

Università degli Studi di Milano  
**Corso di dottorato di ricerca in Scienze della Nutrizione, XXIX Ciclo**  
Settore Scientifico disciplinare di afferenza: MED/40. Settore Concorsuale di afferenza: 06/H

*Ruolo di vitamine e micronutrienti nella  
diagnosi e cura dell'infertilità di coppia*

Coordinatore

Prof. Gian Vincenzo Zuccotti

Tutor

Prof. Fabio Parazzini

**Presentata da**

**Dott. Alessio Paffoni**

Esame Finale

# Sommario

## Introduzione

## Scopo del progetto

## Focus sulle vitamine e i microelementi oggetto del lavoro di tesi.

Vitamina D

Acido folico

Vitamina B12

Omocisteina

Vitamina A

Vitamina E

Ferro e Ferritina

## Materiali e metodi

Studio 1: “Vitamina D e tasso di gravidanza in cicli IVF”

Studio 2: “Vitamina D e concordanza tra livelli sierici dei partner”

Studio 3: “Livelli sierici di vitamina D in donne fertili versus donne sub-fertili”

Studio 4: “Livelli di Folato, Omocisteina, Vitamina B12, Vitamina A, Vitamina E, Ferro, Ferritina”

Studio 5: “Folato, Omocisteina, Vitamina B12 e tasso di gravidanza in cicli IVF”

## Risultati

Studio 1: “Vitamina D e tasso di gravidanza in cicli IVF”

Studio 2: “Vitamina D e concordanza tra livelli sierici dei partner”

Studio 3: “Livelli sierici di vitamina D in donne fertili versus donne sub-fertili”

Studio 4: “Livelli di Folato, Omocisteina, Vitamina B12, Vitamina A, Vitamina E, Ferro, Ferritina”

Studio 5: “Folato, Omocisteina, Vitamina B12 e tasso di gravidanza in cicli IVF”

## Riassunto dei risultati

## Discussione

Vitamina D

Folato

Vitamina A, vitamina E, ferro e ferritina

## Conclusioni

## Bibliografia

## Acknowledgment

## Allegati

Pubblicazioni scientifiche relative alla tesi di dottorato

Progetto di ricerca RF-2013-02358757

# Introduzione

Molteplici fattori influenzano lo sviluppo dell'embrione e del feto: tra questi rivestono particolare importanza la competenza biologico-genetica del concepito e l'interazione con l'ambiente uterino. Quest'ultimo aspetto trova un elemento cardine nell'alimentazione materna, ritenuta essere da molti Autori in stretta relazione con il successo riproduttivo. Benché nei Paesi industrializzati sia possibile seguire diete bilanciate, sono frequenti abitudini che favoriscono regimi alimentari caratterizzati da elevati introiti di grassi e scarsi introiti di minerali e vitamine. Questa condizione si verifica anche durante la gravidanza rappresentando un rischio per la salute materno-fetale (Parisi, 2014). Il processo riproduttivo umano, da un punto di vista probabilistico, è considerato inefficace. Si pensi, infatti, che circa il 50% degli zigoti che si formano dall'incontro dei gameti femminile e maschile viene perso prima dell'impianto o nelle sue prime fasi di sviluppo; una quota addizionale (circa il 15-20%) di embrioni impiantati in utero è destinata ad essere perduta prima del parto. Inoltre, considerando i bambini nati, è importante sottolineare l'incidenza di difetti congeniti in una percentuale variabile tra 1 e 3% (Eurocat website). Nonostante la ricerca scientifica aggiunga progressivamente elementi al processo di comprensione del fallimento riproduttivo, i meccanismi alla base dell'arresto embrionario e delle malformazioni neonatali rimangono ampiamente sconosciuti. Se, ad esempio, si sommano tutti i contributi noti alle cause di malformazione congenita (di tipo genetico sporadico, ereditario, di origine uterina o legati alla gemellarità) si riesce a spiegare poco più della metà degli eventi osservati (Nelson & Holmes, 1989). In questo ambito, esistono alcuni modelli di studio importanti. Uno di essi è rappresentato dal ritardo di crescita intrauterino (IUGR) che è considerato un marcatore di complicanze gravidiche. Nei Paesi industrializzati, secondo l'OMS, l'incidenza di IUGR è pari a circa il 5%, ma nei Paesi in via di sviluppo può raggiungere il 50% (Kelly, 1996). Benché una serie di fattori di rischio siano ormai noti per lo sviluppo di IUGR (fumo, ipertensione, gemellarità...), molto spesso non è possibile identificare una causa certa. Un altro indicatore del successo riproduttivo è, ovviamente, il

tasso di morte in età perinatale che, similmente all'incidenza di IUGR, è caratterizzato da forte disparità nel mondo. Esso infatti varia da 5 a oltre 100 casi ogni 10000 nascite nei Paesi industrializzati e in quelli in via di sviluppo, rispettivamente (WHO Widget, 2016). Le morti materne rappresentano parimenti un indice del successo riproduttivo e, anche in questo caso, si osserva un'incidenza fino a 100 volte superiore nei Paesi in via di sviluppo (WHO Widget, 2016). Nonostante la possibile concomitanza di numerosi fattori confondenti, è lecito ascrivere queste disparità al profilo nutrizionale della popolazione, anche in riferimento ai livelli di micronutrienti (Kramer, 2005). Esistono a questo proposito alcune evidenze che meritano di essere presentate. Un importante studio randomizzato condotto in Nepal ha evidenziato una significativa riduzione del tasso di mortalità materna (superiore al 40%) introducendo la supplementazione a basse dosi di vitamina A o del suo precursore, il  $\beta$ -carotene (West, 1999). Ulteriori evidenze sul ruolo della supplementazione di magnesio, vitamina C, vitamina E nella riduzione delle complicanze ostetriche suggeriscono che il profilo nutrizionale possa effettivamente rivestire un ruolo chiave per la salute materno-fetale (Altman, 2002; Chappell, 1999). La correlazione tra malnutrizione e compromissione delle difese immunitarie, con conseguente sviluppo di processi infettivi, può certamente spiegare molti degli effetti avversi osservati nei Paesi caratterizzati da diete troppo povere o sbilanciate. Non stupisce dunque che la supplementazione di micronutrienti necessari allo sviluppo delle difese immunitarie o alle corrette funzioni del metabolismo energetico possa, almeno in parte, migliorare la prognosi riproduttiva di specifiche popolazioni.

Il ruolo della nutrizione o dei livelli di micronutrienti è più nebuloso nel determinare l'incidenza di malformazioni congenite nei prodotti del concepimento. Esistono, tuttavia, importanti eccezioni rappresentate al meglio dalla correlazione tra bassi livelli di folato e incidenza di difetti del tubo neurale (DTN) nel feto (Czeizel and Dudas, 1992; Li, 2016). Alcuni modelli sperimentali hanno fornito solide basi di studio in questo specifico ambito. Già negli anni Trenta era stato dimostrato che le scrofe private di vitamina A nella loro dieta generassero prole caratterizzata da disturbi dello sviluppo con malformazioni multisistemiche (Hale, 1933). Si è poi assistito allo sviluppo della teratologia che ha

incluso, nei diversi settori di indagine, l'utilizzo di diete particolari per evidenziare l'effetto di specifiche carenze nutrizionali sui difetti congeniti nei concepimenti (Warkany, 1944).

Il successo riproduttivo non è tuttavia misurabile solo valutando il percorso che va dallo zigote alla nascita; è fondamentale considerare la fase pre-concezionale che è caratterizzata, nella specie umana, da un elevato numero di cicli ovulatori in cui la formazione dello zigote o l'impianto non avvengono o si interrompono molto precocemente. Si tratta di un fenomeno che, quando si verifici con frequenza superiore all'atteso, determina lo status di infertilità o sterilità di coppia. L'infertilità di coppia rappresenta anch'essa un modello di studio del processo riproduttivo ed è determinata da molteplici fattori, talvolta concomitanti, che sono noti solo in parte. Nello specifico, è possibile evidenziare una causa di infertilità per buona parte delle coppie interessate, ma per circa il 25-30% delle coppie il percorso diagnostico non esita nell'identificazione di una causa certa. Le coppie vengono in questi casi definite affette da infertilità inspiegata o idiopatica. Mentre i fattori più comuni di infertilità (insufficiente qualità del liquido seminale, disturbi ovulatori, fattori morfologici femminili) possono essere oggetto di terapie mirate, i casi di infertilità inspiegata rappresentano un challenge sia diagnostico che terapeutico (Somigliana, 2016). Di fatto, le tecniche di procreazione medicalmente assistita trovano largo impiego anche qualora non sia possibile identificare con certezza un fattore eziologico, ma questa evidenza non toglie interesse allo studio di nuovi elementi utili a definire il potenziale di fertilità delle coppie. Anche in questo ambito, la nutrizione e i livelli di micronutrienti rappresentano un target di ricerca importante per due aspetti principali: 1) la nutrizione come causa di una parte di infertilità inspiegate e 2) lo status nutrizionale come variabile determinante per le probabilità di successo delle tecniche di PMA, applicate indipendentemente dalle cause di infertilità.

# Scopo del progetto

Questo progetto di dottorato di ricerca ha avuto come obiettivo lo studio di specifici analiti in coppie infertili, con particolare riferimento alle probabilità di successo, in termini di gravidanza, rispetto alle situazioni di carenza/insufficienza. Gli analiti sono stati scelti sulla base di precedenti evidenze scientifiche che suggerissero un loro ruolo nella fisiopatologia della gravidanza o nell'eziopatogenesi dell'infertilità di coppia, come descritto di seguito. Con questi criteri è stato quindi possibile studiare micronutrienti di interesse per la diagnosi/cura delle coppie infertili e per la fisiologia di una eventuale gravidanza ottenuta a seguito dall'applicazione di tecniche di procreazione medicalmente assistita (PMA).

# Focus sulle vitamine e i microelementi oggetto del lavoro di tesi.

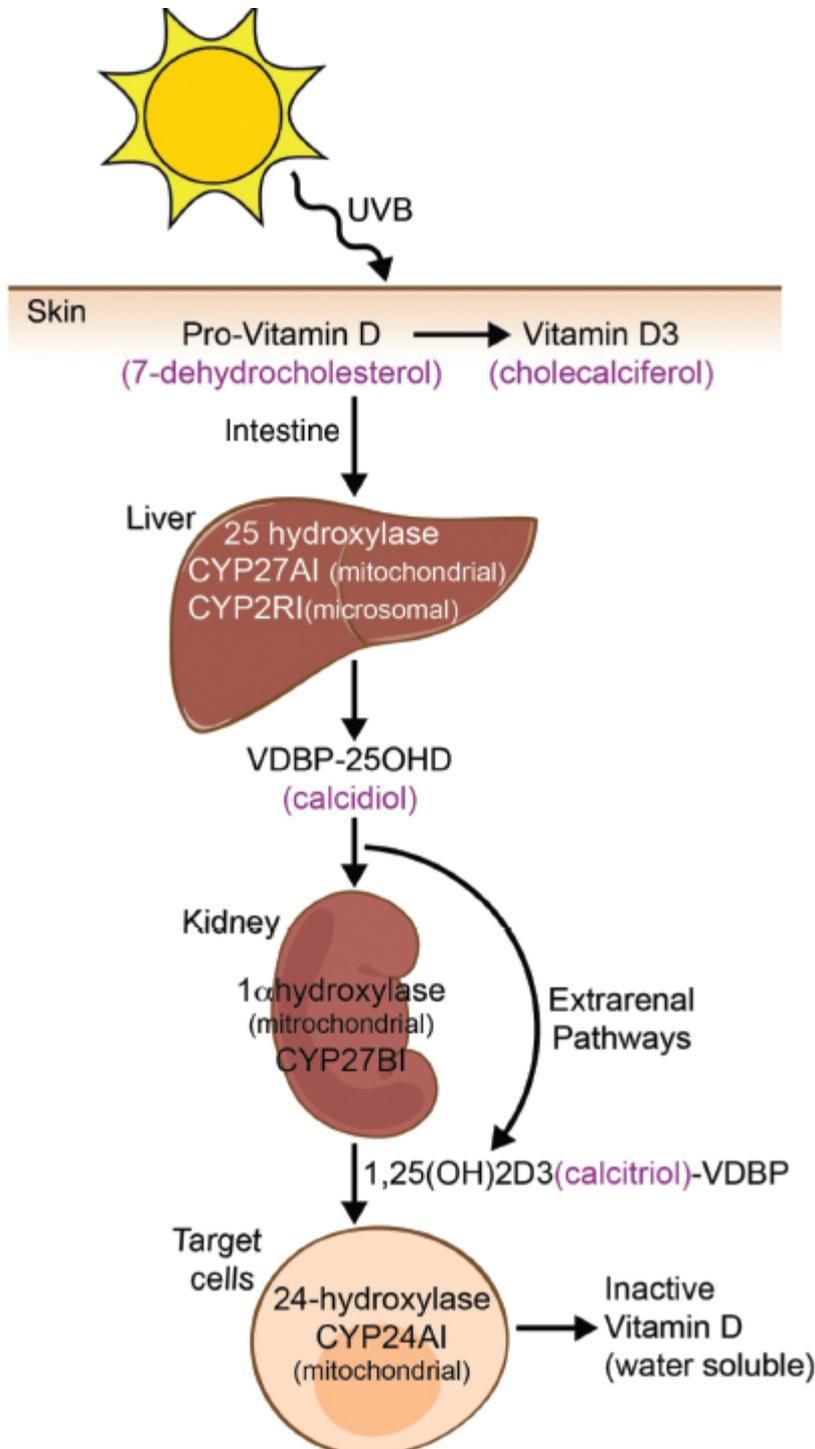
## Vitamina D

### Descrizione generale

La Vitamina D è un ormone steroideo classicamente noto per il suo ruolo nel mantenimento dell'omeostasi del calcio e fosforo e quindi sul metabolismo osseo. Carenze di vitamina D sono ben note essere alla base di condizioni patologiche quali rachitismo e osteomalacia. Da un punto di vista etimologico, non si tratta di una vitamina in senso stretto, in quanto l'organismo umano è in grado di sintetizzarla e solo una minima parte (5-10%) viene assunta con la dieta. L'esposizione ai raggi ultravioletti permette la sintesi di vitamina D nell'epidermide e rappresenta la principale fonte per gli essere umani. esistono due forme principali di rilievo per la salute umana: la vitamina D<sub>2</sub>, o ergocalciferolo, è di origine vegetale e rappresenta una minima parte della vitamina D biodisponibile per l'uomo; la vitamina D<sub>3</sub>, o colecalciferolo, è la forma di origine animale a cui ci si riferisce in genere.

Il precursore cutaneo della vitamina D è il 7-deidrocolesterolo e deriva dal colesterolo contenuto nei cibi. L'esposizione alle radiazioni UVB comporta la trasformazione in pre-vitamina D<sub>3</sub>; dalla stessa reazione originano due sottoprodotti inattivi, il luminosterolo e il tachisterolo. La vitamina D, in forma inattiva, viene trasportata nel sangue legata a un complesso proteico (VDBP). A livello epatico subisce una prima idrossilazione a 25-idrossivitamina D (25(OH)D) che rappresenta la forma di vitamina D, biologicamente non attiva, su cui si basano i dosaggi ematici. Una seconda idrossilazione è necessaria per ottenere la forma biologicamente attiva, la 1 $\alpha$ -25-diidrossivitamina D (1,25(OH)D) o calcitriolo.

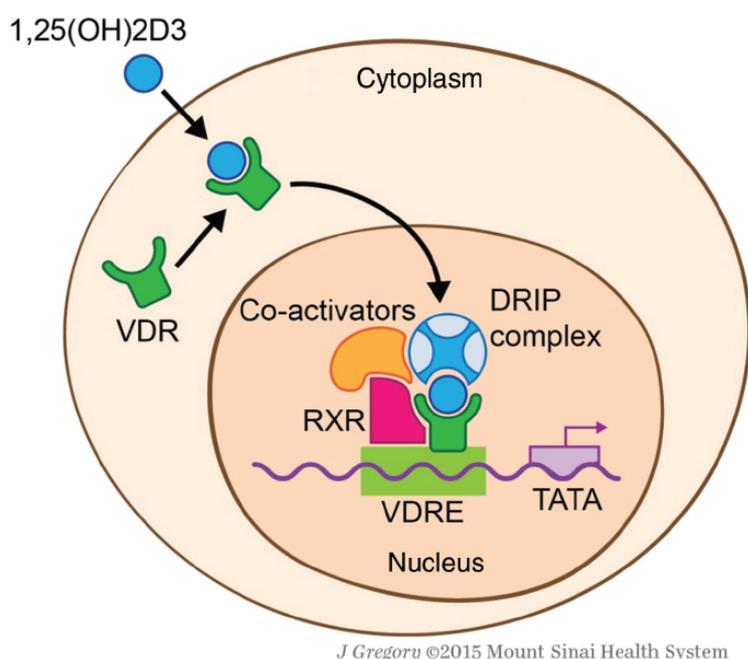
L'enzima che rende possibile l'attivazione della vitamina D (CYP27B1) è presente nel tubulo prossimale renale e nella maggior parte dei tessuti periferici, a dimostrazione della possibilità dell'organismo di regolare localmente i livelli di espressione di vitamina D.



*J Gregory ©2015 Mount Sinai Health System*

La 1,25(OH)D viene trasportata nel sangue legata a VDBP e raggiunge le cellule bersaglio. Come ormone liposolubile, attraversa le membrane cellulari e lega il recettore intracitoplasmatico VDR per

essere poi traslocata nel nucleo; qui interagisce con numerosi co-fattori per assemblare un complesso trascrizionale in grado di legare specifiche sequenze di DNA in regioni promotrici di molti geni (Figura). Gli elementi in grado di legare il complesso trascrizionale vengono definiti “Vitamin D responsive elements” (VDRE). In questo modo la vitamina D esercita la propria funzione di ormone-fattore trascrizionale con effetti genomici: circa il 2-3% dei geni umani possono essere regolati dalla vitamina D.



Il recettore della vitamina D (VDR) possiede inoltre la capacità di interagire con ligandi che mediano azioni non genomiche, quindi più rapide, all’interno della cellula, quali apertura dei canali del calcio e attivazione della fosfolipasi C (Haussler 2011).

Livelli auspicabili di 25(OH)D nel siero sono uguali o superiori a 30 ng/ml (Holick, 2011). Stati carenziali sono caratterizzati da livelli <10 ng/ml. Livelli maggiori o uguali a 20 ng/ml sono ritenuti sufficienti (Ross, 2011). Una consistente proporzione di soggetti nei Paesi industrializzati mostra livelli carenziali o insufficienti di vitamina D. Questa situazione è in larga parte dovuta alla ridotta esposizione al sole conseguente agli stili di vita, all’abbigliamento e alle condizioni climatiche del luogo di residenza. Per questo motivo è suggerita una integrazione di vitamina D tramite supplementazione orale

specialmente per i soggetti più a rischio di carenza (donne gravide, anziani).

La funzione maggiormente nota della vitamina D è la regolazione del metabolismo di calcio e fosforo: gli attori principali di questa regolazione sono l'intestino, l'osso e le ghiandole paratiroidi. Negli enterociti, la vitamina D induce la sintesi della proteina che lega il calcio permettendo l'assorbimento attraverso la membrana; anche il rilascio di calcio dagli enterociti è controllato dal calcitriolo che agisce su uno specifico trasportatore di membrana ATP-dipendente. A livello osseo, il calcitriolo stimola sia l'osteoclasto-genesi che il riassorbimento osseo agendo sulla funzione degli osteoblasti. Nelle ghiandole paratiroidi, la 1,25(OH)D regola la proliferazione cellulare e la trascrizione genica in modo determinante per la corretta crescita dell'organismo.

Negli anni più recenti l'espressione del recettore VDR è stata confermata in molti organi e tessuti quali cellule immunitarie, pancreas, sistema cardiaco e muscolo-scheletrico, organi riproduttivi. Parallelamente, la carenza di vitamina D è stata associata a svariati quadri patologici come tubercolosi, diabete di tipo 1, sclerosi multipla, nefrite, ipertensione, ipertrofia cardiaca.

## **Ruolo nella gravidanza**

E' disponibile molta letteratura che indaga gli effetti avversi della carenza di vitamina D materna sulla gravidanza. L'importanza della vitamina D in gravidanza può, almeno in parte, risultare dalla sua funzione nella decidua uterina, l'interfaccia materno-fetale. La vitamina D attiva viene prodotta sia nei tessuti materni che in quelli fetali e il suo recettore VDR è riscontrabile sia nella placenta che nella decidua. In linea con queste osservazioni, è descritta una correlazione inversa tra livelli di vitamina D e insorgenza di complicanze quali diabete gestazionale, preeclampsia, parto pretermine e basso peso alla nascita: secondo una recente meta-analisi (Wei, 2013), l'Odds Ratio (OR) per questi eventi avversi è significativamente aumentato per le donne con bassi livelli ematici di vitamina D (<20 ng/ml) ed è rispettivamente pari a 2.09 (95% confidence intervals 1.50-2.90), 1.38 (1.12-1.70), 1.58 (1.08-2.31) e 1.52 (1.08-2.15). Un lavoro analogo (Aghajafari, 2013) ha valutato i dati presenti in 3357 studi

osservazionali originali concludendo che livelli insufficienti di 25(OH)D sono associati a diabete gestazionale (pooled OR 1.49, 95% confidence interval: 1.18 - 1.89), pre-eclampsia (1.79, 1.25 - 2.58), e ritardo di crescita intrauterino (1.85, 1.52 - 2.26). Inoltre è stato osservato che donne gravide con bassi livelli sierici di vitamina D hanno una maggiore incidenza di vaginosi batteriche e di bambini con basso peso alla nascita.

Sono dunque molteplici le evidenze a favore di un'associazione tra insufficienza di vitamina D e le comuni complicanze ostetriche. Tuttavia, studi randomizzati che abbiano valutato l'effetto della supplementazione di vitamina D in gravidanza non sono riusciti a evidenziarne con estrema chiarezza un possibile ruolo benefico.

## **Ruolo nella fertilità**

Il ruolo della vitamina D nella fisiopatologia della riproduzione è stato studiato in diversi modelli animali. A supporto di un possibile coinvolgimento della vitamina D nella fertilità, c'è il riscontro della sua attività e del suo recettore negli organi riproduttivi. Di fatto, l'attività della vitamina D, riscontrabile dall'espressione del recettore e dalla presenza dell'enzima  $\alpha$ -idrossilasi indispensabile per la produzione della forma attiva, è stata dimostrata negli organi centrali, soprattutto ipotalamo e sostanza nigra, come negli organi periferici di entrambi i sessi (dotti testicolari, cellule di Sertoli e Leydig, cellule germinali mature e immature, utero, ovaio, placenta...) (Nandi, 2016). I topi knock-out per il recettore della vitamina D hanno un fenotipo riproduttivo compromesso, ed evidenziano dunque un ruolo chiave della vitamina D nella riproduzione. In particolare, i topi maschi mostrano anomalie istologiche del testicolo mentre topi di sesso femminile presentano ipoplasia uterina e alterazione della follicologenesi. L'attività gonadica di sintesi degli estrogeni a carico dell'aromatasi è significativamente diminuita rispetto ai topi wild type (Erben, 2002; Kinuta, 2000). Questi topi mostrano un quadro endocrinologico di ipogonadismo ipergonadotropo (elevati livelli di LH e FSH), sottolineando l'importanza delle azioni

periferiche della vitamina D sulle gonadi. I ratti maschi privati di vitamina D dallo svezzamento alla maturità sessuale hanno una riduzione significativa della fertilità rispetto ai controlli (Kwiecinski 1989). Nell'uomo, si è osservata una correlazione positiva tra livelli di vitamina D e testosterone (Wehr, 2010), ma non esistono evidenze conclusive sulla correlazione tra vitamina D e qualità del liquido seminale (Hammoud, 2012).

Alcuni importanti fattori femminili di infertilità sono stati messi in correlazione con i livelli sierici di 25(OH)D. Tra questi, la sindrome dell'ovaio policistico (PCOS), che rappresenta un comune disturbo del quadro endocrinologico femminile, è stata riscontrata in associazione a insufficienti livelli di vitamina D in circa il 67-85% dei casi (Thomson, 2012). Uno specifico polimorfismo del gene VDR, rs757343, è stato correlato con la severità fenotipica della PCOS (Zadeh-Vakili, 2013). Poichè, tuttavia, la maggior parte delle donne affette da PCOS presenta disturbi metabolici/endocrinologici, non è chiaro se la vitamina D possa influenzare direttamente la manifestazione clinica della malattia o se sia, piuttosto, indirettamente coinvolta tra le alterazioni endocrinologiche osservate. Per quanto riguarda l'endometriosi, altra comune causa di infertilità femminile, la vitamina D sembra avere un ruolo nella modulazione degli effetti della patologia. Nel modello animale, il trattamento con vitamina D nella forma attiva ha mostrato significativi miglioramenti clinici limitando la progressione della malattia (Mariani, 2012; Yildirim, 2014; Abbas, 2013). Anche l'insorgenza di fibromi uterini, la più frequente causa di chirurgia riproduttiva, è riportata essere maggiore in soggetti caratterizzati da bassi livelli di vitamina D (Paffoni, 2013). Non solo, in vitro e nell'animale (ratto di Eker), la vitamina D si è mostrata efficace nel ridurre le dimensioni delle lesioni fibromatose tanto da suggerire un possibile ruolo terapeutico anche per l'uomo (Blauer, 2009; Halder, 2012). Diversi meccanismi sono stati indicati come plausibili per spiegare l'efficacia del calcitriolo nella regressione dei fibromi uterini: in generale, si ritiene che la vitamina D possa esercitare un doppio ruolo che prevede, da una parte, la promozione di fenomeni anti-proliferativi, e dall'altra il rimodellamento della matrice-extracellulare permettendo, nel complesso, la riduzione delle lesioni trattate (Halder, 2011 e 2013; Sharan, 2011).

Le coppie che si sottopongono a trattamenti per la cura dell'infertilità rappresentano un buon modello di studio per la riproduzione anche se, per molti aspetti, non traslabile alla popolazione generale. Uno studio prospettico di alcuni anni fa (Ozkan, 2010) ha identificato nei livelli di vitamina D di donne sottoposte a fecondazione in vitro (IVF) un fattore indipendente in grado di predire le probabilità di successo. Tuttavia, come evidenziato in una recente metanalisi (Vanni, 2014), studi successivi non sono stati in grado di confermare un effetto negativo di valori insufficienti di vitamina D sulle probabilità di gravidanza con IVF. In particolare, come deducibile da tre pubblicazioni indipendenti, livelli sierici <20 ng/ml di 25(OH)D sono stati associati a un Risk Ratio pari a 0.9 (95%CI: 0.5-1.5) di gravidanza clinica rispetto a valori sufficienti, quindi inferiore ma statisticamente non significativo.

## **Acido folico**

### **Descrizione generale**

L'acido folico (acido pteroil(mono) glutammico) è una vitamina idrosolubile del gruppo B (vitamina B9) che ha un ruolo chiave come coenzima nei processi metabolici che coinvolgono unità monocarboniose e omocisteina, nonché nella sintesi, riparazione e metilazione del DNA e, in generale, quando sono implicate intense fasi di crescita e divisione cellulare. E' ben nota l'importanza dell'acido folico per la produzione di eritrociti e per la prevenzione delle forme di anemia su base nutrizionale (Dugdale 2001). L'acido folico è largamente presente in diverse fonti alimentari quali verdure a foglia verde, frutta, fegato, pane... Un deficit di folato comporta una riduzione della sintesi di DNA e la conseguente riduzione della divisione cellulare si traduce in forme di anemia, leucopenia e trombocitopenia (FAO/WHO report, 2004). Inoltre la carenza di acido folico è causa di innalzamento dei valori plasmatici di omocisteina che è implicata in diversi stati patologici come trombosi venosa e arteriosa, neuropatie, demenza e patologie cardiovascolari (si veda oltre). Infine il folato ha proprietà antiossidanti che permettono di proteggere le membrane cellulari e gli acidi nucleici dagli insulti dei radicali liberi

dell'ossigeno (Joshi, 2001).

