*, 2000; Hardarson *et al.*, 2001; Van Royen *et al.*, 2001) [Figure 1B(iv) and Table I]. Second, the observation of a single nucleus within individual blastomeres was considered top quality, and the level of multinucleation indicators of progressively poorer quality (Edwards *et al.*, 1980, 1984; Cummins *et al.*, 1986; Puissant *et al.*, 1987; Visser and Fourie, 1993; Giorgetti *et al.*, 1995; Ziebe *et al.*, 1997; Hu *et al.*, 1998; Desai *et al.*, 2000; Hardarson *et al.*, 2001; Van Royen *et al.*, 2001) [Figure 1B(v) and Table I]. Third, the extent of fragmentation was considered (Alikani *et al.*, 1999, 2000) [Figure 1B(vi) and Table I]. Basically, embryos with blastomeres of equivalent size, a single nucleus per blastomere and no fragmentation were considered top quality and scored higher than embryos containing one or more defects (Table I). The maximum score obtainable was 15 for zygotes and 15 for each day of embryo culture (Table I). Cohorts of

embryos selected for transfer were categorized into three groups dependent on the mean quality of the cohort. Basically, a group of top quality material (group 1) was permitted a single defect, i.e. a mean score of ≥ 14 points. The medium-scoring group (group 2) included material with two or more defects considered minor in the scoring system, i.e. a mean score of 10–14 points. Group 3 or low-scoring embryos contained defects considered severe (resulting in a mean score of < 10 points). Where non-morphological factors were considered (i.e. growth rate), embryos were separated according to day of transfer (i.e. day 2 or 3) and the cohort selected for transfer again divided into three groups. Defining the standard growth rate as two blastomeres on day 2 and five blastomeres on day 3, group 1 embryos were considered advanced for the day of culture (i.e. mean of over four blastomeres on day 2, or seven blastomeres on day 3). Group 2 embryos were considered normally developing (mean of two to three blastomeres on day 2 or four to seven on day 3), and group 3 embryos slow developing (mean of less than two blastomeres on day 2, or less than four on day 3). Weighted scores were calculated as growth rate multiplied by morphology and the obtained value weighted by zygote score. The scoring system was weighted by the equation:

$$\text{Score} = (\text{embryo score} \times \text{number blastomeres}) \times \text{zygote score}$$

The rationale behind this system was to balance 'embryo quality (i.e. morphology with growth rate) and 'zygote quality' (i.e. morphology). This scoring system produces a score of $(15 \times 4) \times 15 = 900$ for a top quality embryo on day 2 and $(15 \times 8) \times 15 = 1800$ points for a top quality day 3 embryo (see Table I). The rationale was to facilitate the separation of embryos with similar morphologies and ease the selection procedure for transfer.

The study was a retrospective analysis of the morphological assessment of 154 patients treated in the Polyclinic of Naples between January and December 2000. Patients were unselected for age, body mass index and treatment protocol. Patients diagnosed for endometriosis or polycystic ovarian syndrome

were excluded from the study due to the possible influence of these factors on oogenesis or endometrial receptivity. As stated above, all patients were treated by ICSI without reference to sperm quality in order to ensure the comparability of the assessments.

Statistical analysis

All data were plotted as mean \pm SD unless stated. All plots and statistical analyses were calculated using the Sigma Plot and Sigma Stat software packages (SPSS; Erkrath, Germany). Regression lines were calculated by the method of least squares, and the significance of the regression lines was tested with the Pearson product-moment test. The *z*-test with Yates' correction was used to test the significance of proportions where necessary.

Relationship between zygote and embryo score

The scoring system outlined in the present study was used to examine the relationship between zygote and embryo morphology, and to test whether the scores could be used accurately to predict the outcome of cycles of IVF. The formation of human zygotes *in vitro* and the further development of this material into embryos was followed through to day 2 (40–41 h) or 3 (64–65 h) after oocyte retrieval. The daily scores of individual embryos was highly variable (Figure 2). It was noted that scores obtained for zygotes did not always correlate with embryo development (Figure 2). In fact, only 18% (211/1171) of top quality zygotes obtaining a score >14 formed low-quality embryos with a score <10 on the day of transfer. In contrast, zygotes achieving a score <10 could also become a high-quality embryo. In addition, 15% (176/1171) of all zygotes with a score <10 (suggesting severe defects; see Figure 1A) formed embryos with a score >14. Furthermore, scores for embryos often varied significantly between days 2 and 3 when extended culture was required (Figure 2A). A test was conducted (by plotting a regression line) to identify any correlation between morphological score on day 1 and the score from the same embryos on day 2 or 3. The data obtained

confirmed the previously described correlation between zygote and embryo scores (Ludwig *et al.*, 2000), whether this score was recorded on day 2 or 3 after fertilization (Figure 2B). The correlation was not perfect however, suggesting that the zygote score can be used merely to estimate embryo score.

Does transfer of a 'top quality' zygote or embryo increase chances of success after IVF?

The data obtained from 154 cycles of IVF where a total of 551 embryos was replaced on day 2 (40–41 h) or day 3 (64–65 h) after scoring zygote or embryo quality on each day of culture were analysed retrospectively. In previous IVF cycles (where zygote morphology was not considered), a pregnancy rate of 37.4% and implantation rate of 16.5% were achieved (among 182 patients treated between January 1998 and January 1999, with mean maternal age 33.2 ± 8.4 years and mean of 3.5 ± 1.3 embryos transferred). These values were used as baseline to permit accurate evaluation of the scoring system presented in the present data. When zygote scores were considered alone, minimal correlation was observed between quality and predictability. Embryos derived from group 1 zygotes achieved 25/59 pregnancies (42.4%), with an implantation rate of 13.2% (mean 3.4 ± 1.1 embryos transferred; Figure 3+, Table II+). However, embryos derived from group 2 zygotes resulted in 40/89 pregnancies (44.9%) with an implantation rate similar (15.7%) to that in group 1 zygotes (3.5 ± 1.6 embryos transferred; Figure 3, Table II). Group 3 zygotes produced poor results, with only one patient achieving pregnancy (pregnancy rate 16.7%, implantation rate 7.1%, 3.4 ± 0.5 embryos transferred; Figure 3+, Table II).

A further test was conducted to determine whether embryo morphology alone was predictive of IVF outcome; this was achieved by assessing the embryo morphology score obtained on the day of transfer against pregnancy and implantation rates. In the present analysis, a poor correlation between cohort score and predictability was again observed. When a cohort of group 1 embryos was transferred, 19/48 patients achieved pregnancy (39.6%), with an

implantation rate of 14.9% (3.6 ± 0.7 embryos transferred; Figure 3, Table II). The transfer of group 2 embryos resulted in 46/88 pregnancies (52.3%) and an implantation rate of 15.4% (3.3 ± 0.8 embryos transferred; Figure 3, Table II). Group 3 embryos again produced poor results, with only one pregnancy was achieved among 18 patients (pregnancy rate 5.5%, implantation rate 4%, 3.2 ± 0.5 embryos transferred; Figure 3, Table II).

The above data suggest that the selection of human zygotes or embryos for transfer on the basis of morphology alone is relatively unpredictable during cycles of IVF. However, these data do not rule out the possibility that such selection of material might be more predictive of success than by using a single scoring system alone (Scott *et al.*, 2000). This hypothesis was re-tested retrospectively by analysing the cumulative zygote and embryo score to determine whether the transfer of morphologically 'perfect' cohorts of human embryos might be more indicative of success after IVF. Again, only minimal correlation was observed. The transfer of cohorts of embryos with a group 1 cumulative score resulted in 15/38 (39.5%) pregnancies and an implantation rate of 13.0% (3.5 ± 1.0 embryos transferred; Figure 3, Table II). Embryos with a group 2 cumulative score resulted in 50/103 pregnancies (48.5%) with an implantation rate of 15.5% (3.4 ± 0.4 embryos transferred; Figure 3, Table II). Group 3 cohorts of embryos again produced 1/13 pregnancies (7.7%) with an implantation rate of 5.3% (3.6 ± 1.0 embryos transferred; Figure 3, Table II). Taken together, these data suggest that morphological analysis, when considered alone, is relatively inaccurate in the prediction of success rates.

In the present study, embryos were never transferred on day 1, and therefore both zygote and embryo quality were always determined. Where possible, the best quality embryos were selected according to the previously mentioned criteria (see Materials and methods). Whether zygote quality was predictive of embryo implantation independent of embryo quality, was tested by examining defined cohorts of transferred embryos. Cases were examined in which embryos derived from a group 3 cohort of zygotes (>10 points) were selected for transfer (Table II); the embryo morphology score in these cases was 12.1 ± 1.2 (28 embryos in six transfers). As previously stated, only one patient

achieved pregnancy, suggesting that poor zygote quality is indicative of a poor prognosis, even when embryo quality is reasonable (compared with group 2 embryos; Table II). As an alternative, cases were examined in which a group 3 cohort of embryos was the only material available for transfer, even after the observation of top quality zygotes. In these cases, one patient in 18 achieved pregnancy (5.5%), and the zygote score for these patients was 13.2 ± 0.8 (76 embryos). Here, the reasonable zygote score did not indicate a good prognosis (compare with group 2 zygotes; Table II).

Is growth rate together with morphology predictive of success?

The above results suggest that little predictive information on pregnancy and implantation rates can be gained from the simple morphological analysis of human zygotes or embryos. Indeed, the rate of development of embryos cultured *in vitro* is often used as a predictor of success after IVF (Edwards *et al.*, 1984; Cummins *et al.*, 1986). The rate of development alone was predictive of success after IVF in the present data; pregnancies achieved after day 2 transfer (40–41 h after insemination) were characterized by 3.44 ± 1.26 (117 embryos in 32 patients) blastomeres as opposed to 2.96 ± 1.20 cells (183 embryos in 55 patients) in patients not achieving pregnancy (two-tailed *t*-test, $P = 0.001$). The number of blastomeres in couples achieving pregnancy after embryo transfer on day 3 (60–61 h after insemination) was also significantly greater than those not achieving pregnancy (6.04 ± 1.57 blastomeres in 128 embryos from 34 pregnant patients versus 5.06 ± 2.07 blastomeres in 123 embryos from 33 non-pregnant patients; two-tailed *t*-test, $P < 0.001$). In the present study, embryos were selected for transfer based on both blastomere number and morphological analysis. A combination of analyses increases the degree of predictability of IVF outcome (Racowsky *et al.*, 2000; Scott *et al.*, 2000). A test was conducted to determine whether a combination of growth rate with embryo and zygote morphology was more indicative of outcome than morphological analysis alone by calculating the mean weighted score for the cohort of embryos transferred after IVF and comparing these scores with the IVF outcome. A strong correlation was noted between the scores and

pregnancy and implantation rates (Table II). Results were subdivided into day 2 and day 3 scores due to the difference in score obtained on these days. Day 2 scores were characterized by a weak correlation between pregnancy and implantation rates. Group 1 embryo cohorts achieved 17/34 pregnancies (50%), with an implantation rate of 11.9% (mean of 3.4 ± 0.8 embryos transferred; Figure 3, Table II). Group 2 material was characterized by 7/21 pregnancies (33.3%), and with an implantation rate not significantly different (13.3%) from that of group 1 (3.1 ± 0.4 embryos transferred; Figure 3⁺, Table II). On day 2, group 3 embryo cohorts achieved 6/24 pregnancies (25.0%), with an implantation rate of 10.4% (3.5 ± 0.5 embryos transferred; Figure 3⁺, Table II⁺), which was not significantly lower than results obtained with group 2 embryo cohorts. In contrast, day 3 scores were marked by a strong correlation between pregnancy and implantation rates. Group 1 cohorts on day 3 were characterized by 20/28 pregnancies (71.4%) and an implantation rate of 24.5% (3.5 ± 0.8 embryos transferred; Figure 3, Table II). Group 2 achieved 14/31 pregnancies (45.2%) and an implantation rate of 13.4% (3.5 ± 0.5 embryos transferred; Figure 3, Table II). Group 3 cohorts achieved only two pregnancies in 16 cases (pregnancy rate 12.5% and implantation rate 4.2%; 3.7 ± 0.9 embryos transferred; Figure 3, Table II).

