

Ruolo del pattern della relaxina intrafollicolare ed endometriale nell'outcome riproduttivo di coppie avviate a cicli di procreazione medica assistita

F. FORNARO, M. R. CAMPITIELLO, C. PACILIO, A. PANARIELLO,
E. DATO, L. IZZO, D. MELE, N. COLACURCI

RIASSUNTO: Ruolo del pattern della relaxina intrafollicolare ed endometriale nell'outcome riproduttivo di coppie avviate a cicli di procreazione medica assistita.

F. FORNARO, M. R. CAMPITIELLO, C. PACILIO, A. PANARIELLO,
E. DATO, L. IZZO, D. MELE, N. COLACURCI

Introduzione. Il presente studio ha avuto come scopo quello di valutare l'esistenza di possibili relazioni tra pattern della relaxina (RLX) endometriale ed intrafollicolare e variabili riproduttive in un campione di donne avviate a cicli IVF.

Materiali e metodi. Sono state reclutate 16 coppie candidate ad ICSI per fattore maschile moderato. Sono stati raccolti e stoccati campioni di endometrio in fase proliferativa e secretiva nel ciclo precedente a quello previsto per la tecnica di PMA, e campioni ematici e fluidi follicolari durante il pick-up ovocitario. Le concentrazioni di RLX-2 nell'endometrio sono state valutate mediante lettura allo spettrofotometro, il dosaggio di relaxina solubile su siero e liquido follicolare è stato eseguito mediante l'impiego di kit ELISA.

Risultati. L'espressione di RLX-2 endometriale nella fase proliferativa era sovrapponibile a quella osservata in fase secretiva. Per quel che concerne la RLX-2 solubile nel sangue e nel fluido follicolare, abbiamo notato valori significativamente più bassi nei fluidi follicolari rispetto alle concentrazioni sieriche. I livelli sierici di RLX-2 hanno mostrato un trend, tuttavia non significativo, verso una correlazione positiva con il numero di follicoli con diametro maggiore di 16 mm. Inoltre, si è osservato un trend verso una correlazione positiva tra livelli sierici di relaxina e numero di ovociti recuperati e tra livelli di relaxina intrafollicolari e qualità ovocitaria. I livelli intrafollicolari erano inoltre più bassi quando corrispondenti agli ovociti nel caso di mancata fertilizzazione rispetto a quelli dei follicoli accoppiati ai casi in cui si è avuta una corretta fertilizzazione. Nessuna apparente correlazione con la qualità embrionale è stata osservata.

Conclusioni. I dati preliminari suggeriscono un coinvolgimento del pattern della relaxina nel processo riproduttivo. In particolare, è possibile ipotizzare che la relaxina di origine ovarica possa controllare la follicologenesi e lo sviluppo ovocitario, indurre e legare il suo recettore endometriale, LGR7, producendo effetti implicati nel processo di impianto embrionale.

SUMMARY: Expression of endometrial and follicular relaxin and reproductive outcome in women undergoing IVF.

F. FORNARO, M. R. CAMPITIELLO, C. PACILIO, A. PANARIELLO,
E. DATO, L. IZZO, D. MELE, N. COLACURCI

Background. The aim of the study was to assess the relationship between the expression of endometrial and follicular relaxin (RLX) and the parameters of reproductive outcome in women undergoing IVF.

Material and methods. Sixteen couples undergoing IVF because of moderate male factor were enrolled. Endometrial samples in proliferative and secretive phases, blood and follicular fluid during oocyte pickup were obtained. RLX-2 concentrations in the endometrium were assessed by means of spectrophotometry, soluble relaxin concentrations in serum and follicular fluid were analyzed by means of ELISA technique. Between January and November 2009, 28 post-menopausal patients, from the menopause outpatients' section of the Department of Obstetrics and Gynecology of the SUN, and were selected. Fourteen of these patients were healthy (Group A) and the other 14 patients suffered from metabolic syndrome (Group B) and were treated with drospirenone (2 mg) and estradiolo emidrato (1 mg) for six months in order to verify whether such therapy could be effective in the treatment of dysfunctional endoteliale.

Results. The results show lower basal values of FMD but not significant in the group of patients with metabolic syndrome and a better response to the compression data in healthy patients, even if statistically not significant.

Conclusions. Our preliminary data show a possible role of relaxin expression in the reproductive process; that ovarian relaxin could be suggested to control the follicle growth and the oocyte development, to induce and link to its endometrial receptor - LGR7 - with effects involved in embryo implantation.