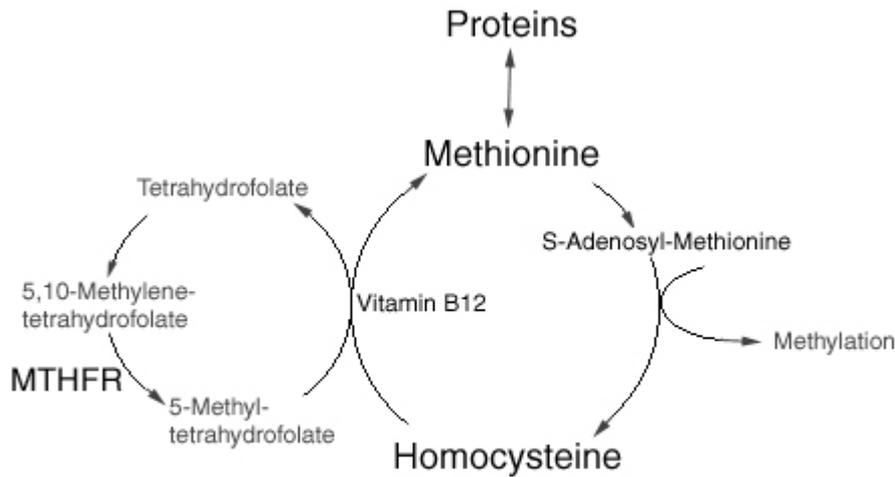
## **Ruolo nella gravidanza**

Oltre 25 anni orsono, il “Medical Research Council Vitamin Study Research Group” ha condotto uno studio randomizzato controllato su larga scala con 1817 donne da 33 centri in sette Paesi per valutare l'effetto dell'acido folico sulla ri-presentazione di difetti del tubo neurale (DTN) e ha mostrato che la supplementazione di 4 mg di acido folico al giorno abbassa il rischio di DTN del 72%

rispetto al gruppo di controllo (senza integrazione di acido folico) (MRC Vitamin Study Research Group, 1991). Un altro importante studio randomizzato controllato è stato condotto da Czeizel et al. nelle donne ungheresi senza storia di NTD. In questo studio, non si è registrato alcun caso di NTD tra 2104 donne che hanno ricevuto multivitaminici contenenti 0,8 mg di acido folico al giorno, mentre si sono riscontrati sei casi di NTD tra 2052 donne che hanno ricevuto soltanto micronutrienti in tracce e vitamina C. Ulteriori studi hanno evidenziato come il folato può fortemente influenzare l'outcome gravidico e il rischio di difetti congeniti alla nascita: una recente Cochrane review ha confermato che la supplementazione di acido folico previene l'insorgenza di DTN (De-Regil, 2015). Livelli inadeguati di folato materno sono inoltre stati messi in correlazione con bambini di basso peso alla nascita, parto pretermine e ritardo di crescita fetale (Fekete, 2012), seppur con evidenze non sempre conclusive (Lassi, 2013). Nel 1995, uno studio caso-controllo (Daly, 1995) ha riportato una relazione dose-risposta tra la concentrazione di folati nei globuli rossi e rischio di difetti del tubo neurale e ha definito che una concentrazione di folati intraeritrocitari  $\geq 906$  nmol/l (400 ng/ml) può fornire una protezione ottimale contro l'insorgenza di NTD. Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità, i livelli di folati raccomandabili per le donne in età riproduttiva al fine di ridurre al minimo l'incidenza di NTD sono stabiliti in 400 ng/ml per la frazione intraeritrocitaria; non sono invece indicate soglie specifiche rispetto al folato sierico (WHO, 2015). Per la popolazione generale, i livelli di folato sierico ritenuti adeguati si basano sul rischio cardiovascolare e si riferiscono in genere a concentrazioni  $>6.6$  ng/ml.

Benché le raccomandazioni per l'assunzione di acido folico nel periodo pre-concezionale (in misura di 0.4-0.8 mg/die per almeno un mese prima del concepimento e per i due-tre mesi successivi), siano condivise da alcuni decenni, la maggior parte delle donne non fa corretto uso di supplementazione (Bestwick, 2014). Molte donne iniziano l'assunzione di folato dopo aver ottenuto la gravidanza quando l'effetto preventivo sul NTD è altamente ridotto o superato (Ren, 2015). Una recente metanalisi (Blumfield, 2013) ha mostrato che l'introito medio di folati tra le donne gravide in tutti i Paesi industrializzati è inferiore del 13-63% rispetto alle dosi raccomandate, evidenziando come i provvedimenti di salute pubblica siano inefficaci. Nel 1998, la Food and Drug Administration statunitense ha introdotto la fortificazione con acido folico delle farine di cereali. Per monitorare l'efficacia dell'intervento, finalizzato ad aumentare l'assunzione di folato, è stato effettuato un confronto tra i livelli di acido folico nelle donne in età riproduttiva appartenenti allo studio National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) dal 1994 al 1998 e quelli delle donne arruolate nel periodo 1999-2000. Il livello mediano di folato sierico è aumentato da 4.8 a 13.0 ng/ml e quello di folato intraeritrocitario è cresciuto da 160 a 263 ng/ml (Gaskins, 2014) a dimostrazione dell'efficacia della fortificazione alimentare.

Alcuni geni coinvolti nel pathway metabolico del folato sono stati messi in relazione con il rischio di NTD. Tra i più importanti deve essere citato il gene che codifica l'enzima MTHFR, che catalizza la conversione del 5,10-methylenetetrahydrofolate (5,10-MTHF) in 5-methyltetrahydrofolate (5-MTHF) e fornisce il gruppo metile necessario per ri-metilare l'omocisteina in metionina (figura seguente) (Liu, 2013).



La variante allelica 677C>T del gene MTHFR è associata a maggiore incidenza di NTD (Van Der Put, 1995). Esistono due spiegazioni principali alla base di questa associazione: la prima è che il genotipo TT in MTHFR 677C>T può attenuare la risposta dei livelli di folato in seguito a supplementazione (Crider, 2011) e la seconda è che le portatrici dell'allele T mostrano ridotta attività dell'enzima MTHFR (Van Der Put, 1995). Il polimorfismo 677C>T ha un ruolo molto rilevante nella determinazione dei livelli di folato; la sua prevalenza varia tra diversi gruppi etnici e in diverse regioni ed è piuttosto comune in Italia (15-26%) (Wilcken, 2003).

## **Ruolo nella fertilità**

In vari modelli animali è stato dimostrato che una grave carenza materna di folati nel periodo preconcezionale e nelle prime fasi di gestazione ostacolano la fertilità e la vitalità fetale. Ad esempio, in ratti immaturi sottoposti a induzione della superovulazione, la carenza di folato inibisce parzialmente l'ovulazione (Willmott, 1968). Nelle scimmie rhesus, la dieta priva di folati causa cicli mestruali irregolari con degenerazione dei follicoli di Graaf, aumento di follicoli atresici/cistici, cellule della granulosa impoverite, e riduzione o assenza del corpo luteo (Mohanty, 1982). Femmine di criceto nutrite con una dieta priva di acido folico per 16 settimane prima dell'accoppiamento si sono rivelate tutte infertili (Mooij, 1992). Inoltre, femmine di topo alimentate con meno di un quarto del folato

ottimale per 8 settimane prima dell'accoppiamento e durante la gestazione hanno mostrato profonde riduzioni dei tassi di gravidanza, del numero di embrioni impiantati e del numero di feti vitali oltre alla notevole riduzione di peso della prole (Xiao, 2005). Questi risultati sottolineano che il folato è necessario per la follicologenesi nei mammiferi e per il corretto sviluppo fetale.

Recentemente, l'impatto del metabolismo del folato è stato studiato anche nella fisiologia della riproduzione umana. Il meccanismo esatto attraverso il quale metabolismo dei folati si intersechi con la funzione ovarica deve ancora essere identificato. Se folato e omocisteina sono presenti nel microambiente dell'ovocita in maturazione, cioè nel liquido follicolare, è possibile che un eccesso di omocisteina, o una carenza di acido folico, possano compromettere la competenza ovocitaria allo sviluppo e l'embriogenesi precoce. In effetti, è stato dimostrato che il folato e l'omocisteina sono presenti nel liquido follicolare, in modo proporzionale ai livelli circolanti (Steegers-Theunissen, 1993). E' stato altresì confermato che, in maniera analoga a quanto avviene nel sangue, la supplementazione di acido folico per via orale è efficace nell'aumentare i livelli anche nell'ambiente follicolare (Boxmeer, 2008).

Secondo alcuni Autori, il folato può migliorare le chance di successo per le coppie che si sottopongono a PMA in quanto contribuisce ad aumentare il numero di ovociti disponibili per le tecniche di fecondazione, la qualità embrionale, e il tasso di gravidanza (Boxmeer 2008, 2009; Gaskins, 2015). Tuttavia, secondo altri studi, non esisterebbe una correlazione positiva tra l'outcome clinico dei trattamenti di PMA e livelli di acido folico (Haggarty, 2006; Murto, 2014). Si tratta di un target di indagine interessante per il quale esiste una plausibilità biologica insita nella straordinaria intensità replicativa tipica dell'embriogenesi e che si candida come possibile fattore modificabile per aumentare il successo nella PMA. Esistono anche dati relativi alle gravidanze naturali secondo i quali la supplementazione con acido folico comporta una riduzione del rischio di aborto spontaneo (Hasan, 2011).

# Vitamina B12

## Descrizione generale

La vitamina B12, o cobalamina, viene sintetizzata dai batteri, dai funghi e dalle alghe ed entra nella catena alimentare umana dopo essere stata incorporata in cibi di origine animale, come il fegato, il latte, la carne e le uova. Da un punto di vista chimico si tratta di una sostanza cristallina altamente solubile in acqua; è formata da un anello corrinico (composto da 4 anelli pirrolici e tre ponti metinici) con al centro un atomo di cobalto coordinato da quattro atomi di azoto. Esistono due forme metabolicamente attive: la metil- e la 5'-deossiadenosilcobalamina.

Per l'assorbimento della vitamina B12, che avviene nella parte distale dell'ileo, è indispensabile il legame con una glicoproteina, il fattore intrinseco, secreta dalle cellule parietali dello stomaco.

La vitamina B12 interviene in tre processi metabolici importanti:

- 1) conversione di metilmalonil-CoA in succinil-CoA
- 2) sintesi dei 2-desossiribonucleotidi.
- 3) conversione di omocisteina in metionina tramite l'enzima omocisteina metiltrasferasi

Il coinvolgimento della vitamina B12 nel metabolismo degli acidi grassi determina la sua importanza per funzionalità delle membrane neuronali e questo spiegherebbe il coinvolgimento neurologico molto frequente in caso di carenza di vitamina B12 (neuropatia demielinizzante): i sintomi neurologici includono parestesie, perdita della sensazione della posizione e delle vibrazioni, perdita della memoria, confusione, irritabilità, perdita della vista, delusione, allucinazioni e psicosi.

La carenza di vitamina B12, impedendo la sintesi di DNA e RNA, provoca l'arresto della divisione cellulare. Le cellule che risentono più rapidamente di questa situazione sono quelle caratterizzate da un elevato turnover come le cellule del midollo osseo (anemia macrocitica megaloblastica) e dell'epitelio gastrointestinale (glossite, aftosi, diarrea, malassorbimento) (Charmel, 2013).

La mancanza di vitamina B12 interferisce con il metabolismo del folato poiché porta all'accumulo da una parte di omocisteina e dall'altra di folato non utilizzabile (perché non trasformato in tetraidrofolato che rappresenta la forma in cui l'acido folico può essere utilizzato dalla cellula). Questa reazione costituisce il punto di incontro fra la biochimica della cobalamina e quella dell'acido folico.

Situazioni di insufficiente introiti di vitamina B12 sono particolarmente rischiose per la salute, soprattutto per i bambini che hanno ridotte riserve epatiche della vitamina e sono pertanto più esposti agli effetti tossici da carenza alimentare di vitamina B12 (es. dieta vegetariana o vegana).

### **Ruolo nella gravidanza**

La conversione mitocondriale di methylmalonyl-CoA a succinil-CoA richiede la vitamina B12 come coenzima e in sua assenza, l'accumulo del primo composto inibisce l'ossidazione degli acidi grassi, promuovendo in tal modo la lipogenesi (Adaikalakoteswari, 2014). Si può pertanto ipotizzare che livelli insufficienti di vitamina B12, a livello cellulare, siano collegati a una disfunzione degli adipociti e comportino complicanze correlate all'obesità modulando il metabolismo lipidico, l'infiammazione cellulare, e causando l'ipometilazione nel percorso di biosintesi del colesterolo (Kumar, 2013).

Una recente revisione sistematica della letteratura ha dimostrato che l'insufficienza di vitamina B12 tra le donne gravide è comune in tutti i Paesi del mondo e in tutti i trimestri con tassi pari a circa 20-30%(Sukumar, 2016). La carenza di vitamina B12 durante la gravidanza ha implicazioni per la salute materno-fetale con specifico riferimento all'adiposità materna, alla resistenza insulinica sia nella madre che nella prole (Yajnik, 2008), all'alterato profilo lipidico nei neonati (Adaikalakoteswari, 2015; Sukumar, 2016).

Bassi livelli di vitamina B12 possono avere un impatto sul peso alla nascita del feto, influenzando lo sviluppo della placenta (Hogeveen, 2010); tuttavia, l'associazione con basso peso alla nascita è ancora da chiarire (Muthayya, 2006; Sukumar, 2016). All'altra estremità dello spettro, l'obesità materna e l'insulino-resistenza sono ben note per essere associate con elevato peso alla nascita fetale (Gaudet,

2014): poiché la vitamina B12 può essere inversamente associata con il BMI materno (Knight, 2015), è possibile che si comporti come mediatore indipendente o confounder per elevato peso alla nascita.

## **Ruolo nella fertilità**

Alcuni piccoli studi clinici hanno trovato un'associazione tra carenza di vitamina B12 e subfertilità femminile (Varadi, 1967; El-Nemr, 1998). Inoltre, uno studio di coorte dai Paesi Bassi ha trovato che la concentrazione di vitamina B12 nel siero e nel liquido follicolare di donne sottoposte a IVF è correlata positivamente con la qualità degli embrioni (Boxmeer, 2009). Un altro ampio studio di coorte non ha trovato alcuna relazione tra concentrazioni di folato plasmatico o concentrazioni di vitamina B12 con gli esiti clinici della fecondazione in vitro; tuttavia, è stato mostrato un tasso significativamente maggiore di parti gemellari in donne con elevato folato plasmatico e vitamina B12, il che suggerisce che queste vitamine del gruppo B potrebbero aumentare la probabilità di ogni embrione di impiantarsi in utero dando luogo alla nascita di un nuovo individuo (Haggarty, 2006). Recentemente, nel già citato studio di Gaskins (2015), è stato indicato che le donne con maggiori concentrazioni di folato e vitamina B12 hanno maggiori probabilità di ottenere una gravidanza in cicli di fecondazione in vitro.

## **Omocisteina**

### **Descrizione generale**

L'omocisteina è un amminoacido solforato che si forma in seguito a perdita di un gruppo metilico da parte della metionina, un aminoacido essenziale. Livelli ematici eccessivi di omocisteina sono considerati un importante fattore di rischio cardiovascolare (Nygard, 1995). Come descritto più sopra, la vitamina B12 e l'acido folico hanno un ruolo fondamentale nel metabolismo e nell'omeostasi della

omocisteina; in particolare, la rimetilazione a metionina richiede acido folico, vitamine B2 e B12, betaina e zinco; l'omocisteina viene degradata in cisteina attraverso una serie di reazioni che richiedono la vitamina B6.

## **Ruolo nella gravidanza**

Lo studio “Generation R” ha incluso 5808 coppie madre-bambino in cui sono stati prelevati campioni di sangue entro la 18<sup>a</sup> settimana di gestazione; ne è risultato che il peso alla nascita era in media 110 g inferiore nei bambini nati da madri nel quintile superiore di omocisteina totale ( $\geq 8.3 \mu\text{mol/l}$ ) rispetto a quelli nati da madri nel quintile inferiore ( $\leq 5.8 \mu\text{mol/l}$ ) (Bergen, 2012). A differenza della concentrazione di folato, i livelli di omocisteina non si sono rivelati associati alle probabilità di parto pretermine o di preeclampsia. Nello stesso studio è stato confermato un aumento di rischio di basso peso alla nascita per le donne appartenenti al quintile superiore di omocisteina.

In precedenza era stato riportato che elevati livelli di omocisteina preconcezionale sono associati a nascita pretermine (Ronnenberg, 2002).

L'associazione tra omocisteina totale prenatale e peso alla nascita è stata indagata anche in altri studi recenti (Lee, 2013; Yajnik, 2014) in cui sono stati raccolti campioni di sangue a 24 - 28 settimane di gestazione: in generale, si è evidenziata un'associazione inversa tra omocisteina totale materna e peso fetale alla nascita.

## **Ruolo nella fertilità**

L'omocisteina è ritenuta avere un effetto embriotossico post-impianto, almeno nel modello animale di ratto (Vanaerts, 1994). Nell'uomo, livelli materni di omocisteina elevati sono stati associati ad aumento di aborto spontaneo (Haggarty, 2006; Kramer, 2009) e a difettiva vascolarizzazione dei villi coriali (Nelen, 2000). Inoltre, in esperimenti in vitro, l'omocisteina induce apoptosi nel trofoblasto, riduce in

modo significativo la secrezione di gonadotropina corionica umana (Simone, 2003) e produce un aumento dose-dipendente delle contrazioni delle cellule miometriali umane ottenute da donne in gravidanza (Ayar, 2003). Si tratta di meccanismi che possono spiegare l'aumento di rischio di aborto spontaneo.

Nella donna, i livelli di omocisteina nel liquido follicolare sono inversamente correlati alla maturità ovocitaria e alle capacità di sviluppo degli embrioni in vitro (Berker, 2009; Ebisch, 2006).

L'omocisteina è nota per essere fonte di specie reattive dell'ossigeno (Edirimanne, 2007): benchè queste sostanze siano importanti per la corretta maturazione dell'ovocita, livelli eccessivi possono compromettere la competenza allo sviluppo, come mostrato nella fecondazione in vitro (Bedaiwy, 2004).

Alcuni studi hanno valutato l'impatto dei livelli di folato e di omocisteina materni sulla capacità di ottenere una gravidanza in modo naturale o con l'aiuto di un trattamento IVF. Lavori indipendenti hanno trovato una prevalenza di omozigosi 677TT nel gene MTHFR molto più elevata in pazienti di sesso femminile che avevano sperimentato ripetuti fallimenti di impianto in cicli di IVF (Azem, 2004; Qublan, 2006) o con storia di aborti ricorrenti (Goodman, 2006). Altri studi non hanno invece mostrato un effetto significativo dei polimorfismi MTHFR sulle probabilità di impianto (Coulam, 2006; Martinelli, 2003) e sulla qualità degli embrioni (Dobson, 2006). Secondo alcuni Autori, il genotipo MTHFR 677CT sarebbe più frequentemente riscontrato nelle donne fertili e in quelle che riescono a ottenere una gravidanza in cicli IVF (Altmäe, 2010; Haggarty, 2006). In linea con questi risultati, è stata osservata una minore incidenza di eterozigosi MTHFR 677CT in donne appartenenti a coppie con infertilità di tipo inspiegato (Altmäe, 2010). Analogamente, alcuni dati ottenuti su embrioni abortiti spontaneamente hanno evidenziato uno svantaggio dei genotipi omozigoti (Zetterberg, 2002; Bae, 2007). è stato dunque ipotizzato che esista un vantaggio riproduttivo del genotipo CT determinato da un bilancio favorevole tra i cicli metabolici che coinvolgono il folato (Laanpere, 2010)

# Vitamina A

## Descrizione generale

Con la definizione di “vitamina A” si intende un gruppo di sostanze liposolubili tra cui il retinolo e i suoi analoghi, i retinoidi. La vitamina A è coinvolta nella funzione immunitaria, nella visione, nella riproduzione e nella comunicazione cellulare. La vitamina A è essenziale per la visione come componente essenziale della rodopsina, una proteina che assorbe la luce nei recettori retinici, e perché supporta il funzionamento delle membrane congiuntivali e della cornea. La vitamina A supporta inoltre la crescita e la differenziazione cellulare, giocando un ruolo fondamentale nella formazione e nella fisiologia di cuore, polmoni, reni e altri organi (Ross, 2010).

Nella dieta umana sono disponibili due forme di vitamina A: vitamina A preformata (retinolo e la sua forma esterificata) e carotenoidi (provitamina A). La vitamina A preformata si trova in alimenti di origine animale, compresi i prodotti lattiero-caseari, pesce e carne (soprattutto fegato). Di gran lunga, la principale forma di provitamina A o carotenoide è il beta-carotene; altri carotenoidi sono l'alfa-carotene e la beta-criptoxantina. Il corpo converte questi pigmenti vegetali in vitamina A. Sia la provitamina A che la vitamina A preformata devono essere metabolizzate a livello intracellulare in acido retinoico e retinaldeide, che rappresentano le forme attive di vitamina A, utili per supportare le funzioni biologiche. Le varie forme di vitamina A vengono solubilizzati in micelle nel lume intestinale e assorbite dalle cellule della mucosa duodenale. La maggior parte della vitamina A, nel corpo umano, è immagazzinata nel fegato sotto forma di esteri di retinile.

I livelli di retinolo e carotenoidi sono generalmente misurati nel plasma. Tuttavia, il loro valore per la valutazione dello stato carenziale di vitamina A è limitato perché i livelli periferici non declinano fino quando le riserve epatiche di di vitamina A nel fegato sono pressoché esaurite (Popper, 1943). Tuttavia, ai fini della pratica clinica, i livelli di retinolo nel plasma sono ritenuti sufficienti per documentare

carezza significative. Queste sono peraltro rare nei Paesi industrializzati, mentre la carezza di vitamina A è comune in molti Paesi in via di sviluppo, a causa di accesso limitato agli alimenti che contengono vitamina A. In questi paesi, la scarsa assunzione di vitamina A è fortemente associata con conseguenze per la salute soprattutto per i gruppi di popolazione caratterizzati da maggiori esigenze nutrizionali, come ad esempio durante i bambini o le donne gravide/in allattamento.

Il sintomo più comune della carezza di vitamina A nei bambini piccoli e nelle donne in gravidanza è la xeroftalmia. Uno dei primi segni di xeroftalmia è la cecità notturna o l'incapacità di vedere in condizioni di scarsa luce o l'oscurità (Lanska, 2009). Una carezza di vitamina A aumenta anche la gravità delle infezioni e aumenta il rischio di mortalità (in particolare per diarrea e morbillo) anche prima della comparsa di xeroftalmia (WHO, 2009).

### **Ruolo nella gravidanza**

Le donne gravide hanno richieste nutrizionali aumentate di vitamina A al fine di permettere il corretto accrescimento fetale senza compromettere il proprio metabolismo e il mantenimento dei tessuti. Secondo l'OMS, quasi 10 milioni di donne nel mondo sono affette da xeroftalmia a causa di carezza di vitamina A (WHO, 2009). Altri effetti dovuti a stati carenziali di vitamina A includono un aumento di mortalità e morbilità materno-infantile, rischio di anemia, ritardo dello sviluppo fetale. Per questi motivi l'OMS raccomanda la supplementazione di vitamina A nelle zone in cui la carezza è endemica al fine di ottenere un miglioramento della salute materno-infantile.

### **Ruolo nella fertilità**

Utilizzando modelli animali si è riscontrato che, nella femmina, l'effetto di carezza di vitamina A sull'esito riproduttivo dipende dal momento in cui viene imposta la carezza e dalla sua gravità. Quando si verifici una grave carezza prima dell'accoppiamento, la riproduzione fallisce prima dell'impianto e, pur avvenendo l'ovulazione, gli ovociti mostrano segni di degenerazione (Evans, 1928).

Warkany e Schraffenberger (1946) hanno dimostrato che la somministrazione prima dell'accoppiamento di quantità limitate di provitamina A in ratti in stato carenziale, può parzialmente far revertire il fallimento riproduttivo permettendo la fecondazione e l'impianto, ma facendo comunque riscontrare un eccesso di morti intrauterine durante la gestazione.

In sintesi, lo status di vitamina A della femmina, sia al momento del concepimento che durante la gravidanza, è un fattore determinante per l'esito riproduttivo e situazioni di carenza possono portare sia ad un completo fallimento prima dell'impianto sia ad un aumento di riassorbimenti fetali o malformazioni.

La vitamina A è anche essenziale per il funzionamento del tratto genitale maschile e per la spermatogenesi. Esistono evidenze relative al ruolo della vitamina A nella trasduzione del segnale che dà inizio alla meiosi nella gonade femminile durante l'embriogenesi e nella gonade maschile dopo la nascita (Pelt, 1990; Clagett-Dame, 2011).

## **Vitamina E**

### **Descrizione generale**

"Vitamina E" è il nome collettivo di un gruppo di composti liposolubili ad elevata attività antiossidante.

La vitamina E si trova naturalmente in alcuni alimenti, viene aggiunta ad altri ed è disponibile come integratore alimentare. Presente in natura in otto forme chimiche (alfa, beta, gamma e delta-tocoferolo e alfa, beta, gamma e delta-tocotrienoli) che hanno diversi livelli di attività biologica. l'alfa (o  $\alpha$ -) tocoferolo è la forma biologicamente più attiva a cui generalmente ci si riferisce in ambito umano.

Le concentrazioni sieriche di vitamina E (alfa-tocoferolo) dipendono dal fegato, che la immagazzina dopo l'assorbimento da parte dell'intestino tenue. Il fegato rilascia la vitamina E preferenzialmente sotto forma di alfa-tocoferolo tramite la proteina di trasferimento specifica; altre forme di vitamina E

circolanti sono nettamente minoritarie (Traber, 2007).

Gli antiossidanti proteggono l'organismo dagli effetti delle specie reattive dell'ossigeno (ROS), che danneggiano le cellule e possono contribuire allo sviluppo di stati morbosi quali malattie cardiovascolari e cancro (Verhagen, 2006). L'organismo umano forma ROS endogeni (che hanno un ruolo fisiologico nella comunicazione tra le cellule) quando trasforma il cibo in energia ed è inoltre esposto ai radicali liberi causati da fattori ambientali, come il fumo di sigaretta, l'inquinamento atmosferico e le radiazioni ultraviolette.

La vitamina E è un antiossidante in quanto è in grado di interrompere la produzione di ROS che si accompagna all'ossidazione dei lipidi e rappresenta pertanto un possibile antagonista dei processi patologici collegati ai ROS. La vitamina E è anche coinvolta nella funzione immunitaria e, come documentato da esperimenti in vitro, nella comunicazione tra cellule, nella regolazione dell'espressione genica e in altri processi metabolici (Shils, 2006).

Gravi stati carenziali di vitamina E sono rari anche nei soggetti che ne hanno uno scarso introito alimentare. I bambini nati prematuri con peso alla nascita molto basso (<1500 grammi) possono presentare grave insufficienza di vitamina E e devono essere sottoposti a supplementazione per ridurre il rischio di complicanze (Brion, 2003).