These data suggest that the combination of embryo morphology, number of blastomeres and zygote score gives a high predictability of pregnancy. However, pregnancies may occur throughout the spectrum of embryo cohorts due to the presence of a single grade 1 embryo even in cohorts with a low mean score. Whether the presence of top quality embryos in transfers influenced pregnancy and implantation rates was tested by examining cases where different numbers of top quality embryos were present. Patients were selected in which four embryos were transferred to enable comparison of the results. In total, 107 patients (total of 47 pregnancies) were included in the analysis (Table III). Where no top quality embryos were present, eight pregnancies were obtained in a total of 24 patients (33.3%), but the implantation rate was low (9.4%; Table III). In cases where four top quality embryos were transferred, a total of six pregnancies was achieved in eight

patients (75%) (Table III). The implantation rate was equally high in these cases, with 28.1% of transferred embryos implanted into the uterus (Table III). These data demonstrate that embryos scored as top quality using the weighted scoring system presented herein are characterized by a significantly higher potential for implantation than lower-scoring embryos.

Whether maternal age had any effect on the weighted embryo score was tested by examining the pregnancy and implantation rates together with embryo score in patients categorized by maternal age. Maternal age is known to have a defined negative effect on pregnancy rate in IVF cycles, and this observation was confirmed in the present study. Patients of maternal age <30 years achieved a pregnancy rate of >60%, whether embryos were transferred on day 2 or 3 after fertilization (Table IV). In cases when maternal age was >40 years, the pregnancy rate did not exceed 20% (Table IV). Embryo score was diminished in relation to maternal age (Table IV), though no significant differences were seen between patients aged <30 years and >40 years (Table IV). These data suggest that maternal age heavily influences pregnancy and implantation rates during IVF cycles, but this was not due to any effect on embryo score.

Discussion

In the present study, an investigation was made as to whether the morphological analysis of human zygotes and preimplantation embryos, either independently or together, might be used to determine IVF outcome. A scoring system for human zygotes and preimplantation embryos was developed, based on previously described factors (Edwards *et al.*, 1980, 1984; Cummins *et al.*, 1986; Puissant *et al.*, 198; Visser and Fourie, 1993, Giorgetti *et al.*, 1995; Ziebe *et al.*, 1997; Hu *et al.*, 1998; Scott and Smith, 1998; Tesarik and Greco, 1999), and the data obtained were examined retrospectively to determine which scoring system was the more accurate. Data obtained from

the in-vitro culture of human embryos, including embryos selected for transfer, showed that the quality of human embryos (as determined by the present scoring system) often changed significantly from day to day. In this sense, top quality zygotes could become very low quality embryos after in-vitro culture, while low quality zygotes often became top quality embryos. Although a significant correlation was identified between the two scores, the correlation coefficient when zygotes were compared with either day 2 or day 3 embryos was low, suggesting that the two factors were relatively independent. These data strongly suggest that the static analysis of zygote quality is not highly predictive of the further development of this material. As IVF outcome was equally poor when good quality embryos derived from poor quality zygotes and poor quality embryos derived from good quality zygotes were transferred, a combination of scores is required to maintain reliability when selecting embryos for transfer. In the present study, embryos for transfer were selected on the basis of blastomere number followed by embryo morphology, and finally by day 1 morphological score. In our hands, this system was highly predictive of IVF outcome. When compared with the IVF outcome obtained without using the score, a 1.9-fold increase in predictability was achieved. In fact, a pregnancy rate of 75% was obtained, together with a corresponding implantation rate of 28.1%, when a cohort consisting of 100% top quality embryos was transferred into the uterus. An implantation rate of 28.1% is very reasonable considering that an implantation rate of 40% is expected after blastocyst transfer (Gardner *et al.*, 1998; Gardner and Schoolcraft, 1999). This implantation rate also compares very well with the relatively low (13–15%) implantation rates obtained globally in the present centre (see Figure 3). The data support the hypothesis that zygote and embryo growth are independent variables and both must be considered to enable the best chance of success in IVF protocols.

The data then suggest that neither zygote nor embryo morphology alone, nor developmental rate, are individually as predictive of IVF outcome than a combination of systems. The present system could be used to form a suitable strategy for cycles of IVF, reducing the number of embryos selected for

transfer (see Scott *et al.*, 2000). This would enable the maintenance of high pregnancy rates with a consequent reduction in the incidence of multiple pregnancies. However, the influence of maternal age on this factor should be taken into consideration, as both the present data and previous reports document a reduction in pregnancy and implantation rates when good quality embryos are transferred into patients of advanced maternal age (van Kooij *et al.*, 1996).































A			Score			Score			Score		
	Opposed in centre	1		Aligned equal numbers	5		Defined granular area	5			
	Opposed outside centre	2		Not aligned equal numbers	4		Defined granular area some vesicles	4			
	Non opposed	3		Not aligned unequal numbers	3		Less defined granular area	3			
	Unequal sizes	4		Small	2		No granular area	2			
	Split	5		Mixed	1		No granular area vesiculated	1			
i.			ii.			iii.					
B			Score			Score			Score		
	Synchronous division Symmetrical Equal sizes	5		All blastomeres one nucleus	5		No fragments	5			
	Asynchronous division Equal sizes	4		<25%blastomeres multinucleated	4		<10% fragments	4			
	Synchronous division Unequal sizes	3		<50% blastomeres multinucleated	3		<25% fragments	3			
	Asynchronous division Unequal sizes	2		<75% blastomeres multinucleated	2		<40% fragments	2			
	No division	1		All blastomeres multinucleated	1		>40% fragments	1			
iv.			v.			vi.					

Figure 1. Design of zygote and embryo scoring system. **(A)** Zygote scoring. The score is equally distributed into three factors: (i) position of pronuclei; (ii) position and type of nucleoli; (iii) cytoplasmic morphology. **(B)** Embryo morphology. Again, the score of 15 is equally distributed between three factors: (iv) blastomere volume and synchrony of cleavage; (v) level of multinucleation; (vi) level of fragmentation.

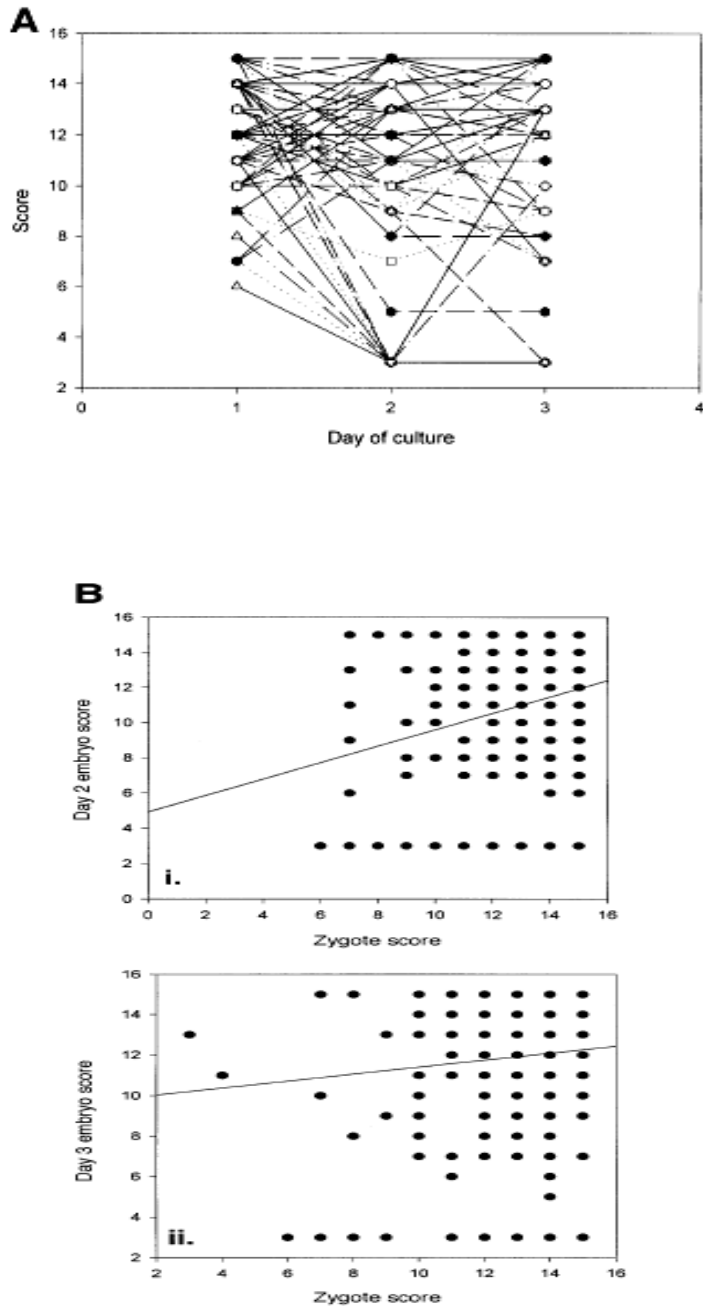


Figure 2. Embryo quality followed through culture during cycles of IVF-embryo transfer. Individual embryos were cultured until day 3 during cycles of assisted reproduction. The morphological analysis was performed at regular intervals. **(A)** The data show the variability of score between day 1 and day 3 in a 70-embryo sample out of a total of 1171 embryos cultured in the 154 patients of the present study. **(B)** Relationship between zygote and embryo score. (i) Zygote versus day 2 embryo score; the data are an analysis of a total of 436 embryos cultured to day 2; the regression line shows a significant correlation coefficient $r = 0.2$ ($P < 0.0001$). (ii) Zygote versus day 3 embryo score; the data are an analysis of a total of 735 embryos cultured to day 3; the regression line shows a marginally significant correlation coefficient $r = 0.1$ ($P = 0.05$).

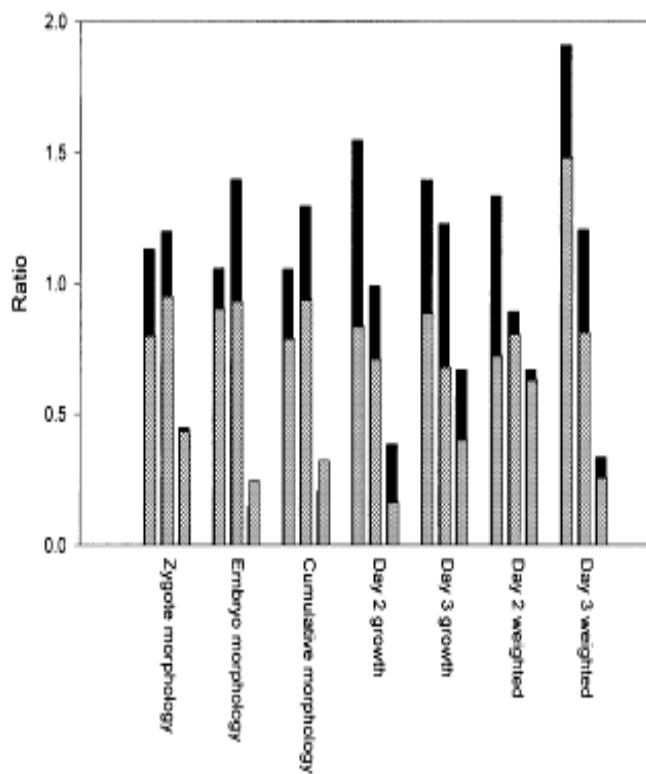


Figure 3. Predictability of scoring systems. The IVF outcome (pregnancy rate and implantation rate) of both individual and combined scoring systems is divided by the control IVF outcome from the present laboratory. Therefore, a ratio >1 indicates increased predictability. Solid bars indicate pregnancy rates; shaded bars indicate implantation rates. The three bars for each grouping indicate groups 1–3 (left to right).

