



Livelli plasmatici di VEGF e flussimetria Doppler nel monitoraggio follicolare di cicli spontanei e con supporto della fase luteinica

Cristina Vetrano, Manuela Piccinino, Alessandro Verza, Mariangela Rampino,
Monica Prina, Luca Cafaro, Antonella Martino, Roberta Rossini

*Clinica Ostetrico-Ginecologica, Università degli Studi di Pavia, Fondazione IRCCS Policlinico
San Matteo, Pavia, Italia*

Abstract

Livelli plasmatici di VEGF e flussimetria doppler nel monitoraggio follicolare di cicli spontanei e con supporto della fase luteinica

Nonostante i miglioramenti delle tecniche di Procreazione Medicalmente Assistita, ancora oggi la percentuale di impianto di embrioni ottenuti mediante tecniche di fecondazione *in vitro* si aggira intorno al 18-20%. Rimangono ancora in gran parte sconosciuti i meccanismi responsabili di questo processo. L'obiettivo dello studio è la ricerca della correlazione tra assetto ormonale, VEGF e modificazioni dell'aspetto ecografico e della vascolarizzazione ovarica e uterina in cicli spontanei e in cicli con supporto della fase luteale. Dai dati esaminati sono risultati un significativo incremento del VEGF in fase postovulatoria e significative modificazioni dei valori di flussimetria ovarica e uterina durante le varie fasi del ciclo mestruale, pur senza riuscire a stabilire una correlazione lineare tra modificazioni ormonali, variazioni di VEGF e flussimetria Doppler. Il supporto con progesterone naturale nella fase luteale determina un aumento significativo del VEGF rispetto al supporto con hCG. Ulteriori studi sono necessari per chiarire i fattori responsabili della recettività endometriale.

VEGF plasmatic levels and Doppler flowmetry in spontaneous and luteal supported cycles follicular monitoring

Despite of medically assisted procreation techniques improvement, still nowadays implantation percentage of embryos obtained with IVF techniques gets to 18-20%. Mechanisms responsible of this failure are still unknown. Objective of our study is searching the correlation among hormonal background, VEGF and ecographic aspect and ovarian/uterine vascularisation modifications in spontaneous and luteal phase supported cycles. Examined data highlight a great VEGF increase in post ovulation phase and significant ovarian and uterine flowmetry values modifications during the different menstrual cycle phases, although the impossibility of establishing a linear correlation among hormonal mutations, VEGF variations and Doppler flowmetry. Progesteron support in luteal phase sets a significant VEGF increase compared to hCG support. Further studies are necessary for straightening the endometrial receptivity responsible factors.

Introduzione

Negli ultimi anni i progressi svolti nel campo della Procreazione Medicalmente Assistita sono stati notevoli grazie ai molteplici schemi della crescita follicolare multipla e al miglioramento delle tecniche di recupero e di fecondazione in vitro degli ovociti, con tassi di fertilizzazione *in vitro* pari al 70-80%.

A tali progressi tuttavia non sono corrisposti incrementi significativi della percentuale di gravidanza [1]. Infatti secondo i dati più recenti la percentuale di impianto per ogni embrione trasferito in utero nei programmi di Riproduzione Assistita è solo del 18-20%. Il successo del trattamento dipende dalla qualità dell'embrione nel 21-31% dei casi e dalla recettività uterina nel 64% [2].

Mentre la qualità dell'embrione può essere studiata con tecniche embriologiche standard [3], la recettività uterina è molto difficile da valutare perché essa è regolata da numerosi fattori. Essa è correlata sicuramente alla struttura e alla funzionalità dell'endometrio, parametri condizionati dalle modificazioni endocrine [4]. Nonostante i numerosi studi ecografici, istologici e biochimici tesi ad identificare le condizioni che rendono l'endometrio adeguato all'impianto [5-6], non sono al momento attuale completamente noti i fattori che le influenzano e gli interventi farmacologici che possono ottimizzarle. E' stata posta particolare attenzione alle modalità di vascolarizzazione della pelvi, dell'utero, dell'ovaio e dell'endometrio e si è dimostrato che la perfusione uterina influenza notevolmente la recettività endometriale [7-8]. La vascolarizzazione endometriale può essere indagata attraverso l'utilizzo del *Color Doppler*. Grazie all'uso appunto del *Color Doppler* e Pulsato è stato dimostrato come ci siano molti cambiamenti nella vascolarizzazione uterina e ovarica durante un normale ciclo mestruale [9]. Tra i fattori che possono regolare il flusso ematico uterino, gli steroidi sessuali sembrano i maggiori responsabili sia per quel che riguarda la modificazione del flusso sanguigno, sia per quel che riguarda le modificazioni delle resistenze [10]. I dati appaiono abbastanza concordi riguardo gli effetti vasodilatatori degli estrogeni, mentre il dibattito è ancora aperto sugli effetti vascolari del progesterone e dei progestinici. Variazioni di flusso ematico possono essere valutate sempre avvalendosi della flussimetria Doppler anche a livello ovarico [11]. Anche in questo distretto la vascolarizzazione risente delle cicliche immissioni ormonali in circolo.