KEY WORDS: Relaxina - Endometrio - Fluido follicolare - IVF - Outcome riproduttivo.
Relaxin - Endometrium - Follicular fluid - IVF - Reproductive outcome.

Introduzione

I fattori determinanti il successo riproduttivo in Procreazione Medica Assistita (PMA) sono rappresentati dal-

la competenza gametica, da cui dipende la qualità embrionale, e dalla recettività endometriale alla blastocisti (1). L'impianto embrionale è la tappa limitante dell'intero processo e rende conto di tassi di gravidanza in PMA bassi e immutati negli anni. Tale fenomeno biologico si realizza grazie ad un dialogo sincronizzato e finemente regolato tra blastocisti ed endometrio (2). La spiegazione della discrepanza tra le percentuali di successo in IVF e i miglioramenti dei protocolli di stimolazione ovarica e del laboratorio di biologia risiede nella mancanza di conoscenze degli eventi che sottendono la recettività endometriale. Quest'ultima è definita come un periodo autolimitante durante il quale l'endometrio acquisisce uno stato funzionale e transitorio che favorisce l'annidamento della blastocisti, tramite cambiamenti morfologici e modificazioni molecolari (3). Mentre da tempo sono ben noti i mutamenti morfologici (trasformazione secretiva delle ghiandole endometriali, edema e decidualizzazione dello stroma), molto resta da chiarire circa l'espressione di molecole che permettono l'impianto embrionale.

Un pattern molecolare coinvolto nei meccanismi di angiogenesi a livello endometriale e recentemente studiato in modelli animali, in quanto coinvolto nel processo di impianto, è rappresentato dal *pathway* della relaxina (RLX) e dei suoi recettori (4).

La produzione di RLX, ritenuta tradizionalmente un ormone della gravidanza, è elevata nei tessuti riproduttivi femminili e, in particolare, il corpo luteo è il maggiore produttore di RLX e la RLX-2 è l'isoforma circolante più rappresentata. Tale molecola esplica le sue azioni attraverso il legame al suo specifico recettore, denominato LGR-7 (5).

L'importanza dell'azione della RLX nei processi riproduttivi è suggerita da diverse esperienze sperimentali, condotte quasi esclusivamente in studi *in vitro* o sul modello animale. La RLX contribuisce alla regolazione del tono vascolare e dell'angiogenesi attraverso l'induzione del *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) e dell'ossido nitrico (NO) insieme con modifiche del *turnover* del collagene.

La RLX promuove la crescita dell'endometrio e la proliferazione delle cellule endoteliali delle arterie spirali. Del tutto recentemente, è stato dimostrato che colture di cellule stromali porcine, quando stimolate da RLX e IGF-I, aumentano significativamente la proliferazione di cellule endoteliali e la concomitante espressione del VEGF, supportando l'ipotesi che una delle funzioni della RLX sia quella di sostenere la preparazione dell'endometrio all'impianto, attraverso la modulazione di ormoni, fattori di crescita come il VEGF e di altre molecole, come l'NO, associate alla decidualizzazione e alla neoangiogenesi endometriale durante la finestra di impianto (6). Un altro sito di azione della relaxina a livello endometriale è caratterizzato dalle metalloproteinasi (MMPs). Infatti, tale molecola regola negativamente l'espressione delle

MMPs e positivamente quella dei loro inibitori endogeni. Questi risultati, dimostrano che la RLX promuove l'angiogenesi e contemporaneamente previene l'integrità della matrice extracellulare, suggerendo un suo ruolo nei fenomeni biologici coinvolti nelle varie fasi dell'impianto. Inoltre, in modelli sperimentali *in vitro* condotti su colture di cellule della granulosa, è stato dimostrato che i livelli di espressione della RLX prodotta correlano positivamente e significativamente con l'outcome riproduttivo (7).

Il presente studio ha avuto come scopo quello di valutare l'esistenza di possibili relazioni tra pattern della RLX endometriale ed intrafollicolare e variabili riproduttive in un campione di donne avviate a cicli di PMA.

Materiali e metodi

Sono state arruolate 16 coppie candidate ad ICSI per fattore maschile moderato con i seguenti criteri di inclusione: età > 18 e ≤ 39 anni, regolarità del ciclo mestruale, cariotipo normale, FSH 3° giorno ciclo ≤ 10 mUI/ml. Sono state escluse donne con PCOS, endometriosi di grado moderato-severo, abortività ripetuta, iperprolattinemia, precedente *poor response* ovarica in cicli IVF, pazienti con partner maschile affetto da oligostenoteratozoospermia di grado severo.