## **Ruolo nella gravidanza**

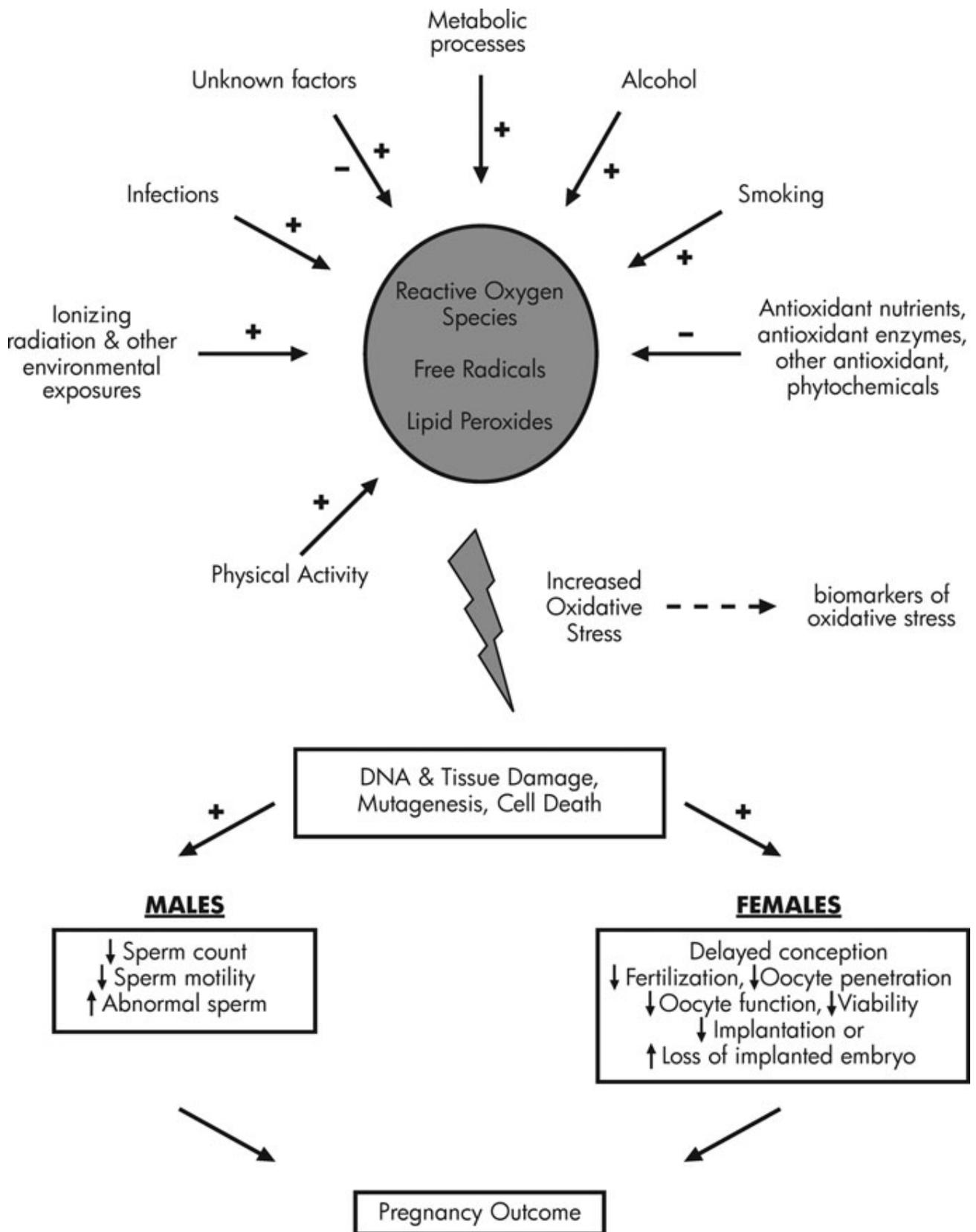
Il rischio di complicanze ostetriche collegabili allo stress ossidativo, come la pre-eclampsia o il diabete gestazionale, potrebbe, almeno in teoria, essere contrastato dall'azione antiossidante della vitamina E.

Tuttavia, una recente review Cochrane ha riportato che allo stato attuale delle evidenze scientifiche, non è raccomandabile la supplementazione routinaria di vitamina E in gravidanza per la prevenzione delle seguenti complicanze: morte intrauterina e neonatale, parto pretermine, pre-eclampsia, ritardo di crescita intrauterino o rottura precoce delle membrane. Un effetto positivo è stato invece associato alla prevenzione di abruptio placentae (Rumbold, 2015)

Non ci sono evidenze conclusive sulla relazione tra livelli materni e fetali di vitamina E, ma è stato riportato che topi sottoposti a restrizione di vitamina E in gravidanza generano prole con bassi livelli di vitamina E a livello cerebrale e con alterata espressione di ~ 50 geni legati a funzioni di segnalazione cellulare e biosintesi (Roy, 2002).

## **Ruolo nella fertilità**

Lo stress ossidativo a livello locale può avere un impatto negativo sulle potenzialità di sviluppo dei gameti e degli embrioni. Alcuni dei possibili meccanismi coinvolti sono il danno al DNA, la perossidazione dei lipidi di membrana e l'ossidazione delle proteine. Nella figura che segue è schematizzato il ruolo dello stress ossidativo nel processo riproduttivo:



*Lo stress ossidativo nella riproduzione (da Ruder, 2008)*

Un eccesso di stress ossidativo è associato ad alcune forme di infertilità femminile, quali endometriosi, idrosalpinge e ovaio policistico. Per questo motivo è plausibile che sostanze ad azione antiossidante, come la vitamina E, possano avere un effetto benefico sul processo riproduttivo migliorando, in particolare, la crescita dell'epitelio vascolare e dell'endometrio (Ruder, 2008; Takasaki, 2010).

## **Ferro e Ferritina**

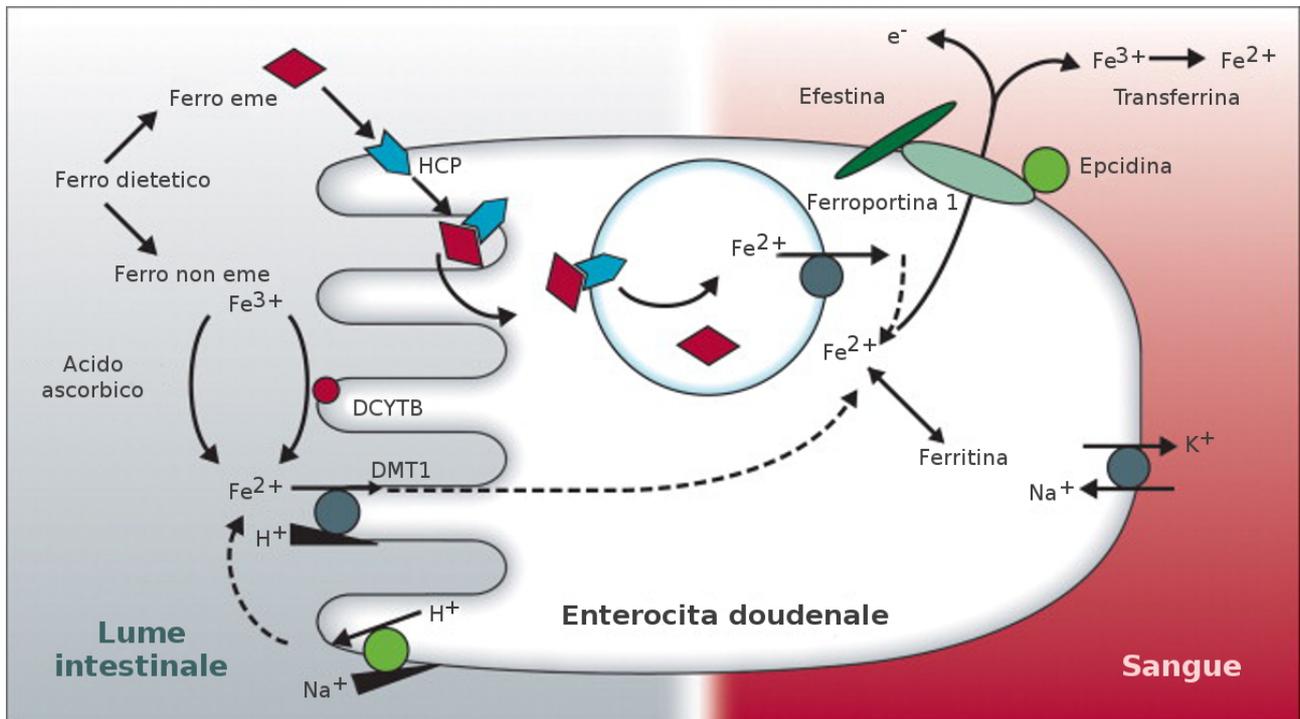
### **Descrizione generale**

Il ferro è un componente essenziale dell'emoglobina, una proteina eritrocitaria che trasferisce ossigeno dai polmoni ai tessuti. Come componente della mioglobina, una proteina che fornisce ossigeno ai muscoli, il ferro supporta il metabolismo energetico. Il ferro è inoltre necessario per la crescita, lo sviluppo, il normale funzionamento cellulare e la sintesi di alcuni ormoni e del tessuto connettivo.

Il ferro è un minerale naturalmente presente in molti alimenti in due forme principali: “eme” e “non-eme”. Le piante e gli alimenti arricchiti di ferro contengono ferro non-eme, mentre carne, pesce e pollame contengono ferro sia eme che non-eme. Il ferro eme, che si forma quando il ferro si combina con la protoporfirina IX, può essere assorbito nel duodeno, mentre il ferro non-eme necessita di una preventiva trasformazione in ione ferroso con il contributo della vitamina C per essere assorbito nel lume intestinale.

La maggior parte dei 3-4 grammi di ferro elementare presente nell'uomo adulto è legato all'emoglobina. Gran parte del ferro rimanente è immagazzinato in forma di ferritina o emosiderina (prodotto di degradazione della ferritina) nel fegato, nella milza e nel midollo osseo o si trova nella mioglobina del tessuto muscolare. Gli esseri umani, in genere, perdono solo piccole quantità di ferro nelle urine e nelle feci; le perdite di ferro sono maggiori nelle donne con mestruazioni, a causa della perdita di sangue. L'epcidina è un ormone peptidico circolante prodotto dal fegato e di recente scoperta che ha la

funzione chiave di regolare sia l'assorbimento del ferro che la sua distribuzione in tutto il corpo (Drakesmith, 2012).



*Il metabolismo del ferro ad opera degli enterociti duodenali:*

Fonte: <http://clashdot.wdfiles.com/local-files/info%3Airon-metabolism/FeAbs.jpg>

Come mostrato in figura, la ferritina rappresenta una proteina intracellulare deputata allo stoccaggio e al rilascio controllato del ferro. Essa è prodotta dalla maggior parte degli organismi viventi, incluse alghe, batteri, piante e animali. Nell'uomo si comporta da "tampone" per contrastare sia le insufficienze che i sovraccarichi di ferro. La maggior parte della ferritina si trova in forma citosolica, ma una quota viene secreta nel siero e funziona da trasportatore del ferro. Questa quota di ferritina plasmatica è un marker indiretto della quantità di ferro totale dell'organismo ed è pertanto utilizzata nei test diagnostici (Wang, 2010). La ferritina è un complesso sferico composto da 24 subunità proteiche nel quale il ferro è immagazzinato in forma solubile e non tossica. Nella ferritina, il ferro è rinchiuso all'interno in un guscio proteico, l'apoferritina, che può captare il  $\text{Fe}^{2+}$  (ione ferroso) ed ossidarlo affinché venga depositato come  $\text{Fe}^{3+}$  (ione ferrico).

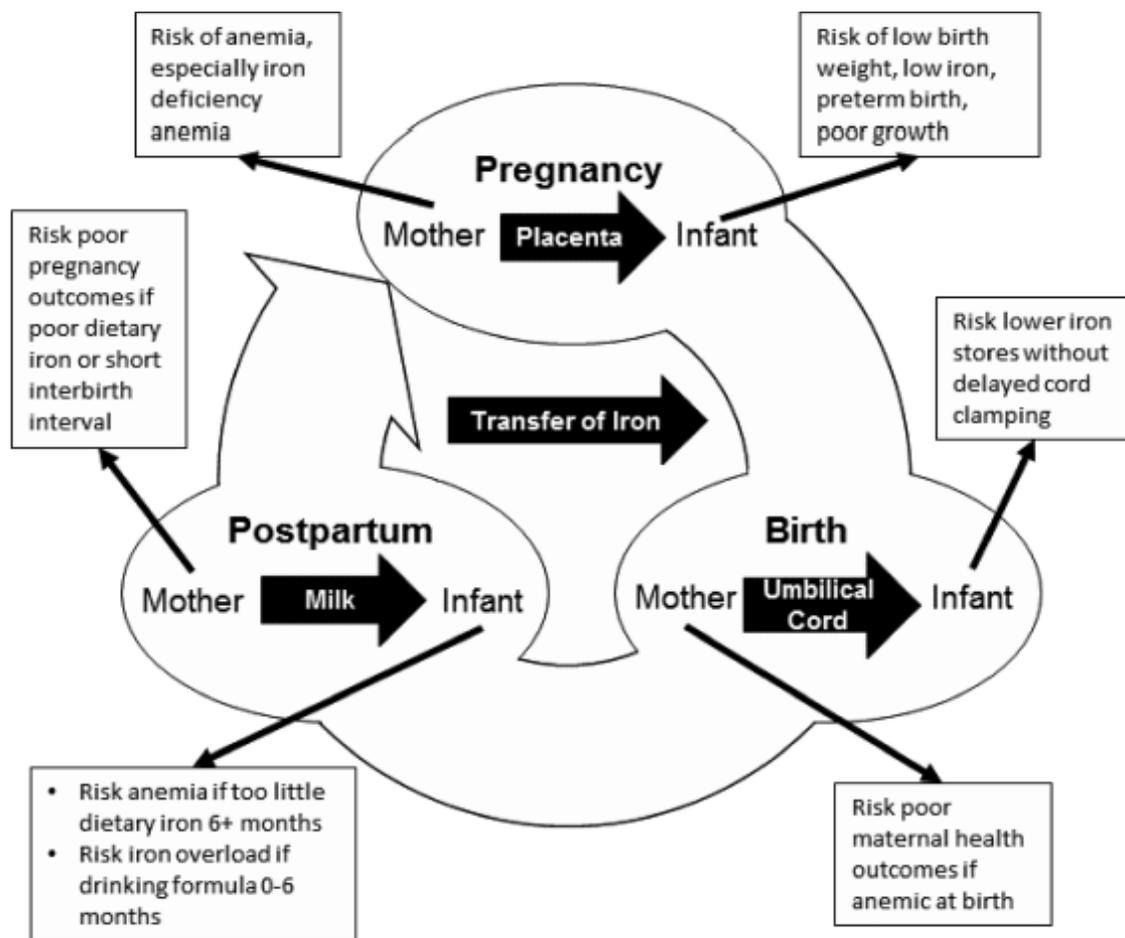
Le carenze di ferro isolate non sono molto comuni nei Paesi industrializzati, se non in presenza di

cattiva alimentazione, disturbi dell'assorbimento e perdita di sangue. Le persone con carenza di ferro hanno generalmente altre carenze nutrizionali. L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) stima che circa la metà dei 1,62 miliardi di casi di anemia in tutto il mondo siano dovuti alla carenza di ferro (WHO, VMNIS website) che rappresenta pertanto il più comune dei deficit nutrizionali (Scholl, 2005) . Nei Paesi in via di sviluppo, la carenza di ferro è spesso il risultato di enteropatie e di perdita di sangue associate a parassiti gastrointestinali.

## **Ruolo nella gravidanza**

Dai dati prodotti dallo studio NHANES è emerso che durante la gravidanza si assiste a un progressivo aumento degli stati di insufficienza di ferro: 7% nel primo trimestre, 14% nel secondo trimestre e 30% nel terzo trimestre (Mei, 2011). La supplementazione di ferro, insieme a quella di acido folico, rappresenta un intervento comune tra le donne gravide al fine di prevenire l'anemia ed è considerata avere un effetto positivo sulla salute materno-fetale. Infatti, se la madre raggiungesse livelli di insufficienza per questi nutrienti, sarebbero incapaci di sostenere le richieste metaboliche del feto in accrescimento.

Le conseguenze dell'anemia da carenza di ferro in gravidanza sono serie e possono includere, ad esempio, ritardo dello sviluppo psicomotorio (Hunt, 2002) e maggiore rischio di infezioni (Oppenheimer, 2001). La figura che segue schematizza il ciclo del ferro durante la gravidanza e l'allattamento, evidenziando i possibili rischi connessi agli stati carenziali.



*Il ciclo del ferro durante la gestazione e l'allattamento, e i possibili rischi da carenza. Da Miller, 2016*

Il peso alla nascita sembra essere, in base a dati recenti, direttamente correlato ai livelli di emoglobina materni (Bakacak, 2016). Al fine di ridurre il rischio di parto pre-termine e basso peso alla nascita è consigliabile avere livelli di emoglobina durante il secondo trimestre di gestazione tra i 95 e i 105 g/l (Steer, 2000), e a termine tra i 95 e i 125 g/l (Hyttén, 1971). Livelli di emoglobina durante la gravidanza inferiori a 95 g/l sono associati a basso peso alla nascita, indurimento della placenta e parto prematuro (Burke, 2014).

Esiste una Cochrane review in base alla quale la supplementazione orale quotidiana con ferro riduce significativamente il rischio di basso peso alla nascita e previene l'anemia materna in gravidanza (Peña-Rosas, 2015).

## **Ruolo nella fertilità**

Nonostante gli effetti noti del ferro sul benessere generale, pochi studi hanno esaminato la relazione tra lo stato del ferro e la fertilità nelle donne. Come parte di un più ampio studio volto ad indagare il ruolo della supplementazione del ferro nel contrastare la perdita di capelli, Rushton et al. (1991) hanno studiato le caratteristiche di sette donne che hanno avuto una gravidanza durante la supplementazione. La storia riproduttiva di queste donne ha evidenziato che tre di esse avevano fatto ricorso a tecniche di PMA, mentre le restanti 4 non erano mai riuscite a ottenere una gravidanza. Nonostante la numerosità molto ridotta, questo studio suggerisce un legame intrigante tra lo stato del ferro e la capacità di concepire. Uno studio più corposo, da un punto di vista numerico, ha coinvolto in modo prospettico 18.555 donne in età pre-menopausale negli Stati Uniti e ha evidenziato che le utilizzatrici di integratori di ferro e le donne che assumevano maggiori dosi di ferro non-eme avevano un rischio di infertilità ovulatoria significativamente ridotto (Chavarro, 2006). Questi dati suggeriscono un ruolo del ferro nella fertilità e nella maturazione ovocitaria, come supportato da alcuni dati sul modello animale (Briggs, 1999; Kolesarova, 2011; Li, 2014)

# Materiali e metodi

Il progetto è stato condotto presso la Unità Operativa “Centro PMA” della Fondazione IRCCS Ca’ Granda Ospedale Maggiore Policlinico di Milano in collaborazione con il Dipartimento di Scienze Cliniche e di Comunità dell’Università di Milano, al fine di valutare lo status basale di alcuni micronutrienti e di porlo in relazione alle probabilità di ottenere una gravidanza. I soggetti sono stati reclutati tra le coppie trattate per problemi di infertilità; solo per lo studio dei livelli sierici in donne fertili versus donne subfertili il reclutamento è avvenuto tra le donne gravide al momento dell’esecuzione dei test di screening del primo trimestre (U.O. Ostetricia e Ginecologia). Sono stati valutati obiettivi differenti utilizzando casistiche disgiunte o, in parte, sovrapposte. In particolare, il lavoro di dottorato si è basato sugli studi sintetizzati nella tabella che segue e dettagliati più avanti:

Studio	Analita	Outcome primario	Disegno sperimentale	Soggetti reclutati	Periodo reclutamento
1	Vitamina D	Tasso di gravidanza in cicli IVF	Prospettico cross-sectional	480 donne da coppie infertili	Gennaio 2012 - Dicembre 2012
2	Vitamina D	Concordanza tra livelli sierici dei partner	Prospettico cross-sectional	103 coppie infertili	Aprile 2014- Maggio 2014
3	Vitamina D	Livelli sierici in donne fertili versus donne subfertili	Caso-controllo prospettico	73 casi e 73 controlli	Giugno 2013
4	Folato, Omocisteina, Vitamina B12, Vitamina A, Vitamina E, Ferro, Ferritina	Percentuale di soggetti con livelli insufficienti	Prospettico cross-sectional	269 donne da coppie infertili	Marzo 2015 - Dicembre 2015
5	Folato, Omocisteina, Vitamina B12	Tasso di gravidanza in cicli IVF	Prospettico cross-sectional	209 donne da coppie infertili	Marzo 2015 - Dicembre 2015

Le analisi biochimiche sono state eseguite presso la Unità Operativa “Laboratorio Centrale” della Fondazione IRCCS Ca’ Granda Ospedale Maggiore Ca’ Granda.

I coefficienti di variazione intra e inter-saggio sono stati inferiori a 10% e 15%, rispettivamente.

Gli analiti (Vitamina D, Folato sierico e intraeritrocitario, Omocisteina, Vitamina B12, Vitamina A, Vitamina E, Ferro, Ferritina) sono stati dosati da sangue periferico prelevato a digiuno nella mattina in cui i soggetti reclutati erano convocati per l’esecuzione degli esami preparatori al programma di PMA. I campioni sono stati analizzati entro due ore dal prelievo per misurare vitamina B12, omocisteina, ferro e ferritina mentre sono stati congelati a -20 °C fino al momento dell’analisi per quanto riguarda le vitamine D, A ed E, il folato sierico e il folato intraeritrocitario. Il folato contenuto nei globuli rossi (folato RBC) è stato dosato su sangue intero, l’omocisteina su plasma, mentre gli altri analiti sono stati misurati su campioni di siero.

La quantificazione dei livelli sierici di 25(OH)D è stata effettuata avvalendosi di un kit commerciale basato sulla chemiluminescenza (Liaison 25 OH total Vitamin D assay, DiaSorin). Folati, vitamina B12 e ferritina sono stati dosati con saggi di elettrochemiluminescenza su una piattaforma Cobas e602 (Roche D.I., Svizzera). Omocisteina e ferro sono stati misurati con un test enzimatico (Sentinel Diagnostic, Milano, Italia) e colorimetrico (Iron 2nd Gen, Roche D.I.), rispettivamente, utilizzando una piattaforma Cobas c702 (Roche D.I.). Le vitamine A ed E sono state dosate in cromatografia liquida con tecnologia HPLC (Thermo Fisher, Waltham, USA).

I livelli considerati adeguati sono riportati nella tabella seguente, insieme alle voci bibliografiche di riferimento.

Analita	Livello adeguato	Riferimento
Vitamina D 25(OH)D	>20 ng/ml	Ross, 2011
Folato sierico	> 6.6 ng/ml	Dhonukshe-Rutten, 2009
Folato intraeritrocitario	>400 ng/ml	WHO, 2015
Omocisteina totale	<1.41 mg/l	Selhub, 1999
Vitamina B12	>474 pg/ml	Dhonukshe-Rutten, 2009
Vitamina A	>0.2 mg/l	WHO, 2011
Vitamina E	>5 mg/l	Cabot, 2004
Ferro sierico	>60 µg/dl	Saxena, 2014
Ferritina	20-200 ng/ml	Saxena, 2014

L'analisi statistica è stata effettuata con il software SPSS versione 20.0 (IBM, Armonk, NY, USA).

In generale, le variabili misurabili continue sono espresse come media e deviazione standard se distribuite in modo gaussiano, o come mediana e range interquartile (IQR) in caso contrario. Le variabili categoriche sono descritte come frequenza assoluta e percentuale. In alcuni casi le variabili sono state descritte anche con valore minimo e massimo, terzili, quartili. Medie e proporzioni sono presentate, qualora opportuno, con i relativi intervalli di confidenza al 95% (95%CI). Per ogni studio è stato preliminarmente effettuato uno calcolo numerico del campione necessario per indagare l'outcome primario, ponendo come livello di significatività  $p < 0.05$  e come potenza 80% o 90% (errore di tipo 1 e di tipo 2 posti rispettivamente a 5% e 10%- 20%), come di seguito specificato.

Per ogni fase del lavoro di ricerca è stata ottenuta l'approvazione del Comitato Etico competente (Comitato Etico Area B, Milano) e i soggetti reclutati hanno firmato apposito consenso informato.

## **Studio 1: “Vitamina D e tasso di gravidanza in cicli IVF”**

### **Obiettivo dello studio**

Determinare se lo status di vitamina D sierica nelle donne possa influenzare il tasso di successo delle procedure di IVF.

### **Criteri di inclusione**

Donne con indicazione alla IVF, età compresa tra 18 e 42 anni, indice di massa corporea (BMI) compreso tra 18 e 25 kg/m<sup>2</sup>, riserva ovarica adeguata secondo i criteri di Bologna (Ferraretti, 2011).

### **Criteri di esclusione**

Donne con patologie croniche, tumori, ipertensione, diabete, sclerosi multipla, patologie autoimmuni,

malattie renali, epatiche o cardiache, necessità di trattamenti farmacologici cronici. Sono inoltre state escluse le donne che non avessero effettuato il trasferimento in utero degli embrioni o che lo avessero effettuato oltre 90 giorni dopo il prelievo per il dosaggio di vitamina D, o che fossero state in vacanza con esposizione al sole nel periodo tra il prelievo ematico e il ciclo di IVF.

## **Outcome primario**

Tasso di gravidanza clinica per “embryo transfer” nel gruppo di donne con 25(OH)D <20 ng/ml rispetto a quelle con 25(OH)D  $\geq$ 20 ng/ml, cut off in accordo all’Institute of Medicine (IOM) (Ross, 2011).

## **Outcome secondari**

- Tasso di gravidanza clinica per “embryo transfer” paragonando tre gruppi: donne con 25(OH)D <20 ng/ml; donne con 25(OH)D compresa tra 20 e 30 ng/ml e donne con 25(OH)D  $\geq$ 30 ng/ml.
- Tasso di impianto nei gruppi di cui sopra
- Presenza di embrioni di buona qualità definiti in presenza di 4 cellule in seconda giornata di sviluppo o 8-10 cellule in terza giornata con nessuna o minima presenza di frammentazione cellulare (<10%).

## **Procedure**

Le pazienti consenzienti e che soddisfacessero i criteri di inclusione sono state sottoposte a un prelievo di sangue per il dosaggio basale di 25(OH)D in occasione della visita di preparazione alla stimolazione ovarica per il ciclo di IVF. Il trattamento di stimolazione ovarica e fecondazione in vitro è stato eseguito secondo protocolli standard in uso presso la unità operativa (Benaglia, 2013). Il ciclo di stimolazione è stato sospeso prima del prelievo ovocitario in caso di rischio per la salute della paziente (esempio rischio di sindrome da iperstimolazione ovarica) o in caso di esito insoddisfacente (risposta

troppo scarsa). Dopo 12-14 giorni dal prelievo ovocitario, le donne giunte al trasferimento degli embrioni, hanno effettuato un test di gravidanza su sangue (dosaggio hCG) e, in caso di positività, è stato effettuato un controllo ecografico due settimane più tardi al fine di documentare la presenza di una gravidanza clinica. Questa, che rappresenta l'outcome primario, è stata definita come la presenza di almeno un sacco gestazionale in utero con battito cardiaco fetale. L'implantation rate è stato definito come il numero di embrioni correttamente impiantati in utero rispetto al totale degli embrioni trasferiti. Il personale medico e biologico coinvolto nelle procedure di IVF non è stato informato dei risultati del dosaggio di 25(OH)D fino a conclusione del ciclo.

### **Calcolo numerosità e analisi statistica**

La dimensione campionaria è stata calcolata basandosi su un tasso di gravidanza atteso del 25% per le pazienti con livelli sufficienti di 25(OH)D ( $\geq 20$  ng/ml) e ponendo come clinicamente rilevante un dimezzamento delle probabilità di successo per le donne con livelli insufficienti ( $< 20$  ng/ml). Ponendo gli errori di tipo I e II a 0.05 e 0.10, rispettivamente, il numero di donne da reclutare è risultato pari a 120 per gruppo, per un periodo previsto di reclutamento pari a 12 mesi.

I test utilizzati per l'analisi statistica sono stati test esatto di Fisher, Chi quadrato, t test di Student, test di Wilcoxon, come appropriato.

Con l'analisi di regressione logistica binaria è stato aggiustato il risultato in base alla presenza di eventuali fattori confondenti, noti per influenzare l'outcome clinico o i livelli di 25(OH)D o risultati differenti tra i due gruppi in studio ( $p < 0.10$ ).