Le modificazioni vascolari uterine e ovariche sono determinate da un altro importante meccanismo: l'angiogenesi. Fra l'elevato numero di fattori identificati come stimolatori o inibitori dell'angiogenesi [12-13] un elemento chiave è risultato il *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) [14]. Anche il VEGF risentirebbe delle modificazioni cicliche ormonali.

Con il nostro studio abbiamo valutato la correlazione tra l'assetto ormonale, i livelli sierici di VEGF, e le modificazioni della vascolarizzazione e dell'aspetto uterino e ovarico durante il ciclo mestruale. Successivamente abbiamo valutato la possibile influenza di un intervento farmacologico in fase luteale sulla concentrazione sierica di VEGF e, conseguentemente sulla vascolarizzazione.

Materiali e Metodi

Abbiamo reclutato 25 donne di età compresa tra 25 e 35 anni, con ciclo mestruale regolare (*range* 28-30 giorni), afferenti al centro di Procreazione Medicalmente Assistita della nostra Clinica per problemi di infertilità maschile (oligo e/o terato e/o astenospermia lieve-moderata).

Tutte le pazienti sono state sottoposte ad ecografia morfologica ginecologica per via transaddominale e transvaginale in fase follicolare precoce che ha determinato l'esclusione di 5 di esse: 3 per riscontro di endometriosi ovarica, 1 per sactosalpinge bilaterale e 1 per sospetto setto uterino. Nelle 20 pazienti rimaste è stata documentata l'ovulazione con monitoraggio follicolare sia ecografico che ormonale e i livelli di FSH in terza giornata erano <15 UI/L.

L'esame ecografico è stato eseguito utilizzando un apparecchio Eidos con *Color Doppler* e trasduttore transvaginale da 6.5 MHz. Esso è stato condotto secondo la tecnica classica, a vescica vuota, ponendo la sonda a contatto con il fornice vaginale anteriore o posteriore a seconda dell'atteggiamento uterino (antiverso o retroverso).

E' stato valutato lo spessore e l'aspetto morfologico dell'endometrio e lo sviluppo follicolare. L'endometrio è stato studiato in scansioni longitudinali e ne è stato misurato il diametro antero-posteriore a livello fundico. La morfologia endometriale è stata descritta in accordo con le definizioni di Yoshimitsu e colleghi.

La crescita follicolare è stata espressa utilizzando la media delle dimensioni follicolari rilevate su 3 piani (antero-posteriore, longitudinale e trasversale). Abbiamo considerato come segno di ovulazione la scomparsa e/o la riduzione dei diametri del follicolo dominante. Il flusso delle arterie uterine è stato studiato a livello del loro ramo ascendente, subito dopo la biforcazione, visualizzata in scansioni trasversali, lateralmente all'utero, a livello della giunzione cervico/uterina. Per lo studio della vascolarizzazione ovarica abbiamo preso in considerazione quella intraparenchimale, il più vicino possibile alla parete del follicolo dominante, durante la fase follicolare e ovulatoria, e la vascolarizzazione nella zona periferica del corpo luteo, nella fase post ovulatoria. La rilevazione Doppler della flussimetria uterina e ovarica è stata effettuata utilizzando i seguenti indici:

- Rapporto Sistolico/Diastole (S/D), dove S è la velocità massima del picco sistolico e D è la velocità minima telediastolica;
- Indice di Resistenza (RI), calcolato dividendo la differenza sisto-diastolica per la velocità massima di picco sistolico, cioè $(S-D)/S$;
- Indice di Pulsatilità (PI), calcolato dividendo la differenza sistodiastolica per la velocità media, cioè $(S-D)/M$.

Controlli ecografici sono stati eseguiti: in fase follicolare precoce (entro il 5° giorno del ciclo), in fase follicolare media (diametro medio del follicolo dominante di 14-16 mm), in fase preovulatoria (diametro follicolare medio 18-20 mm), e in fase postovulatoria (dopo 2 giorni dal controllo c).