Metodi

Al fine di verificare gli obiettivi dello studio, sono stati raccolti e stoccati campioni di endometrio in fase proliferativa e secretiva nel ciclo precedente a quello previsto per la tecnica di PMA al fine di valutare eventuali correlazioni tra espressione endometriale di RLX-2 e LGR7 e parametri di outcome riproduttivo (numero di follicoli ovarici al prelievo ovocitario, numero di ovociti recuperati e qualità ovocitaria, tasso di fertilizzazione, qualità embrionale, percentuale di gravidanza). Inoltre, durante il pick-up ovocitario, si è provveduto a raccogliere e stoccare adeguatamente campioni ematici e fluidi follicolari al fine di dosare le concentrazioni di RLX-2 solubile. Tali valutazioni biochimiche umorali sono state eseguite per ricercare possibili correlazioni tra i livelli sierici e intrafollicolari di RLX-2 e i predetti parametri di outcome riproduttivo.

Indagini su endometrio

La raccolta dei campioni di tessuto endometriale in fase proliferativa è stata condotta in corso di isteroscopia diagnostica utilizzando pinze da biopsia. In tale maniera, sono state effettuate biopsie di circa 0,5 cm. Queste sono state quindi suddivise con lama da bisturi in 2 pezzi. Il campionamento endometriale in fase medio-luteale è stato effettuato mediante Novak.

I prelievi endometriali sono stati conservati a -20°C

in Eppendorf a seconda della tecnica di studio, in formalina (n = 1 pezzo) a temperatura ambiente o in 1 ml di RNA-later (n = 1 pezzi) e conservati a -20°C, fino all'analisi.

I campioni tissutali sono stati adeguatamente processati per valutare l'espressione nel tessuto endometriale della RLX-2 e del suo recettore LGR-7. L'espressione delle suddette molecole è stata effettuata attraverso RT-PCR.

Estrazione di RNA totali dai prelievi biotici

Per l'estrazione degli RNA totali è stato utilizzato il kit RNeasy Plus Mini Handbook (Qiagen). I tessuti prelevati sono stati omogenizzati con un Ultra-Turrax nella soluzione di lisi contenente guanidina tiocianato e 10 µl di β-mercaptoetanololo per ml di soluzione (600 µl/campione). Dopo centrifugazione il supernatante è stato caricato su speciali colonne per l'eliminazione del DNA genomico e, in seguito, l'RNA è stato lavato con etanolo al 70% ed eluito con acqua sterile. Ne è stata infine determinata la concentrazione mediante lettura allo spettrofotometro dell'assorbanza alla lunghezza d'onda di 260 nm. Aliquote di 500 ng di RNA totali sono state separate elettroforeticamente per controllare l'integrità degli RNA ribosomiali.

RT-PCR

Per la sintesi del primo filamento di cDNA sono stati utilizzati come stampo gli mRNA totali. Un mg di RNA è stato incubato per 5 minuti a 65°C in presenza di pdN8 (oligodeossiribonucleotidi random) di innescò (0,8 mM), di dNTP (deossinucleotidi, 10mM), e H₂O trattata con DEPC (diethyl pirocarbonato). La miscela è stata poi immediatamente raffreddata in ghiaccio e successivamente sono stati aggiunti ad essa: tampone di sintesi (10x), DTT (ditiotreitolo, 10mM) e Superscript III Trascrittasi inversa (100U). La reazione di sintesi è stata portata avanti alla temperatura di 50°C per 1 ora al termine della quale l'enzima è stato inattivato a 70°C per 15 minuti. Il cDNA così ottenuto è stato utilizzato per le successive reazioni di amplificazione condotte utilizzando oligonucleotidi specifici per hLGR7 e per hGAPDH, costitutivamente espresso.