Table I. Cut-off values^a used in assigning groupings

	Group 1	Group 2	Group 3
Zygote morphology	≥14	10-13.9	<10
Embryo morphology	≥14	10-13.9	<10
Cumulative morphology (average score)	≥14	10-13.9	<10
Growth rate (day 2)	≥4	2-3	≤2
Growth rate (day 3)	≥8	4-7	≤4
Day 2 weighted score	≥600	400-599	<400
Day 3 weighted score	≥1000	500-999	<500

^aAll scores are based on the average score for the cohort of embryos transferred into the patients' uterus. Growth rate indicates the number of blastomeres observed on the day of analysis.

Table II. Relationship between embryo scoring systems and outcome of assisted reproduction

	Group 1	Group 2	Group 3
Zygote morphology	42.4 (13.2) (<i>n</i> = 59)	44.9 (15.7) (<i>n</i> = 89)	16.7 (7.1) (<i>n</i> = 6)
Embryo morphology	39.6 (14.9) (<i>n</i> = 48)	52.3 (15.4) (<i>n</i> = 88)	5.5 (4.0) (<i>n</i> = 18)
Cumulative morphology	39.5 (13.0) (<i>n</i> = 38)	48.5 (15.5) (<i>n</i> = 103)	7.7 (5.3) (<i>n</i> = 13)
Growth rate (day 2)	57.9 (13.8) (<i>n</i> = 19)	37.0 (11.7) (<i>n</i> = 46)	14.3 (2.6) (<i>n</i> = 14)
Growth rate (day 3)	52.2 (14.6) (<i>n</i> = 24)	46.0 (11.2) (<i>n</i> = 39)	25.0 (6.6) (<i>n</i> = 12)
Weighted score (day 2)	50.0 (11.9) (<i>n</i> = 34)	33.3 (13.3) (<i>n</i> = 21)	25.0 (10.4) (<i>n</i> = 24)
Weighted score (day 3)	71.4 (24.5) (<i>n</i> = 28)	45.2 (13.4) (<i>n</i> = 31)	12.5 (4.2) (<i>n</i> = 16)

Results are expressed as pregnancy rate with implantation rate in brackets.

n = the total number of patients in each grouping.

Data are derived from 154 patients treated within the study period with a mean (\pm SD) maternal age of 31.9 ± 9.3 years and receiving 3.4 ± 1.2 embryos at transfer.

Table III. Impact of high-scoring embryos in the transferred cohort

Score	No. of patients	Maternal age (years)	Pregnancy rate (n)	Implantation rate (n)	Live births (n)
0	24	32.6 ± 9.6	8 (33.3)	9 (9.4) ^a	9
1	32	33.5 ± 12.8	12 (37.5)	15 (11.7)	14
2	24	35.2 ± 11.3	12 (50)	12 (12.5)	11
3	19	31.1 ± 12.3	9 (47.3)	13 (17.1)	13
4	8	32.7 ± 8.3	6 (75)	9 (28.1) ^a	8

Values in parentheses are percentages.

^aSignificant difference (z -test with Yates' correction, $P = 0.016$, $OR = 0.7$).

The data represent cases where four embryos were transferred (107 patients from 154 in the study group, 47 pregnancies in total). High-scoring embryos are defined as embryos in which the day 2 or 3 weighted score was sufficiently high for individual embryos to be considered grade 1 (see Table D).

Table IV. Effect of maternal age on weighted embryo score and pregnancy rates

Maternal age (years)	No. of patients	No. of embryos transferred*	Average weighted score, transferred embryos*	No. of pregnancies (%)	No. of fetal heart beats (implantation rate; %)	No. of live births
<i>Day 2 transfer</i>						
<30	21	72 (3.1 ± 0.5)	466 ± 276	14 (66.6) ^a	18 (25) ^b	17
30-40	44	168 (3.8 ± 1.2)	423 ± 189	14 (31.8)	17 (10.1)	17
>40	14	503 (4.5 ± 1.2)	78 ± 222	2 (14.3%) ^a	2 (4%) ^b	2
<i>Day 3 transfer</i>						
<30	18	618 (3.3 ± 0.6)	65 ± 301	11 (61.1)	15 (24.6) ^c	13
30-40	51	199 (3.7 ± 1.5)	766 ± 244	14 (27.5)	18 (9.1)	18
>40	6	28 (4.3 ± 1.1)	745 ± 200	1 (16.7)	1 (3.5) ^c	1

All patients are included in the data.

*Data are mean ± SD. Mean and SD refer to the number of embryos transferred per patient. Weighted score refers to transferred embryos only.

No significant difference in embryo score was noted between groups (one-way ANOVA). Significant differences in outcome between patients under age 30 years and those over age 40 years were noted (z -test with Yates' correction, ^a $P = 0.007$, $\alpha = 0.814$; ^b $P = 0.005$, $\alpha = 0.847$; ^c $P = 0.04$, $\alpha = 0.547$)

References

1. Ahuja, K.K., Smith, W., Tucker, M. and Craft, I. (1985) Successful pregnancies from the transfer of pronuclear embryos in an outpatient in vitro fertilisation program. *Fertil. Steril.*, 44, 181–184.
2. Alikani, M., Cohen, J., Tomkin, G., Garrisi, J., Mack, C. and Scott, R.T. (1999) Human embryo fragmentation in-vitro and its effects for human pregnancy and implantation. *Fertil. Steril.*, 71, 836–842.
3. Alikani, M., Calderon, G., Tomkin, G., Garrisi, J., Kokot, M. and Cohen, J. (2000) Cleavage anomalies in early human embryos and survival after prolonged culture in vitro. *Hum. Reprod.*, 15, 2634–2643.
4. Coetsier, T. and Dhont, M. (1998) Avoiding multiple pregnancies in in-vitro fertilisation: who's afraid of single embryo transfer? *Hum. Reprod.*, 10, 2663–2670.
5. Cummins, J.M., Breen, T.M., Harrison, K.L., Shaw, J.M., Wilson, L.M. and Hennessey, J.F. (1986) A formula for scoring human embryo growth rates in in vitro fertilisation: its value in predicting pregnancy and in comparison with visual estimates of embryo quality. *J. In Vitro Fertil. Embryo Transfer*, 3, 284–295.
6. Dale, B., Fiorentino, A., De Stefano, R., Di Matteo, L., De Simone, M.L., Wilding, M. and Zullo, F. (1999) Activated oocyte transfer (AOT) as a stress-free approach to the treatment of infertility. *Hum. Reprod.*, 14, 1771–1772.
7. Dale, B., Fiorentino A., De Simone, M.L., Di Matteo, L., Scotto di Frega, A., Wilding, M., Fehr, P., Bassan, M., Lo Giudice, C., Maselli, A. et al. (2002) Zygote versus embryo transfer: a prospective randomised multicentre trial. *J. Assist. Reprod. Genet.* (in press).
8. Desai, N., Goldstein, J., Rowland, D. and Goldfarb, J. (2000) Morphological evaluation of human embryos and derivation of an embryo quality scoring system specific for day 3 embryos: a preliminary study. *Hum. Reprod.*, 15, 2190–2196.

9. Edwards, R.G., Steptoe, P.C. and Purdy, J.M. (1980) Establishing full-term human pregnancies using cleaving embryos grown in vitro. *Br. J. Obstet. Gynaecol.*, 87, 737–756.
10. Edwards, R.G., Fishel, S.B., Cohen, J., Fehilly, C.B., Purdy, J.M., Slater, J.M., Steptoe, P.C. and Webster, J.M. (1984) Factors influencing the success of in vitro fertilisation for alleviating human infertility. *J. In Vitro Fertil. Embryo Transfer*, 1, 3–23.
11. Gardner, D.K. and Schoolcraft, W. (1999) Elimination of higher order multiple gestations by blastocyst culture and transfer. In Shoham, Z., Howles, C. and Jacobs, H. (eds), *Elimination of Higher Order Multiple Gestations by Blastocyst Culture and Transfer*. Martin Dunitz, London, pp. 267–274.
12. Gardner, D.K., Vella, P., Lane, M., Wagley, L., Schlenker, T. and Schoolcraft, W.B. (1998) Culture of human blastocysts increases implantation rates and reduces the need for multiple embryo transfers *Fertil. Steril.*, 69, 84–88.
13. Giorgetti, C., Terriou, P., Auquier, P., Hans, E., Spach, J.L., Salzmann, J. and Roulier, R. (1995) Embryo score to predict implantation after in vitro fertilization: based on 957 single embryo transfers. *Hum. Reprod.*, 10, 2427–2431.
14. Hardarson, T., Hanson, C., Sjogren, A. and Lundin, K. (2001) Human embryos with unevenly sized blastomeres have lower pregnancy and implantation rates: indications for aneuploidy and multinucleation. *Hum. Reprod.*, 16, 313–318.
15. Hu, Y., Maxson, W.S., Hoffman, D.I., Ory, S.J., Eager, S., Dupre, J. and Lu, C. (1998) Maximising pregnancy rates and limiting high-order multiple conceptions by determining the optimal number of embryos to transfer based on quality. *Fertil. Steril.*, 69, 650–657.
16. Langley, M.T., Marek, D.M., Gardner, D.K., Doody, K.M. and Doody, K.J. (2001) Extended embryo culture in human assisted reproduction treatments *Hum. Reprod.*, 16, 902–908.
17. Ludwig, M., Schopper, B., Al-Hasani, S. and Diedrich, K. (2000) Clinical use of a pronuclear stage score following intracytoplasmic sperm injection:

- impact on pregnancy rates under the conditions of the German embryo law Hum. Reprod., 15, 325–329.*
18. Pennings, G. (2000) *Multiple pregnancies: a test case for the moral quality of assisted reproduction. Hum. Reprod., 15, 2466–2469.*
 19. Puissant, F., Van Rysselberge, M., Barlow, P., Dewesze, J. and Leroy, F. (1987) *Embryo scoring as a prognostic tool in IVF treatment. Hum. Reprod., 2, 705–708.*
 20. Quinn, P., Stone, B.A. and Marrs, R.P. (1990) *Suboptimal laboratory conditions can affect pregnancy outcome after embryo transfer on day 1 or day 2 after insemination in vitro. Fertil. Steril., 63, 168–170.*
 21. Racowsky, C., Jackson, K.V., Cekleniak, N.A., Fox, J.H., Hornstein, M.D. and Ginsberg, E.J. (2000) *The number of eight-cell embryos is a key determinant for selecting day 3 or day 5 transfer. Fertil. Steril., 73, 558–564.*
 22. Rjinders, P. and Jansen, C. (1998) *The predictive value of day 3 embryo morphology regarding blastocysts formation, pregnancy and implantation rate after day 5 transfer following in-vitro fertilisation or intracytoplasmic sperm injection. Hum. Reprod., 13, 2869–2873.*
 23. Sadowy, S., Tomkin, G., Munne, S., Ferrara-Congedo, T. and Cohen, J. (1998) *Impaired development of zygotes with uneven pronuclear size. Zygote, 6, 137–142.*
 24. Scott, L.A. and Smith, S. (1998) *The successful use of pronuclear embryo transfers the day following oocyte retrieval Hum. Reprod., 13, 1003–1013.*
 25. Scott, L., Alvero, R., Leondires, M. and Miller, B. (2000) *The morphology of human pronuclear embryos is positively related to blastocysts development and implantation. Hum. Reprod., 15, 2394–2403.*
 26. Smith, S., Scott, L. and Hosid, S. (1993) *Combined intrauterine triplet and ectopic pregnancy following pronuclear transfer in a patient with elevated serum progesterone during ovulation induction. J. Assist. Reprod. Genet., 10, 478–480.*
 27. Tesarik, J. and Greco, E. (1999) *The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology Hum. Reprod., 14, 1318–1323.*

