



M. Passafaro

RIASSUNTO

I processi fisiologici dell'ovulazione e della fecondazione necessitano di un'attività sincronica e modulata tra la funzione endocrina ed immunitaria: popolazioni leucocitarie e citochine.

La fase ovulatoria, per verificarsi fisiologicamente, necessita di uno stimolo pro-infiammatorio, limitato in intensità e durata.

Nel processo riproduttivo gli eventi patologici possono essere considerati un aspetto del quadro di Infiammazione Cronica di Basso Grado, associata ad alterazioni del Sistema Immunitario.

L'abortività è correlata ad uno squilibrio tra famiglie di citochine Th1/Th2.

Lo squilibrio quantitativo e cronologico tra le citochine pro-infiammatorie, anti-infiammatorie e la fase di neo-angiogenesi durante la finestra temporale dell'impianto in pazienti con aborto ricorrente è un fattore chiave per il mancato sviluppo di una sede endometriale favorevole.

Il G-CSF, unitamente agli estrogeni materni e a β -HCG, stimola le cellule T-Reg a virare verso il braccio Th2, con successiva produzione modulatrice di IL-10 e di IL-4.

Sulla base delle evidenze di Letteratura e degli studi clinici svolti è stata introdotta una terapia con GCSF 4CH SKA e Interleuchina 4 4CH SKA nel trattamento di pazienti con abortività ricorrente entro la 6^a settimana di gravidanza.

Sono state arruolate 6 pazienti con anamnesi ostetrica di RPL, età media anni 38,16 \pm 2,04 e complessivamente 14 aborti entro la 6^a settimana (2,33 \pm 0,51/paziente).

Il trattamento con Guna-GCSF 4CH, 20 gtt. x 2 vv./die + Guna-Interleukin 4 4CH, 20 gtt. x 2 vv./die + Liliun compositum (-Heel), 1 fl. i.m./sett. ha portato a 6 gravidanze entro 60 giorni di terapia (media 56,66 \pm 20,41) con 2 gravidanze a termine (1 spontanea, 1 con PMA) e 4 gravidanze in corso al 3^o trimestre [$>$ 24^a sett. (3 spontanee, 1 con PMA)].

I risultati ottenuti, alla luce dei supporti di Letteratura e di precedenti studi, costituiscono un'ulteriore conferma circa il ruolo che la Low Dose Medicine può svolgere in tutte le terapie di regolazione fisiologica.

PAROLE CHIAVE

PROCESSO RIPRODUTTIVO, OVULAZIONE, IMPIANTO EMBRIONALE, ABORTIVITÀ SPONTANEA RICORRENTE (RPL), PROCREAZIONE MEDICALMENTE ASSISTITA (PMA), SISTEMA IMMUNITARIO, CITOCHINE Th1/Th2, G-CSF, T-REG, INTERLEUCHINA 10, INTERLEUCHINA 4, MEDICINA LOW DOSE

SUMMARY: The physiological processes of ovulation and fertilization require a synchronic and modulated activity between the endocrine function and the Immune System: leukocyte populations and cytokines.

To occur physiologically the ovulatory phase requires a pro-inflammatory stimulus, limited in intensity and duration.

GCSF LOW DOSE SKA NELL'ABORTIVITÀ SPONTANEA RICORRENTE

LOW DOSE SKA GCSF IN RECURRENT PREGNANCY LOSS

INTRODUZIONE

L'abortività spontanea (AS) è un evento patologico i cui connotati oltrepassano gli aspetti puramente clinici, riguardando profondamente la sfera emotiva della donna e della coppia.

– L'AS, soprattutto se ripetuta, determina un aggravio in termini economico-sanitari per l'aumento, talora la pleora, di esami e procedure cui la donna e la

coppia si sottopongono allo scopo di ricercarne le cause.

L'AS episodica è relativamente comune, evidenziandosi in circa il 15% di tutte le gravidanze (Stephenson et Al., 2007).

– L'abortività spontanea ricorrente (RPL, *Recurrent Pregnancy Loss*), con due o più eventi abortivi, pur risultando meno incidente in termini percentuali, resta

The pathological events in the reproductive process can be considered an aspect of the framework of low-grade chronic inflammation, associated with alterations of the Immune System.

Miscarriage is related to an imbalance between families of Th1/Th2 cytokines.

The quantitative and chronological imbalance between the pro-inflammatory, anti-inflammatory cytokines and the neo-angiogenesis phase during the implantation time window in patients with recurrent abortion is a key factor for the failure to develop a favourable endometrial site.