Elettroforesi su gel

I prodotti di RT-PCR sono stati analizzati mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio condotta a temperatura ambiente in un gel orizzontale applicando una differenza di potenziale costante da 3 a 8 V/cm. L'agarosio (1,2%; BIORAD) è stato sciolto a 100°C in una soluzione tampone TAE 1x (TAE 20x modificato: Tris 96,8 gr, acido acetico glaciale 22,8 ml, EDTA 0,5M pH8 4,0 ml) e, una volta raffreddata tale soluzione, è stato aggiunto ad essa bromuro di etidio ad una concentrazione finale di 0,5 µg/ml. I campioni di cDNA sono stati caricati sul gel solidificato dopo essere stati appe-

santiti con una soluzione contenente glicerolo 5% e blu di bromofenolo 0,042%. I risultati della separazione elettroforetica sono stati visualizzati per esposizione del gel su un transilluminatore a lampada UV, analizzati mediante l'utilizzo del programma Geldoc e quantizzati normalizzando i valori di densitometria ottenuti per LGR7 con i valori dei corrispettivi GAPDH.

Indagini su liquido follicolare

Prima di procedere al prelievo ovocitario ad ogni donna è stato effettuato un prelievo ematico al fine di stoccare campioni di siero. Al momento del pick-up ovocitario, sono stati raccolti i fluidi follicolari derivanti dal follicolo dominante di ciascun ovaio. Si è provveduto a separare gli ovociti recuperati in modo tale da seguire le successive evoluzioni. Il dosaggio di relaxina solubile su siero e liquido follicolare è stato eseguito mediante l'impiego di kit ELISA. Tutti i campioni e tutti i reagenti sono stati portati a temperatura ambiente. Sono state lavate le strisce di microtitolazione per 5 volte con 250 µl di buffer di lavaggio diluito 1:10. Dopo l'ultimo lavaggio è stato rimosso il buffer residuo capovolgendo la piastra su carta assorbente. Sono stati aggiunti 100 µl di standard e di campioni, in duplicato, nelle rispettive provette. È stato usato il SAMPLEBUF come STD 0 pg/ml. Coperta bene la piastra è stata incubata per una notte (16-22 h) a 4-8°C. Dopo l'ultimo lavaggio è stato rimosso il buffer residuo capovolgendo la piastra su carta assorbente. Sono stati aggiunti 100 µl di AB (anticorpo biotinilato) in ciascuna provetta. È stata coperta la piastra ed incubata per 2 ore a 4-8°C. Sono stati aggiunti 100 µl di CONJ (coniugato streptavidina - perossidasi), quindi la piastra è stata incubata per un'ora a 4-8°C. Sono stati poi aggiunti 100 µl di SUB (termetilenbenzidina substrato) in ciascuna provetta. La piastra è stata incubata per 20-30 min a temperatura ambiente (18-26 °C) al buio. Si sono quindi aggiunti 50 µl di STOP solution in ciascuna provetta, si è provveduto ad agitare vigorosamente e a misurare immediatamente l'assorbimento con un lettore ELISA a 450 nm contro una lettura a 620 nm (o 690 nm) come riferimento.

Valutazione della qualità ovocito-embrionale

Entro un'ora dal recupero del complesso ovocita-cumulo, si è provveduto a rimuovere il cumulo ooforo e la corona radiata e si è proceduto a valutazione della maturazione ovocitaria, utilizzando il grading secondo Veeck, mentre la qualità embrionale è stata valutata in tre gradi di decrescente qualità (grado I = qualità ottima, grado II = qualità intermedia, grado III = qualità scarsa), in accordo allo score di Steer.

Analisi statistica

I risultati ottenuti sono stati inseriti in un database

di Windows. Sono stati utilizzati per l'analisi parametrica il *t-test* di Student per dati appaiati e quello per dati non appaiati, per l'analisi non parametrica il *Mann-Whitney test* ed il *Wilcoxon matched-pairs test* per confronti tra gruppi ed all'interno dei gruppi. Lo Spearman e il Pearson test sono stati impiegati, rispettivamente, per le correlazioni per i dati distribuiti per ranghi e per quelli parametrici. Per il confronto di frequenze è stato adottato il test del Chi-quadro o il Fisher's exact test, quando appropriato.