## **Studio 2: “Vitamina D e concordanza tra livelli sierici dei partner”**

### **Obiettivo dello studio**

Determinare la concordanza dello status di vitamina D tra i membri delle coppie infertili e valutare se questo abbia una influenza sulla causa di infertilità.

### **Criteri inclusione**

Sono stati reclutati entrambi i partner di coppie infertili caratterizzate da: durata dell'infertilità superiore a un anno (o due anni per l'infertilità idiopatica); indicazione alla IVF; età 18-42 anni per entrambi i partner; BMI <25 Kg/m<sup>2</sup> per entrambi i partner.

### **Criteri di esclusione**

Storia di neoplasia, ipertensione, diabete, sclerosi multipla, necessità di trattamenti medici cronici, malattie autoimmuni e malattie coronariche, epatiche o renali in almeno uno dei due membri della coppia. Sono inoltre state escluse coppie in cui almeno un partner avessero effettuato una recente (meno di 3 mesi) vacanza con esposizione al sole, così come coloro facessero uso di supplementazione di vitamina D.

### **Outcome primario**

Percentuale di coppie in cui i membri mostrano concordanza per livelli sierici di vitamina D (entrambi sufficienti o entrambi insufficienti)

## **Outcome secondari**

Correlazione tra i livelli di vitamina D tra i membri della coppia.

Influenza dei livelli di vitamina D di coppia sul fattore di infertilità.

## **Procedure**

Al fine di stabilire una correlazione tra i membri delle coppie infertili, entrambi i partner che hanno accettato di far parte dello studio hanno fornito un campione di sangue per il dosaggio della 25(OH)D.

I campioni di sangue sono stati lasciati coagulare a temperatura ambiente e poi centrifugati a 2000 g per 10 minuti per eseguire l'analisi. L'insufficienza di vitamina D è stata definita come livelli sierici di 25(OH)D <20 ng/ml (Ross et al., 2011).

Secondo i protocolli standard, per la diagnostica di base della coppia infertile sono stati effettuati: analisi seminali (almeno due valutazioni ad almeno due mesi di distanza); valutazione della pervietà tubarica (sia con isterosalpingografia o isterosonosalpingografia), valutazione ormonale per la partner femminile (dosaggio sierico di AMH e FSH), ecografia transvaginale. In accordo ai risultati delle prime analisi, e di indagini supplementari, sono state eventualmente poste le seguenti diagnosi: endometriosi in presenza di pregressa chirurgia per stadi di malattia III-IV o in presenza di endometriomi ovarici all'ecografia transvaginale e/o noduli peritoneali profondi. Fattore maschile, in caso di entrambi gli spermioigrammi patologici per concentrazione dello sperma, motilità e morfologia secondo le linee guida dell'OMS (WHO, 2010). Una diagnosi di infertilità inspiegata è stata posta in caso di negatività a tutte le indagini diagnostiche o in presenza di lievi anomalie non abbastanza significative da ostacolare un concepimento naturale (Kersten, 2015). In particolare, sono state considerate affette da infertilità inspiegata le coppie con le seguenti lievi anomalie: pervietà tubarica monolaterale, fattore maschile lieve (solo uno dei due esami risultato inferiore di normalità), precedente intervento per endometriosi di I-II stadio.

## **Calcolo numerosità e analisi statistica**

La dimensione del campione è stata calcolata ipotizzando un tasso medio di livelli insufficienti di 25(OH)D di circa il 55% (Pagliardini, 2015). Su questa base, ci si attende circa il 50% ( $0.55^2 + 0.45^2$ ) di coppie concordanti se la distribuzione è determinata in modo casuale e in assenza di correlazione tra i partner della stessa coppia. Ritenendo clinicamente rilevante un aumento del 15% del numero di casi concordanti (cioè un aumento dal 50% al 65%) e impostando gli errori di tipo I e II a 0.05 e 0.20, rispettivamente, il numero di coppie da reclutare è risultato di almeno 85. Sulla base del numero di pazienti che si rivolgono alla nostra unità si è ritenuto di effettuare il reclutamento nell'arco di due mesi, anche al fine di evitare un eccesso di variabilità legata alla stagionalità.

La correlazione tra i due partner della coppia è stata valutata utilizzando l'analisi di regressione lineare e l'entità dell'associazione è stata stimata con il coefficiente di correlazione di Pearson (R). Il test di McNemar è stato utilizzato per valutare la concordanza tra variabili categoriche. Il confronto tra i livelli sierici di 25(OH)D è stato eseguito utilizzando il test t di Student's (per le analisi continue) o il test Chi quadrato (per le analisi categoriche).

## **Studio 3: “Livelli sierici di vitamina D in donne fertili versus donne sub-fertili”**

### **Obiettivo dello studio**

Determinare se donne fertili (che abbiano ottenuto la gravidanza entro un anno di rapporti liberi) e donne sub-fertili (che abbiano ottenuto gravidanza in un tempo superiore ai 12 mesi) differiscano per i livelli basali di vitamina D.

## **Criteri di inclusione**

Donne gravide di età compresa tra 18 e 39 anni reclutate al momento del test di screening per anomalie fetali durante il primo trimestre di gravidanza. Sono state identificate come “casi” le donne che avevano impiegato 12-24 mesi per ottenere il concepimento, mentre sono state scelte come “controlli” le successive donne di pari età che avevano ottenuto una gravidanza entro 12 mesi di ricerca.

## **Criteri di esclusione**

Assunzione di supplementi contenenti vitamina D. Cicli irregolari o cause note di subfertilità (fattore maschile, fattore tubarico o endometriosi). Concepimenti ottenuti con tecniche di PMA. Donne in sovrappeso od obese ( $BMI > 25 \text{ Kg/m}^2$ ).

## **Outcome primario**

Confronto dei livelli sierici di vitamina D tra casi e controlli

## **Procedure**

In occasione del test di screening fetale del primo trimestre, le donne rispondenti ai criteri di inclusione sono state invitate a partecipare allo studio fornendo un campione di sangue. Si è effettuato un appaiamento tra casi e controlli utilizzando il criterio temporale, per evitare le variazioni stagionali di vitamina D, e l'età che è un fattore determinante per le probabilità di gravidanza. Tutti i sieri sono stati congelati a  $-20^\circ\text{C}$  e analizzati in tre sedute successive scongelando un numero simile di casi e controlli.

## **Calcolo numerosità e analisi statistica**

Il numero di donne da reclutare, pari a 73 casi e 73 controlli appaiati per età, è stato stimato basandosi sui seguenti assunti: disegno appaiato, errori di tipo I e II pari rispettivamente a 0.05 e 0.20, riduzione clinicamente rilevante dei livelli di 25(OH)D nei casi pari ad almeno il 15% dei controlli (17 ng/ml

versus 20 ng/ml, rispettivamente).

## **Studio 4: “Livelli di Folato, Omocisteina, Vitamina B12, Vitamina A, Vitamina E, Ferro, Ferritina”**

### **Obiettivo dello studio**

Misurare i seguenti analiti nel sangue di donne appartenenti a coppie infertili e descrivere la frequenza delle situazioni di appropriatezza: folato sierico, folato RBC, omocisteina totale plasmatica, vitamina B12, vitamina A, vitamina E, ferro e ferritina.

### **Criteri di inclusione**

Donne appartenenti a coppie infertili con indicazione alla IVF

### **Criteri di esclusione**

Pazienti non caucasiche

### **Outcome primario**

Percentuale di donne che mostrano livelli adeguati dei singoli analiti, con particolare riferimento all'acido folico

### **Outcome secondari**

Percentuale di donne che mostrano livelli adeguati di analiti, in base a caratteristiche particolari come assunzione di supplementi orali ed età.

## **Procedure**

Ogni soggetto identificato come reclutabile è stato intervistato in merito alle caratteristiche cliniche generali e alla storia clinica. Durante gli esami di routine del percorso diagnostico per infertilità, per ogni donna consenziente, è stata prelevata una quota aggiuntiva di sangue nella misura di circa 20 ml per l'obiettivo della ricerca e cioè al fine di misurare: folato sierico, folato intraeritrocitario (RBC), omocisteina, vitamina B12, vitamina A, vitamina E, ferro e ferritina.

## **Calcolo della numerosità e analisi statistiche**

Si è previsto di arruolare per lo studio 270 donne candidate al trattamento di fecondazione in vitro. Dal momento che quasi il 90% delle donne che frequentano la nostra clinica vive nell'area metropolitana di Milano o zone circostante in Lombardia, si è ritenuto che il campione fosse omogeneo per caratteristiche demografiche e geografiche.

La dimensione del campione di 270 donne è stata calcolata al fine di descrivere la frequenza del 25% prevista di soggetti che raggiungono livelli adeguati di folatemia (come riportato da Zappacosta, 2014), con un intervallo di confidenza arbitrariamente ritenuto opportuno, vale a dire il 20-30%.

## **Studio 5: “Folato, Omocisteina, Vitamina B12 e tasso di gravidanza in cicli IVF”**

### **Obiettivo dello studio**

Valutare se i livelli di folato sierico, folato intraeritrocitario, omocisteina e vitamina B12 siano associati al tasso di gravidanza clinica in donne sottoposte a cicli di fecondazione in vitro.

## **Criteri di inclusione**

Donne appartenenti a coppie infertili di età 18-40 anni con indicazione alla fecondazione in vitro.

## **Criteri di esclusione**

Donne non caucasiche

## **Outcome primario**

Tasso di gravidanza clinica in donne appartenenti al terzo terzile di folato intraeritrocitario rispetto alle donne appartenenti al primo e secondo terzile.

## **Outcome secondari**

Tasso di gravidanza rispetto a folato sierico, omocisteina e vitamina B12.

## **Procedure**

Ogni soggetto identificato come reclutabile è stato intervistato in merito alle caratteristiche cliniche generali e alla storia clinica. Durante gli esami di routine del percorso diagnostico per infertilità, per ogni donna consenziente, è stata prelevata una quota aggiuntiva di sangue nella misura di circa 15 ml per l'obiettivo della ricerca e cioè al fine di misurare: folato sierico, folato intraeritrocitario (RBC), omocisteina e vitamina B12.

Il trattamento di stimolazione ovarica e fecondazione in vitro è stato eseguito secondo protocolli standard in uso presso la unità operativa (Benaglia, 2013). Il ciclo di stimolazione è stato sospeso prima del prelievo ovocitario in caso di rischio per la salute della paziente (esempio rischio di sindrome da iperstimolazione ovarica) o in caso di esito insoddisfacente (risposta troppo scarsa). Dopo 12-14 giorni dal prelievo ovocitario, le donne giunte al trasferimento degli embrioni, hanno effettuato un test di gravidanza su sangue (dosaggio hCG) e, in caso di positività è stato effettuato un controllo ecografico

tre settimane più tardi al fine di documentare la presenza di una gravidanza clinica. Questa, che rappresenta l'outcome primario, è stata definita come la presenza di almeno un sacco gestazionale in utero con presenza di battito cardiaco fetale. Il personale medico e biologico coinvolto nelle procedure di IVF non è stato informato dei risultati dei dosaggi ematici fino a conclusione del ciclo.

### **Calcolo della numerosità e analisi statistiche**

La numerosità campionaria di 200 donne è stata calcolata basandosi su un tasso di gravidanza atteso pari al 27%, supponendo una probabilità di gravidanza doppia per le donne appartenenti al terzo terzile di folato RBC rispetto a quelle appartenenti al primo o secondo terzile (41.0 % e 20.5%, rispettivamente). L'errore di tipo I è stato impostato a 0.05, mentre l'errore di tipo II a 0.20.

# Risultati

## Studio 1: “Vitamina D e tasso di gravidanza in cicli IVF”

Per l'inclusione nello studio sono state inizialmente valutate 803 donne. Trecentoventitre di esse sono state escluse per i seguenti motivi: criteri di inclusione non sussistenti (n=189), livelli di 25(OH)D non disponibili, tempo intercorso tra dosaggio di 25(OH)D e ciclo di IVF superiore a 90 giorni.

Sono state dunque considerate 480 donne che hanno iniziato altrettanti cicli di IVF. I livelli sierici di 25(OH)D sono risultati inferiori a 20 ng/ml nel 46% dei casi (n=222) e pari o superiori a 20 ng/ml nel restante 54% delle donne (n=258). Il trasferimento di embrioni è stato cancellato o sospeso in 68 (31%) e 77 (30%) cicli, rispettivamente (p=0.92), lasciando per l'analisi dei dati 154 donne nel gruppo 25(OH)D<20 ng/ml e 181 donne nel gruppo 25(OH)D ≥20 ng/ml. Le caratteristiche cliniche dei due gruppi sono riassunti nella tabella seguente:

Tabella. Caratteristiche delle donne selezionate in base ai livelli di vitamina D.			
Caratteristiche	Gruppo con vitamina D <20 ng / ml n = 154	Gruppo con vitamina D ≥20 ng / ml n = 181	p
Età (anni)	37.0 ± 4.3	36.8 ± 3.8	0.71
Razza			<b>0.04</b>
Caucasica	140 (91%)	176 (97%)	<b>0.02</b>
Bianca ispanica	10 (6%)	1 (1%)	<b>0.003</b>
Altre	4 (3%)	4 (2%)	1.00
BMI (Kg / m <sup>2</sup> )	21.1 ± 2.0	20.4 ± 2.0	<b>0.004</b>
Durata dell'infertilità (anni)	4.6 ± 2.5	4.0 ± 2.5	<b>0.030</b>
Precedenti parti	14 (9%)	28 (16%)	0.08
Precedente chirurgia ginecologica	25 (16%)	25 (14%)	0.54
Precedenti cicli IVF	91 (59%)	112 (62%)	0.65
FSH 3° giorno del ciclo (UI/ml)	7.7 ± 3.0	8.1 ± 3.1	0.23
AMH (ng / ml)	2.3 ± 2.2	2.2 ± 2.1	0.67
Conta follicoli antrali	10.8 ± 8.5	10.6 ± 6.7	0.81
Indicazione alla IVF			
Inspiegata o ridotta riserva ovarica	50 (32%)	44 (24%)	0.11
Fattore maschile	55 (36%)	67 (37%)	0.82
Fattore tubarico o endometriosi	29 (19%)	33 (18%)	0.89
Misto	20 (13%)	37 (20%)	0.08
Vitamina D sierica (ng / ml)	14.1 ± 3.8	29.1 ± 8.3	<b>0.001</b>
Giorni tra dosaggio vitamina D e ciclo IVF	36.7 ± 22.8	33.7 ± 21.3	0.22

I dati sono espressi come media ± SD o numero (percentuale)

Si è evidenziata una differenza statisticamente significativa tra i due gruppi rispetto alle seguenti variabili: etnia (donne ispaniche hanno mostrato più frequentemente insufficienza di vitamina D), BMI (risulta più elevato nella donne con vitamina D <20 ng/ml), durata dell'infertilità (risultata maggiore nelle donne con minori livelli di vitamina D).

I parametri principali che descrivono l'esito della stimolazione ovarica e della fecondazione/coltura in vitro degli embrioni sono risultati simili tra i due gruppi. Ciononostante, per le donne appartenenti alla categoria a minore concentrazione di vitamina D sierica, si è verificata una minore disponibilità di

embrioni di buona qualità e, di conseguenza, è stata meno frequente l'esecuzione di embryo transfer allo stadio di blastocisti (vedi tabella che segue).

Caratteristiche del ciclo di fecondazione in vitro rispetto ai valori basali di vitamina D			
Caratteristiche	Vitamina D <20 ng/ml n=154	Vitamina D ≥20 ng/ml n=181	p
Protocollo di stimolazione ovarica			0.42
Lungo	62 (40%)	60 (33%)	0.21
Antagonista GnRH	54 (35%)	69 (38%)	0.57
Flare-up	39 (25%)	52 (29%)	0.543
FSH dose totale (IU)	2700 ± 1221	2655 ± 1339	0.75
Durata della stimolazione (giorni)	9.4 ± 2.1	9.4 ± 2.0	1.00
N° ovociti recuperati	8.1 ± 4.2	7.9 ± 4.2	0.62
N° ovociti utilizzati	5.5 ± 2.8	5.5 ± 2.7	0.94
Tasso di fecondazione (%)	75 (56-100)	80 (63-100)	0.57
N° embrioni in 2°/3° giornata	3.5 ± 2.1	3.8 ± 2.2	0.15
N° embrioni Top Quality			<b>0.01</b>
0	76 (49%)	74 (41%)	0.13
1-2	69 (45%)	78 (43%)	0.83
≥ 3	9 (6%)	29 (16%)	<b>0.003</b>
Embryo Transfer <sup>a</sup>			0.17
Cleavage stage (giorno 2)	49 (32%)	53 (29%)	0.64
Cleavage stage (giorno 3)	91 (59%)	99 (55%)	0.44
Blastocisti (giorno 5)	14 (9%)	29 (16%)	0.07
N° embrioni trasferiti			0.62
1	39 (25%)	51 (28%)	0.62
2	93 (60%)	110 (61%)	1.00
3	22 (14%)	20 (11%)	0.41
Gravidanza clinica	30 (20%)	56 (31%)	<b>0.02</b>
Embrioni impiantati in utero	37 (13%)	70 (21%)	<b>0.006</b>
Data espressi come media ± SD o mediana (range interquartile) o numero (percentuale)			
Top Quality Embryo: 4 cellule al giorno 2 o 8 cellule il giorno 3, con frammentazione <10%			
Per variabili con ≥3 categorie, sono riportati i p values sia complessivi che per sottogruppi			
a L'embryo transfer è stato eseguito il giorno 2 di sviluppo in caso di embrioni vitali disponibili ≤ 2 e il giorno 5 in caso di embrioni di buona qualità in terza giornata ≥ 4. Negli altri casi è stato effettuato il giorno 3.			

Le donne con 25(OH)D ≥ 20 ng/mL hanno ottenuto più frequentemente una gravidanza clinica rispetto a quelle con insufficienza di 25(OH)D. L'Odds Ratio (OR) crudo è risultato pari a 1.85 (95%CI: 1.11–3.08) mentre l'OR aggiustato per età, etnia, BMI, parità, durata dell'infertilità, numero di

embrioni trasferiti e periodo di studio è risultato pari a 2.15 (95%; CI: 1.23–3.77) ( $p=0.007$ ). Risultati simili sono stati osservati in riferimento al tasso di impianto, con OR in donne con 25(OH)D $\geq$  20 ng/mL pari a 1.83 (95% CI: 1.19–2.83,  $p=0.006$ ) e OR aggiustato (per le variabili di cui sopra e per la presenza di embrioni “top quality”) pari a = 1.91 (95% CI: 1.20–3.05,  $p=0.006$ ).

L’analisi dei dati è stata ripetuta considerando tre categorie di donne in base ai livelli di 25(OH)D, nello specifico: donne con livelli insufficienti (<20 ng/mL), donne con livelli sufficienti (21–29 ng/mL), e donne con livelli adeguati ( $\geq$ 30 ng/mL). I risultati sono riportati nelle tabelle che seguono.

Tabella. Caratteristiche delle donne selezionate in base ai livelli di vitamina D.				
Caratteristiche	Gruppo con vitamina D <20 ng / ml n = 154	Gruppo con vitamina D 20-29 ng / ml n = 117	Gruppo con vitamina D $\geq$ 30 ng / ml n = 64	p
Età (anni)	37.0 $\pm$ 4.3	36.7 $\pm$ 3.7	37.0 $\pm$ 4.1	0.79
Razza				0.15
Caucasica	140 (91%)	114 (97%)	62 (97%)	0.07
Bianca ispanica	10 (6%)	2 (2%)	2 (3%)	0.17
Altre	4 (3%)	1 (1%)	0 (0%)	0.43
BMI (Kg / m <sup>2</sup> )	21.1 $\pm$ 2.0	20.1 $\pm$ 2.1	20.3 $\pm$ 2.2	<b>0.003</b>
Durata dell’infertilità (anni)	4.6 $\pm$ 2.5	4.1 $\pm$ 2.3	4.0 $\pm$ 2.7	0.19
Precedenti parti	14 (9%)	15 (13%)	13 (20%)	0.07
Precedente chirurgia ginecologica	25 (16%)	15 (13%)	9 (14%)	0.79
Precedenti cicli IVF	91 (59%)	71 (61%)	36 (56%)	0.96
FSH 3° giorno del ciclo (UI/ml)	7.7 $\pm$ 3.0	7.9 $\pm$ 2.9	8.5 $\pm$ 3.4	0.21
AMH (ng / ml)	2.3 $\pm$ 2.2	2.2 $\pm$ 2.2	2.2 $\pm$ 1.8	0.91
Conta follicoli antrali	10.8 $\pm$ 8.5	10.7 $\pm$ 6.1	10.6 $\pm$ 7.5	0.98
Indicazione alla IVF				<b>0.01</b>
Inspiegabile o ridotta riserva ovarica	50 (33%)	32 (27%)	12 (19%)	0.12
Fattore maschile	55 (36%)	39 (33%)	28 (44%)	0.35
Fattore tubarico o endometriosi	29 (19%)	16 (14%)	17 (27%)	0.11
Misto	20 (13%)	30 (26%)	7 (11%)	<b>0.01</b>
Vitamina D sierica (ng / ml)	14.1 $\pm$ 3.8	24.4 $\pm$ 2.8	37.9 $\pm$ 7.9	<b>0.001</b>
Giorni tra dosaggio vitamina D e ciclo IVF	36.7 $\pm$ 22.8	34.6 $\pm$ 24.5	32.1 $\pm$ 13.4	0.36
I dati sono espressi come media $\pm$ SD o numero (percentuale)				

Caratteristiche del ciclo di fecondazione in vitro rispetto ai valori basali di vitamina D				
Caratteristiche	Vitamina D <20 ng/ml n=154	Vitamina D 20-29 ng/ml n=117	Vitamina D 20-29 ng/ml n=64	p
Protocollo di stimolazione ovarica				0.29
Lungo	62 (40%)	43 (37%)	17 (27%)	0.16
Antagonista GnRH	54 (35%)	39 (33%)	30 (47%)	0.17
Flare-up	39 (25%)	35 (30%)	17 (27%)	0.70
FSH dose totale (IU)	2700 ± 1221	2815 ± 1265	2492 ± 1118	0.23
Durata della stimolazione (giorni)	9.4 ± 2.1	9.6 ± 2.1	9.1 ± 2.1	0.31
N° ovociti recuperati	8.1 ± 4.2	7.6 ± 4.3	8.4 ± 4.0	0.46
N° ovociti utilizzati	5.5 ± 2.8	5.4 ± 2.8	5.8 ± 2.6	0.68
Tasso di fecondazione (%)	75 (56-100)	83 (67-100)	75 (57-86)	0.13
N° embrioni in 2°/3° giornata	3.5 ± 2.1	3.9 ± 2.3	3.8 ± 1.9	0.29
N° embrioni Top Quality				<b>0.05</b>
0	76 (49%)	47 (40%)	29 (45%)	0.32
1-2	69 (45%)	52 (44%)	24 (38%)	0.58
≥ 3	9 (6%)	18 (16%)	11 (17%)	<b>0.01</b>
Embryo Transfer <sup>a</sup>				0.12
Cleavage stage (giorno 2)	49 (32%)	38 (33%)	15 (23%)	0.42
Cleavage stage (giorno 3)	91 (59%)	64 (55%)	35 (55%)	0.71
Blastocisti (giorno 5)	14 (9%)	15 (13%)	14 (22%)	<b>0.04</b>
N° embrioni trasferiti				0.65
1	39 (25%)	30 (26%)	21 (33%)	0.49
2	93 (60%)	74 (63%)	36 (56%)	0.65
3	22 (14%)	13 (11%)	7 (11%)	0.67
Gravidanza clinica	30 (20%)	33 (28%)	23 (36%)	<b>0.03</b>
Embrioni impiantati in utero	37 (13%)	40 (18%)	30 (26%)	<b>0.004</b>
Data espressi come media ± SD o mediana (range interquartile) o numero (percentuale)				
Top Quality Embryo: 4 cellule al giorno 2 o 8 cellule il giorno 3, con frammentazione <10%				
Per variabili con ≥3 categorie, sono riportati i p values sia complessivi che per sottogruppi				
a L'embryo transfer è stato eseguito il giorno 2 di sviluppo in caso di embrioni vitali disponibili ≤ 2 e il giorno 5 in caso di embrioni di buona qualità in terza giornata ≥ 4. Negli altri casi è stato effettuato il giorno 3.				

Come riportato in tabella, le probabilità di gravidanza clinica e di impianto si sono rivelate crescenti all'aumentare dei livelli basali di 25(OH)D. Gli ORs crudo e aggiustato per gravidanza clinica nelle donne con 25(OH)D pari ad almeno 30 ng/ml sono risultati pari a 1.9 (95% CI:1.0 –3.3; p=0.04) e 2.1 (95% CI: 1.1– 4.0; p=0.03), rispettivamente. Per quanto riguarda l'implantation rate, gli ORs sono

risultati pari a 2.0 (95% CI: 1.2–3.2; p=0.006) e 2.2 (95% CI: 1.3–3.8; p=0.004), rispettivamente.

## Studio 2: “Vitamina D e concordanza tra livelli sierici dei partner”

Durante i due mesi previsti per lo studio, sono state reclutate 103 coppie infertili, in numero lievemente superiore a quanto previsto. Le caratteristiche di base di queste coppie sono illustrate nella tabella che segue.

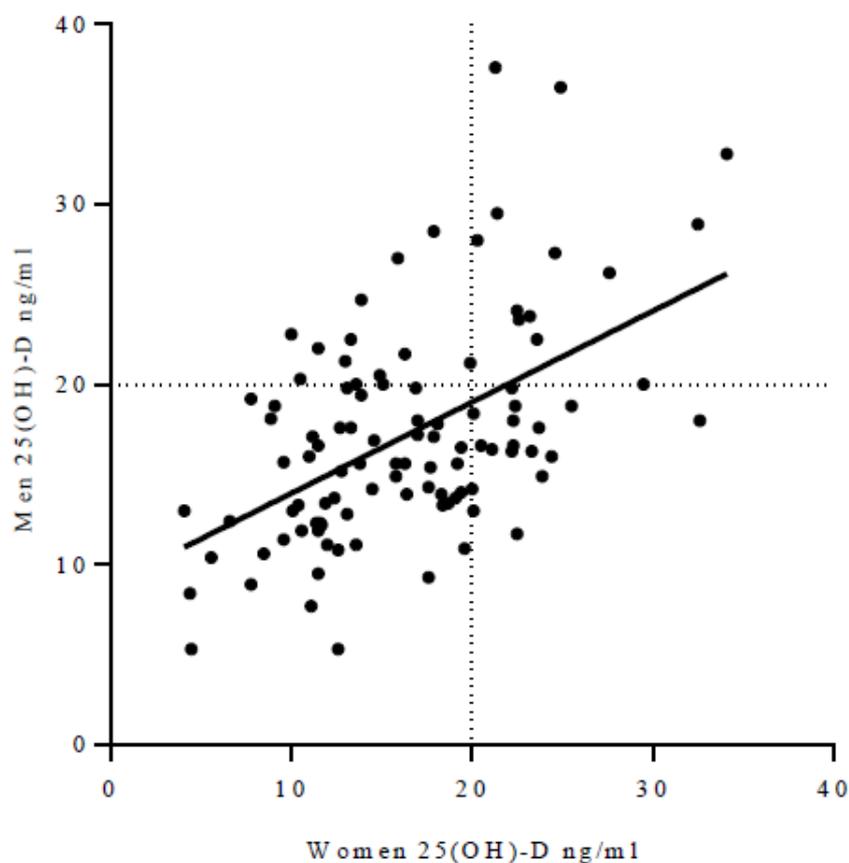
Caratteristiche delle coppie reclutate (n=103)		
	Donne	Uomini
Età (anni)	35.5 ± 3.7	38.8 ± 5.2
BMI (Kg/m <sup>2</sup> )	21.1 ± 1.9	23.0 ± 1.5
Etnia		
Caucasica	91 (88%)	97 (94%)
Altro	12 (12%)	6 (6%)
Coppie discordanti per etnia	7 (7%)	
Precedenti gravidanze	27 (26%)	
Precedenti cicli IVF	33 (32%)	
Durata infertilità (anni)	3.4 ± 2.1	
Causa di infertilità		
Maschile	25 (24%)	
Tubarica	11 (11%)	
Endometriosi	20 (19%)	
Inspiegata	38 (4%)	
Mista	9 (9%)	
Mese di inclusione		
Aprile	53 (52%)	
Maggio	50 (48%)	
Dati riportati come media ± SD o numero (%)		

I livelli sierici di 25(OH)D delle donne e degli uomini sono risultati essere rispettivamente  $16.4 \pm 6.2$  e  $17.2 \pm 6.0$  ng/ml. Non si sono osservate variazioni significative nell'arco temporale del reclutamento. Nelle donne, la media  $\pm$  SD di 25(OH)D sierica in aprile e maggio era  $15.1 \pm 5.6$  e  $17.8 \pm 6.5$  ng/ml, rispettivamente ( $p = 0.35$ ). Negli uomini, era  $16.1 \pm 5.8$  e  $18.3 \pm 6.0$  ng/ml, rispettivamente ( $p = 0.14$ ). Complessivamente, 150 soggetti (73 donne e 77 uomini) hanno mostrato livelli insufficienti di 25(OH)D, pari a un tasso del 73%, quindi superiore alla nostra ipotesi iniziale (55%, basata su una precedente rilevazione riportata in Pagliardini et al., 2015). Come mostrato nella tabella che segue, la concordanza tra condizione di sufficienza o insufficienza tra partner è stata osservata in 73 coppie (71%), quindi con frequenza superiore al 61% previsto per solo effetto del caso ( $0,73^2 + 0,27^2$ ). Il test di McNemar indica che questo risultato confuta l'ipotesi nulla di una distribuzione casuale degli eventi ( $p = 0.007$ ).