Il monitoraggio ormonale è stato effettuato contemporaneamente a quello ecografico come segue:

- in fase follicolare precoce sono state dosate le concentrazioni sieriche di *Vascular endothelial Growth Factor* (VEGF), estradiolo (E2), ormone luteinizzante (LH) e prolattina (PRL);
- in fase follicolare media: VEGF, E2, LH;
- in fase preovulatoria: VEGF, E2, LH;
- in fase postovulatoria: VEGF, E2, P, PRL.

I dosaggi ormonali sono stati effettuati con metodica RIA; il siero per la misurazione di VEGF è stato stoccato a -20°C e successivamente analizzato utilizzando la metodica EIA.

Tutte le donne sono state sottoposte quindi ad un ciclo di monitoraggio follicolare ecografico ed ormonale. Successivamente le medesime pazienti sono state randomizzate in due gruppi in base al tipo di farmaco somministrato come supporto della fase luteale:

- GRUPPO A: 10 pazienti a cui è stato somministrato HCG (Gonasi HP 5000 UI i.m. Serono). Una fiala il giorno della accertata ovulazione (controllo d), più altre 2 successivamente, a intervalli di due giorni l'una dall'altra;
- GRUPPO B: 10 pazienti a cui è stato somministrato progesterone naturale micronizzato per via intravaginale (Crinone 8% gel vaginale Serono). Una applicazione quotidiana a partire dal giorno della accertata ovulazione per dieci giorni. In entrambi i gruppi è stato eseguito un esame ecografico bidimensionale, flussimetrico e un dosaggio ormonale come segue: in fase luteale precoce (dopo due giorni dal controllo periovulatorio), dosando VEGF, P, E2 e PRL; in fase luteale tardiva (dopo sette giorni dal controllo periovulatorio) dosando VEGF e P.

L'analisi statistica è stata effettuata mediante statistica descrittiva (media, deviazione standard, mediana, quartili), correlazione di Pearson, test t di student per dati indipendenti, MANOVA e comparazioni *ad hoc* di Duncun, a seconda dei casi, in modo appropriato.

Risultati

VEGF e cicli spontanei

La figura 1 mostra le modificazioni dei livelli plasmatici di VEGF durante le diverse fasi del ciclo mestruale. E' interessante notare che i livelli di VEGF sono significativamente più elevati nella fase postovulatoria ($p < 0.03$) rispetto alle fasi precedenti.

Nessuna correlazione significativa è emersa tra i livelli di VEGF e l'assetto ormonale indagato durante il ciclo mestruale (PRL, LH, E2 e progesterone). Le fluttuazioni dei livelli plasmatici di estradiolo, LH e prolattina hanno mostrato il decorso fisiologico dei cicli mestruali sottoposti a monitoraggio. La crescita follicolare è stata regolare e il diametro del follicolo dominante in fase preovulatoria era di 19 mm. Anche la crescita endometriale è stata regolare e progressiva con un significativo aumento ($p < 0.001$) dello spessore a ciascuna rilevazione durante il ciclo di monitoraggio.

Per quanto riguarda la circolazione uterina è emerso quanto segue: il PI dell'arteria uterina sia destra che sinistra era significativamente aumentato in fase postovulatoria ($p < 0.04$ e $p < 0.03$ rispettivamente) così come l'RI ($p < 0.03$ e $p < 0.04$ rispettivamente) e il rapporto sistole/diastole ($p < 0.02$ e $p < 0.03$ rispettivamente) (figure 2A, 2B e 2C).

Per quanto riguarda la circolazione ovarica è emerso quanto segue: il PI dell'ovaio sede del follicolo dominante presenta un andamento simile bilateralmente con un decremento significativo sia a destra che a sinistra ($p < 0.05$ e $p < 0.02$ rispettivamente) tra la fase pre e post ovulatoria; lo stesso si verifica per l'RI ($p < 0.02$ e $p < 0.03$ rispettivamente) e il rapporto S/D ($p < 0.04$ e $p < 0.01$ rispettivamente) a livello dell'ovaio sede del follicolo dominante bilateralmente (figure 3A, 3B e 3C).

Nessuna correlazione significativa è emersa tra i livelli di VEGF e la flussimetria Doppler delle arterie uterine e delle ovaie, bilateralmente, e in relazione alla dominanza di lato.

Allo stesso modo nessuna correlazione significativa è stata evidenziata tra i livelli plasmatici di estradiolo, progesterone ed LH e i valori di flussimetria Doppler.