Risultati

I parametri antropometrico-demografici delle pazienti e quelli inerenti l'outcome della PMA sono riportati, rispettivamente, nelle Tabelle 1 e 2. Dai 32 follicoli dominanti sono stati recuperati 28 ovociti. Da 4 follicoli non è stata recuperata alcuna ovocellula. Dei 28 ovociti, 20 erano in metafase II e 8 in metafase I. Dopo ICSI, si sono fecondati 24 dei 28 ovociti (FR = 85.7%) dando origine ad altrettanti embrioni: 7 di grado I, 12 di grado II e 5 di grado III. La RLX-2 endometriale è risultata quantizzabile in 10 delle 16 pazienti in entrambe le fasi endometriali, mentre nei restanti casi è risultata indosabile (valore riportato come 0,01). L'espressione di RLX-2 nella fase proliferativa era sovrapponibile a quella osservata in fase secretiva (Fig. 1). Diversamente, il recettore per la relaxina, LGR7, era espresso in tutte e 16 le donne. Considerando l'intero gruppo di studio, abbiamo trovato un trend di maggiore espressione ($p = 0.08$) di LGR7 in fase secretiva rispetto alla fase proliferativa (Fig. 1). In particolare, tale incremento di espressione è stato riscontrato in otto casi, mentre in sei casi si è osservata una riduzione e in due casi nessuna variazione. Per quel che concerne la RLX-2 solubile nel sangue e nel fluido follicolare, abbiamo notato valori significativamente ($p < 0.01$) più bassi nei fluidi follicolari rispetto alle concentrazioni sieriche (Fig. 2). I livelli sierici di RLX-2 hanno mostrato un trend, tuttavia non significativo, verso una correlazione positiva con il numero di follicoli con diametro maggiore di 16 mm ($p = 0.15$). Inoltre, si è osservato un trend verso una correlazione positiva ($p = 0.22$) tra livelli sierici di relaxina e numero di ovociti recuperati. I livelli intrafollicolari di RLX-2 erano più alti - avvicinandosi a significatività statistica ($p = 0.06$) - nei casi in cui è stato recuperato il rispettivo ovocita rispetto ai follicoli privi di gamete. Inoltre, la RLX-2 intrafollicolare era più alta - avvicinandosi a significatività statistica ($p = 0.09$) - nei follicoli da cui erano recuperati ovociti in metafase II rispetto al contenuto dei follicoli da cui sono stati recuperati ovociti immaturi, in metafase I. Un trend di correlazione positiva è stato trovato anche tra livelli di relaxina intrafollicolari e qualità ovocitaria. Come detto in prece-

TABELLA 1 - CARATTERISTICHE DEMOGRAFICHE E ANTROPOMETRICHE DELLA POPOLAZIONE DI STUDIO (MEDIE \pm DS).

Età paziente (anni)	33.5 \pm 3.6
Durata sterilità (anni)	3.8 \pm 1.3
FSH basale (UI/L)	8.6 \pm 1.4
BMI (Kg/m ²)	23.7 \pm 2.1
Età partner maschile (anni)	35.8 \pm 4.2

TABELLA 2 - PARAMETRI DI OUTCOME RIPRODUTTIVO (MEDIE \pm DS).

N° follicoli al pick-up ovocitario	8.9 \pm 1.7
N° follicoli con diametro > 16 mm	7.9 \pm 1.5
E2 al pick-up ovocitario (pg/mL)	1219.9 \pm 359.4
N° ovociti recuperati	6.8 \pm 2.1
N° ovociti MII da follicolo dominante	20
N° ovociti MI da follicolo dominante	8
N° follicoli vuoti	4
N° ovociti inserminati	2.7 \pm 0.5
N° embrioni trasferiti	2.5 \pm 0.5
FR ovociti da follicolo dominante	85.7%(24/28)
N° embrioni I grado da follicolo dominante	8
N° embrioni II grado da follicolo dominante	11
N° embrioni III grado da follicolo dominante	5

denza, dopo ICSI, si è ottenuta la fecondazione di 24/28 ovociti derivanti dai follicoli dominanti di ciascun ovaio. I livelli intrafollicolari corrispondenti agli ovociti in esame erano più bassi nel caso di mancata fecondazione ($n = 4$) rispetto a quelli dei follicoli accoppiati ai casi ($n = 24$) in cui si è avuta una corretta fecondazione; la differenza ha mostrato un trend verso significatività statistica ($p = 0.14$). Nessuna apparente correlazione con la qualità embrionale è stata osservata. In sei pazienti si sono osservati concentrazioni di relaxina più alte, sebbene non in maniera statisticamente significativa, sia nel sangue sia nel fluido follicolare rispetto alle altre donne ($p = 0.09$ e $p = 0.13$, rispettivamente per sangue e fluido follicolare). In tutti e sei i casi, l'espressione endometriale di LGR7 in fase secretiva ha mostrato un trend di correlazione positiva con i valori di relaxina solubile nel sangue. In quattro delle suddette sei pazienti sono state ottenute altrettante gravidanze, di cui una bigemina, tuttora in regolare evoluzione. Nelle quattro donne gravide, la RLX-2 sierica mostrava livelli più alti in confronto alle altre donne e la differenza tra i due gruppi approssimava la significatività statistica (23.4 \pm 2.0 vs 9.2 \pm 9.1 pg/ml; $p = 0.08$). In aggiunta, le donne che hanno ottenuto la gravidanza presentavano un trend di espressione di LGR7 in fase secretiva verso valori più alti rispetto alla restante popolazione di studio (1.9 \pm 0.2 vs 0.8 \pm 0.7); anche in questo caso, la differenza si avvicinava a significatività statistica ($p = 0.08$) (Fig. 3).