	Uomini		Totale
	25(OH)D $\geq 20$ ng/ml	25(OH)D $< 20$ ng/ml	
Donne 25(OH)D $\geq 20$ ng/ml	<b>13 (13%)</b>	17 (16%)	30 (29%)
Donne 25(OH)D $< 20$ ng/ml	13 (13%)	<b>60 (58%)</b>	73 (71%)
Totale	26 (25%)	77 (75%)	103

McNemar test,  $p=0.007$

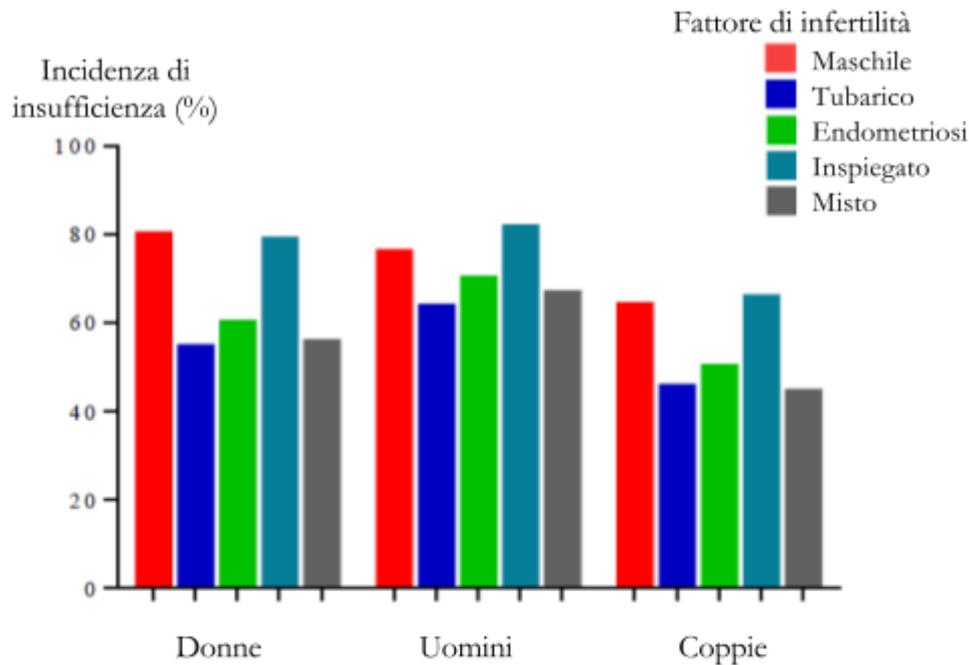
L'analisi della correlazione lineare dei livelli di vitamina D tra i partner è illustrato nella figura che segue ed è significativamente positiva, caratterizzata da un coefficiente di correlazione di Pearson  $R = 0.52$  ( $p < 0.001$ ).



*Correlazione tra i livelli di vitamina D tra i partner delle coppie infertili*

Analizzando la frequenza di insufficienza di vitamina D tra soggetti con diversi fattori di infertilità, non è emersa alcuna differenza statisticamente significativa. Il risultato è mostrato nella figura seguente.

Quando si sono confrontate coppie con infertilità inspiegata (n = 38) con quelle con infertilità per tutte le altre cause (n = 65), il numero di coppie con entrambi i partner con livelli insufficienti di 25(OH)D erano 25 (66%) e 35 (54%), rispettivamente (p = 0.30).



Frequenza di insufficienza di vitamina D in base alla causa di infertilità. Il numero di coppie per gruppo era la seguente: fattore maschile (n = 25), fattore tubarico (n = 11), endometriosi (n = 20), inspiegabile (n = 38) e misto (n = 9). I dati sono presentati separatamente prendendo in considerazione le donne (parte sinistra), uomini (parte centrale) e entrambe le parti (parte destra). Per questi ultimi, il tasso si riferisce al numero di coppie con entrambi i partner sono risultati insufficienti. Nessuna differenza statisticamente significativa è emersa per tutte e tre le analisi (p = 0,22, p = 0,69 e p = 0,52 rispettivamente).

### Studio 3: “Livelli sierici di vitamina D in donne fertili versus donne sub-fertili”

Sono state reclutate 146 donne equamente suddivise tra casi subfertili (ricerca prole per 12-24 mesi) e controlli fertili (ricerca prole <12 mesi). Le caratteristiche di base delle 146 donne incluse sono mostrate nella tabella seguente. Come conseguenza di risultati non rassicuranti del test di screening per anomalie genetiche fetali, 6 (8%) donne tra i casi e 4 (5%) donne tra i controlli hanno richiesto la diagnosi genetica invasiva (amnio/villocentes) (p=0.75). Una donna di 35 anni appartenente al gruppo di controllo ha avuto una diagnosi definitiva di aneuploidia fetale esitata in interruzione spontanea della gravidanza. Escludendo questa paziente, il tasso di complicanze ostetriche nei casi (n = 73) e controlli

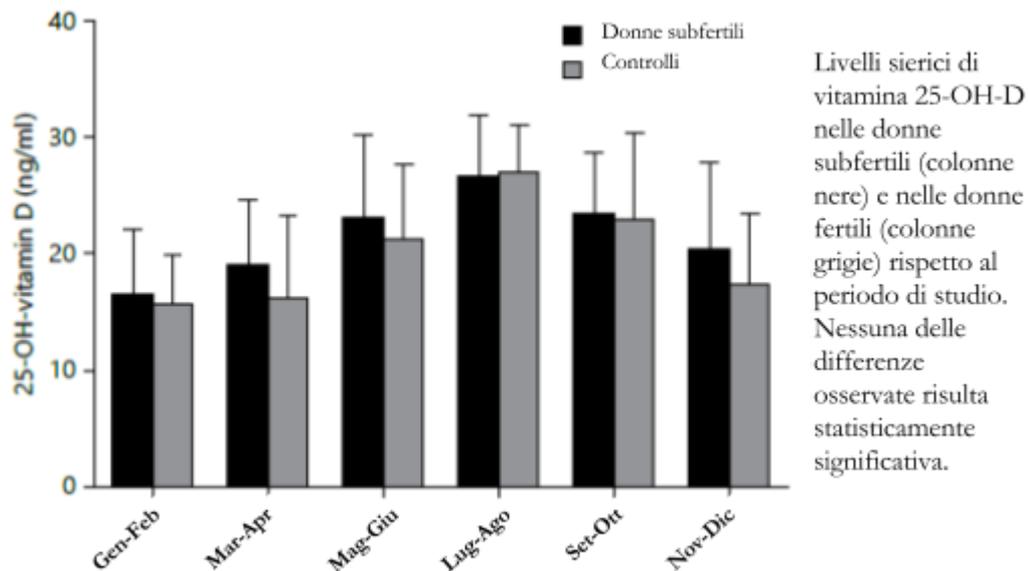
(n = 72) è stato sovrapponibile tra i due gruppi: nascita pretermine verificatasi in 8 (11%) casi e 8 (11%) controlli (p = 1,00), disturbi ipertensivi in 6 (8%) casi e 8 (11%) controlli (p = 0,59), diabete gestazionale in 6 (8%) casi e 5 (7%) controlli (p = 1.00). Il taglio cesareo è stato effettuato per 27 (37%) casi e 26 (36%) controlli (p=1.00).

Caratteristiche basali dei casi (ricerca prole 12-24 mesi) e dei controlli (ricerca prole <12 mesi)

	Casi (n=73)	Controlli (n=73)	p
Età donna (anni)	32.8 ± 3.7	32.7 ± 3.8	0.96
Età uomo (anni)	36.6 ± 4.9	35.0 ± 4.0	0.04
BMI donna Kg/m <sup>2</sup>	22.1 ± 3.4	21.8 ± 3.4	0.62
Etnia			1.00
Caucasica	70 (96)	71 (97)	
Altro	3 (4)	2 (3)	
Scolarità			0.42
Scuole primarie	11 (15)	6 (8)	
Scuole secondarie	29 (40)	33 (45)	
Università	31 (42)	34 (47)	
Precedenti figli	13 (18)	26 (36)	0.02
Ciclo mestruale (giorni)	28 ± 2	29 ± 2	0.64
Fumo prima della gravidanza	16 (22)	11 (15)	0.39
Gravidanza gemellare	1 (1)	2 (3)	1.00
Epoca gestazionale al reclutamento	11.5 ± 0.5	11.6 ± 0.6	0.34
Dati riportati come media ± SD o numero (%)			

Il peso dei neonati si è rivelato simile tra i due gruppi, essendo pari a 3248 ± 593 e 3304 ± 348 g in casi e controlli, rispettivamente p = 0.49.

I livelli di vitamina 25(OH)D sono risultati sovrapponibili tra casi e controlli: la media  $\pm$  SD era  $21.2 \pm 6.8$  e  $19.7 \pm 7.3$  ng/ml, rispettivamente ( $p = 0.16$ , t test per dati appaiati;  $p = 0.20$ , t test per dati indipendenti). La differenza (95% CI) tra livelli medi di 25(OH)D dei casi e dei controlli era = 1.5 (95%CI: -0.6 / + 3.6) ng/ml. Il confronto tra i livelli di vitamina D, in base al periodo di arruolamento, sono mostrati nella figura che segue:



Il 47% dei casi e il 51% dei controlli aveva livelli di vitamina D  $<20$  ng/ml ( $p=0.73$ , test McNemar;  $p=0.74$ , test esatto di Fisher). L'OR per subfertilità (tempo di ricerca prole  $>12$  mesi) nelle donne con insufficienza di vitamina D è risultato non significativo, pari a 0.85 (95%CI: 0.44-1.62). L'OR aggiustato per età paterna e precedenti figli (variabili risultate differenti tra i due gruppi) è risultato di 0.84 (95% CI: 0.42-1.66). Il numero (%) di donne in stato carenziale (25(OH)D  $<10$  ng/ml) era pari a 3 (4%) nei casi e 6 (8%) nei controlli ( $p = 0.45$ , McNemar test;  $p=0.49$  test esatto di Fisher). L' Odds Ratio crudo e aggiustato per subfertilità nelle donne con carenza di vitamina D è risultato uguale a 0.48 (95% CI: 0.12-1.99) e 0.70 (95% CI: 0.15-2.95), rispettivamente, quindi anche in questo caso non influenzato dai livelli di vitamina D. La correlazione esistente per l'intera popolazione ( $N = 146$ ) tra il tempo di ricerca della gravidanza e livelli di 25-OH-vitamina D non ha mostrato significatività statistica (Pearson  $R^2 = 2\%$ ,  $p = 0.07$ ). Le analisi dei dati sono state ripetute escludendo la donna che ha avuto l'aborto

spontaneo e il rispettivo caso e sono stati ottenuti risultati del tutto sovrapponibili.

## Studio 4: “Livelli di Folato, Omocisteina, Vitamina B12, Vitamina A, Vitamina E, Ferro, Ferritina”

Sono state identificate 342 donne idonee al reclutamento. Di esse, 269 (79%) hanno fornito il consenso alla partecipazione e hanno donato il campione di sangue per i dosaggi oggetto dello studio. L'età, il BMI e le principali caratteristiche delle donne arruolate nello studio sono riportate in tabella:

Caratteristiche basali delle donne arruolate

	Partecipanti n=269
Età (anni)	37.1 ± 3.5
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	22.3 ± 4.3
Fumo	65 (24%)
Durata infertilità (anni)	
1 - 2	(116) 43%
3 - 5	(110) 41%
≥ 6	(43) 16%
Indicazione femminile alla IVF	
Inspiegata	99 (37%)
Età/ridotta riserva ovarica	68 (25%)
Fattore tubarico/endometriosi	86 (32%)
Ovulatoria	16 (6%)
Precedenti gravidanze	69 (26%)
Precedenti parti	37 (14%)
Precedenti aborti spontanei	37 (14%)

I dati sono riportati come numero (%), media ± SD o mediana (range interquartile).  
IVF= fecondazione in vitro

Il range di età per le donne reclutate era pari a 27-45 anni e quello di BMI pari a 15.2-51.1 kg/m<sup>2</sup>.

Per quanto riguarda i livelli degli analiti misurati nel sangue, in alcuni casi i risultati non sono stati disponibili. In particolare, folato, omocisteina e vitamina B12 non sono stati disponibili per una

paziente, mentre vitamina A e vitamina E non sono stati disponibili per quattro pazienti in quanto i rispettivi prelievi ematici non sono giunti al laboratorio in condizioni appropriate.

Le tabelle che seguono descrivono i livelli di folato sierici, folato intraeritrocitario (RBC), omocisteina, vitamina B12, vitamina A, vitamina E, sideremia e ferritina nella popolazione e riportano la percentuale di soggetti con livelli ritenuti adeguati per i diversi analiti.

#### Risultati dei dosaggi effettuati

Sostanza	Donne N° totale	Media geometrica (95%CI)	Media $\pm$ SD	Mediana (1°-3° quartile)
Folato sierico	268	10.1 (9.4-10.8)	11.4 $\pm$ 5.4	10.1 (6.8-16.4)
Folato RBC	268	280 (270-290)	293 $\pm$ 91	291 (225-347)
Omocisteina	268	1.20 (1.15-1.20)	1.27 $\pm$ 0.53	1.13 (0.99-1.43)
Vitamina B12	268	441 (421-461)	476 $\pm$ 216	444 (353-554)
Vitamina A	265	0.39 (0.38-0.40)	0.40 $\pm$ 0.10	0.39 (0.34-0.45)
Vitamina E	265	12.2 (11.9-12.5)	12.4 $\pm$ 2.3	12.2 (10.8-13.8)
Ferro sierico	269	86.3 (82.0-90.3)	93.0 $\pm$ 36.5	87 (70-115)
Ferritina sierica	269	40.5 (36.9-44.3)	53.0 $\pm$ 39.4	42 (24-71)

95%CI: Intervallo di confidenza al 95%

#### Percentuale di donne con livelli appropriati dei singoli analiti

Sostanza	Soglia di appropriatezza	Donne con valori appropriati		
		N°	Percentuale	(95%CI)
Folato sierico	> 6.6 ng/ml	208	78%	(72-83%)
Folato RBC	> 400 ng/ml	32	12%	(8-16%)
Omocisteina	<1.41 mg/l	186	69%	(64-75%)
Vitamina B12	> 474 pg/ml	117	44%	(38-50%)
Vitamina A	> 0.20 mg/l	262	99%	(97-100%)
Vitamina E	> 5 mg/l	265	100%	(99-100%)
Ferro sierico	> 60 $\mu$ g/dl	224	83%	(78-88%)
Ferritina sierica	20-200 ng/ml	221	82%	(77-87%)

95%CI: Intervallo di confidenza al 95%

Solo il 69% e il 44% delle donne valutate nello studio ha mostrato un livello adeguato di omocisteina e vitamina B12, rispettivamente. Considerando i valori di riferimento per la popolazione generale, il

folato nel siero è risultato adeguato nel 78% dei soggetti. Utilizzando il valore di cut-off minimo per il folato intraeritrocitario (151 ng/ml; WHO 2012) sviluppato in relazione alle concentrazioni di omocisteina come indicatore metabolico, abbiamo riscontrato livelli appropriati per il 98% (95% CI: 95-99%) delle donne arruolate. Tuttavia, solo una stretta minoranza (12%) delle pazienti ha mostrato una concentrazione di folato RBC considerata specificamente adeguata per la prevenzione dei difetti del tubo neurale nel feto (> 400 ng/ml).

Al contrario, i livelli sierici di vitamina A, vitamina E, ferro e ferritina erano appropriati nella quasi totalità dei casi analizzati (> 80%).

Le tabelle che seguono mostrano la frequenza di donne con livelli appropriati in relazione a due importanti variabili: l'età e l'utilizzo di supplementazione orale di acido folico. Raggruppando le donne in base ai terzili di età, non sono state osservate differenze nella percentuale di soggetti che raggiungono livelli adeguati dei singoli analiti, con l'eccezione di omocisteina e vitamina A, per le quali una maggiore percentuale di soggetti di età  $\geq 39$  anni si è rivelata avere valori appropriati rispetto alle donne più giovani.

Percentuale di donne con livelli appropriati dei singoli analiti, in base all'età anagrafica

Sostanza	Soggetti N°	Età (anni)			p
		$\leq 35$	36-38	$\geq 39$	
Folato sierico	268	74 (63-83)%	74 (64-83)%	84 (75-90)%	0.19
Folato RBC	268	11 (5-19)%	13 (7-22)%	12 (7-20)%	0.91
Omocisteina	268	72 (61-81)%	58 (47-69)%	77 (68-85)%	<b>0.016</b>
Vitamina B12	268	37 (26-48)%	47 (36-58)%	47 (37-58)%	0.27
Vitamina A	265	96 (90-99)%	100 (96-100)%	100 (96-100)%	<b>0.030</b>
Vitamina E	265	100 (96-100)%	100 (96-100)%	100 (96-100)%	n.a.
Ferro sierico	269	84 (74-91)%	83 (73-90)%	84 (75-90)%	0.98
Ferritina sierica	269	86 (77-93)%	77 (66-85)%	84 (75-90)%	0.32

Dati riportati come percentuale (intervallo di confidenza al 95%); n.a.= non applicabile

Percentuale di donne con livelli appropriati dei singoli analiti, in base all'utilizzo di supplementazione orale di acido folico.

Sostanza	Soggetti N°	Supplementazione acido folico		
		Sì	No	p
Folato sierico	268	94 (89-97)%	64 (55-72)%	<b>0.001</b>
Folato RBC	268	22 (15-31)%	3 (1-7)%	<b>0.001</b>
Omocisteina	268	85 (77-91)%	56 (48-64)%	<b>0.001</b>
Vitamina B12	268	45 (36-54)%	42 (34-50)%	0.62
Vitamina A	265	98 (93-100)%	100 (97-100)%	0.11
Vitamina E	265	100 (97-100)%	100 (97-100)%	n.a.
Ferro sierico	269	83 (76-89)%	83 (76-89)%	0.98
Ferritina sierica	269	82 (75-88)%	83 (75-89)%	0.54

Dati riportati come percentuale (intervallo di confidenza al 95%); n.a.= non applicabile

In totale, 125 donne su 269 (pari al 46%, 95%CI: 40-53%) hanno riferito di assumere da almeno un mese supplementazione orale di acido folico al momento della partecipazione allo studio. Come previsto, queste donne hanno mostrato una probabilità significativamente maggiore di avere adeguati livelli di folato sierico, di folato RBC e di omocisteina rispetto alle donne non utilizzatrici di supplementazione. Interessante notare come solo una minoranza di pazienti avesse raggiunto livelli ottimali di folato intraeritrocitario nonostante la supplementazione di acido folico; in particolare, il tasso di donne con livelli pre-gravidici ottimali di folato RBC (> 400 ng/ml) è stato pari al 25% (95% CI: 15-38%) e al 23% (95% CI: 12-37%) tra chi aveva fatto uso di acido folico per almeno un anno e chi lo aveva assunto per meno di un anno, rispettivamente (p = 0.83).

L'analisi di regressione lineare effettuata per valutare l'effetto di alcune variabili prese in considerazione (uso di supplementazione di acido folico, indice di massa corporea BMI, fumo, precedenti figli ed età) sulla concentrazione degli analiti ha dato i risultati riportati nella tabella che segue.

Interessante notare che l'assunzione di acido folico ha mostrato:

- 1) una significativa associazione positiva con i livelli di folato sierici, coefficiente di B (95% CI) = 7.7 (6.7; 8.6),  $R^2=0.50$ ,  $p=0.001$ ;
- 2) una significativa associazione positiva con i livelli di folato RBC, coefficiente B (95% CI) = 82.0 (62.3; 101.7),  $R^2=0.20$ ,  $p=0.001$ ;
- 3) una significativa associazione negativa con la concentrazione di omocisteina, coefficiente B (95% CI) = -2.50 (-3.42; -1.58),  $R^2=0.10$ ,  $p=0.001$ .

Inoltre, il BMI ha mostrato una significativa associazione negativa con:

- 1) folato sierico, coefficiente B (95% CI) = -0.20 (-0.35; -0.05),  $R^2=0.26$ ,  $p = 0.009$ ;
- 2) sideremia, coefficiente B (95% CI) = -1.23 (-2.25; -0.20),  $R^2=0.02$ ,  $p=0.019$ .

L'analisi di regressione lineare non ha evidenziato altre associazioni statisticamente significative come mostrato nella tabella che segue.

Analisi di regressione logistica per individuare il contributo delle variabili indipendenti nella determinazione dei livelli delle singole sostanze misurate nel sangue.

		<b>Variabili Indipendenti</b>				
<b>Sostanza</b>		Uso di acido folico (0=no; 1 =si)	BMI (kg/m <sup>2</sup> )	Fumo	Precedenti parti (n°)	Età (anni)
Folato sierico	B (95%CI)	<b>7.72 (6.73; 8.60)**</b>	<b>-0.20 (-0.35; -0.05)*</b>	-0.15 (-2.39;0.29)	-1.37 (-3.04; -0.31)	0.06 (-0.13; 0.25)
	R <sup>2</sup>	0.50	0.26	0.013	0.01	0.002
Folato RBC	B (95%CI)	<b>82.0(62.3; 101.7)**</b>	-0.48 (-3.05; 2.10)	-10.5 (-32.9; 11.9)	-14.1 (-42.6; 14.3)	2.94 (-0.18; 6.06)
	R <sup>2</sup>	0.20	0.001	0.08	0.004	0.13
Omocisteina	B (95%CI)	-0.34 (0.46; -0.21)**	-0.01 (-0.02; 0.01)	-0.02 (-0.20; 0.16)	0.005 (-0.16; 0.17)	0.001 (-0.02; 0.02)
	R <sup>2</sup>	0.10	0.001	0.001	0.001	0.001
Vitamina B12	B (95%CI)	46.10 (-5.71; 97.91)	-3.97 (-10.04; 2.09)	-11.9 (-54.3; 30.7)	35.98 (-31.12; 103.13)	3.24 (-4.17; 10.65)
	R <sup>2</sup>	0.011	0.006	0.003	0.004	0.003
Vitamina A	B (95%CI)	-0.008 (-0.32; 0.02)	0.001 (-0.002; 0.004)	0.01 (-0.02; 0.04)	0.02 (-0.02; 0.05)	0.00 (-0.003; 0.003)
	R <sup>2</sup>	0.002	0.001	0.004	0.003	0.001
Vitamina E	B (95%CI)	0.41 (-0.15; 0.98)	0.015 (-0.052; 0.081)	-0.12 (-0.75;0.52)	-0.373 (-1.11; 0.36)	0.04 (-0.04; 0.12)
	R <sup>2</sup>	0.008	0.001	0.001	0.004	0.004
Ferro	B (95%CI)	-1.55 (-10.36; 7.25)	<b>-1.23 (-2.25, -0.20)*</b>	4.44 (-5.16; 14.05)	-0.32 (-11.71; 11.06)	0.01 (-1.24; 1.26)
	R <sup>2</sup>	0.001	0.021	0.008	0.001	0.001
Ferritina sierica	B (95%CI)	4.93 (-4.45; 14.40)	-1.55 (-10.46; 7.25)	3.36 (-7.99; 14.72)	-9.33 (-21.55; 2.89)	-0.14 (-1.49; 1.21)
	R <sup>2</sup>	0.004	0.001	0.003	0.008	0.001

I coefficienti B risultanti dall'analisi di regressione logistica indicano la variazione nella concentrazione dell'analita dovuta al cambiamento di una unità nella variabile indipendente.

R<sup>2</sup>= è il quadrato del coefficiente multiplo di correlazione ed esprime la percentuale di variazione dei livelli dell'analita dovuta alla variabile indipendente.

RBC= Red Blood Cells; 95%CI= Intervallo di confidenza al 95%

Fumo: 0 =No, 1= <5 sigarette/giorno; 2= ≥5 sigarette/giorno

\*= p<0.02; \*\*=p=0.001

Da notare che l'uso di supplementazione di acido folico comporta un incremento pari a 7.7 ng/ml e a 82 ng/ml dei livelli di folato sierico e intraeritrocitario, rispettivamente. Un aumento di un'unità di

BMI prevede, viceversa, una riduzione pari a 0.2 ng/ml dei livelli di folato nel siero.

## Studio 5: “Folato, Omocisteina, Vitamina B12 e tasso di gravidanza in cicli IVF”

Sono state reclutate 211 donne di età  $\leq 40$  anni. Circa il 20% delle pazienti inizialmente selezionate per partecipare allo studio non ha accettato; le caratteristiche basali delle donne non reclutate non sono risultate differenti da quelle delle donne incluse (dati non mostrati). Due donne sono state escluse per mancanza dei dosaggi e l'analisi finale dei dati ha riguardato pertanto 209 pazienti. Per sei di esse non è disponibile il dosaggio di omocisteina. Le principali caratteristiche cliniche e i parametri relativi al ciclo di IVF sono riportati nelle seguenti tabelle:

Caratteristiche basali delle donne incluse nello studio

Variabile	n= 209
Età (anni)	36.1 $\pm$ 3.0
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	22.1 $\pm$ 4.0
Durata infertilità (anni)	3.8 $\pm$ 2.5
Precedenti gravidanze	31 (15%)
Numero precedenti cicli IVF	
0	124 (59%)
1-2	65 (31%)
3-5	20 (10%)
FSH 3° giorno del ciclo (IU/ml)	7.8 $\pm$ 3.2
AMH (ng/ml)	2.0 [0.9-3.7]
Indicazione alla PMA	
Inspiegata / ridotta riserva ovarica	44 (21%)
Maschile	54 (26%)
Fattore tubarico / endometriosi	57 (27%)
Mista	48 (23%)
Fattore ovulatorio	6 (3%)

Dati espressi come media  $\pm$  SD, mediana [range interquartile] o numer (percentuale)

Novantasette donne su 209 (pari al 46%) hanno riferito di aver fatto uso di supplementazione di acido folico per almeno un mese prima della partecipazione allo studio. I valori medi, le mediane, i quartili e i terzili delle concentrazioni di folato, omocisteina e vitamina B12 sono riassunti nella tabella che segue.