28. Tesarik, J., Junca, A.M., Hazout, A., Aubriot, F.X., Nathan, C., Cohen-Bacrie, P. and Dumont-Hassan, M. (2000) Embryos with high implantation potential after intracytoplasmic sperm injection can be recognised by a simple, non-invasive examination of pronuclear morphology *Hum. Reprod.*, 15, 1396–1399.
29. van Kooij, R.J., Looman, C.W., Habbemma, J.D., Dorland, M. and te Verde, E.R. (1996) Age-dependent decrease in embryo implantation rate after in-vitro fertilisation. *Fertil. Steril.*, 66, 769–775.
30. Van Royen, E., Mangelschots, K., de Neubourg, D., Laureys, I., Ryckaert, G. and Gerns, J. (2001) Calculating the implantation potential of day 3 embryos in women younger than 38 years of age: a new model. *Hum. Reprod.*, 16, 326–332.
31. Visser, D. and Fourie, F. (1993) The applicability of cumulative embryo score selection and quality control in an in-vitro fertilization/embryo transfer programme. *Hum. Reprod.*, 8, 1719–1722.
32. Wittemer, C., Bettahar-Lebugle, K., Ohl, J., Rongieres, C., Nisand, I. and Gerlinger, P. (2000) Zygote evaluation: an efficient tool for embryo selection. *Hum. Reprod.*, 15, 2591–2597.
33. Ziebe, S., Petersen, K., Lindenberg, S. Andersen, A.G., Gabrielsen, A. and Andersen, A.N. (1997) Embryo morphology or cleavage stage: how to select the best embryos for transfer after in-vitro fertilization. *Hum. Reprod.*, 12, 1545–1549.

Capitolo V Pubblicazione II

Intra-follicular leptin concentration as a predictive factor for *in vitro* oocyte fertilization in assisted reproductive techniques

G. De Placido¹, C. Alviggi^{1,5}, A. Mollo¹, I. Strina¹, E. Fiore¹, R. Clarizia¹, M. Wilding², E. Alviggi¹, V. Sanna³, T. Pagano¹, and G. Matarese³

¹*Dipartimento Universitario di Scienze Ostetriche Ginecologiche e Medicina della Riproduzione, Area Funzionale di Medicina della Riproduzione ed Endoscopia Ginecologica, Università degli Studi di Napoli 'Federico II', Naples, Italy;* ²*Centre for Reproductive Biology, Clinica Villa del Sole, Naples, Italy;* ³*Istituto di Endocrinologia e Oncologia Sperimentale del CNR (IEOS-CNR), Naples, Italy.*

Introduction

Granulosa and theca cells are involved in follicular development and oocyte maturation. These compartments are able to produce and release several molecules in response to pituitary stimulation. These products (i.e., estradiol, androgens and inhibin B) reach the blood stream and regulate pituitary secretion of follicular stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH). Nevertheless, both paracrine and autocrine mechanisms are also effective in controlling cellular growth and activities during folliculogenesis. In this context, follicular fluid (FF) may also represent a *medium* in which these signals are secreted to exert a paracrine activity. Thus, FF content may progressively change during folliculogenesis reflecting aspects of quality and maturity of the process (Erickson and Shimasaki, 2001; Mendoza *et al.*, 2002;).

Leptin, the product of the *ob* gene, is a 16kD, non-glycosylated protein which plays a central role in the regulation of food intake, energy expenditure, and reproductive function. It is mainly produced by adipocytes, but smaller

quantities of *ob* gene mRNA have been also found in other tissues, such as stomach, muscle, mammary gland, placenta, and trophoblast cells (Zachow and Magoffin, 1997; Finn *et al.*, 1998; Matarese & La Cava, 2004). Evidence from *ob/ob* female mice (Friedman, 2002) and congenitally leptin deficient women (Farooqi *et al.*, 2002; Chan *et al.*, 2003; Welt *et al.*, 2004) clearly indicates that this hormone is involved in the reproductive process: in both cases a constitutive hypogonadotropic hypogonadism is reversed by the administration of recombinant leptin, suggesting a central regulatory mechanism (Foster and Nagatami, 1999). Evidence suggests that leptin locally controls reproductive organs (Conway e Jacobs, 1997; Zachow and Magoffin, 1997; Zamorano *et al.*, 1997). *In vitro* studies have demonstrated that this hormone is expressed by granulosa and cumulus oophorus cells in the preovulatory human follicle (Cioffi *et al.*, 1996). In particular, subsets of granulosa and cumulus cells produce and accumulate leptin and other growth factors, suggesting that this process may be involved in preovulatory and post-ovulatory follicular development (Antczak *et al.*, 1997). In addition, leptin expression has been detected by immunofluorescence in human and murine meiotically mature oocytes (Cioffi *et al.*, 1997; Antczak and Van Blerkom, 1997). More recently, data from assisted reproductive techniques (ART) have clearly shown that this hormone is detectable in the FF (Barroso *et al.* 1999; Bützow *et al.* 1999; Messinis *et al.*, 1998; 1999; Mantzoros *et al.*, 2000; Welt *et al.*, 2003).

In Italy, ART has been recently regulated by a Law which reduces to a maximum of three the number of embryos that can be produced *in vitro*. All embryos must be transferred and none can be suppressed and/or cryo-preserved. As a consequence, the number of oocytes that can be fertilized in each cycle is also reduced to a maximum of three. Thus, for the first time an oocyte selection would be extremely valuable. At the moment, the choice of the oocyte to use in the “in vitro” procedure may be exclusively based on morphological aspects. Therefore, there is a need to develop further selection criteria able to rapidly identify those oocytes which could have the highest potential of fertilization.

The aim of this longitudinal observational study was to investigate the role of FF leptin concentration as a possible predictor of oocyte and embryo quality. We evaluated the relationship between FF leptin levels and both the fertilization rate and embryo morphology. We hypothesize that potentially useful information on each single oocyte can be derived from the study of its FF characteristics and biochemical content.

Materials and methods

Patient selection

In this longitudinal observational study, patients who underwent their first intra-cytoplasmic sperm injection (ICSI) program in the University “Federico II” of Naples, between June and December 2003 were enrolled. Only young, normogonadotrophic and eumenorrhic (menses every 24-35 days with an intra-individual variability of ± 3 days) women, with hysteroscopic evidence of a regular uterine cavity, and displaying a “normal” response [more than 4 oocytes retrieved and estradiol (E₂) serum peak >1500 pg/mL] to controlled ovarian stimulation (COS) were included. Finally, only couples whose male partner had a sperm concentration >5 x 10⁶ and in whom motile spermatozoa of normal morphology were utilized for the ICSI procedure, were studied.

The following exclusion criteria were adopted for women: high basal concentration (at the third day of at least one spontaneous menstrual cycle in the three months preceding the enrolment) of FSH (bFSH >10 mIU/mL), age >36 years, body mass index (BMI) >25 kg/m², biochemical and/or ultrasonographic evidence of polycystic ovarian syndrome (PCOS), stage III-IV endometriosis according to the *American Society for Reproductive Medicine* (formerly the *American Fertility Society*) classification revisited in 1985 (rAFS, 1985); autoimmune, metabolic, thyroid, and chromosomal disorders; presence of one only ovary. For male partners, age >40 years, BMI >28 kg/m², presence of autoimmune, metabolic and chromosomal abnormalities, evidence of cystic fibrosis mutations, and Y chromosomal microdeletions, were adopted as exclusion criteria [the analysis of *AZF α* ,

AZFc and *AZFc* regions had been performed in subjects with $<7 \times 10^6$ spermatozoa per mL, according to the EMQN guidelines (Simoni *et al.*, 1999)]. Serum leptin levels were evaluated in all subjects under standardised conditions (between 08.00-10.00 a.m., after 12-14 hours fasting) on the third day of the spontaneous menstrual cycle preceding the enrolment.

The study design was in agreement with the Helsinki declarations for experimental procedures, and did not require neither adjunctive diagnostic strategies nor invasive procedures other than those commonly recommended. However, the study protocol was approved by the IRB board Departmental expert-board and an informed consent was signed by patients before their enrolment.

Assisted Reproduction procedures and follicular fluid sampling

The GnRH-agonist (GnRH-a) long protocol was executed according to the following modalities (De Placido *et al.*, 2001): triptorelin (Decapeptyl 3.75 mg depot, Ipsen S.p.A., Milan, Italy) was administrated i.m. on the first day of a spontaneous menstrual cycle. After 14 days, the hypothalamus-hypophysis-ovary axis desensitisation was evaluated: the presence of serum E_2 levels ≤ 40 pg/mL in association with a ultrasonographic (USG) finding of endometrial thickness ≤ 5 mm and absence of ovarian follicles, were considered as adequate conditions to start the exogenous gonadotrophins administration. Thus, a daily dose of 150-300 IU of recombinant FSH [rFSH (Gonal-F, Serono Pharma, Rome, Italy)] was administrated subcutaneously, according to patients age, BMI and previous cycles outcome data. On day 5 of stimulation, serum E_2 levels were measured: in presence of concentrations >160 pg/mL or <80 pg/mL, the daily rFSH dose was respectively reduced or increased by 75 IU. Starting from the day 8 of stimulation, on alternate days and until the human chorionic gonadotrophin (hCG) administration, evaluations of E_2 serum levels and follicular growth (USG) were performed, in order to individualize the rFSH daily dose. An ovulatory dose (10,000 IU i.m.) of hCG (Gonasi; AMSA s.r.l., Rome, Italy) was administrated when at least 3 follicles of mean diameter >17 mm were observed. Oocytes were retrieved through trans-vaginal US-guided aspiration, 35 hours after the hCG injection. Because

contamination from fluids deriving from other follicles could represent a relevant bias, the first follicle aspirated in each ovary was considered for the analysis. Taking into account that this experimentation was designed to analyze the relationship between intra-follicular leptin levels and oocyte quality, only FF of follicles >15 mm and in which an oocyte was found were evaluated.

USG measurement of each follicle mean diameter was systematically performed, just before the aspiration procedure. FF were immediately centrifuged for 5 minutes at 2000 rpm; then the supernatant was retrieved and preserved in a -80°C freezer.

Each single oocyte deriving from a given follicle examined for leptin concentration was followed in the subsequent steps of the standard in vitro fertilization procedure. In order to estimate the relationship between leptin concentration and fertilization rate, it was chosen to analyze only mature oocytes. Thus, only those oocytes prepared to undergo the ICSI procedure after the removal of the cumulus oophorus and observation of the 1st polar body. 16-18 hours after insemination, a fertilization check was performed. Embryos derived from fertilized oocytes were evaluated according to our scoring system: two independent scores, both ranging between 0-15, were attributed at the zygote stage and on day +2 of culture respectively (De Placido et al., 2002). Parameters taken into account for this system were: position of pronuclei, morphology and orientation of nucleoli, blastomere orientation and synchrony of cleavage, grade of fragmentation. In addition, a cumulative score was given according to the following calculation: weighted score = (day 2 embryo score x number blastomeres) x zygote score. This scoring system produces a score of (15 x 4) x 15 = 900 for a top quality embryo. Embryos with a high score, in our previous experience, had an higher chance of implantation (De Placido et al., 2002). Patients received a luteal phase supplementation with progesterone (Prontogest; AMSA s.r.l., Rome, Italy) 50 mg/die i.m., starting from the oocyte retrieval day. Embryo transfer was performed 48-72 hours after the oocyte retrieval.