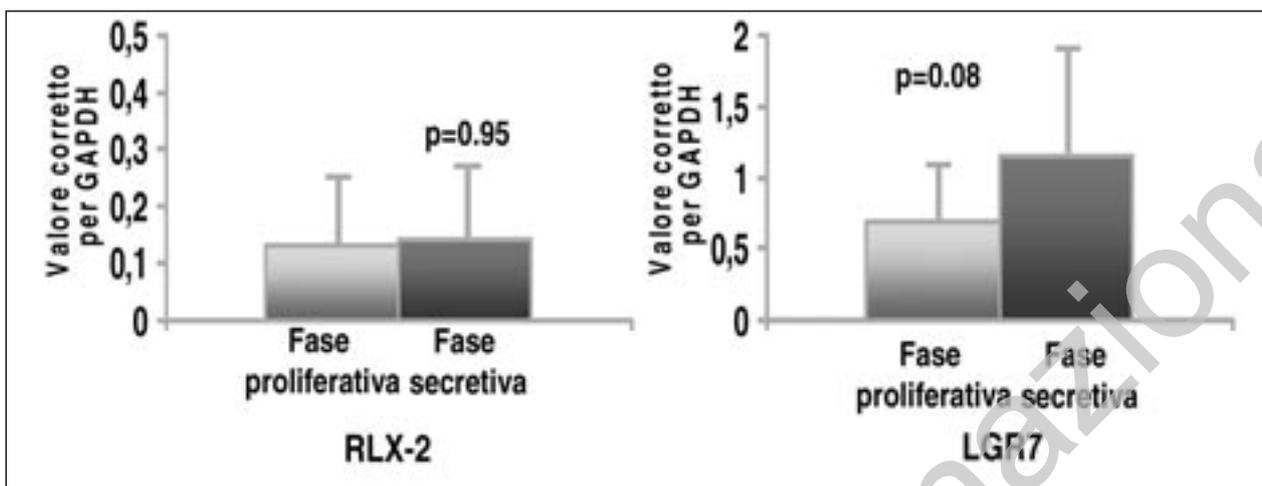


Fig. 1 - Espressione nel tessuto endometriale di RLX-2 e LGR7 (medie±DS).

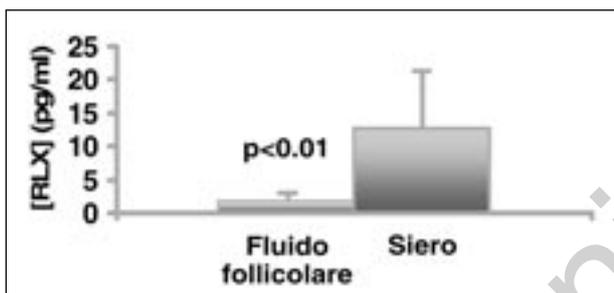


Fig. 2 - Concentrazioni di RLX-2 solubile nel siero e nel fluido follicolare (medie±DS).

Discussione e conclusioni

I risultati del nostro lavoro mostrano una più alta espressione endometriale del recettore della relaxina LGR7 in fase secretiva rispetto a quella proliferativa del ciclo mestruale spontaneo. Tale dato è in accordo con quelli di Bond e coll. del 2004 i quali hanno analizzato l'espressione di