Analita	Concentrazione			Terzili		
	Media ± SD	Media geometrica (95%CI)	Mediana (IQR)	Primo	Secondo	Terzo
	Folato RBC (ng/ml)	295 ± 92	281 (271-292)	279 (225-346)	≤ 236	237 - 326
Folato sierico (ng/ml)	11.4 ± 5.4	10.1 (9.5-10.8)	10.1 (6.7-17.0)	≤ 7.4	7.5 - 14.2	≥ 14.3
Omocisteina (mg/l)	9.5 ± 4.0	9.1 (8.6-9.3)	8.7 (7.5-10.8)	≤ 7.9	8.0 - 9.8	≥ 9.9
Vitamina B12 (pg/ml)	475 ± 218	439 (419-460)	438 (356-549)	≤ 379	380 - 499	≥ 500

95%CI: Intervallo di confidenza 95%; RBC: Red Blood Cells; IQR: Range Inter-Quartile

Cinquantasei donne hanno ottenuto una gravidanza clinica (27%). Il valore mediano [IQR] di folato intraeritrocitario nelle donne che hanno ottenuto una gravidanza è risultato pari a 328 [226-377] ng/ml, significativamente superiore a quello delle donne che non hanno ottenuto una gravidanza, essendo questo pari a 263 [225-330] ng/ml ( $p=0.018$ , test U di Mann-Whitney). Per quanto riguarda gli altri analiti, abbiamo osservato i seguenti valori mediani [IQR] nelle donne gravide e non gravide:

Folato sierico → gravide: 13.6 [8.4-19.2] ng/ml; non gravide: 9.4 [5.9-15.3] ng/ml;  $p=0.001$ ;

Omocisteina → gravide: 8.4 [7.0-10.1] mg/l; non gravide: 8.8 [7.7-11.0] mg/l;  $p=0.055$ ;

Vitamina B12 → gravide: 455 [378-563] pg/ml; non gravide: 429 [338-537];  $p=0.367$ .

Anche il folato sierico si è mostrato quindi significativamente superiore nelle donne il cui ciclo di IVF è esitato in una gravidanza.

La concentrazione di folati intraeritrocitari, come atteso, è positivamente correlata con la concentrazione di folati sierici (coefficiente di Spearman = 0.68,  $p<0.001$ ) e negativamente correlata con quella di omocisteina (-0.43,  $p<0.001$ ). Al contrario, la vitamina B12 ha valori non correlati a quelli dei folati intraeritrocitari (0.10,  $p=0.10$ ).

Le donne con concentrazioni intraeritrocitarie di folato appartenenti al terzo terzile ( $\geq 327$  ng/ml) sono state paragonate alle donne appartenenti agli altri due terzili (concentrazioni  $< 327$  ng/ml): le caratteristiche basali sono risultate simili, con l'eccezione dell'indicazione alla IVF. I risultati sono riassunti nella tabella che segue:

Variabile	Donne nel 3° terzile di folati RBC ( $\geq$ 327 ng/ml) n= 71	Donne nel 1° e 2° terzile di folati RBC ( $\geq$ 327 ng/ml) n= 138
Età (anni)	36.6 $\pm$ 3.1	35.8 $\pm$ 2.9
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	22.2 $\pm$ 3.4	22.0 $\pm$ 4.2
Durata infertilità (anni)	3.8 $\pm$ 2.3	3.8 $\pm$ 2.7
Precedenti gravidanze	9 (13%)	22 (16%)
Numero precedenti cicli IVF		
0	37 (52%)	87 (63%)
1-2	25 (35%)	40 (29%)
3-5	9 (13%)	11 (8%)
FSH 3° giorno del ciclo (IU/ml)	7.9 $\pm$ 3.1	7.7 $\pm$ 3.2
AMH (ng/ml)	2.2 [0.9-3.6]	1.9 [0.9-3.9]
Indicazione alla PMA		
Inspiegata / ridotta riserva ovarica	23 (32%)	21 (15%)*
Maschile	17 (24%)	37 (27%)
Fattore tubarico / endometriosi	13 (18%)	44 (32%)*
Mista	17 (24%)	31 (22%)
Fattore ovulatorio	1 (1%)	5 (4%)

Dati espressi come media  $\pm$  SD, mediana [range interquartile] o numero (percentuale)

\*  $p < 0.05$ , per riga

Il tasso di gravidanza clinica per ciclo, invece, è stato significativamente superiore per le donne appartenenti al terzile superiore di folati intraeritrocitari, paragonate alle donne appartenenti al primo e secondo terzile (vedi tabella seguente).

	Terzili di concentrazione Folato RBC		
	Terzo (≥327 ng/ml)	Primo-Secondo (<327 ng/ml)	P
Cicli iniziati	71	138	
Cicli cancellati prima del pick-up	3/71 (4%)	10/138 (7%)	0.55
Per scarsa risposta ovarica	3/71 (4%)	7/138 (5%)	1.00
OPU	68/71 (96%)	128/138 (93%)	0.55
Casi senza ovociti idonei	3/68 (4%)	9/128 (7%)	0.55
Tecnica inseminazione			
IVF Standard	26/65 (40%)	51/119 (43%)	
ICSI	39/65 (60%)	68/119 (57%)	0.70
Tasso fecondazione	0.80 [0.50-1.00]	0.80 [0.61-1.00]	0.70
Tasso di utilizzo*	0.46 [0.29-1.00]	0.40 [0.22-0.67]	0.89
“Freeze all”	10/65 (15%)	25/119 (21%)	0.35
Nessun embrione vitale	2/65 (3%)	10/119 (8%)	0.16
Embryo Transfer a fresco	47/65 (72%)	74/119 (62%)	0.17
con 1 Embrione	32 (68%)	56 (76%)	
con 2 Embrioni	15 (32%)	18 (24%)	0.36
CPR/paziente a fresco	17/47 (36%)	14/74 (19%)	<b>0.034</b>
Pazienti con embryo transfer da congelato	22/65 (34%)	44/119 (37%)	0.67
1 ciclo	20 (91%)	30 (68%)	
2 cicli	0 (0%)	10 (23%)	0.10
3 cicli	2 (9%)	4 (9%)	
CPR/paziente con embrioni scongelati	10/22 (45%)	13/44 (30%)	0.20
CPR cumulativo per ciclo	27/71 (38%)	27/138 (20%)	<b>0.004</b>
CPR cumulativo per pick-up	27/68 (40%)	27/128 (21%)	<b>0.006</b>
Pazienti con embrioni rimanenti	12/65 (18%)	22/119 (18%)	1.00
di cui non gravide	5 (42%)	12 (55%)	0.67

Dati riportati come numero (percentuale) o mediana [range inter-quartile]

RBC: Red blood cells; pick up: prelievo ovocitario; IVF: In vitro fertilization; ICSI: Intracytoplasmic sperm injection; CPR: Clinical Pregnancy Rate (tasso di gravidanza clinica)

\* (n° embrioni trasferiti + n° of embrioni congelati) / n° zigoti

Il tasso di gravidanza clinica per ciclo a fresco e il tasso di gravidanza clinica cumulativo (ciclo a fresco + cicli con scongelamento) si sono mostrati significativamente aumentati per le donne appartenenti al terzo terzile di folati intraeritrocitari. L'OR di “gravidanza clinica cumulativa per ciclo iniziato” nelle donne con folato RBC nel terzo terzile di concentrazione è risultato pari a 2.5 (95%CI: 1.3-4.7, p=0.006). L'OR aggiustato per età, BMI e indicazione alla IVF (che si è dimostrata differente tra i due

gruppi) è risultato pari a 2.8 (95%CI: 1.5-5.3, p=0.002).

Lo stesso tipo di analisi è stata ripetuta per confrontare i tassi di gravidanza delle donne appartenenti a differenti terzili per folato sierico, omocisteina e vitamina B12.

I risultati sono riportati nella tabella che segue:

Tasso di gravidanza cumulativa in base alla concentrazione degli analiti

Sostanza	Terzile di	Altri	p	Odds Ratio (95%CI)
	riferimento*	Gravidanze		
Folato RBC	27/71 (38%)	27/138 (20%)	<b>0.004</b>	2.5 (1.3-4.7)
Folato sierico	27/72 (38%)	29/137 (21%)	<b>0.011</b>	2.2 (1.2-4.2)
Omocisteina	22/68 (32%)	32/135 (24%)	0.19	1.5 (0.8-2.9)
Vitamina B12	21/71 (30%)	35/138 (25%)	0.51	0.8 (0.4-1.5)

Dati riportati come numero (percentuale); RBC: Red Blood Cells; 95%CI: Intervallo di Confidenza al 95%. L'Odds Ratio si riferisce alla gravidanza cumulativa nel terzile di riferimento rispetto agli altri.

\* Il terzile di riferimento è il terzo terzile per il folato sierico ( $\geq 14.3$  ng/ml), il folato RBC ( $\geq 327$  ng/ml) e la vitamina B12 ( $\geq 500$  pg/ml) mentre è il primo terzile per l'omocisteina ( $\leq 7.9$  mg/l).

L'effetto positivo dei folati sulle probabilità di gravidanza si è confermato anche per il folato dosato nel siero. Per quanto riguarda il ruolo dell'omocisteina, nonostante un trend a favore dei livelli inferiori, non si registra un risultato statisticamente significativo.

Al fine di aggiustare gli Odds Ratio di gravidanza cumulativa per i singoli analiti, abbiamo individuato le variabili eventualmente differenti tra gruppi appartenenti a diversi terzili da utilizzare nell'analisi di regressione insieme a età e BMI (dati non riportati). Gli ORs per folato sierico e vitamina B12 sono stati così aggiustati anche per "precedenti figli", mentre l'OR per omocisteina è stato aggiustato anche per "indicazione alla IVF". Gli ORs sono rimasti invariati, con l'eccezione di quello per il folato sierico che è diventato = 2.1 (95%CI: 1.1-4.0)

## Riassunto dei risultati

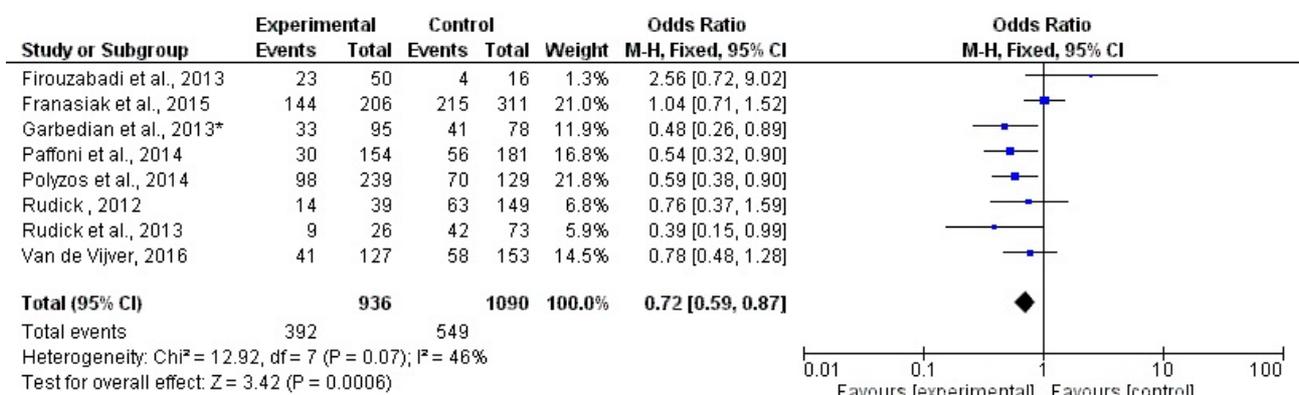
Studio	Analita	Outcome primario	Risultato principale	Pubblicazione
1	Vitamina D	Tasso di gravidanza in cicli IVF	Le donne con 25(OH)D $\geq$ 20 ng/ml hanno maggiori probabilità di gravidanza rispetto a quelle con insufficienza di 25(OH)D. OR aggiustato = 2.15 (95%; CI: 1.23–3.77) (p=0 .007).	Paffoni et al., J Clin Endocrinol Metab 2014
2	Vitamina D	Concordanza tra livelli sierici dei partner	Nel 71% delle coppie infertili si è osservata concordanza tra condizione di sufficienza o insufficienza tra partner, frequenza superiore a quanto previsto per solo effetto del caso (p = 0.007).	Paffoni et al., 2016 <i>submitted</i>
3	Vitamina D	Livelli sierici in donne fertili versus donne subfertili	Lo status di vitamina D non influenza la fertilità naturale. OR per subfertilità (tempo di ricerca prole >12 mesi) nelle donne con insufficienza di vitamina D = 0.85 (95%CI: 0.44-1.62)	Somigliana et al., Gynecol Obstet Invest. 2016
4	Folato, Omocisteina, Vitamina B12, Vitamina A, Vitamina E, Ferro, Ferritina	Percentuale di soggetti con livelli insufficienti	Solo una minoranza di donne afferenti il centro PMA presenta valori pre-gravidici adeguati di folato intraeritrocitario (12%), e di vitamina B12 (44%)	La Vecchia et al., Eur J Contracept Reprod Health Care 2016
5	Folato, Omocisteina, Vitamina B12	Tasso di gravidanza in cicli IVF	Le donne con valori di folato intraeritrocitario e folato sierico che ricadono nel terzo terzile per concentrazione hanno maggiori probabilità di gravidanza clinica in cicli di IVF. OR=2.8 (1.5-5.3) e 2.1 (1.1-4.0), rispettivamente.	Paffoni et al., 2016 <i>submitted</i>

# Discussione

## Vitamina D

Il nostro studio trasversale sui livelli di vitamina D nelle donne sottoposte a cicli di fecondazione in vitro ha evidenziato un tasso di successo (gravidanza clinica) significativamente ridotto per le donne che mostravano livelli insufficienti di 25(OH)D (<20 ng/ml). I nostri risultati sono sostanzialmente in linea con quelli osservati precedentemente nei due studi di Rudick et al (2012, 2014) e di Garbedian (2013), ma contrastano con quanto osservato in due studi iraniani (Aleyasin, 2011; Firouzabadi, 2014) che, tuttavia, mostravano una percentuale di donne con livelli sufficienti di vitamina D estremamente bassa esponendo lo studio a un rischio di errore di tipo II. Nel complesso, sommando anche i dati pubblicati successivamente, si può ritenere che livelli insufficienti di vitamina D influiscano negativamente sulle probabilità di gravidanza in cicli di fecondazione in vitro.

Il contributo dei diversi studi disponibili è riassunto nella figura seguente che indica per le donne con vitamina D insufficiente una riduzione relativa del tasso di gravidanza stimata intorno al 30%



Metanalisi degli studi osservazionali sul tasso di gravidanza in donne sottoposte a IVF con livelli di 25(OH)D insufficienti (control) rispetto a donne con livelli sufficienti (experimental).

Analisi effettuata con software RevMan. Version 5.3. Copenhagen: The Nordic Cochrane Centre, The Cochrane Collaboration, 2014

Tale effetto sembra essere mediato sia a livello ovarico, sia a livello endometriale. Infatti, nonostante una risposta simile alla stimolazione farmacologica dell'ovulazione, il numero di embrioni di alta qualità e, di conseguenza, la possibilità di effettuare l'embryo transfer allo stadio di blastocisti, sono maggiori in presenza di livelli sufficienti di vitamina D e questi ultimi permettono, inoltre, maggiori probabilità di impianto. L'effetto della vitamina D a livello uterino può esplicarsi sia attraverso la regolazione di geni target come HoxA10, sia modulando la risposta immunitaria locale che è considerata critica per lo sviluppo di una gravidanza fisiologica (Viganò, 2006).

Esistono alcuni aspetti da tenere in considerazione quando vengono paragonati differenti studi sulla vitamina D. Una questione di grande interesse è la soglia utilizzata per definire lo status di insufficienza. Il valore di cut-off comunemente accettato per definire la carenza di vitamina D [livelli sierici di 25(OH)D <20 ng/ml] è stato stabilito sulla base del metabolismo osseo nella popolazione generale, e può essere non opportuno per le caratteristiche del periodo peri-concezionale: alcuni Autori, infatti, suggeriscono che i livelli circolanti di 25(OH)D durante la gestazione dovrebbero essere superiori ai 40 ng/ml (Hollis, 2011). Pertanto, una maggiore biodisponibilità di vitamina D rispetto al valore di cut-off standard di 20 ng/ml potrebbe essere benefica anche per le coppie che si sottopongono a trattamenti per l'infertilità, con valori opportuni ancora da stabilire. Interessante notare come, tra i diversi studi, circa il 50-80% delle donne arruolate presenti valori superiori a 20 ng/ml; questa percentuale cala rapidamente all'aumentare della soglia utilizzata o in specifiche popolazioni. Alcune condizioni cliniche che si incontrano comunemente tra i candidati IVF (tra cui la fascia specifica di età, aumentato BMI, ovaio policistico, endometriosi, fibromatosi uterina) sono correlabili a variazioni significative nei livelli sierici di 25(OH)D; queste condizioni sono anche associate a variazioni rilevanti nei tassi di successo delle tecniche di IVF e devono essere pertanto sempre considerate nell'analisi dei dati. Purtroppo in alcuni degli studi attualmente presenti in letteratura non è possibile valutare l'impatto di questi fattori di confondimento.

Dai nostri dati emerge che i risultati migliori si possono ottenere nelle donne con livelli di vitamina D

ottimali, cioè pari ad almeno 30 ng/ml, evidenziando un progressivo aumento delle probabilità di gravidanza all'aumentare dei livelli sierici di vitamina D.

Il nostro studio presenta alcuni limiti: in primo luogo, seppur statisticamente significativo, l'intervallo di confidenza relativo all'OR per gravidanza clinica è piuttosto ampio, e non permette pertanto, di per sé, di stimare con precisione l'entità dell'effetto osservato. A questo proposito, va sottolineato che la nostra casistica rappresenta uno dei contributi numericamente più corposi disponibili in letteratura e, insieme agli altri studi ora disponibili, ha permesso di ottenere una stima affidabile del contributo dell'insufficienza di vitamina D nei risultati della IVF. In secondo luogo, si può supporre una relazione causale tra bassi livelli di vitamina D e riduzione dei tassi di gravidanza, ma in base ai risultati disponibili non è possibile dimostrarla: non è altresì possibile escludere che si tratti di due fenomeni semplicemente associati o secondari a una causa comune. Le numerose evidenze ottenute con i modelli animali e i risultati osservati nell'uomo depongono fortemente a favore di un nesso causale (Luk, 2012), ma solo idonei studi randomizzati potranno verificare l'efficacia della vitamina D nell'aumentare le probabilità di successo della IVF. In caso affermativo, si tratterebbe di un trattamento particolarmente importante in quanto estremamente economico (nell'ordine di pochi euro annui) e privo di rischi per la maggior parte della popolazione che, inoltre, potrebbe avere effetti benefici sull'outcome ostetrico riducendo l'incidenza di pre-eclampsia e diabete gestazionale (Aghajafari, 2013).

A questo proposito, e sulla base delle evidenze osservazionali del nostro e di altri studi, abbiamo disegnato uno studio clinico randomizzato controllato multicentrico (con l'Ospedale San Raffaele) con lo scopo di valutare se la supplementazione di vitamina D, nelle donne con insufficienza, possa aumentare la probabilità di gravidanza clinica. Questo progetto è stato finanziato nel bando competitivo di ricerca finalizzata 2013 ad opera del Ministero della Salute sotto il coordinamento del Prof. Somigliana e il reclutamento delle pazienti è iniziato a Ottobre 2016. I risultati sono attesi entro 36 mesi. Ci si attende che risolvendo la situazione di insufficienza con una singola dose di 600.000 UI di vitamina D si possano aumentare del 50% le probabilità di gravidanza delle donne sottoposte a IVF. I

dettagli del progetto sono in allegato.

Nonostante la presenza di numerosi studi sull'effetto della vitamina D nella riproduzione umana, non è disponibile alcun dato sulla possibilità che i livelli insufficienti possano combinare i loro effetti negativi su entrambi i partner delle coppie infertili. Considerando il ruolo essenziale dell'esposizione solare e delle abitudini alimentari nella regolazione dei livelli circolanti di vitamina D, ci si può attendere che vi sia una correlazione tra lo status dei membri di una stessa coppia. Per questo motivo abbiamo voluto testare questa ipotesi indagando se nelle coppie senza una causa nota di infertilità si verifici un eccesso di coppie concordanti per insufficienza di vitamina D. In altre parole, l'insufficienza di vitamina D potrebbe essere un ostacolo alla riproduzione coinvolgendo entrambi i partner di una coppia e non solo i singoli individui. Il nostro studio prospettico sulle coppie ha dimostrato che la concordanza (73%) è significativamente superiore a quanto ci si attenderebbe per effetto del caso (61%), supportando l'effetto dello stile di vita comune all'interno delle coppie sui livelli sierici di 25(OH)D. D'altra parte, non siamo stati in grado di identificare un'incidenza significativamente aumentata di coppie insufficienti per vitamina D all'interno di specifiche indicazioni alla IVF: in questo senso il nostro studio ha escluso che l'insufficienza di vitamina D possa rappresentare per sé un fattore di infertilità anche se ha suggerito che tra le coppie con infertilità inspiegata ci possa essere un eccesso di concordanza per insufficienza di vitamina D. Al fine di evitare l'effetto della stagionalità sui risultati, abbiamo utilizzato un periodo breve di reclutamento (2 mesi) che ha limitato la numerosità campionaria stabilita per l'outcome primario di concordanza tra i partner. Per questo motivo, deve essere riconosciuto che il nostro campione è insufficiente per delucidare l'obiettivo secondario dello studio, cioè la distribuzione dei casi di insufficienza rispetto alla causa di infertilità. Un campione significativamente più ampio, che tenga conto dell'effetto della stagionalità, potrebbe essere utilizzato per trarre delle conclusioni in merito, con l'obiettivo finale di stabilire se la supplementazione di vitamina D possa avere un ruolo se somministrata a entrambi i membri di una coppia carente.

Per il problema dell'effetto confondente della stagionalità, abbiamo scelto per il reclutamento un

periodo generalmente non interessato da vacanze (primavera) e abbiamo escluso le coppie che avessero soggiornato in luoghi di villeggiatura soleggiate. Nel periodo utilizzato, la percentuale di soggetti con livelli  $>20$  ng/ml di 25(OH)D si è dimostrata inferiore all'atteso (probabilmente a causa della lontananza temporale dalle vacanze estive) e la popolazione selezionata, in particolare, non è stata numericamente idonea per studiare soglie differenti ed estendere l'analisi ai casi in cui entrambi i partner mostrassero livelli carenziali ( $<10$  ng/ml) o ottimali ( $>30$  ng/ml) (Hosseid-Nezhad e Holick, 2013). Infatti, il numero di coppie di cui entrambi i partner avevano livelli superiori a 30 ng/ml o inferiori a 10 ng/ml era insufficiente (3 e 3, rispettivamente) per consentire analisi statistiche.

La concordanza tra livelli di vitamina D all'interno delle coppie infertili ha una rilevanza clinica che merita approfondimenti. È interessante notare come la correlazione sia statisticamente significativa, ma il coefficiente R di Pearson (0.52) non indica un'associazione forte (Cohen, 1988). Allo stesso modo, anche se una concordanza del 73% per status di sufficienza e insufficienza può sembrare elevata, va sottolineato che se la distribuzione fosse stata guidata esclusivamente dal caso, ci si sarebbe atteso un tasso di concordanza pari al 61%. Questa concordanza moderata era attesa sulla base dei numerosi fattori che possono influenzare i livelli di vitamina D e che solo in parte possono sovrapporsi tra i membri di una coppia. Anche se si suppone che i partner condividano in larga parte le vacanze, gli hobby all'aria aperta e la dieta, queste sovrapposizioni non possono essere rigorose. Inoltre, i partner possono differire per caratteristiche di pigmentazione cutanea, per l'uso di creme solari, per l'utilizzo di lampade abbronzanti UV, per l'abbigliamento e per il tipo di lavoro. Tutti questi fattori sono noti per influenzare lo status di vitamina D (Hosseid-Nezhad e Holick, 2013).

La fecondazione in vitro rappresenta un interessante strumento per lo studio della fertilità umana, soprattutto perché permette di valutare la competenza dei gameti e degli embrioni alle prime fasi dello sviluppo; tuttavia non permette di considerare alcuni aspetti cruciali della fisiologia riproduttiva, quali la funzionalità della cervice uterina, il trasporto degli spermatozoi nel tratto genitale femminile, l'attività tubarica e molte delle regolazioni endocrine. Poiché il ruolo della vitamina D nella riproduzione

potrebbe insistere su uno o più di questi aspetti, abbiamo deciso di estendere le nostre indagini anche ai concepimenti naturali. Abbiamo dunque valutato se i livelli sierici di 25(OH)D possano influenzare il tempo di ricerca prole reclutando donne al primo trimestre di gravidanza che avessero impiegato più di 12 mesi per ottenere la gravidanza (quindi subfertili per definizione) e donne che avessero impiegato meno di 12 mesi (quindi fertili). I livelli sierici di vitamina D sono risultati sovrapponibili tra i due gruppi e l'analisi per soglia di 25(OH)D pari a 20 ng/ml non ha mostrato differenze in termini di incidenza di subfertilità. I nostri dati hanno dunque escluso che i livelli sierici di vitamina D abbiano un ruolo chiave nei concepimenti naturali. Il disegno sperimentale scelto, coinvolgendo donne gravide sia tra i casi che tra i controlli, può sembrare inappropriato. In realtà, il tempo di ricerca prole rappresenta un modello di studio per la fertilità molto efficace perché privo della maggior parte dei comuni bias ed è stato utilizzato in alcuni studi cardine per l'infertilità di coppia, per indagare, ad esempio il trend temporale dell'infertilità (Joffe, 2000), o l'effetto di alcuni fattori ambientali sulle probabilità di concepimento (Homan, 2007) o, ancora, l'effetto della qualità spermatica sulla fertilità (Guzick, 2001). I nostri dati depongono a sfavore di una associazione tra livelli di vitamina D e tempo di ricerca prole; bisogna tuttavia considerare che nel nostro campione solo una piccola percentuale di donne mostrava livelli ottimali di vitamina D (pari ad almeno 30 ng/ml). Abbiamo dunque potuto concludere che in una popolazione con livelli bassi di vitamina D, questa non influisce sul tempo di ricerca prole, ma non ci è stato possibile indagare se lo status ottimale di vitamina D possa rappresentare un vantaggio in termini di tempo necessario per ottenere una gravidanza. Il disegno sperimentale ottimale per chiarire questi aspetti sarebbe quello di reclutare prospetticamente donne in cerca di gravidanza e monitorare periodicamente i loro livelli di vitamina D per poter controllare anche le variazioni dovute alla stagione: si tratta ovviamente di un disegno particolarmente oneroso e complicato.

Nell'interpretazione dei nostri risultati è necessario tenere in considerazione che l'effetto della vitamina D potrebbe essere ristretto a particolari sottogruppi e non interessare la popolazione generale. Se, ad esempio, immaginassimo una correlazione con il tasso di aborto precoce, dovremmo ammettere che il

nostro campione, reclutato intorno alla 12esima settimana di gestazione, è non informativo. Inoltre, il dosaggio in questa fase della gravidanza potrebbe risentire di un possibile effetto “modificatore” della gravidanza stessa e non rappresentare un vero valore basale. Le evidenze attuali, tuttavia, non individuano nella gravidanza un possibile fattore in grado di alterare i livelli sierici di 25(OH)D (Møller, 2012).

Valutati i limiti dello studio, possiamo sostenere che i nostri dati non sostengono l'ipotesi che i livelli di vitamina D nella donna abbiano un ruolo cruciale per la fertilità naturale.