G-CSF, acting together with maternal estrogens and β -HCG, stimulates the T-Regs to turn towards the Th2 arm, with subsequent modulatory production of IL-10 and IL-4.

6 patients with recurrent pregnancy loss (RPL) have been treated with Guna-GCSF 4CH, 20 drops x 2/day + Guna-Interleukin 4 4CH, 20 drops

x 2/day + Liliun compositum (-Heel), 1 ampoule/week i.m.

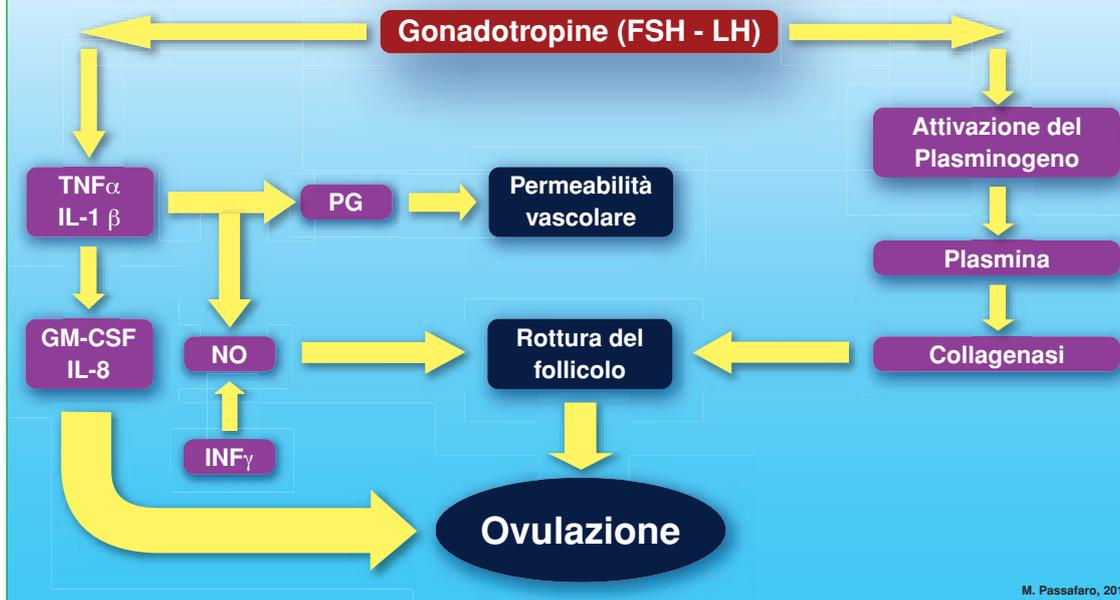
6 pregnancies have been achieved within 60 days of therapy (average 56.66 \pm 20.41) with 2 full-term pregnancies (1 spontaneous, 1 with MAP) and 4 pregnancies in progress at the 3rd trimester ($>$ 24th week) (3 spontaneous, 1 with MAP).

The results, especially regarding to literature evidence and previous studies, constitute a further confirmation for the role that Low Dose Medicine can play in all physiological regulatory therapies.

KEY WORDS: REPRODUCTIVE PROCESS, OVULATION, EMBRYONIC IMPLANT, RECURRENT PREGNANCY LOSS (RPL), MEDICALLY ASSISTED PROCREATION (MAP), IMMUNE SYSTEM, CYTOKINES Th1/Th2, G-CSF, T-REG, INTERLEUKIN 10, INTERLEUKIN 4, LOW DOSE MEDICINE

FIG. 1

Ormoni e Citochine nella Fase ovulatoria



Azione di Ormoni e Citochine nel processo ovulatorio.

– Le Gonadotropine avviano la stimolazione della cascata enzimatica in sinergia con la liberazione di Citochine pro-infiammatorie.

Figura elaborata dall'autore.

– Fonte: Grimstad F. et Al., 2016.

M. Passafaro, 2019

comunque un fenomeno di notevole impatto, coinvolgendo il 5% delle coppie: una donna su cento ha, nella propria vita riproduttiva, tre o più aborti (Branch et Al., 2010).