VEGF e cicli spontanei con supporto della fase luteale

Nessuna differenza significativa è stata rilevata nelle dimensioni del corpo luteo e nello spessore endometriale in fase postovulatoria e durante la supplementazione della fase luteale con hCG o progesterone per via vaginale. E' interessante comunque segnalare che i livelli plasmatici di progesterone erano significativamente più elevati ($p < 0.03$) nel gruppo trattato con il progesterone naturale rispetto al gruppo trattato con hCG. Un dato estremamente interessante è emerso confrontando i livelli plasmatici di VEGF durante i due regimi di supporto della fase luteale. Infatti, come mostra la figura 4, i livelli plasmatici di VEGF aumentano di più nel gruppo trattato con progesterone naturale rispetto al gruppo trattato con hCG ($p < 0.029$).

Non sono emerse correlazioni significative tra i dati flussimetrici sia uterini che ovarici e i livelli plasmatici di VEGF nella fase luteale durante il supporto sia con progesterone che con hCG.

Discussione

I nostri dati confermano le evidenze della letteratura riguardo la crescita dei livelli plasmatici di VEGF in cicli ovulatori regolari durante la fase luteale rispetto alla fase follicolare. Nella nostra casistica tale aumento dei livelli plasmatici di VEGF si accompagna ad una regolare differenziazione endometriale in senso secretivo e ad un aumento dell'indice di pulsatilità e dell'indice di resistenza delle arterie uterine, oltre che del rapporto sistole/diastole. Inoltre i valori flussimetrici ovarici mostrano un decremento significativo a livello dell'ovaio sede del follicolo dominante bilateralmente tra la fase pre e post ovulatoria. E' però opportuno sottolineare che nel nostro studio non siamo riusciti ad evidenziare una correlazione lineare tra i livelli plasmatici di estradiolo, progesterone ed LH e i livelli circolanti di VEGF. Inoltre non è emersa una correlazione significativa tra i valori di flussimetria doppler uterina ed ovarica e i livelli plasmatici di VEGF e degli altri ormoni. E' assai probabile che la potenza statistica del nostro campione non sia stata sufficiente ad evidenziare tale dato e, pertanto, stante il parallelismo tra l'aumento dei livelli plasmatici di VEGF e l'andamento della vascolarizzazione uterina ed ovarica durante il ciclo mestruale, è ipotizzabile che il VEGF sia coinvolto in modo cruciale nei fenomeni di adattamento circolatorio necessari alla deiscenza follicolare e ai fenomeni connessi alla luteinizzazione. Che il progesterone possa essere un mediatore importante dell'azione del VEGF, soprattutto per la competenza e la recettività endometriale, è testimoniato dal fatto che la terapia di supporto luteale a base di progesterone aumenta le concentrazioni plasmatiche di VEGF maggiormente rispetto al supporto con hCG. Si può pertanto concludere che i livelli plasmatici di VEGF in fase luteale devono essere considerati un *marker* piuttosto attendibile di processi ovulatori regolari che possono esistere in un concepimento. Uno squilibrio nella produzione di VEGF potrebbe essere considerato un potenziale indicatore di stati di alterata fertilità. Ulteriori studi sono necessari per chiarire il ruolo dei fattori di regolazione dei livelli di VEGF e di altri fattori responsabili della recettività endometriale.

Tabelle e Figure

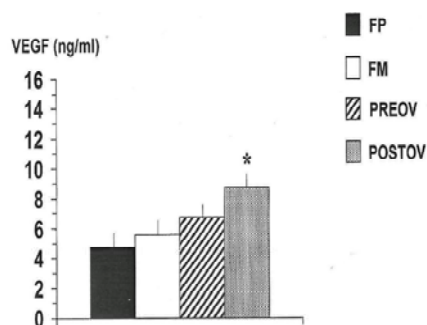


Figura 1. Variazioni dei livelli di VEGF.

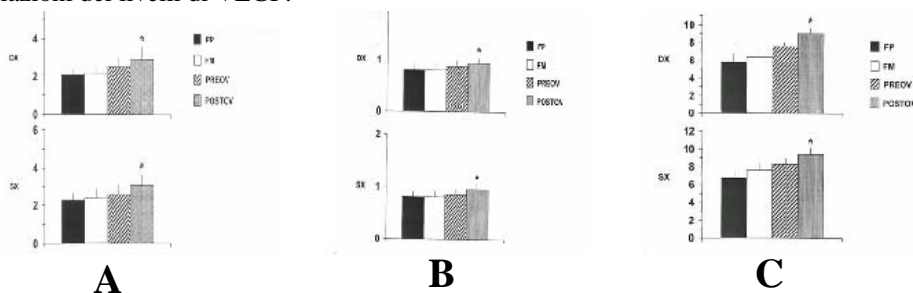


Figura 2. Circolazione uterina: A)PI, B)RI e C)S/D.