Hormone measurements

Serum and intra-follicular leptin levels were determined with human leptin enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits (Alexis Corporation, Laüfelfingen, Switzerland). The assay detection limit was 0.2 ng/mL. Intra- and inter-assay coefficients of variation (CV) were <8%. Serum E₂ and LH concentrations were measured using fluorescence enzymatic dosage techniques (ELFA) (BioMèrieux sa, Lion, France). The assay detection limits were 0.04 pg/mL and 0.08 mIU/mL for E₂ and LH, respectively. Intra- and inter-assay CV were <7% for both hormones. Serum FSH was determined with immunofluorimetric method (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK); detection limit was 0.4 mIU/mL and intra and inter-assay CV was <8%.

Statistical analysis

Results have been reported as mean \pm SD. Data were analyzed with Statistica for Windows, version 5.1 (*Stat. Soft. Inc.*, Tulsa, USA) and SPSS 11.5 (*SPSS Inc.*, Chicago, USA). One way analysis of variance (ANOVA) and Mann-Whitney *U*-test were employed to evaluate differences between groups for normally and not-normally distributed data, respectively. Relationship between two continuous variables was evaluated with the Pearson correlation coefficient or the Spearman rank test when normally or not-normally distributed, respectively. Multiple regression model was used to evaluate the associations of multiple continuous variables with a continuous, dependent variable. Logistic binomial regression was employed when a dicotomous variable was the dependent one. Receiving operating characteristics (ROC) curves were created for the possible predictive variables and the area under the curve (AUC) was calculated. A two tailed *p* value of <0.05 was considered to be statistically significant.

Results

Intra-follicular leptin is not correlated with BMI

Out of 40 couples initially enrolled, a mature oocyte was retrieved in the first follicle aspirated of at least one ovary in 37 women; two couples were excluded due to the presence of a sperm concentration $<5 \times 10^6$ at the moment of the ICSI procedure. In 12 out of 35 remaining subjects, one mature oocyte for each ovary was available. Among these patients, three had both the oocytes fertilized, two had no oocyte fertilized, whereas seven had one oocyte fertilized and the other not. Among patients with one only oocyte retrieved (n=23), 12 had the oocyte fertilised, whereas 11 showed no evidence of fertilization. Thus, 47 mature oocytes were utilized for the analysis and divided in two subgroups: the group A included 25 oocytes (from 22 patients) with evidence of fertilization (presence of 2 *pronuclei*) at the 16-18 hours check. 22 mature oocytes (from 20 patients) with evidence of non-fertilization were included in group B. Thus, the case occurred that, if a patient had an oocyte fertilized and the other not, she was included and analyzed in both groups.

Demographic, anthropometric, hormonal characteristics and indications for ART resulted comparable between two groups of patients corresponding to the two groups of oocytes (table 1). As shown in figure 1, a significant positive correlation between leptin serum levels and BMI was observed in the 31 women who had at least one oocyte analyzed ($r = 0.4, p < 0.05$). In contrast, when FF leptin was evaluated, the correlation with BMI was lost also when the two groups of patients were separately evaluated [FF leptin *versus* BMI in all subjects: $r = -0.1; p = 0.5$; FF leptin *versus* BMI group A: $r = 0.3, p = 0.2$; FF leptin *versus* BMI group B: $r = -0.3, p = 0.2$). No significant correlation was shown between serum and intra-follicular leptin levels, neither in the group with evidence of fertilization, nor in the one with no fertilized oocytes (Figure 2).

Oocyte fertilization is associated with higher intra-follicular leptin

Mean intra-follicular leptin levels resulted to be significantly higher in the group A when compared with the group B (26.0 ± 6.1 versus 15.3 ± 10.6 ng/mL, respectively, $p < 0.01$) (table 1, Figure 3). Although no significant correlation between FF leptin levels and BMI emerged in our study population, the difference in mean FF leptin concentration between groups was also controlled with respect to this parameter: the intra-follicular leptin levels/BMI ratio also resulted significantly higher in the group A (1.2 ± 0.3 versus 0.7 ± 0.5 , $p < 0.05$). In contrast, mean follicular diameters resulted to be similar in the two groups (group A 21.4 ± 3.4 mm; group B 21.0 ± 5.1 mm, $p = 0.5$) (table 1). Similarly, when the 26 FF were considered as whole, no significant correlation between leptin levels and mean follicular dimensions emerged ($r = 0.2$, $p = 0.1$).

When a logistic regression model was created, with a backward stepwise procedure, the most predictive variable toward fertilization of the oocyte was intra-follicular leptin concentration (Wald = 7.3, $p < 0.001$, table 2). The FF leptin/BMI ratio was excluded from this analysis due to the proven co-linearity with intra-follicular leptin itself.

With the purpose of identifying a FF leptin cut-off valuable to discriminate between “good prognosis” and “low prognosis” oocytes, we created a ROC curve, employing the fertilization of the oocyte as a positive test result. The area under the curve (AUC) was 0.81 and a cut-off value of 20.25 ng/mL resulted to be the more reliable in predicting fertilization of oocytes (figure 4). Using that cut-off, two further groups of oocytes have been identified: group 1, formed by 23 oocytes (from 21 women) whose follicles had higher intra-follicular leptin levels, and group 2, formed by 24 oocytes/FF (from 19 women) with leptin levels ≤ 20.25 ng/mL. Among the twelve women having two follicles analyzable, 5 showed a discrepancy having one follicle with lower and the other with higher leptin levels. Also in this case, if a patient had this discrepancy between her two follicles, she was attributed to both groups. Basic characteristics were similar in the two groups of patients (table 3). The percentage of oocytes fertilized with respect to the number of mature oocyte

resulted to be significantly higher in the group 1 than group 2 patients (86.1% versus 15.9%, $p = 0.001$). Mean follicular dimensions were similar in the two groups (22.2 ± 4.2 versus 20.3 ± 4.2 mm, $p = 0.08$).

Intra-follicular leptin levels and embryo quality

Within the study population, it was possible to study the *in vitro* evolution of a total of 15 fertilized oocytes. Possible relationships between leptin concentrations in the original follicles and the score attributed to the embryos at the stadium of zygote and at 48 hours (day +2 from the insemination) of *in vitro* culture were evaluated. In both cases no significant correlation was observed (linear regression analysis leptin- zygote score: $r = -0.01$, $p = 0.6$; linear regression analysis leptin- embryo score at day +2: $r = 0.1$, $p = 0.6$). Equally, no significant correlation was found between leptin concentrations and number of blastomers at day +2 ($r = 0.4$, $p = 0.07$), neither between the FF molecule concentrations and cumulative embryo score (*weighted score*, $r = 0.3$, $p = 0.1$).

Discussion

In the present study, intra-follicular leptin levels have been correlated with fertilization rates and to the quality score given to single embryos on the basis of specific morphological parameters (De Placido et al., 2002).

Leptin levels were significantly higher in those follicles whose oocyte resulted fertilized, in comparison with the follicular population marked by non-fertilized oocytes. This aspect is consistent with the results of the logistic regression analysis defining the intra-follicular leptin concentration as the most predictive factor for fertilization. In addition, the predictivity of this parameter towards probabilities of fertilization resulted even more reliable when oocytes/patients were stratified in function of the FF leptin concentrations: the identification of a cut-off value of 20.25 ng/mL by means of a ROC curve allowed the identification of two groups of FF, characterised by higher and equal/lower levels, respectively: oocytes deriving from FF of

the former subgroup displayed significantly increased probabilities of fertilization.

No statistically significant correlation has been demonstrated between mean follicular diameter and leptin concentrations when the study population has been analyzed as a whole. Moreover, mean follicular diameter did not differ between the group of oocytes with evidence of fertilization and those non-fertilized. Finally, when patients were divided in two subgroups on the basis of leptin levels (group 1 and 2), no statistically significant difference was observed in this parameter. Taken together, these data suggest that, at least in case of finding of a mean diameter >15 mm, follicular diameter is not correlated with leptin production, neither seems to be predictive towards fertilization probability. In contrast, leptin production appears to be independent of follicle dimensions and is marked by a more elevated level of predictability towards oocyte quality, intended as probability of fertilisation. These results should be considered in the context of legal aspects that in Italy currently reduces to a maximum of three the embryos that can be obtained *in vitro*. In fact, the only way to be sure of obtaining this result is to inseminate only three oocytes. Following confirmation of our data, FF leptin concentration may be adopted as a predictive factor in the choice of the three oocytes to utilize.

These results are apparently in contrast with previous evidence (Barroso *et al.*, 1999; Mantzoros *et al.*, 2000) which indicated an inverse correlation between intra-follicular leptin levels and outcome of ART programmes. Such a discrepancy may derive from the fact that these studies were differently designed and/or not aimed to evaluate relationships between single follicle leptin production and relative oocyte quality. In particular, data by Barroso *et al.* regarded the relationship between intra-follicular leptin and other factors which seemed to affect embryo morphology, such as vascular endothelial growth factor and nitric oxide. In the study of Mantzoros *et al.*, although only the first fluid from the dominant follicle was evaluated, correlation analysis involving oocyte quality was not executed. In that case, two subgroups of normal patients had been identified on the basis of previous IVF outcome:

women with poor prognosis (no pregnancy throughout three IVF cycles) showed significantly higher FF leptin levels when compared with “good prognosis” women who conceived within three IVF attempts. Our data do not exclude the possibility of a poor-prognosis condition associated with systemic and/or local over-production of leptin during folliculogenesis. In such a case, a peripheral resistance may lead to over-expression of this and/or other paracrine factor potentially involved in follicular maturation (Bützow *et al.*, 1999; Mantzoros *et al.*, 2000). On the other hand, it could be hypothesized that FF leptin, when in a hypothetical normal range, may represent the effect of an adequate granulosa proliferation and activity. This hypothesis is consistent with our study in which a direct follow-up of single oocytes throughout an IVF cycle has been performed, and all the steps have been evaluated with respect to the FF leptin concentration. It is to be underlined that this study has not been designed in order to correlate FF leptin with categorical variables, such as implantation and/or pregnancy rates. This kind of analysis would have been executed in a larger population and whether only oocytes/embryos with known FF leptin concentration had been transferred into the uterus, which was not in case. Nevertheless, the hypothesis of a relationship between FF leptin and embryo quality is also tested. In particular, a correlation analysis has been executed with zygote and embryo scoring systems. In our experience, these parameters are good predictors of embryo viability and implantation rate (De Placido *et al.*, 2002). Our results failed to show any significant correlation with those variables. This results are consistent with previous evidence suggesting that leptin activity is mainly involved in biological processes concomitant and following oocyte fertilization (Antczak and Van Blerkom, 1997).

Although this study has not been designed in order to investigate leptin physiology throughout stimulated folliculogenesis, our data seem to suggest that this hormone is locally produced. This hypothesis is supported by the evidence that positive significant correlation between serum leptin levels and BMI observed in our study population was lost when FF levels of the hormone were evaluated. Interestingly, this observation seemed to be more

evident in the group with higher FF leptin levels (group 1), whereas in women with lower FF concentration the p value was 0.06. Thus, a local production may reflect follicular dynamics and prevail over a dynamic equilibrium with the blood stream. This consideration is consistent with other data demonstrating that a leptin is directly produced by granulosa cells and may exert paracrine activity within the human ovarian follicle (Antczak *et al.*, 1997; Zachow and Magoffin, 1997; Brannian *et al.*, 1999).