– La RPL è il risultato di cause molto eterogenee (Grimstad et Al., 2016); nella paziente o nella coppia possono venir riscontrate anomalie morfologiche dell'Apparato genitale, squilibri ormo-

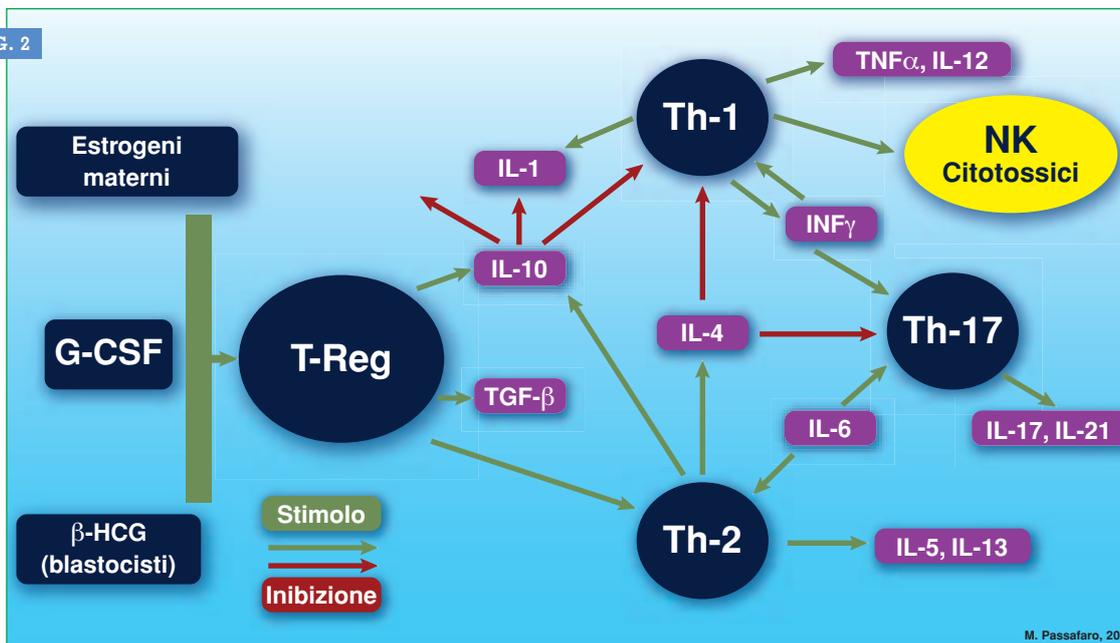
nali e anomalie cromosomiche. In almeno il 50% dei casi non risulta determinabile la causa precisa e la diagnosi rientra nel novero di RPL idiopatica (Fritz and Speroff, 2010).

Il successo di una gravidanza passa attraverso uno scambio appropriato tra madre e feto, non solo di Ossigeno, nutrienti, eliminazione di metaboliti, ma soprattutto di continue e reciproche informazioni: segnali neuroendocrini e

immunitari che garantiscono un continuo e dinamico adattamento reciproco. – Anomalie o interruzioni di queste connessioni possono determinare l'interruzione del processo evolutivo gravidico (Rull et Al., 2012).

– Come tutti i processi fisiologici, anche la funzione riproduttiva richiede un equilibrio neuroendocrino e immunitario frutto di continua regolazione reciproca.

FIG. 2



Relazioni tra le popolazioni linfocitarie nei processi iniziali della gravidanza.

– Gli Estrogeni materni, la β-HCG embrionale, ma soprattutto il G-CSF, sono lo stimolo principale della modulazione operata dalle T-Reg sulle altre linee cellulari linfocitarie.

Figura elaborata dall'autore.

– Fonti: Chaouat G. et Al., 2007; Kwak-Kim J.W. et Al., 2013; Grimstad F. et Al., 2016.