## Folato

Il progetto di dottorato ha inoltre valutato i livelli ematici di altri micronutrienti ritenuti importanti per il processo riproduttivo. In una coorte prospettica di 269 donne italiane candidate a fecondazione in vitro, abbiamo riscontrato che i livelli di folati e di vitamina B12 sono marcatamente inferiori a quanto auspicabile. Utilizzando i valori soglia per la popolazione generale, la concentrazione di folato nel siero e negli eritrociti è risultata adeguata nella maggioranza della popolazione: tuttavia, utilizzando la soglia di folati intraeritrocitaria specificatamente indicata per prevenire i difetti del tubo neurale (>400 ng/ml), solo il 12% delle donne reclutate mostrava livelli adeguati. Anche tra le donne utilizzatrici di supplementazione orale di acido folico da più di un mese, i livelli di folato intraeritrocitario si sono rivelati adeguati solo in circa il 20% dei casi; come atteso, le donne che non facevano uso di supplementazione mostravano livelli idonei solo sporadicamente (3%). Si tratta di un risultato particolarmente interessante in quanto il folato intraeritrocitario è considerato un utile marcatore di insufficienza di acido folico nelle donne in età riproduttiva, mentre il folato sierico non lo è (Daly, 1995).

Nella popolazione generale, il polimorfismo 677C→T nel gene *MTHFR* è considerato essere il principale fattore determinante lo status di folato nelle donne di età riproduttiva. La variante omozigote TT è associata a livelli particolarmente ridotti di folato nel sangue (Tsang, 2015). La frequenza di questo

genotipo omozigote varia nelle diverse regioni e tra diversi gruppi etnici ed è molto comune in Italia, con una percentuale compresa tra il 15 e il 26% (Wilcken, 2003). Anche se nel nostro studio non è stata effettuata l'analisi genetica, possiamo ritenere che un genotipo particolarmente sfavorevole possa spiegare, almeno in parte, l'elevata frequenza di insufficienza di folato anche tra le donne che facevano uso di supplementazione orale. Per interpretare i nostri risultati, dobbiamo ricordare che la popolazione in studio è composta da donne che si sottopongono a trattamenti per l'infertilità: si tratta cioè di una popolazione molto selezionata. All'interno di questa popolazione, la proporzione di donne utilizzatrici di supplementazione di acido folico è stata pari al 46%; pur essendo una percentuale inferiore a quanto auspicabile, è superiore a quanto riportato in uno studio italiano multicentrico condotto su donne in cerca di gravidanza (Mastroiacovo, 2014). La bassa proporzione di donne con adeguati livelli di folati riscontrata nel nostro studio è largamente sovrapponibile a quanto pubblicato in altri studi, sia per le donne italiane in età riproduttiva, sia per altre popolazioni, incluse quelle in cui esiste la fortificazione degli alimenti con acido folico (Zappacosta, 2013; Kaehler, 2012; Tinker, 2015).

I nostri risultati sono di particolare interesse considerando che coinvolgono due aspetti fondamentali del processo riproduttivo: la salute del neonato e la probabilità di ottenere una gravidanza. In merito al secondo aspetto, non ci sono ancora evidenze conclusive, ma è ragionevole ritenere che alcuni micronutrienti, come la vitamina B12 e il folato, possano migliorare la fecondazione, l'impianto e l'evoluzione della gravidanza rappresentando, pertanto, un bersaglio terapeutico facilmente modificabile nella popolazione interessata.

Ogni donna dovrebbe assumere acido folico nel periodo periconcezionale (WHO, 2015); tuttavia nel nostro studio, meno della metà delle donne reclutate ha riferito di fare uso di supplementazione. Si tratta di una situazione critica che sottolinea l'urgenza di promuovere campagne di sensibilizzazione sull'importanza dell'acido folico nel periodo pre concezionale. In Italia non esistono strategie pubbliche per implementare l'uso di folato nella popolazione generale e inoltre i cibi non vengono fortificati. La supplementazione viene in genere suggerita in varie linee guida relative alla gravidanza e consiste in

complessi multivitaminici contenenti 0.4 mg di acido folico. In base a dati pubblicati in letteratura, possiamo stimare che nella popolazione generale italiana, solo una donna su quattro si supplementa con acido folico prima di una gravidanza (Zappacosta, 2013; Mastroiacovo, 2014; Lauria, 2012). Nella nostra casistica di donne infertili abbiamo osservato una frequenza circa doppia che suggerisce che le donne sottoposte a trattamenti per l'infertilità abbiano maggiore consapevolezza del problema e, probabilmente, vengano indirizzate per tempo alla supplementazione. Anche in quest'ottica, tuttavia, è necessario intensificare gli sforzi dei centri PMA per aumentare la percentuale di donne con livelli auspicabili di folato. Nel 1998, la Food and Drug Administration statunitense ha introdotto la fortificazione dei cereali con acido folico. Come già riportato, gli studi NHANES sono serviti per evidenziare che con la fortificazione alimentare, la media del folato sierico è aumentata da 4.8 a 13.0 ng/ml, mentre il folato intraeritrocitario è salito da 160 a 264 ng/ml (Gaskins, 2014). E' interessante confrontare la nostra popolazione con quella statunitense per scoprire come i livelli da noi riscontrati siano simili a quelli dello studio NHANES di circa 15 anni fa, cioè prima dell'introduzione della fortificazione alimentare. Paragonando invece donne candidate a trattamenti per l'infertilità, la popolazione degli USA mostra valori di folato sierico nettamente superiori a quelli riscontrati nel nostro studio: in particolare, il primo quartile riportato negli studi di Gaskins (2014, 2015) è sovrapponibile al terzo quartile della nostra popolazione. Significa che negli USA circa tre quarti delle donne mostrava valori superiori a 16.6 ng/ml a fronte di circa un quarto delle donne da noi reclutate.

I nostri dati hanno confermato una relazione inversa del BMI sui livelli di folato sierico, ma non di quello intraeritrocitario. Si tratta di una osservazione già emersa nello studio NHANES che aveva indicato per un aumento di BMI pari a 10 Kg/m<sup>2</sup> una riduzione dell'11% (o 1.9 ng/ml) dei livelli di folato (Mojtabai, 2004). L'analisi di regressione logistica dei nostri dati ha mostrato risultati del tutto sovrapponibili, con un decremento di 0.2 ng/ml di folato sierico per ogni punto di BMI in più. Pare opportuno, pertanto, che le donne in sovrappeso facciano uso di dosi aumentate di acido folico.

Lo studio prospettico che ha indagato i tassi di successo della IVF rispetto allo status del pathway

dell'omocisteina ha fornito risultati di interesse: la probabilità di gravidanza clinica per ciclo iniziato è significativamente superiore per le donne che ricadono nel terzile superiore per livelli di folati (sia sierici che intraeritrocitari). Poiché i dati basali dei gruppi di studi sono sovrapponibili e non abbiamo riscontrato differenze negli elementi prognostici principali, riteniamo che i risultati siano da ritenere robusti. Si tratta di dati che vanno ad aggiungersi a evidenze precedenti sulla associazione positiva tra il successo riproduttivo (a livello di qualità dei gameti, di probabilità di impianto e gravidanza) e un corretto pathway dell'omocisteina (Boxmeer, 2008; Gaskins 2014; Gaskins, 2015). Altre evidenze in merito all'effetto di specifici polimorfismi in geni coinvolti nel metabolismo dell'omocisteina sull'esito delle stimolazioni ovariche e della IVF (Haggarty, 2006; Laanpere, 2011) rafforzano indirettamente l'ipotesi di un coinvolgimento di questi metaboliti nella fisiopatologia della riproduzione umana. Non mancano, tuttavia, studi in cui non si sia evidenziato un effetto benefico dei livelli di folato o omocisteina sul tasso di successo nella fecondazione in vitro (Haggarty, 2006; Murto, 2014; Murto, 2015). Analogamente, per la vitamina B12, è stata evidenziata in precedenza un'associazione positiva con l'outcome della IVF in una popolazione esposta alla fortificazione con acido folico (Gaskins, 2015), ma altri due studi di coorte non erano giunti alla medesima conclusione (Haggarty, 2006; Boxmeer, 2009). I nostri dati sulla vitamina B12 sono in linea con questi ultimi lavori. Le differenze osservate tra i diversi studi non sono facilmente spiegabili; è possibile tuttavia, indicare alcune ipotesi. In primo luogo, è necessario valutare con attenzione i criteri di inclusione: gli ultimi lavori citati non hanno preso in considerazione le donne a cui non era stato eseguito l'embryo transfer o la cui gravidanza si fosse interrotta prematuramente. Se adeguati livelli di folato possono contrastare gli esiti negativi e influenzare le prime fasi del processo riproduttivo, l'esclusione di queste pazienti può aver mascherato il vero effetto sull'intera coorte. Inoltre, poiché non esistono soglie di riferimento condivise per ottimizzare le chance di successo nella IVF, sono stati utilizzati diversi approcci per l'analisi dei dati in accordo alle esigenze di stratificazione delle singole popolazioni. Così le categorie di riferimento sono sensibilmente discordanti tra i diversi lavori. In ultimo bisogna considerare che le differenti

caratteristiche socio-demografiche e geografiche possono giustificare buona parte della variabilità riscontrata negli studi fino ad ora pubblicati.

In generale, nonostante alcune discrepanze, è possibile affermare con ragionevole fondatezza che livelli adeguati di folati e omocisteina possono migliorare le probabilità di gravidanza nelle donne sottoposte a IVF. Il rationale biologico è insito nell'importanza del pathway dell'omocisteina in processi metabolici fondamentali per lo sviluppo e la crescita cellulare, come la sintesi degli acidi nucleici e delle proteine, la metilazione del DNA, la divisione cellulare e la produzione di energia che sono alla base dell'instaurarsi di una gravidanza e dello sviluppo di un nuovo individuo (Ebisch, 2007).

Nel nostro studio non è stato possibile evidenziare un effetto del folato o dell'omocisteina sui parametri embriologici; tuttavia, poiché il calcolo della numerosità era stato effettuato per indagare il tasso di gravidanza clinica, è possibile che i nostri risultati negativi siano dovuti a un sottodimensionamento campionario o al disegno dello studio.

Per interpretare correttamente i risultati ottenuti, è opportuno considerare alcuni limiti del nostro studio. In primis, la nostra popolazione è caratterizzata da bassi livelli di folato a causa di una scarsa diffusione della supplementazione e dell'assenza di cibi fortificati; per questo motivo le nostre conclusioni, pur rappresentative per la popolazione italiana, devono essere estrapolate ad altre popolazioni solo con la dovuta cautela. In questo ambito è interessante notare una similarità tra i nostri dati e quelli prodotti da un recente studio multicentrico nazionale che riporta una frequenza di supplementazione (acido folico per almeno un mese) pari al 49% tra le donne gravide che avevano programmato la gravidanza e pari al 58% tra le donne che l'avevano ottenuta con la procreazione medicalmente assistita (Nilsen, 2016).

In secondo luogo, anche se statisticamente significativi, gli ORs ottenuti mostrano un intervallo piuttosto ampio, tale da impedire una precisa stima dell'effetto dei folati sulla probabilità di gravidanza. Terzo, i nostri dati sono ancora privi dell'esito finale della gravidanza (tasso di bambini nati), ma, data l'ampiezza delle differenze osservate e considerando che maggiori livelli di folato dovrebbero prevenire

l'aborto o, al limite, non avere alcun effetto (Gindler, 2001; Gaskins, 2014), possiamo ragionevolmente affermare che i risultati saranno confermati anche dal dato relativo alle nascite. In modo analogo, sarebbe maggiormente informativo estendere il follow up fino al completo utilizzo di tutti gli embrioni prodotti durante il ciclo di IVF ed eventualmente crioconservati; tuttavia, considerando che un disegno sperimentale simile richiede molti mesi o anni per essere praticato, bisognerebbe tenere in considerazione che possibili variazioni concomitanti nei livelli basali di folato potrebbero alterare i risultati. In ogni caso, il nostro studio ha permesso di analizzare il dato cumulativo per circa l'85% delle pazienti incluse.

I dati prodotti da questo studio affermano che, nella nostra popolazione, le donne che affrontano cicli di IVF con maggiori livelli di folato ematico hanno una probabilità almeno doppia di ottenere una gravidanza clinica rispetto alle donne con livelli inferiori. Benché non sia ancora possibile stabilire un nesso causale tra carenza di folato e difficoltà di concepimento, sarebbe estremamente interessante approfondire questo aspetto e disegnare studi per individuare delle soglie di riferimento specifiche al fine di promuovere interventi nutrizionali efficaci nell'ottimizzazione dei trattamenti di IVF e nella riduzione delle complicanze ostetrico/fetali.

## **Vitamina A, vitamina E, ferro e ferritina**

Riguardo a vitamina A e vitamina E, abbiamo rilevato che la quasi totalità della popolazione analizzata mostrava livelli adeguati. Si tratta di un dato atteso considerando che le situazioni carenziali per queste vitamine sono infrequenti se non nei Paesi in via di sviluppo dove talvolta rappresentano una emergenza sanitaria (WHO, 2009). E' stato inoltre riportato che le donne fumatrici hanno una maggiore incidenza di insufficienza di vitamina A (Yang, 2015); i nostri dati non confermano questa osservazione, ma è possibile che la numerosità campionaria non sia stata sufficiente per chiarire questo aspetto. Si tratta di un'associazione interessante poiché l'uso di tabacco è stato correlato con alcune complicanze

della gravidanza quali basso peso alla nascita, aborto e morte neonatale improvvisa (Andres, 2000).

I livelli di ferro e ferritina sono risultati idonei nella maggioranza (>80%) delle pazienti studiate. Si tratta di livelli simili a quelli tipici delle donne italiane al primo trimestre di gravidanza (Parisi, in press). Livelli di ferritina elevati (>70 µg/l) possono contrastare la progressiva perdita di ferro attesa durante la gravidanza anche in assenza di supplementazione di ferro (Milman, 2006): simili valori, tuttavia, sono stati riscontrati in meno del 25% dei nostri casi. Questo significa che anche se i livelli ematici di ferro sono considerabili idonei rispetto alla popolazione generale, le specifiche richieste nutrizionali della gravidanza fanno sì che molte delle donne candidate a IVF si trovino in uno status pre-gravidico non ottimale. Abbiamo osservato che i livelli di ferro sono in correlazione negativa con il BMI; in particolare, ogni aumento di 1 kg/m<sup>2</sup> nel BMI è associato, nella nostra popolazione, a una riduzione della concentrazione di ferro pari a 1.2 µg/dl . Questo dato deve essere tenuto in considerazione per stabilire i dosaggi di ferro da somministrare nelle donne in sovrappeso o obese.

I risultati del nostro studio sono probabilmente rappresentativi della popolazione italiana che si sottopone a trattamenti per la fertilità. A causa della specificità del campione, tuttavia, è necessario utilizzare cautela quando si voglia estendere la validità dei dati alla popolazione generale in età concezionale. Si pensi, ad esempio, che l'età media delle donne sottoposte a IVF è superiore a quella delle altre donne e che lo specifico percorso terapeutico favorisce la consapevolezza dell'importanza della supplementazione multivitaminica/minerale.

Un altro importante fattore di confondimento nell'analisi dei nostri dati è rappresentato dalla possibile presenza di stili di vita (alimentari) che incidono significativamente sui risultati. Per valutare l'effetto del regime alimentare sui dati a nostra disposizione, le donne reclutate sono state sottoposte a un questionario alimentare validato (FFQ, Decarli, 1996 ). I dati, attualmente in elaborazione, potranno chiarire il ruolo della dieta sui livelli dei micronutrienti analizzati.

# Conclusioni

Questo progetto di dottorato di ricerca ha evidenziato che le coppie infertili, e in particolare le donne, presentano con elevata frequenza livelli insufficienti di vitamina D, folato e vitamina B12. Questa condizione, con specifico riferimento alla vitamina D e al folato, oltre a rappresentare un fattore di rischio per le complicanze di una possibile gravidanza, è fortemente associata a un minor tasso di successo delle tecniche di fecondazione in vitro. Ulteriori studi sono necessari per evidenziare eventuali relazioni causali tra gli stati di insufficienza e il successo riproduttivo. Per quanto riguarda l'efficacia della supplementazione di vitamina D, a latere del presente progetto di dottorato, è appena stato intrapreso uno studio randomizzato multicentrico.

La dimostrazione di un beneficio in termini di gravidanze per ciclo di IVF attraverso l'utilizzo di supplementazione di micronutrienti sarebbe un risultato di enorme interesse perché porrebbe le basi di un intervento efficace, economico e di facile realizzazione in un ambito in cui i progressi sono ormai lenti e perlopiù dipendenti da costose tecnologie.

# Bibliografia

- Abbas MA, Taha MO, Disi AM, Shomaf M. Regression of endometrial implants treated with vitamin D3 in a rat model of endometriosis. *European Journal of Pharmacology* 2013;**715**:72–75.
- Adaikalakoteswari A, Vatish M, Lawson A, Wood C, Sivakumar K, Mcternan P, Webster C, Anderson N, Yajnik C, Tripathi G, *et al.* Low Maternal Vitamin B12 Status Is Associated with Lower Cord Blood HDL Cholesterol in White Caucasians Living in the UK. *Nutrients* 2015;**7**:2401–2414.
- Adaikalakoteswari A, Jayashri R, Sukumar N, Venkataraman H, Pradeepa R, Gokulakrishnan K, Anjana RM, Mcternan PG, Tripathi G, Patel V, *et al.* Vitamin B12 deficiency is associated with adverse lipid profile in Europeans and Indians with type 2 diabetes. *Cardiovascular Diabetology* 2014;**13**:
- Aghajafari F, Nagulesapillai T, Ronksley PE, Tough SC, O'Beirne M, Rabi DM. Association between maternal serum 25-hydroxyvitamin D level and pregnancy and neonatal outcomes: systematic review and meta-analysis of observational studies. *BMJ* 2013;**346**: f1169.
- Aleyasin A, Hosseini MA, Mahdavi A, Safdarian L, Fallahi P, Mohajeri MR, Abbasi M, Esfahani F. Predictive value of the level of vitamin D in follicular fluid on the outcome of assisted reproductive technology. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2011;**159**: 132-137.
- Altmäe S, Stavreus-Evers A, Ruiz JR, Laanpere M, Syvänen T, Yngve A, Salumets A, Nilsson TK. Variations in folate pathway genes are associated with unexplained female infertility. *Fertility and Sterility* 2010;**94**:130–137.
- Altman D, Carroli G, Duley L, Farrell B, Moodley J, Neilson J, Smith D; Magpie Trial Collaboration Group.. Do women with pre-eclampsia, and their babies, benefit from magnesium sulphate? The Magpie Trial: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*. 2002;**359**:1877-1890.
- Andres RL, Day MC. Perinatal complications associated with maternal tobacco use. *Semin Neonatol*

2000;**5**: 231-241.

Ayar A, Celik H, Ozcelik O, Kelestimur H. Homocysteine-induced enhancement of spontaneous contractions of myometrium isolated from pregnant women. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica* 2003;**82**:789–793.

Azem F. Increased rates of thrombophilia in women with repeated IVF failures. *Human Reproduction* 2004;**19**:368–370.

Bae J, Shin SJ, Cha SH, Choi DH, Lee S, Kim NK. Prevalent genotypes of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR C677T and A1298C) in spontaneously aborted embryos. *Fertility and Sterility* 2007;**87**:351–355.

Bakacak M, Avci F, Ercan O, Köstü B, Serin S, Kiran G, Bostanci MS, Bakacak Z. The effect of maternal hemoglobin concentration on fetal birth weight according to trimesters. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine* 2014;**28**:2106–2110.

Bedaiwy MA, Falcone T, Mohamed MS, Aleem AA, Sharma RK, Worley SE, Thornton J, Agarwal A. Differential growth of human embryos in vitro: Role of reactive oxygen species. *Fertility and Sterility* 2004;**82**:593–600.

Benaglia L, Bermejo A, Somigliana E, Faulisi S, Ragni G, Fedele L, Garcia-Velasco JA. In vitro fertilization outcome in women with unoperated bilateral endometriomas. *Fertility and Sterility* 2013;**99**:1714–1719.

Bergen N, Jaddoe V, Timmermans S, Hofman A, Lindemans J, Russcher H, Raat H, Steegers-Theunissen R, Steegers E. Homocysteine and folate concentrations in early pregnancy and the risk of adverse pregnancy outcomes: the Generation R Study. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology* 2012;**119**:739–751.

Berker B, Kaya C, Aytac R, Satiroglu H. Homocysteine concentrations in follicular fluid are associated with poor oocyte and embryo qualities in polycystic ovary syndrome patients undergoing assisted reproduction. *Human Reproduction* 2009;**24**:2293–2302.

- Bläuer M, Rovio PH, Ylikomi T, Heinonen PK. Vitamin D inhibits myometrial and leiomyoma cell proliferation in vitro. *Fertility and Sterility* 2009;**91**:1919–1925.
- Boxmeer JC, Macklon NS, Lindemans J, Beckers NG, Eijkemans MJ, Laven JS, Steegers EA, Steegers-Theunissen RP. IVF outcomes are associated with biomarkers of the homocysteine pathway in monofollicular fluid. *Human Reproduction* 2009;**24**:1059–1066.
- Boxmeer JC, Brouns RM, Lindemans J, Steegers EA, Martini E, Macklon NS, Steegers-Theunissen RP. Preconception folic acid treatment affects the microenvironment of the maturing oocyte in humans. *Fertility and Sterility* 2008;**89**:1766–1770.
- Briggs DA, Sharp DJ, Miller D, Gosden RG. Transferrin in the developing ovarian follicle: evidence for de-novo expression by granulosa cells. *Mol Hum Reprod.* 1999;**5**:1107-1114.
- Brion LP, Bell EF, Raghuvver TS. Vitamin E supplementation for prevention of morbidity and mortality in preterm infants. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2003;
- Burke R, Leon J, Suchdev P. Identification, Prevention and Treatment of Iron Deficiency during the First 1000 Days. *Nutrients* 2014;**6**:4093–4114.
- Cabot RC, Harris NL, Shepard J-AO, Ebeling SH, Ellender SM, Peters CC, Kratz A, Ferraro M, Sluss PM, Lewandrowski KB. Normal Reference Laboratory Values. *New England Journal of Medicine* 2004;**351**:1548–1563.
- Carmel R. Diagnosis and management of clinical and subclinical cobalamin deficiencies: Why controversies persist in the age of sensitive metabolic testing. *Biochimie* 2013;**95**:1047–1055.
- Chappell LC, Seed PT, Briley AL, Kelly FJ, Lee R, Hunt BJ, Parmar K, Bewley SJ, Shennan AH, Steer PJ, *et al.* Effect of antioxidants on the occurrence of pre-eclampsia in women at increased risk: a randomised trial. *The Lancet* 1999;**354**:810–816.
- Chavarro JE, Rich-Edwards JW, Rosner BA, Willett WC. Iron Intake and Risk of Ovulatory Infertility. *Obstetrics & Gynecology* 2006;**108**:1145–1152.
- Clagett-Dame M, Knutson D. Vitamin A in Reproduction and Development. *Nutrients* 2011;**3**:385–428.

- Cohen, J. (1988). *Statistical power analysis for the behavioral sciences* (2nd ed.). Hillsdale, NJ, Etc.: Erlbaum
- Coulam CB, Jeyendran R, Fishel LA, Roussev R. Multiple thrombophilic gene mutations are risk factors for implantation failure. *Reproductive BioMedicine Online* 2006;**12**:322–327.
- Czeizel AE, Dudás I. Prevention of the First Occurrence of Neural-Tube Defects by Periconceptional Vitamin Supplementation. *New England Journal of Medicine* 1992;**327**:1832–1835.
- Daly LE, Kirke PN, Molloy A, Weir DG, Scott JM. Folate levels and neural tube defects. Implications for prevention. *JAMA* 1995;**274**:1698-1702.
- Decarli A, Franceschi S, Ferraroni M, Gnagnarella P, Parpinel MT, La Vecchia C, Negri E, Salvini S, Falcini F, Giacosa A. Validation of a food-frequency questionnaire to assess dietary intakes in cancer studies in Italy. Results for specific nutrients. *Ann Epidemiol* 1996;**6**:110-118
- Dhonukshe-Rutten RAM, Vries JHMD, Bree AD, Put NVD, Staveren WAV, L C P G M De Groot. Dietary intake and status of folate and vitamin B12 and their association with homocysteine and cardiovascular disease in European populations. *European Journal of Clinical Nutrition* 2007;**63**:18–30.
- Dobson A, Davis R, Rosen M, Shen S, Rinaudo P, Chan J, Cedars M. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C variants do not affect ongoing pregnancy rates following IVF. *Human Reproduction* 2006;**22**:450–456.
- Drakesmith H, Prentice AM. Hcpidin and the Iron-Infection Axis. *Science* 2012;**338**:768–772.
- EUROCAT. *EUROCAT* [Internet] Available from: <http://www.eurocat-network.eu/accessprevalencedata/prevalencetables>.
- Ebisch I. Homocysteine, glutathione and related thiols affect fertility parameters in the (sub)fertile couple. *Human Reproduction* 2006;**21**:1725–1733.
- Ebisch IM, Thomas CM, Peters WH, Braat DD, Steegers-Theunissen RP. The importance of folate, zinc and antioxidants in the pathogenesis and prevention of subfertility. *Hum Reprod Update* 2007;**13**:163-174.

- Edirimanne VE, Woo CW, Siow YL, Pierce GN, Xie JY, O K. Homocysteine stimulates NADPH oxidase-mediated superoxide production leading to endothelial dysfunction in rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 2007;**85**:1236–1247.
- El-Nemr A, L. Sabatini C., Wilson A. M. Vitamin B12 deficiency and IVF. *Journal of Obstetrics and Gynaecology* 1998;**18**:192–193.
- Erben RG. Deletion of Deoxyribonucleic Acid Binding Domain of the Vitamin D Receptor Abrogates Genomic and Nongenomic Functions of Vitamin D. *Molecular Endocrinology* 2002;**16**:1524–1537.
- Evans, H.M. The effects of inadequate vitamin A on the sexual physiology of the female. *J. Biol. Chem.* 1928, **77**:651–654.
- Ferraretti AP, La Marca A, Fauser BC, Tarlatzis B, Nargund G, Gianaroli L, Eshre Consensus on the Definition of 'Poor Response' to Ovarian Stimulation for in Vitro Fertilization: The Bologna Criteria. *Hum Reprod* 2011;**26**: 1616-1624
- Firouzabadi RD, Rahmani E, Rahsepar M, Firouzabadi MM. Value of follicular fluid vitamin D in predicting the pregnancy rate in an IVF program. *Arch Gynecol Obstet* 2014;**289**: 201-206.
- Garbedian K, Boggild M, Moody J, Liu KE. Effect of vitamin D status on clinical pregnancy rates following in vitro fertilization. *CMAJ Open* 2013;**1**: E77-82.
- Gaskins AJ, Afeiche MC, Wright DL, Toth TL, Williams PL, Gillman MW, Hauser R, Chavarro JE. Dietary folate and reproductive success among women undergoing assisted reproduction. *Obstet Gynecol* 2014;**124**: 801-809.
- Gaskins AJ, Chiu Y-H, Williams PL, Ford JB, Toth TL, Hauser R, Chavarro JE. Association between serum folate and vitamin B-12 and outcomes of assisted reproductive technologies. *American Journal of Clinical Nutrition* 2015;**102**:943–950.
- Gaudet L, Ferraro ZM, Wen SW, Walker M. Maternal Obesity and Occurrence of Fetal Macrosomia: A Systematic Review and Meta-Analysis. *BioMed Research International* 2014;**2014**:1–22.
- Gindler J, Li Z, Berry RJ, Zheng J, Correa A, Sun X, Wong L, Cheng L, Erickson JD, Wang Y et al.