In conclusion, our results identify FF leptin over follicular diameter as marker of oocyte quality in terms of predictability of fertilization. In contrast, this factor does not seem to be correlated with embryo quality. Following confirmation of our data, real time FF leptin measurement may represent a reliable strategy for choosing oocytes to undergo *in vitro* procedures. These results underline the relevance of FF variables in developing multi-factorial models for oocyte selection.

Table 1. Leptin levels of FF whose oocytes were fertilized (group A) or not (group B), and demographic, anthropometric and hormonal characteristics of patients corresponding to the two groups.

	Follicles whose oocytes were fertilized (n = 25)	Follicles whose oocytes were not fertilized (n = 22)
Intra-follicular leptin levels (ng/mL) ¹	26.1 ± 6.1	15.3 ± 10.6
Intra-follicular leptin levels/BMI ratio ^{1, 2}	1.2 ± 0.3	0.7 ± 0.5
Mean follicular diameter (mm)	21.4 ± 3.4	21.0 ± 5.1

*Characteristics of the patients
from whom oocytes were obtained*

Number ³	22	20
Age (y)	28.7 ± 2.9	29.3 ± 1.5
BMI (Kg/m ²)	22.9 ± 1.7	23.3 ± 1.6
Basal FSH (mIU/mL)	6.0 ± 1.2	5.9 ± 0.9
Basal LH (mIU/mL)	4.4 ± 1.1	3.7 ± 1.1
Day 3 E ₂ (pg/mL)	36.3 ± 8.9	39.4 ± 11.9
Basal serum leptin levels (day 3) (ng/mL)	21.9 ± 5.5	22.9 ± 3.7
Serum leptin levels/BMI ratio	0.95 ± 0.21	0.98 ± 0.17

¹p < 0.05

²When two follicles/oocytes were analyzed in the same patient, the same BMI was utilized twice in the SPSS database.

³Eight out of 26 patients evaluated had two FF/oocytes analyzable. Four of them showing a different outcome between these two oocytes (one fertilized and the other not) were considered in both groups.

Table 2. Logistic regression model for oocyte fertilization.

	B	Wald	<i>P value</i>
BMI (Kg/m ²)	0.040	0.017	0.896
Age (y)	0.080	0.118	0.731
Basal FSH (mIU/mL)	-0.400	0.711	0.399
Mean follicular diameter (mm)	-0.146	1.209	0.271
Day 3 E ₂ (pg/mL)	-0.065	2.167	0.141
Basal LH (mIU/mL)	1.055	3.600	0.058
Intra-follicular leptin level (ng/mL)	0.208	6.927	0.008

Table 3. Percentage of fertilization of oocytes originating from follicular fluids whose leptin levels were >20.25 ng/mL (group 1) or ≤20.25 ng/mL (group 2), and demographic, anthropometric and hormonal characteristics of patients corresponding to the two groups.

	Follicles whose leptin levels were >20.25 ng/mL (n = 23)	Follicles whose leptin levels were ≤20.25 ng/mL (n = 24)
Oocytes fertilized (%) ¹	85.7	16.7
Intra-follicular leptin levels (ng/mL) ¹	29.0 ± 6.4	13.2 ± 5.7
Intra-follicular leptin levels/BMI ratio ^{1,2}	1.31 ± 0.3	0.6 ± 0.3
Mean follicular diameter (mm)	22.0 ± 4.0	20.3 ± 4.4

Characteristics of the patients

from whom oocytes were obtained

Number ³	21	19
Basal FSH (mIU/mL)	6.0 ± 1.2	5.9 ± 1.0
Basal LH (mIU/mL)	4.2 ± 1.2	3.9 ± 1.1
Day 3 E ₂ (pg/mL)	38.9 ± 9.5	36.4 ± 11.4
Basal serum leptin levels (day 3) (ng/mL)	21.7 ± 5.3	23.1 ± 3.8
Serum leptin levels/BMI ratio	0.93 ± 0.2	1.0 ± 0.18

¹p <0.05

²When two follicles/oocytes were analyzed in the same patient, the same BMI was utilized twice in the SPSS database. ³Eight out of 26 patients evaluated had two FF/oocytes analyzable. Four of them showing leptin levels ≤20.25 ng/mL in one follicle and >20.25 ng/mL in the other, were considered in both groups

Figure 1. Correlation between day 3 serum leptin levels and BMI in the whole study population.

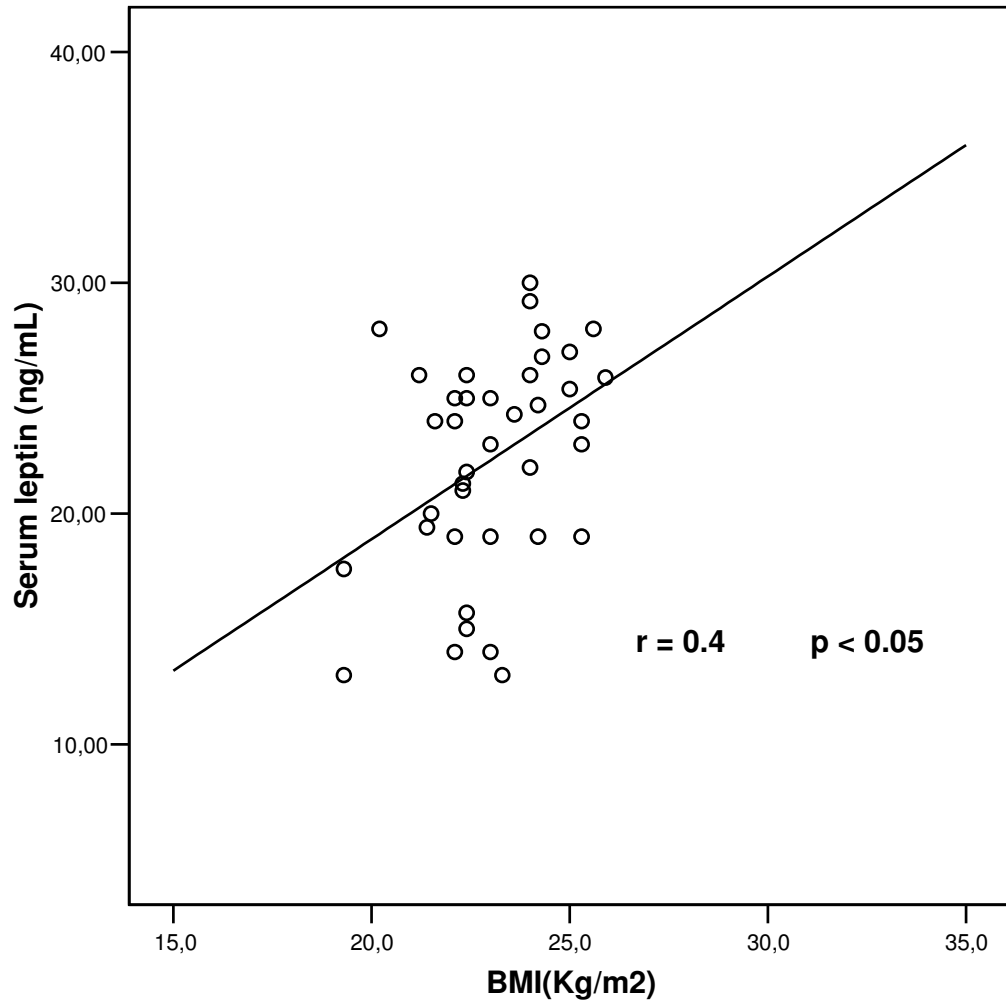


Figure 2. Scattergram of intra-follicular/serum leptin concentration for follicles with non-fertilised and fertilised oocytes.

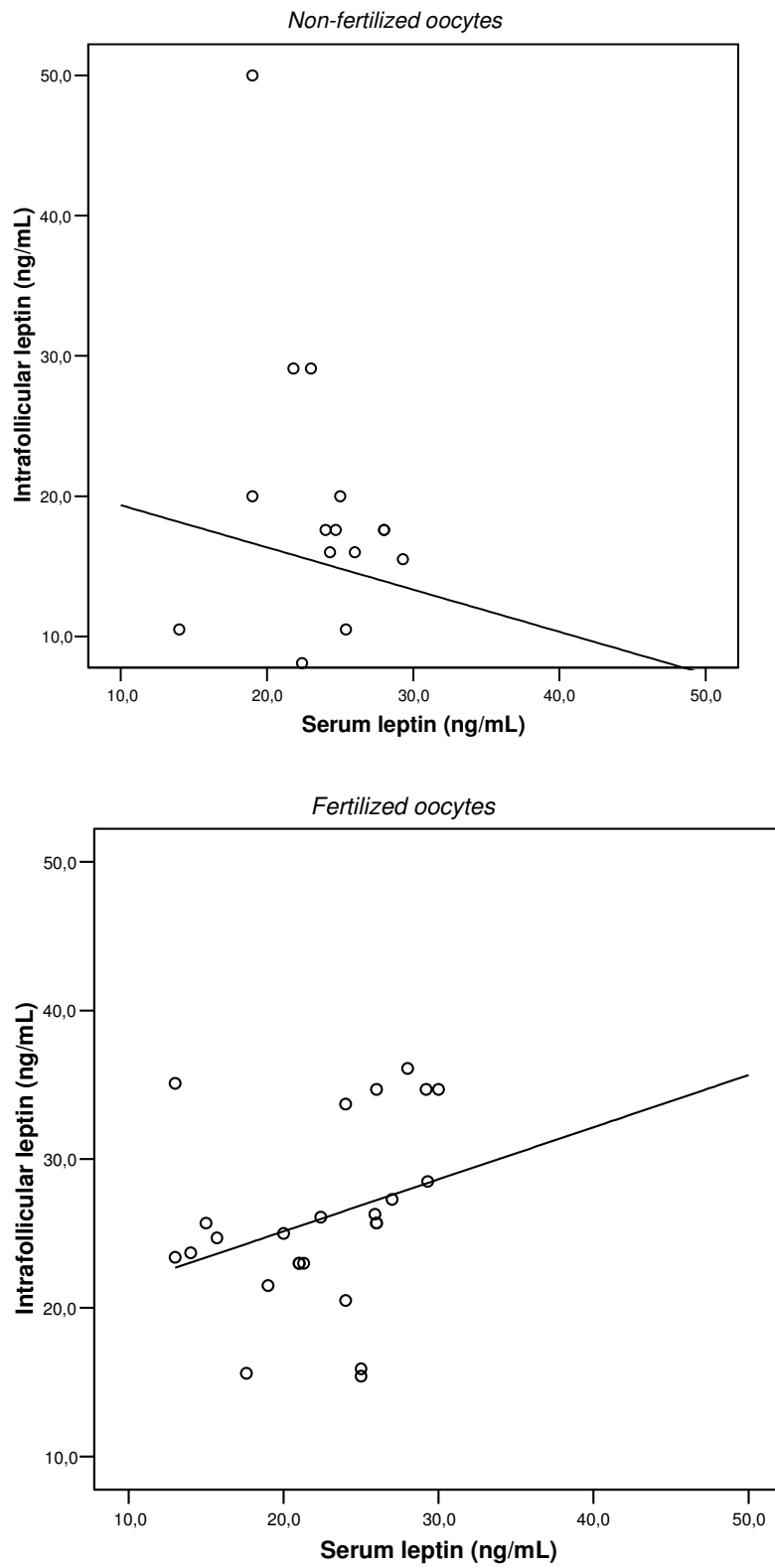


Figure 3. Serum and intra-follicular leptin in follicles with non-fertilised and fertilised oocytes.