LGR7 in donne di età compresa tra 34 e 46 anni sottoposte ad isterectomia per patologie ginecologiche benigne in differenti fasi del ciclo mestruale (8). Questi Autori hanno riscontrato una maggiore espressione di LGR7 nella fase secretiva precoce e in quella medio-secretiva rispetto ad altre fasi (proliferativa precoce, medio-proliferativa, proliferativa tardiva, secretiva tardiva e mestruale). Gli Autori concludevano che tale pattern di espressione suggeriva un coinvolgimento nel processo di impianto embrionale. Al meglio delle nostre conoscenze, la nostra esperienza è la prima a valutare l'espressione del recettore LGR7 sia in fase proliferativa che secretiva endometriale nella stessa paziente. Inoltre, il nostro studio differisce da quello di Bond e coll. anche per le caratteristiche delle pazienti valutate. Infatti, abbiamo analizzato il ciclo mestruale spontaneo in donne più giovani, in assenza di patologie ginecologiche in atto e avviate a PMA nel ciclo successivo al prelievo endometriale. L'assenza di espressione di relaxina endometriale in 6 delle 16 pazienti e la bassissima espressione nei rimanenti 10 casi suggerisce che l'origine

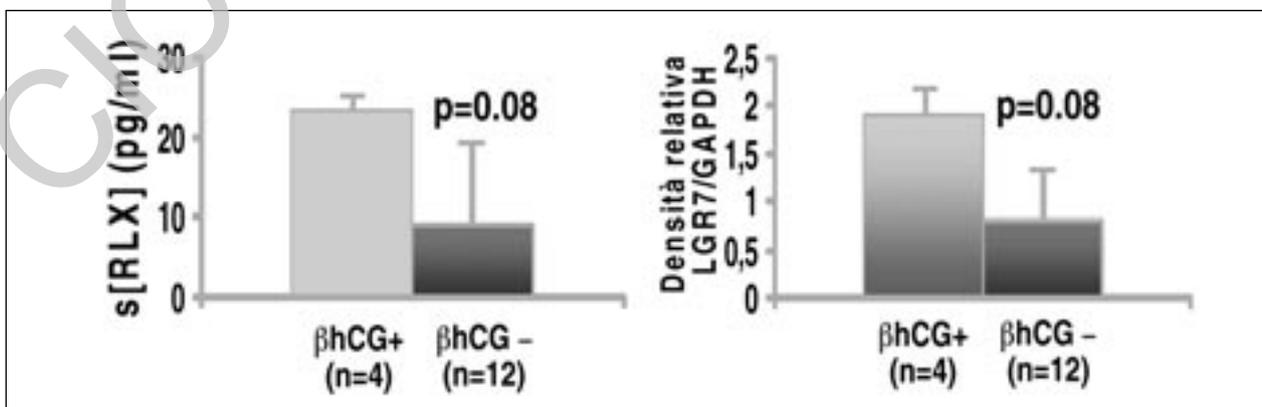


Fig. 3 - Concentrazioni sieriche di RLX-2, espressione in fase secretiva di LGR7 e gravidanze (medie±DS).

della molecola e gli eventuali effetti a livello endometriale siano preminentemente dovuti al compartimento ovarico. A tale riguardo, è stato riportato che la massima produzione della relaxina e i livelli circolanti sono sostenuti dalla produzione e dismissione follicolare. Durante il ciclo mestruale, i livelli plasmatici di relaxina sono minimi durante la fase follicolare, aumentano in fase luteale, raggiungendo un plateau dopo 6–7 ore dal picco di LH, suggerendo che il corpo luteo è la fonte principale di relaxina plasmatica circolante. I nostri risultati vanno nella medesima direzione, dal momento che le concentrazioni sieriche di relaxina hanno mostrato un trend di correlazione positiva con il numero di follicoli in evoluzione. Inoltre, i nostri dati confermano quanto riportato in un precedente studio secondo il quale i valori circolanti di relaxina erano fortemente correlati al numero di follicoli prodotti e a quello di ovociti recuperati (9). Sulla scorta dei suddetti dati della letteratura e dei nostri risultati, è possibile speculare che la relaxina prodotta a livello ovarico possa agire a livello endometriale inducendo l'espressione del suo recettore. Un possibile ruolo nell'annidamento del *pathway* della relaxina e del suo recettore è suggerito dalla maggiore espressione nel periodo corrispondente alla finestra di impianto embrionale. I nostri dati di un trend di correlazione positiva tra concentrazioni sieriche di relaxina e livelli di espressione endometriale di LGR7 in fase secretiva nelle sei pazienti che mostravano concentrazioni sieriche di relaxina maggiori rispetto alle altre donne sembrano a supporto di tale ipotesi. In aggiunta, quattro delle suddette pazienti hanno avuto una gravidanza, di cui una bigemina, tuttora in regolare evoluzione. Un recente studio ha dimostrato per la prima volta che la somministrazione di relaxina ricombinante umana durante la finestra di impianto in un modello di primate (*Macaca fascicularis*) femmina in età fertile determina un aumento

dello spessore endometriale e un trend verso tassi di gravidanza più alti rispetto a controlli (10).