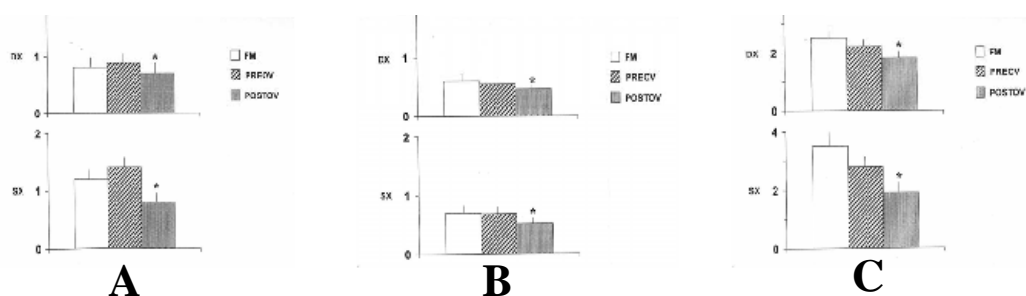


Figura 3. Flussimetria intraovarica: A)PI, B)RI e C)S/D.

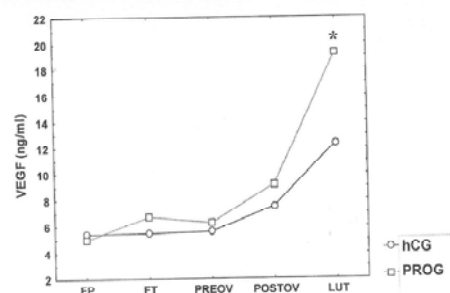


Figura 4. Variazione dei livelli di VEGF in cicli con supporto della fase luteale.

Bibliografia

1. Braendle W, Linder C, Liebttemberg A et al. Endocrine profiles and luteal function during GnRH analogue/HMG therapy. *Human Reprod.* 1989; G: 121.
2. Schwartz LB, Chiu AS, Courtney M et al. The embryo versus endometrium controversy revisited as it relates to predicting pregnancy outcome in in-vitro-fertilization-embryo transfer cycles. *Human reprod* 1997; 12: 45-50.
3. Erenus M, Zouves C, Rajamahendran P et al. The effect of embryo quality on subsequent pregnancy rates after in vitro fertilizatio. *Fertil Steril* 1991; 56: 707.
4. Hutchinson KA, Lunenefeld B, Diamone MP et al. Human chorionic gonadotropin, estradiol and progesterone profiles in conception and non conception cycles in an vitro fertilization program. *Fertil Steril* 1989; 52: 441.
5. Yaron Y, Botchan A, Amit A et al. Endometrial receptivity in a light of modern assisted reproductive technologies. *Fertil Steril* 1994; 62: 225.
6. Bassil S. Changes in endometrial thickness, width, length and pattern in predicting pregnancy outcome during ovarian stimulation in vitro fertilization. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2001; 18: 258.
7. Zaidi J, Campbell S, Pittraf R et al. Endometrial thickness, morphology, vascular penetration and velocimetry in predicting implantation in an in vitro fertilization program. *Ultrasound Obstet Gyecol* 1995; 6: 191.
8. Salle B, Bied Damon V, Benchaib M et al. Preliminary report of an ultrasonography and colour Doppler uterine score to predict uterine receptivity in an vitro fertilization embryo transfer cycles. *Human Reprod* 1998; 13: 1669-1673.
9. Tan SL, Zaidi J, Campbell S et al. Changes in the ovarian and uterine arteries during the menstrual cycle. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 175: 625.
10. Bourne T, Hagstrom H, Granberg S et al. Ultrasound studies of vascular and morphological changes in the human uterus after a positive self test for urinary luteinising hormone surge. *Human Reprod* 1996; 11: 369-375.
11. Lunenefeld E, Schwartz I, Meizner I et al. Intravarian blood flow during spontaneous and stimulated cycles. *Hum Reprod* 1996; 1: 2481-2483.
12. Regulation of angiogenesis. *EXS Birkhauser*, Boston, 1997.
13. Nicosia RR, Villaschi S. Autoregulation of angiogenesis by cells of the vassel wall. *Int Rev Cytol* 1999; 185: 1-43.
14. Yamamoto S. Expressionof vascular endothelial growth factor (VEGF) during folliculogenesis and corpus luteum formation in human ovary. *Gynecol Endocrinol* 1997; 11: 371.