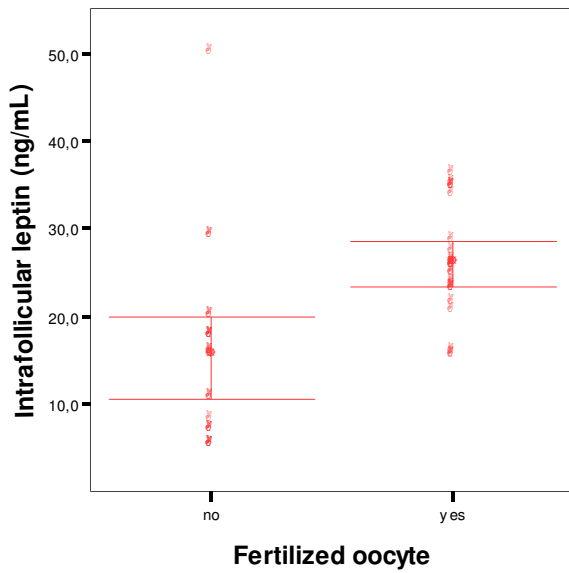
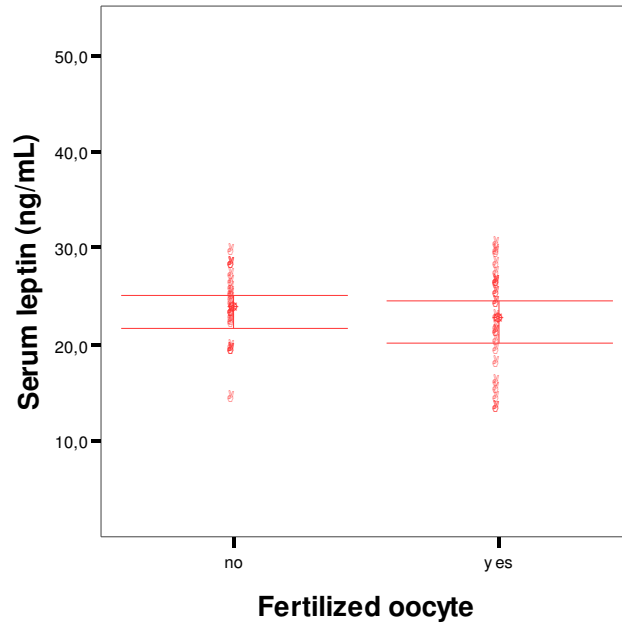
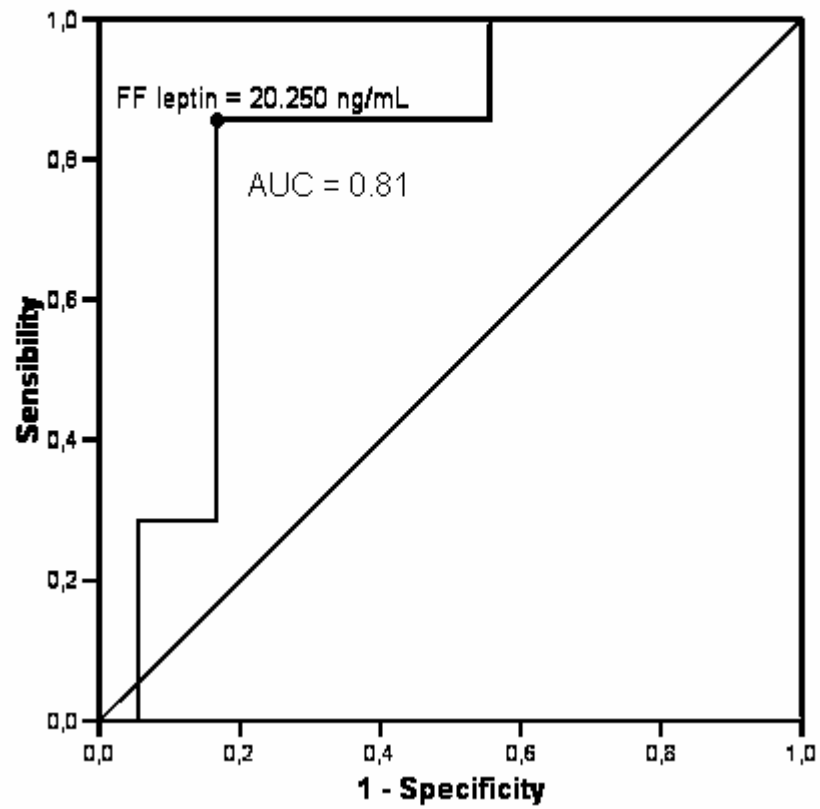


Figure 4. ROC curve for intra-follicular leptin towards oocyte fertilization.



Acknowledgements

The authors would like to thank Christos Mantzoros for the helpful revision of the manuscript.

References

1. Antczak, M. & Van Blerkom, J.V. (1997) Oocyte influences on early development: the regulatory proteins leptin and STAT3 are polarized in mouse and human oocytes and differentially distributed within the cells of the preimplantations stage embryo. *Molecular Human Reproduction*, 3, 1067-1086.
2. Barroso, G., Barrionuevo, M., Rao, P., Graham, L., Danforth, D., Huey, S., Abuhamad, A. & Oehninger, S. (1999) Vascular endothelial growth factor, nitric oxide, and leptin follicular fluid levels correlate negatively with embryo quality in IVF patients. *Fertility and Sterility*, 72, 1024-1026.
3. Brannian, J.D., Zhao, Y. & Mc Elroy, M. (1999) Leptin inhibits gonadotropin-stimulated granulosa cell progesterone production by antagonizing insulin action. *Human Reproduction*, 14, 1445-1448.
4. Bützow, T.L., Moilanen, J.M., Lehtovirta, M., Tuomi, T., Hovatta, O., Sieberg, R., Nilsson, C.G. & Apter, D. (1999) Serum and follicular fluid leptin during in vitro fertilization: relationship among leptin increase, body fat mass, and reduced ovarian response. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 84, 3135-3139.
5. Chan, J.L., Heist, K., De Paoli, A., Veldhuis, J. & Mantzoros, C. (2003) The role of falling leptin levels in the neuroendocrine and metabolic adaptation to short-term starvation in healthy men. *Journal of Clinical Investigation*, 111, 1409-1421.
6. Cioffi, J.A., Shafer, A., Zupancic, T., Smith-Gbur, J., Mikhail, A., Platika, D. & Snodgrass, H.R. (1996) Novel B219/ob receptor isoforms: possible

- role of leptin in hematopoiesis and reproduction. Nature Medicine, 2, 585-588.*
7. Conway, G.S. & Jacobs, H.S. (1997) *Leptin: a hormone of reproduction. Human Reproduction, 12, 633-635.*
 8. De Placido, G., Mollo, A., Alviggi, C., Strina, I., Varricchio, M.T., Ranieri, A., Colacurci, N., Tolino, A. & Wilding, M. (2001) *Rescue of IVF cycles by HMG in pituitary down-regulated normogonadotrophic young women characterized by a poor initial response to recombinant FSH. Human Reproduction, 16, 1875-9.*
 9. De Placido, G., Wilding, M., Strina, I., Alviggi, E., Alviggi, C., Mollo, A., Varricchio, M.T., Tolino, A., Schiattarella, C. & Dale, B. (2002) *High outcome predictability after IVF using a combined score for zygote and embryo morphology and growth rate. Human Reproduction, 17, 2402-2409.*
 10. Erickson, G.F. & Shimasaki, S. (2001) *The physiology of folliculogenesis: the role of novel growth factors. Fertility and Sterility, 76, 943-949.*
 11. Farooqi, I.S., Matarese, G., Lord, G.M., Keogh, J.M., Lawrence, E., Agwu, C., Sanna, V., Jebb, S.A., Perna, F., Fontana, S., Lechler, R.I., De Paoli, A.M. & O'Rahilly, S. (2002) *Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. Journal of Clinical Investigation, 110, 1093-1103.*
 12. Fink, B.N., Kelley, K.W., Dantzer, R. & Johnson, R.W. (1998) *In vivo and in vitro evidence for the involvement of tumor necrosis factor-alpha in the induction of leptin by lipopolysaccharide. Endocrinology, 139, 2278-2283.*

13. Finn, P.D., Cunningham, M.J., Pau, K.Y., Spies, H.G., Clifton, D.K. & Steiner, R.A. (1998) *The stimulatory effect of leptin on the neuroendocrine reproductive axis of the monkey. Endocrinology, 139, 4652-4662.*
14. Foster, D.L. & Nagatani, S. (1999) *Physiological perspectives on leptin as a regulator of reproduction: role in timing puberty. Biology of Reproduction, 60, 205-215.*
15. Friedman, JM. (2002) *The function of leptin in nutrition, weight, and physiology. Nutrition Reviews 60, S1-14.*
16. *Nutrition Reviews 60, S1-14.*
17. Mantzoros, C.S., Cramer, D.W., Liberman, R.F. & Barbieri, R.L. (2000) *Predictive value of serum and follicular fluid leptin concentrations during assisted reproductive cycles in normal women and in women with the polycystic ovarian syndrome. Human Reproduction, 15, 539-544.*
18. Matarese, G. & La Cava, A. (2004) *The intricate interface between immune system and metabolism. Trends in Immunology, 25, 193-200.*
19. Mendoza, C., Ruiz-Requena, E., Ortega, E., Cremades, N., Martinez, F., Bernabeu, R., Greco, E. & Tesarik, J. (2002) *Follicular fluid markers of oocyte developmental potential. Human Reproduction, 17, 1017-1022.*
20. Messinis, I.E., Milingos, S., Zikopoulos, K., Kollios, G., Seferiadis, K. & Lolis, D. (1998) *Leptin concentrations in the follicular phase of spontaneous cycles and cycles superovulated with follicle stimulating hormone. Human Reproduction, 13, 1152-1156.*
21. Messinis, I.E. & Milingos, S.D. (1999) *Leptin in human reproduction. Human Reproduction, 5, 52-63.*

22. Welt, C., Schneyer, A., Heist, K., & Mantzoros, C. (2003) *Leptin and Soluble Leptin Receptor in Follicular Fluid. Journal of Assisted Reproduction and Genetics, 12, 495-501.*
23. Welt, C., Chan, J.L., Bullen, J., Murphy, R., Smith, P., De Paoli, A., Karalis, A. & Mantzoros, C. (2004) *Recombinant human leptin in women with hypothalamic amenorrhea. New England Journal of Medicine, 351, 987-997.*
24. Zachow, R.J. & Magoffin, D.A. (1997) *Direct intra-ovarian effects of leptin: Impairment of the synergistic action of insulin-like growth factor-I on follicle-stimulating hormone-dependent estradiol-17 beta production by rat ovarian granulosa cells. Endocrinology, 138, 847-850.*
25. Zamorano, P.L., Maehsh, V.B., de Sevilla, L.M., Chorich, L.P., Bhat, G.K. & Brann, D.W. (1997) *Expression and localization of the leptin receptor in endocrine and neuroendocrine tissues of the rat. Neuroendocrinology, 65, 223-228.*

Capitolo VI Discussione

6.1 Sistema di *scoring* combinato: valore predittivo nelle tecniche di fecondazione assistita

Le linee di ricerca, sviluppate nel corso del Dottorato, sono state finalizzate a determinare se l'analisi morfologica degli zigoti e degli embrioni potesse avere valore predittivo nei confronti dell'esito delle tecniche di fecondazione assistita.