Per quel che concerne il versante follicolare, i nostri risultati suggeriscono un coinvolgimento della relaxina anche nei processi sottesi allo sviluppo ovocitario, fin dalle prime fasi, come sembra essere dimostrato dai livelli di relaxina intrafollicolari più alti nei casi in cui era recuperato l'ovocita rispetto ai follicoli vuoti e da concentrazioni di relaxina che mostravano un trend verso una correlazione positiva con maturità e qualità ovocitaria. Di converso, non abbiamo riscontrato alcuna apparente relazione con la qualità embrionale. Questo dato, tuttavia, necessita di un campione di studio molto più ampio, minimizzando gli effetti di variabili post-inseminazione indipendenti dalla qualità ovocitaria. Bisogna considerare, infatti, che l'attitudine di un singolo ovocita a fecondare dopo ICSI riflette in maniera stretta la qualità del gamete femminile mentre la segmentazione dello zigote è subordinata a fattori interferenti, come i mezzi di coltura embrionale e la qualità seminale - scarsa nel caso del nostro studio - che può associarsi ad un'ineadeguata espressione del patrimonio genico spermatico. Il riscontro di un trend verso livelli intrafollicolari di RLX-2 più alti in caso di corretta fertilizzazione rispetto al contenuto di questa molecola in caso di mancata fecondazione è ulteriormente suggestiva di un ruolo della RLX-2 nei meccanismi di sviluppo e maturazione ovocitaria.

In conclusione, i dati preliminari derivanti dalla nostra esperienza, da convalidare con una casistica più ampia, suggeriscono un coinvolgimento del pattern della relaxina nel processo riproduttivo. In particolare, è possibile ipotizzare che la relaxina di origine ovarica possa, in maniera autocrina, controllare la follicologenesi e lo sviluppo ovocitario e, soprattutto, indurre e legare il suo recettore endometriale, LGR7, producendo effetti implicati nel processo di impianto embrionale.

Bibliografia

1. Boomsma CM, Macklon NS. What can the clinician do to improve implantation? *Reprod Biomed Online* 2006;13(6):845-55.
2. Guzeloglu-Kayisli O, Basar M, Arici A. Basic aspects of implantation. *Reprod Biomed Online* 2007;15(6):728-39.
3. van Mourik MS, Macklon NS, Heijnen CJ. Embryonic implantation: cytokines, adhesion molecules, and immune cells in establishing an implantation environment. *J Leukoc Biol* 2009;85(1):4-19.
4. Van Der Westhuizen ET, Summers RJ, Halls ML, Bathgate RA, Sexton PM. Relaxin receptors—new drug targets for multiple disease states. *Curr Drug Targets* 2007;8(1):91-104.
5. Halls ML, Bathgate RA, Summers RJ. Signal switching after stimulation of LGR7 receptors by human relaxin 2. *Ann NY Acad Sci* 2005;1041:288-91.
6. Kaczmarek MM, Blietk A, Schams D, Ziecik AJ. The effect of insulin-like growth factor-I, relaxin and luteinizing hormone on vascular endothelial growth factor secretion by cultured endometrial stromal cells on different days of early pregnancy in pigs. *Reprod Biol* 2008;8(2):163-70.
7. Stewart DR, VandeVoort CA. Relaxin secretion by human granulosa cell culture is predictive of in-vitro fertilization—embryo transfer success. *Human Reproduction* 1999; 14(2):338-344
8. Bond CP, Parry LJ, Samuel CS, Gehring HM, Lederman FL, Rogers PA, Summers RJ. Increased expression of the relaxin receptor (LGR7) in human endometrium during the secretory phase of the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89(7):3477-85.
9. Kristiansson P, Svärdsudd K, von Schoultz B, Wramsby H. Supraphysiological serum relaxin concentration during pregnancy achieved by in-vitro fertilization is strongly correlated to the number of growing follicles in the treatment cycle. *Hum Reprod* 1996;11(9):2036-40.
10. Hayes ES, Curnow EC, Trounson AO, Danielson LA, Unemori EN. Implantation and pregnancy following in vitro fertilization and the effect of recombinant human relaxin administration in *Macaca fascicularis*. *Biol Reprod* 2004;71(5):1591-7.