- Folic acid supplements during pregnancy and risk of miscarriage. *Lancet* 2001;**358**:796-800.
- Goodman C, Coulam C, Jeyendran R, Fishel L, Roussev R. 1139687336 Which thrombophilic gene mutations are risk factors for recurrent pregnancy loss? *American Journal of Reproductive Immunology* 2006;**55**:391–391.
- Guzick DS, Overstreet JW, Factor-Litvak P, Brazil CK, Nakajima ST, Coutifaris C, Carson SA, Cisneros P, Steinkampf MP, Hill JA et al. Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. *N Engl J Med* 2001;**345**:1388-1393.
- Haggarty P, Mccallum H, Mcbain H, Andrews K, Duthie S, Mcneill G, Templeton A, Haites N, Campbell D, Bhattacharya S. Effect of B vitamins and genetics on success of in-vitro fertilisation: prospective cohort study. *The Lancet* 2006;**367**:1513–1519.
- Halder SK, Osteen KG, Al-Hendy A. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 Reduces Extracellular Matrix-Associated Protein Expression in Human Uterine Fibroid Cells. *Biology of Reproduction* 2013;**89**:150–150.
- Halder SK, Sharan C, Al-Hendy A. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 Treatment Shrinks Uterine Leiomyoma Tumors in the Eker Rat Model. *Biology of Reproduction* 2012;**86**:116–116.
- Halder SK, Goodwin JS, Al-Hendy A. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 Reduces TGF- $\beta$ 3-Induced Fibrosis-Related Gene Expression in Human Uterine Leiomyoma Cells. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2011;**96**:
- Hale F. Pigs Born without Eye Balls. *Problems of Birth Defects* 1933;166–167.
- Hammoud AO, Meikle AW, Peterson CM, Stanford J, Gibson M, Carrell DT. Association of 25-hydroxy-vitamin D levels with semen and hormonal parameters. *Asian Journal of Andrology* 2012;**14**:855–859.
- Hogeveen M, Blom HJ, Heijden EHVD, Semmekrot BA, Sporcken JM, Ueland PM, Heijer MD. Maternal homocysteine and related B vitamins as risk factors for low birthweight. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 2010;**202**

- Hollis BW, Wagner CL. Vitamin D requirements and supplementation during pregnancy. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2011;**18**:371-375.
- Homan GF, Davies M, Norman R. The impact of lifestyle factors on reproductive performance in the general population and those undergoing infertility treatment: a review. *Hum Reprod Update* 2007;**13**:209-223.
- Hosseini-Nezhad A, Holick MF. Vitamin D for health: a global perspective. *Mayo Clin Proc* 2013;**88**:720-755.
- Hunt JM. Reversing productivity losses from iron deficiency: the economic case. *J Nutr*. 2002;**132**:794S-801S.
- Hyttén FE, Leitch I. *The physiology of human pregnancy*. 1971; Blackwell Scientific Publications Ltd: Oxford.
- Joffe M. Time trends in biological fertility in Britain. *Lancet* 2000;**355**:1961-1965.
- Kaehler ST, Baumgartner H, Jeske M, Anliker M, Schennach H, Marschang P, Ratt A, Colvin AC, Falk J, Gasser A et al. Prevalence of hypovitaminosis D and folate deficiency in healthy young female Austrian students in a health care profession. *Eur J Nutr* 2012;**51**:1021-1031.
- Kelly A, Kevany J, Onis MD, Shah P. A WHO collaborative study of maternal anthropometry and pregnancy outcomes. *International Journal of Gynecology & Obstetrics* 1996;**53**:219–233.
- Kersten FA, Hermens RP, Braat DD, Hoek A, Mol BW, Goddijn M, Nelen WL, Group IS. Overtreatment in couples with unexplained infertility. *Hum Reprod* 2015;**30**: 71-80.
- Kinuta K, Tanaka H, Moriwake T, Aya K, Kato S, Seino Y. Vitamin D Is an Important Factor in Estrogen Biosynthesis of Both Female and Male Gonads<sup>1</sup>. *Endocrinology* 2000;**141**:1317–1324.
- Knight BA, Shields BM, Brook A, Hill A, Bhat DS, Hattersley AT, Yajnik CS. Lower Circulating B12 Is Associated with Higher Obesity and Insulin Resistance during Pregnancy in a Non-Diabetic White British Population. *Plos One* 2015;**10**:
- Kolesarova A, Capcarova M, Medvedova M, Sirotkin AV, Kovacik J. In vitro assessment of iron effect

- on porcine ovarian granulosa cells: secretory activity, markers of proliferation and apoptosis. *Physiol Res*. 2011;**60**:503-510
- Kramer MS, Kahn SR, Rozen R, Evans R, Platt RW, Chen MF, Goulet L, Seguin L, Dassa C, Lydon J, *et al*. Vasculopathic and thrombophilic risk factors for spontaneous preterm birth. *International Journal of Epidemiology* 2009;**38**:715–723.
- Kramer MS. Maternal Nutrition and Adverse Pregnancy Outcomes: Lessons from Epidemiology. *The Impact of Maternal Nutrition on the Offspring Nestlé Nutrition Workshop Series: Pediatric Program* 2005;1–15.
- Kumar KA, Lalitha A, Pavithra D, Padmavathi IJ, Ganeshan M, Rao KR, Venu L, Balakrishna N, Shanker NH, Reddy SU, *et al*. Maternal dietary folate and/or vitamin B12 restrictions alter body composition (adiposity) and lipid metabolism in Wistar rat offspring. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 2013;**24**:25–31.
- Kwiecinski GG, Petrie GI, DeLuca HF. Vitamin D is necessary for reproductive functions of the male rat. *J Nutr*. 1989;**119**:741-744.
- Laanpere M, Altmäe S, Stavreus-Evers A, Nilsson TK, Yngve A, Salumets A. Folate-mediated one-carbon metabolism and its effect on female fertility and pregnancy viability. *Nutrition Reviews* 2010;**68**:99–113.
- Laanpere M, Altmäe S, Kaart T, Stavreus-Evers A, Nilsson TK, Salumets A. Folate-metabolizing gene variants and pregnancy outcome of IVF. *Reprod Biomed Online* 2011;**22**: 603-614.
- Lanska DJ. Chapter 29 Historical aspects of the major neurological vitamin deficiency disorders. *Handbook of Clinical Neurology History of Neurology* 2009;435–444.
- Lauria, L. Percorso Nascita: Promozione E Valutazione Della Qualità Di Modelli Operativi: Le Indagini Del 2008-2009 E Del 2010-2011. Roma: Istituto Superiore Di Sanità, 2012.
- Lee HA, Park EA, Cho SJ, Kim HS, Kim YJ, Lee H, Gwak HS, Kim KN, Chang N, Ha EH, *et al*. Mendelian Randomization Analysis of the Effect of Maternal Homocysteine During Pregnancy, as Represented by Maternal MTHFR C677T Genotype, on Birth Weight. *Journal of Epidemiology*

2013;**23**:371–375.

Leon A. G. J. M. Vanaerts, Blom HJ, Deabreu RA, Trijbels FJM, Eskes TKAB, Peereboom-Stegeman JHJC, Noordhoek J. Prevention of neural tube defects by and toxicity of L-homocysteine in cultured postimplantation rat embryos. *Teratology* 1994;**50**:348–360.

Li K, Wahlqvist M, Li D. Nutrition, One-Carbon Metabolism and Neural Tube Defects: A Review. *Nutrients* 2016;**8**:741.

Li YQ, Cao XX, Bai B, Zhang JN, Wang MQ, Zhang YH. Severe Iron Deficiency Is Associated with a Reduced Conception Rate in Female Rats. *Gynecologic and Obstetric Investigation* 2014;**77**:19–23.

Luk J, Torrealday S, Neal Perry G, Pal L. Relevance of vitamin D in reproduction. *Hum Reprod* 2012;**27**: 3015-3027.

Mariani M, Viganò P, Gentilini D, Camisa B, Caporizzo E, Lucia PD, Monno A, Candiani M, Somigliana E, Panina-Bordignon P. The selective vitamin D receptor agonist, elocalcitol, reduces endometriosis development in a mouse model by inhibiting peritoneal inflammation. *Human Reproduction* 2012;**27**:2010–2019.

Martinelli I, Passamonti SM, Battaglioli T, Taioli E, Ragni G, Levi-Setti P, Lodigiani C, Mannucci PM. Embryo implantation after assisted reproductive procedures and maternal thrombophilia. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2003;**1**

Mastroiacovo P, Nilsen RM, Leoncini E, Gastaldi P, Allegri V, Boiani A, Faravelli F, Ferrazzoli F, Guala A, Madrigali V et al. Prevalence of maternal preconception risk factors: an Italian multicenter survey. *Ital J Pediatr* 2014;**40**: 91.

Mei Z, Cogswell ME, Looker AC, Pfeiffer CM, Cusick SE, Lacher DA, Grummer-Strawn LM. Assessment of iron status in US pregnant women from the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES), 1999-2006. *Am J Clin Nutr* 2011;**93**: 1312-1320.

Miller EM. The reproductive ecology of iron in women. *American Journal of Physical Anthropology* 2016;**159**:172–195.

- Milman N. Iron and pregnancy--a delicate balance. *Ann Hematol* 2006;**85**: 559-565.
- Mohanty D, Das KC. Effect of folate deficiency on the reproductive organs of female rhesus monkeys: a cytomorphological and cytokinetic study. *J Nutr*. 1982;**112**:1565-1576.
- Mojtabai R. Body mass index and serum folate in childbearing age women. *Eur J Epidemiol* 2004;**19**:1029-1036.
- Møller UK, Streym S, Heickendorff L, Mosekilde L, Rejnmark L. Effects of 25OHD concentrations on chances of pregnancy and pregnancy outcomes: a cohort study in healthy Danish women. *Eur J Clin Nutr* 2012;**66**: 862-868.
- Mooij P, Wouters M, Thomas C, Doesburg W, Eskes T. Disturbed reproductive performance in extreme folic acid deficient golden hamsters. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 1992;**43**:71–75.
- Murto T, Kallak TK, Hoas A, Altmäe S, Salumets A, Nilsson TK, Skoog Svanberg A, Wånggren K, Yngve A, Stavreus-Evers A. Folic acid supplementation and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene variations in relation to in vitro fertilization pregnancy outcome. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2015;**94**: 65-71.
- Murto T, Skoog Svanberg A, Yngve A, Nilsson TK, Altmäe S, Wånggren K, Salumets A, Stavreus-Evers A. Folic acid supplementation and IVF pregnancy outcome in women with unexplained infertility. *Reprod Biomed Online* 2014;**28**: 766-772.
- Muthayya S, Kurpad AV, Duggan CP, Bosch RJ, Dwarkanath P, Mhaskar A, Mhaskar R, Thomas A, Vaz M, Bhat S, *et al*. Low maternal vitamin B12 status is associated with intrauterine growth retardation in urban South Indians. *European Journal of Clinical Nutrition* 2006;**60**:791–801.
- Nandi A, Sinha N, Ong E, Sonmez H, Poretsky L. Is there a role for vitamin D in human reproduction? *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation* 2016;**25**:
- Nelen WL. Maternal homocysteine and chorionic vascularization in recurrent early pregnancy loss. *Human Reproduction* 2000;**15**:954–960.

- Nelson K, Holmes LB. Malformations Due to Presumed Spontaneous Mutations in Newborn Infants. *New England Journal of Medicine* 1989;**320**:19–23.
- Nilsen RM, Leoncini E, Gastaldi P, Allegri V, Agostino R, Faravelli F, Ferrazzoli F, Finale E, Ghirri P, Scarano G et al. Prevalence and determinants of preconception folic acid use: an Italian multicenter survey. *Ital J Pediatr* 2016;**42**: 65.
- Nygaard O. Total plasma homocysteine and cardiovascular risk profile. The Hordaland Homocysteine Study. *JAMA: The Journal of the American Medical Association* 1995;**274**:1526–1533.
- Oppenheimer SJ. Iron and its relation to immunity and infectious disease. *J Nutr.* 2001;**131**:616S-633S
- Ozkan S, Jindal S, Greenseid K, Shu J, Zeitlian G, Hickmon C, Pal L. Replete vitamin D stores predict reproductive success following in vitro fertilization. *Fertility and Sterility* 2010;**94**:1314–1319.
- Paffoni A, Somigliana E, Vigano' P, Benaglia L, Cardellicchio L, Pagliardini L, Papaleo E, Candiani M, Fedele L. Vitamin D Status in Women With Uterine Leiomyomas. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2013;**98**:
- Pagliardini L, Vigano' P, Molgora M, Persico P, Salonia A, Vailati S, Paffoni A, Somigliana E, Papaleo E, Candiani M. High Prevalence of Vitamin D Deficiency in Infertile Women Referring for Assisted Reproduction. *Nutrients* 2015;**7**:9972–9984.
- Parisi F, Laoreti A, Cetin I. Multiple Micronutrient Needs in Pregnancy in Industrialized Countries. *Annals of Nutrition and Metabolism* 2014;**65**:13–21.
- Parisi F, Berti C, Mandò C, Martinelli A, Mazzali C, Cetin I. Effects of different regimens of iron prophylaxis on maternal iron status and pregnancy outcome: a randomized control trial. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2016: *in press*
- Pelt AMV. The origin of the synchronization of the seminiferous epithelium in vitamin A-deficient rats after vitamin A replacement. *Biology of Reproduction* 1990;**42**:677–682.
- Peña-Rosas JP, De-Regil LM, Garcia-Casal MN, Dowswell T. Daily oral iron supplementation during pregnancy. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2015;

- Popper H. The Clinical Significance Of The Plasma Vitamin A Level. *Journal of the American Medical Association* 1943;**123**:1108.
- Qublan HS, Eid SS, Ababneh HA, Amarin ZO, Smadi AZ, Al-Khafaji FF, Khader YS. Acquired and inherited thrombophilia: implication in recurrent IVF and embryo transfer failure. *Human Reproduction* 2006;**21**:2694–2698.
- Ronnenberg A. Preconception folate and vitamin B6 status and clinical spontaneous abortion in Chinese women. *Obstetrics & Gynecology* 2002;**100**:107–113.
- Ross AC. *Dietary reference intakes for calcium and vitamin D*. 2011; National Academies Press: Washington, DC.
- Roy S, Lado BH, Khanna S, Sen CK. Vitamin E sensitive genes in the developing rat fetal brain: a high-density oligonucleotide microarray analysis. *FEBS Letters* 2002;**530**:17–23.
- Ross CA. Vitamin A. In: Coates PM, Betz JM, Blackman MR, et al., eds. *Encyclopedia of Dietary Supplements*. 2nd ed. London and New York: Informa Healthcare; 2010:778-91
- Ruder EH, Hartman TJ, Blumberg J, Goldman MB. Oxidative stress and antioxidants: exposure and impact on female fertility. *Human Reproduction Update* 2008;**14**:345–357.
- Rudick B, Ingles S, Chung K, Stanczyk F, Paulson R, Bendikson K. Characterizing the influence of vitamin D levels on IVF outcomes. *Hum Reprod* 2012;**27**: 3321-3327.
- Rudick BJ, Ingles SA, Chung K, Stanczyk FZ, Paulson RJ, Bendikson KA. Influence of vitamin D levels on in vitro fertilization outcomes in donor-recipient cycles. *Fertil Steril* 2014;**101**: 447-452.
- Rumbold A, Ota E, Hori H, Miyazaki C, Crowther CA. Vitamin E supplementation in pregnancy. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2015;
- Rushton DH, Ramsay ID, Gilkes JJ, Norris MJ. Ferritin and fertility. *Lancet*.1991;**337**:1554.
- Saxena R. *Bedside obstetrics & gynecology*. 2014; Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd.: New Delhi.
- Scholl TO. Iron status during pregnancy: setting the stage for mother and infant. *Am J Clin Nutr*.

2005;**81**:1218S-1222S.

Sharan C, Halder SK, Thota C, Jaleel T, Nair S, Al-Hendy A. Vitamin D inhibits proliferation of human uterine leiomyoma cells via catechol-O-methyltransferase. *Fertility and Sterility* 2011;**95**:247–253.

Shils ME, Shike M. *Modern nutrition in health and disease*. 2006; Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia.

Selhub J, Jacques PF, Rosenberg IH, Rogers G, Bowman BA, Gunter EW, Wright JD, Johnson CL. Serum total homocysteine concentrations in the third National Health and Nutrition Examination Survey (1991-1994): population reference ranges and contribution of vitamin status to high serum concentrations. *Ann Intern Med*. 1999;**131**:331-9.

Simone ND. Homocysteine Induces Trophoblast Cell Death with Apoptotic Features. *Biology of Reproduction* 2003;**69**:1129–1134.

Somigliana E, Paffoni A, Busnelli A, Filippi F, Pagliardini L, Vigano P, Vercellini P. Age-related infertility and unexplained infertility: an intricate clinical dilemma. *Human Reproduction* 2016;**31**:1390–1396.

Somigliana E, Paffoni A, Lattuada D, Colciaghi B, Filippi F, Vecchia IL, Tirelli A, Baffero GM, Persico N, Viganò P, *et al*. Serum Levels of 25-Hydroxyvitamin D and Time to Natural Pregnancy. *Gynecologic and Obstetric Investigation* 2016;**81**:468–471.

Steegers-Theunissen RP, Steegers EA, Thomas CM, Hollanders HM, Peereboom-Stegeman JHC, Trijbels FJ, Eskes TK. Study on the presence of homocysteine in ovarian follicular fluid\*\*Supported by grant 28.1006 from the Dutch “Praeventie Fonds,” Den Haag, The Netherlands. *Fertility and Sterility* 1993;**60**:1006–1010.

Steer P, Alam MA, Wadsworth J, Welch A. Relation between maternal haemoglobin concentration and birth weight in different ethnic groups. *BMJ*. 1995;**310**:489-491.

Steer PJ. Maternal hemoglobin concentration and birth weight. *Am J Clin Nutr* 2000;**71**:1285S-1287S.

Sukumar N, Rafnsson SB, Kandala N-B, Bhopal R, Yajnik CS, Saravanan P. Prevalence of vitamin B-12

- insufficiency during pregnancy and its effect on offspring birth weight: a systematic review and meta-analysis. *American Journal of Clinical Nutrition* 2016;**103**:1232–1251.
- Sukumar N, Venkataraman H, Wilson S, Goljan I, Selvamoni S, Patel V, Saravanan P. Vitamin B12 Status among Pregnant Women in the UK and Its Association with Obesity and Gestational Diabetes. *Nutrients* 2016;**8**:768.
- Sukumar N, Adaikalakoteswari A, Venkataraman H, Maheswaran H, Saravanan P. Vitamin B12 status in women of childbearing age in the UK and its relationship with national nutrient intake guidelines: results from two National Diet and Nutrition Surveys. *BMJ Open* 2016;**6**:
- Takasaki A, Tamura H, Miwa I, Taketani T, Shimamura K, Sugino N. Endometrial growth and uterine blood flow: a pilot study for improving endometrial thickness in the patients with a thin endometrium. *Fertility and Sterility* 2010;**93**:1851–1858.
- Thomson RL, Spedding S, Buckley JD. Vitamin D in the aetiology and management of polycystic ovary syndrome. *Clinical Endocrinology* 2012;**77**:343–350.
- Tinker SC, Hamner HC, Qi YP, Crider KS. U.S. women of childbearing age who are at possible increased risk of a neural tube defect-affected pregnancy due to suboptimal red blood cell folate concentrations, National Health and Nutrition Examination Survey 2007 to 2012. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2015;**103**: 517-526.
- Traber MG. Vitamin E Regulatory Mechanisms. *Annual Review of Nutrition* 2007;**27**:347–362.
- Tsang BL, Devine OJ, Cordero AM, Marchetta CM, Mulinare J, Mersereau P, Guo J, Qi YP, Berry RJ, Rosenthal J et al. Assessing the association between the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 677C>T polymorphism and blood folate concentrations: a systematic review and meta-analysis of trials and observational studies. *Am J Clin Nutr* 2015;**101**:1286-1294.
- Vanni VS, Vigano' P, Somigliana E, Papaleo E, Paffoni A, Pagliardini L, Candiani M. Vitamin D and assisted reproduction technologies: current concepts. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2014;**12**:47.
- Varadi S. Pernicious Anæmia And Infertility. *The Lancet* 1967;**290**:1305.

- Verhagen H, Buijsse B, Jansen E, Bueno-De-Mesquita B. The State of Antioxidant Affairs. *Nutrition Today* 2006;**41**:244–250.
- Viganò P, Lattuada D, Mangioni S, Ermellino L, Vignali M, Caporizzo E, Panina-Bordignon P, Besozzi M, Di Blasio AM. Cycling and early pregnant endometrium as a site of regulated expression of the vitamin D system. *J Mol Endocrinol* 2006;**36**:415-424.
- WHO. Global prevalence of vitamin A deficiency in populations at risk 1995–2005. WHO Global Database on Vitamin A Deficiency. Geneva, World Health Organization, 2009
- WHO Guideline: Optimal Serum and Red Blood Cell Folate Concentrations in Women of Reproductive Age for Prevention of Neural Tube Defects. Geneva: World Health Organization; 2015
- WHO. Serum retinol concentrations for determining the prevalence of vitamin A deficiency in populations. Vitamin and Mineral Nutrition Information System. Geneva, World Health Organization, 2011 (WHO/NMH/NHD/MNM/11.3) (<http://www.who.int/vmnis/indicators/retinol.pdf>, accessed [11.12.2016])
- WHO Widget. *WHO Widget* [Internet] Available from: <http://who.int/test/forms/mncah/>.
- WHO | About VMNIS. *WHO* [Internet]. World Health Organization Available from: <http://www.who.int/vmnis/en/>.
- Wang W, Knovich MA, Coffman LG, Torti FM, Torti SV. Serum ferritin: Past, present and future. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 2010;**1800**:760–769.
- Warkany J. Congenital malformations induced by maternal nutritional deficiency. *The Journal of Pediatrics* 1944;**25**:476–480.
- Warkany J, Schraffenberger E. Congenital malformations induced in rats by maternal vitamin A deficiency; defects of the eye. *Arch Ophthalmol.* 1946;**35**:150-69.
- Wehr E, Pilz S, Boehm B, März W, Obermayer-Pietsch B. Association of vitamin D status with serum androgen levels in men. *Clinical Endocrinology* 2009;
- Wei S-Q, Qi H-P, Luo Z-C, Fraser WD. Maternal vitamin D status and adverse pregnancy outcomes: a

- systematic review and meta-analysis. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine* 2013;**26**:889–899.
- West KP, Katz J, Khattry SK, Leclercq SC, Pradhan EK, Shrestha SR, Connor PB, Dali SM, Christian P, Pokhrel RP, *et al.* Double blind, cluster randomised trial of low dose supplementation with vitamin A or beta carotene on mortality related to pregnancy in Nepal. *Bmj* 1999;**318**:570–575.
- Wilcken B, Bamforth F, Li Z, Zhu H, Ritvanen A, Renlund M, Stoll C, Alembik Y, Dott B, Czeizel AE *et al.* Geographical and ethnic variation of the 677C>T allele of 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): findings from over 7000 newborns from 16 areas world wide. *J Med Genet* 2003;**40**: 619–625.
- Willmott M, Bartosik DB, Romanoff EB. The Effect Of Folic Acid On Superovulation In The Immature Rat. *Journal of Endocrinology* 1968;**41**:439–445.
- Xiao S, Hansen DK, Horsley ET, Tang Y-S, Khan RA, Stabler SP, Jayaram HN, Antony AC. Maternal folate deficiency results in selective upregulation of folate receptors and heterogeneous nuclear ribonucleoprotein-E1 associated with multiple subtle aberrations in fetal tissues. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology* 2005;**73**:6–28.
- Yajnik CS, Chandak GR, Joglekar C, Katre P, Bhat DS, Singh SN, Janipalli CS, Refsum H, Krishnaveni G, Veena S, *et al.* Maternal homocysteine in pregnancy and offspring birthweight: epidemiological associations and Mendelian randomization analysis. *International Journal of Epidemiology* 2014;**43**:1487–1497.
- Yajnik CS, Deshpande SS, Jackson AA, Refsum H, Rao S, Fisher DJ, Bhat DS, Naik SS, Coyaji KJ, Joglekar CV, *et al.* Vitamin B12 and folate concentrations during pregnancy and insulin resistance in the offspring: the Pune Maternal Nutrition Study. *Diabetologia* 2007;**51**:29–38.
- Yildirim B, Guler T, Akbulut M, Oztekin O, Sariiz G. 1-Alpha, 25-Dihydroxyvitamin D3 Regresses Endometriotic Implants in Rats by Inhibiting Neovascularization and Altering Regulation of Matrix Metalloproteinase. *Postgraduate Medicine* 2014;**126**:104–110.

- Yang C, Chen J, Liu Z, Yun C, Piao J, Yang X. Prevalence and influence factors of vitamin A deficiency of Chinese pregnant women. *Nutr J* 2016;**15**: 12.
- Zadeh-Vakili A, Tehrani FR, Daneshpour MS, Zarkesh M, Saadat N, Azizi F. Genetic polymorphism of vitamin D receptor gene affects the phenotype of PCOS. *Gene* 2013;**515**:193–196.
- Zappacosta B, Persichilli S, Iacoviello L, Di Castelnuovo A, Graziano M, Gervasoni J, Leoncini E, Cimino G, Mastroiacovo P. Folate, vitamin B12 and homocysteine status in an Italian blood donor population. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2013;**23**:473-480.
- Zetterberg H, Regland B, Palmér M, Ricksten A, Palmqvist L, Rymo L, Arvanitis DA, Spandidos DA, Blennow K. Increased frequency of combined methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C mutated alleles in spontaneously aborted embryos. *European Journal of Human Genetics* 2002;**10**:113–118.

# Acknowledgment

Questo progetto di dottorato, finanziato da fondi di ricerca corrente della Fondazione IRCCS Ca' Granda di Milano e da un grant non condizionato di Bayer spa, è stato svolto grazie a:

- il Prof. Edgardo Somigliana, responsabile della UO Centro PMA della Fondazione IRCCS Ca' Granda di Milano
- il Prof. Fabio Parazzini del Dipartimento di Scienze Cliniche e di Comunità dell'Università degli Studi di Milano
- la Dott.ssa Stefania Ferrari della UO Centro PMA della Fondazione IRCCS Ca' Granda di Milano
- la Dott.ssa Paola Viganò della UO Scienze della Natalità dell'Ospedale San Raffaele di Milano
- il personale della UO Centro PMA e della UO Laboratorio Centrale della Fondazione IRCCS Ca' Granda
- le UUOCC di Ostetricia e Ginecologia della clinica L. Mangiagalli di Milano dirette dal prof. Luigi Fedele e dal prof. Giorgio Bolis.

# Allegati

## Publicazioni scientifiche relative alla tesi di dottorato:

1. Paffoni A, Ferrari S, Viganò P, Pagliardini L, Papaleo E, Candiani M, Tirelli A, Fedele L, Somigliana E. Vitamin D deficiency and infertility: insights from in vitro fertilization cycles. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014 Nov;99(11):e2372-6.
2. Paffoni A, Ferrari S, Mangiarini A, Noli S, Bulfoni A, Viganò P, Parazzini F., Somigliana E. Concordance of vitamin D peripheral levels in infertile couples' partners. *Gynecological Endocrinology*, *in press*.
3. Somigliana E, Paffoni A, Lattuada D, Colciaghi B, Filippi F, La Vecchia I, Tirelli A, Baffero GM, Persico N, Viganò P, Bolis G, Fedele L. Serum Levels of 25-Hydroxyvitamin D and Time to Natural Pregnancy. *Gynecol Obstet Invest.* 2016;81(5):468-71.
4. La Vecchia I, Paffoni A, Castiglioni M, Ferrari S, Bertolus R, Ferraris Fusarini C, Bettinardi N, Somigliana E, Parazzini F. Folate, homocysteine and selected vitamins and minerals status in infertile women. *Eur J Contracept Reprod Health Care*, 2017;22(1):70-5.
5. Paffoni A, Castiglioni M, Ferrari S, La Vecchia I, Ferraris Fusarini C, Bettinardi N, Parazzini F, Somigliana E. Homocysteine pathway and in vitro fertilization outcome. *Submitted*

## Progetto di ricerca RF-2013-02358757

Finanziato nell'ambito della Ricerca Finalizzata bando 2013 "Vitamin D Supplementation on Assisted Reproduction Technology (ART) outcomes: a randomized clinical controlled trial and an investigation of the involved biological mechanisms" Codice EudraCT: 2015-004233-27