In una prima fase si è provveduto a valutare il valore predittivo di singoli punteggi attribuiti a ciascuno stadio di sviluppo embrionario. Sulla base di nostre esperienze preliminari e dei dati della letteratura (Edwards et al, 1980; 1984; Cummins et al., 1986; Puissant *et al.*, 1987; Visser and Furie, 1993; Giorgetti *et al.*, 1995; Ziebe *et al.*, 1997; Hu et al.,1998; Scott and Smith, 1998; Tesarik and Greco, 1999), si è inizialmente proceduto alla elaborazione del sistema di *scoring* sperimentale, differenziato per zigoti ed embrioni pre-impianto. Tale sistema è stato, quindi, perfezionato ed ottimizzato sulla base di analisi di correlazione a carattere retrospettivo. Le analisi di correlazione eseguite hanno evidenziato, in primo luogo, come, in corso di coltura *in vitro*, la qualità degli embrioni possa modificarsi significativamente di giorno in giorno: zigoti di alta qualità possono dar vita ad embrioni di qualità scadente e viceversa.

Quando lo *score* attribuito agli zigoti è stato posto in rapporto a quelli assegnati agli embrioni in seconda ed in terza giornata, il coefficiente di correlazione è risultato relativamente basso. Tali

evidenze, analizzate nell'insieme, suggeriscono che le caratteristiche morfologiche di zigoti ed embrioni siano variabili tra di loro indipendenti, laddove le une non risultano affatto predittive nei confronti delle altre.

Risultati altrettanto interessanti sono emersi dalla valutazione del valore predittivo della qualità degli zigoti e degli embrioni, prese singolarmente, nei confronti dell'*outcome* dei cicli di fecondazione assistita. Le percentuali di gravidanza nelle pazienti in cui erano stati trasferiti embrioni di buona qualità, derivanti da zigoti di bassa qualità, sono risultate sovrapponibili a quelle osservate nelle donne in cui erano stati trasferiti embrioni di bassa qualità, derivanti da zigoti di qualità soddisfacente. Sulla scorta di queste evidenze si è ritenuto necessario elaborare e valutare la predittività di uno *score* combinato, che tenesse conto di differenti variabili, quali lo *score* allo stadio di zigote il numero di blastomeri e la morfologia degli embrioni. Una volta messo a punto il sistema, ad ogni embrione è stato attribuito un *weighted score* che è stato messo in relazione ai sopra menzionati parametri di *outcome*.

I dati hanno mostrato come il *weighted score* sia contrassegnato da un valore predittivo significativamente più elevato rispetto ai sistemi di valutazione morfologica tradizionali. Paragonando i risultati ottenuti presso il nostro centro in epoca pre- e post-utilizzo di tale sistema, si è evidenziato un incremento di 1,9% in termini di valore predittivo. Infatti, si è riusciti ad ottenere una percentuale di gravidanza del 75% con una corrispondente percentuale d'impianto del 28,1%, quando è stato possibile trasferire un gruppo di embrioni tutti di alta qualità. Una percentuale d'impianto di 28,1% è un valore da considerarsi elevato, se si tiene conto che la

percentuale d'impianto, dopo il trasferimento di blastocisti, risulta pari al 40% .

Questa percentuale d'impianto, inoltre, appare notevolmente elevata se paragonata a quella ottenuta in questo centro (13-15%) negli anni precedenti.

In conclusione viene supportata l'ipotesi che lo sviluppo degli zigoti e degli embrioni siano due variabili indipendenti tra loro e che entrambe debbano essere opportunamente considerate e elaborate, al fine di migliorare le probabilità di successo nei protocolli di fecondazione assistita.

I dati ottenuti suggeriscono che il presente sistema di *scoring* combinato può essere utilizzato per stabilire una strategia, nei cicli di fecondazione assistita, atta a ridurre il numero di embrioni selezionati per il transfer. Tutto ciò al fine di mantenere alte le percentuali di gravidanza riducendo l'incidenza di gravidanze multiple. Viene inoltre confermato l'impatto dell'età materna sulle probabilità di successo nelle tecniche di fecondazione assistita.

6.2 Livelli intrafollicolari di leptina: valore predittivo nelle tecniche di fecondazione assistita

I livelli intrafollicolari di leptina sono stati correlati ai tassi di fertilizzazione ed allo *score* attribuito a singoli embrioni, sulla base degli specifici parametri morfologici sopra menzionati (De Placido *et al.*, 2002).

Il dato di maggiore rilievo, emerso dalla sperimentazione, è quello relativo alla evidenza di livelli medi di leptina significativamente più elevati nei follicoli il cui l'ovocita è risultato fertilizzato, rispetto alla popolazione follicolare contrassegnata da ovociti non fertilizzati. Tale osservazione trova conferma anche nell'analisi di regressione logistica che ha identificato, nella concentrazione intrafollicolare di leptina, il fattore più predittivo nei confronti della fertilizzazione degli ovociti.

Tale predittività è risultata ancora più evidente allorché le pazienti (o i follicoli di origine) sono state analizzate in funzione delle concentrazioni di ormone; l'identificazione, mediante una curva ROC, di un valore di *cut-off* pari a 20.25 ng/mL ha, infatti, consentito la stratificazione della popolazione di studio in due gruppi, contrassegnati da livelli di leptina intrafollicolari rispettivamente più alti o più bassi. Il sottogruppo di donne con livelli di ormone intrafollicolari più elevati ha mostrato tassi di fertilizzazione significativamente più alti. È interessante osservare come, almeno nella casistica presa in esame, non sia stata evidenziata alcuna correlazione statisticamente significativa tra dimensioni follicolari medie e livelli di leptina. Inoltre le

dimensioni follicolari medie si sono rivelate sovrapponibili nel gruppo di pazienti con evidenza di fertilizzazione e nei soggetti con ovocita maturo non fertilizzato. Anche in questo caso, quando le pazienti sono state suddivise in due sottogruppi sulla base del sopra menzionato *cut-off*, non si sono osservate differenze significative relative alle dimensioni medie dei follicoli di origine. Nell'insieme, queste evidenze suggeriscono che, almeno in caso di riscontro di un diametro medio >15 mm, le dimensioni follicolari non presentano alcuna relazione con la produzione di leptina né, tantomeno, sembrano essere predittive nei confronti della probabilità di fertilizzazione. Al contrario, la produzione di leptina sembra essere indipendente dalle dimensioni dei follicoli stessi e comunque contrassegnata da un più elevato grado di "predittività" nei confronti della qualità ovocitaria, intesa come attitudine alla fertilizzazione. Tale evidenza presenta numerose potenzialità applicative soprattutto dopo la legge in vigore in Italia dal 10 Marzo 2004. Tale legge impedisce che vengano utilizzati più di 3 ovociti per paziente al fine di non ottenere un numero superiore a 3 embrioni da trasferire. I dati emersi dalla nostra sperimentazione suggeriscono che la selezione dei 3 ovociti in ciascuna paziente potrebbe essere basata non solo sulla valutazione di parametri morfologici, ma anche su variabili biochimiche intrafollicolari, quali le concentrazioni di leptina.

I risultati ottenuti sono in apparente contrasto con precedenti evidenze (Barroso *et al.*, 1999; Messinis *et al.*, 1999; Mantzoros *et al.*, 2000) suggestive di una correlazione inversa tra livelli intrafollicolari di leptina ed esito dei programmi di PMA. Tale discrepanza può derivare dal fatto che questi studi erano stati

finalizzati a valutare correlazioni tra le concentrazioni cumulative di leptina intrafollicolare e tassi di gravidanza; in altre parole, era stata analizzata la relazione tra la media delle concentrazioni di molecola rilevate in un *pool* di follicoli ed alcune variabili categoriche, quali i tassi di impianto e di gravidanza. In tal modo non era risultato possibile valutare se l'evento impianto o gravidanza fosse attribuibile allo specifico ovocita/follicolo in cui era stata misurata la produzione di leptina. Nel presente studio, al contrario, è stato eseguito un vero e proprio *follow up*, dal recupero al trasferimento in utero, di ogni singolo ovocita/embrione; tale evoluzione è stata quindi rapportata alle concentrazioni di molecola nel follicolo di origine. Questa procedura non consente di effettuare alcuna analisi di correlazione tra livelli di ormone e tassi di gravidanza; infatti tale analisi sarebbe realizzabile soltanto nell'ipotesi teorica di un trasferimento in utero esclusivamente di ovociti/embrioni testati per leptina nel follicolo di origine. Tuttavia, essa risulta certamente più accurata ai fini dell'analisi della correlazione tra leptina e "qualità" sia ovocitaria (intesa in termini di tassi di fertilizzazione), sia embrionaria, valutata attraverso sistemi di *scoring* opportunamente validati. In tale contesto è importante sottolineare che, quando i livelli intrafollicolari di leptina sono stati esaminati rispetto allo *score* embrionario, sia attribuito nei differenti stadi di sviluppo sia cumulativo, non è stata evidenziata alcuna correlazione significativa.

I dati ottenuti nella presente sperimentazione sembrano suggerire che, in corso di follicologenesi, ci sia una produzione locale di leptina. Tali ipotesi è sostenuta dal fatto che la correlazione positiva, statisticamente significativa, osservata tra livelli sierici di

leptina e BMI nella popolazione in esame, viene persa nel momento in cui si prendono in considerazione le concentrazioni intrafollicolari di ormone. E' interessante notare come tale discrepanza risulti maggiormente evidente nel gruppo di pazienti con livelli intrafollicolari di leptina elevati (gruppo 1), laddove, nella popolazione con livelli di ormone più bassi (gruppo 2), il test di Pearson ha evidenziato un valore di P pari a 0.06. Tali evidenze sono in accordo con diversi lavori presenti in letteratura che dimostrano come la leptina sia prodotta direttamente dalle cellule della granulosa ed estrinsechi la propria attività a livello follicolare (Antezak *et al.*, 1997; Zachow and Magoffin, 1997; Brannian *et al.*, 1999).

In conclusione, è possibile ipotizzare che i livelli intrafollicolari di leptina siano da considerare un'espressione indiretta dell'attività delle cellule della granulosa. Questa attività, a propria volta, potrebbe riflettere aspetti di maturazione e "qualità" dell'ovocita. In tale ottica, lo stadio di maturazione dell'ovocita, inteso come raggiungimento dell'assetto intracitoplasmatico e nucleare più favorevole alla fecondazione, sembrerebbe essere correlabile più ad un parametro biochimico, quale la produzione intrafollicolare di una molecola solubile, che alle dimensioni del follicolo di origine. L'assenza di correlazioni statisticamente significative tra concentrazioni intrafollicolari di leptina e qualità embrionaria nelle tecniche di fecondazione assistita, lascia ipotizzabile che nello sviluppo dell'embrione siano maggiormente coinvolte altre variabili, quali la qualità del liquido seminale e l'età materna. Se i risultati riportati dovessero trovare conferma, la valutazione della concentrazione intrafollicolare di leptina potrebbe

rappresentare un utile strategia nella selezione degli ovociti da destinare alle tecniche di fecondazione assistita.

Ringraziamenti:

Vorrei, in primo luogo ringraziare il professore Giuseppe De Placido che mi ha dato l'opportunità di intraprendere il cammino del Dottorato di Ricerca e che in questi anni mi ha sempre appoggiato ed incoraggiato.

I miei sentiti ringraziamenti vanno a mio fratello Carlo, che è sempre riuscito a ritagliare per me un po' del suo tempo, al dott. Martin Wilding, il mio maestro, come mi piace scherzosamente chiamarlo, alla dottoressa Ida Strina che ha sempre dimostrato di credere in me e nelle mie capacità.

Una ringraziamento speciale va ai miei genitori ed a Fabrizio, sempre presenti al mio fianco nei momenti di difficoltà ed indecisione.