M. Passafaro, 2019

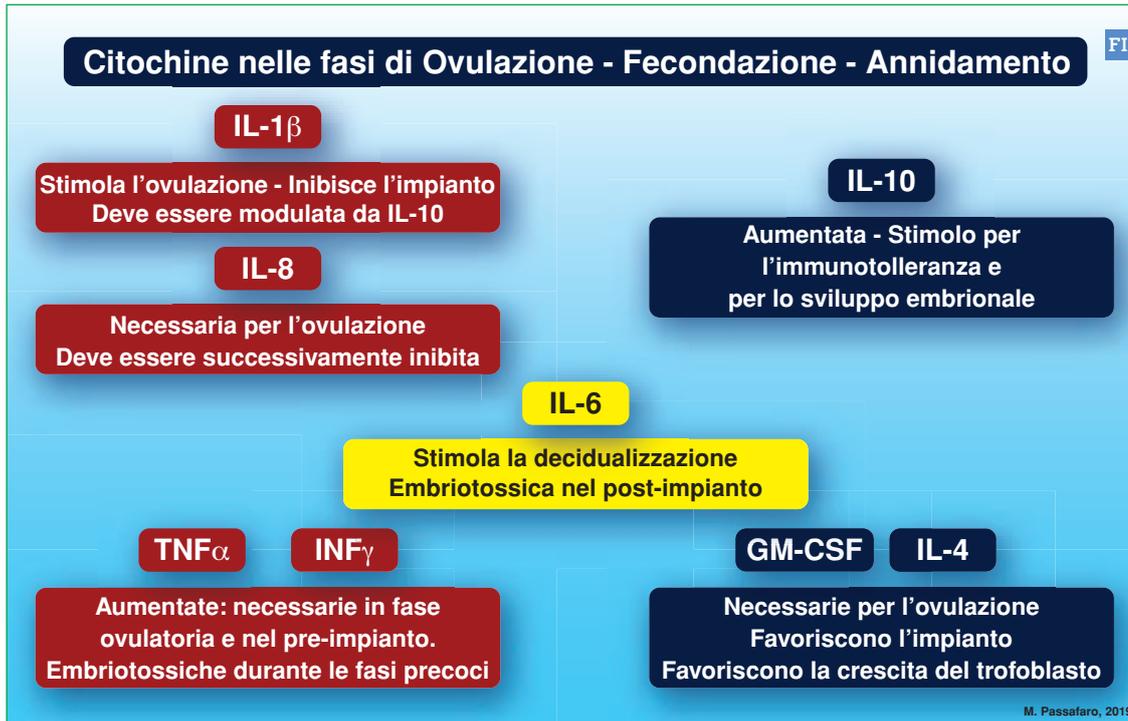


FIG. 3

Ruoli ed azione delle Citochine nel processo riproduttivo.

Figura elaborata dall'autore.

– **Fonti:**

Chaouat G. et Al., 2007;
Kwak-Kim J.W. et Al., 2013;
Grimstad F. et Al., 2016.

SISTEMA IMMUNITARIO E PROCESSO RIPRODUTTIVO

Gli eventi che conducono all'ovulazione e all'instaurarsi di una gravidanza necessitano di un'azione sincronica e sono modulati tra le componenti neuro-endocrine e il SI.

– La Fase ovulatoria stessa è correlata ad uno stato pro-infiammatorio localizzato e delimitato in intensità e durata: si viene a determinare una fase di prevalenza **Th1**, con liberazione di IL-1 e di TNF α .

Le citochine prodotte dalle popolazioni linfocitarie Th1 sostengono, inoltre, il processo di decidualizzazione necessario alla creazione di un ambiente endometriale favorevole all'impianto del prodotto del concepimento e alle fasi precoci dell'annidamento della blastocisti (Grimstad et Al., 2016) (FIG. 1).

Le citochine prodotte dal SI possono sostenere o al contrario danneggiare o sopprimere l'impianto del prodotto del concepimento (Laird et Al., 2003; Park et Al., 2011).

– Il prodotto del concepimento deve trovarsi in uno stato privilegiato di **tol-**

leranza immunitaria: l'azione del SI, soprattutto la fase infiammatoria, deve esprimersi nel momento e nell'intensità appropriato/a (Haller-Kikkatalo et Al., 2014).

La gravidanza è, per tutta la sua durata, uno stato pro-infiammatorio, contemplando un naturale incremento di fattori come TNF α , IL-1, IL-6, con la necessaria modulazione, fisiologica, della IL-10: quest'ultima, a propria volta, tende a ridurre l'espressione di IL-2 e soprattutto di IFN γ (Laird et Al., 2003; Grimstad et Al., 2016).

– L'endometrio si trova costantemente, per la rappresentazione della popolazione cellulare e, soprattutto per la produzione di citochine, in uno stato dinamico (Krieg et Al., 2015).

Nella Fase luteale (16°-21° giorno in un ciclo di 28), l'endometrio va incontro ad una continua variabilità decisiva per l'impianto e la successiva evoluzione embrionale (Ruiz-Alonso et Al., 2012).

Tra le componenti cellulari del SI, in questa fase delicata, il ruolo chiave viene svolto dalle Cellule T-Reg (**T-Reg**).

– Le T-Reg di origine materna migrano risentendo degli stimoli estrogenici materni e della β -HCG prodotta dalla blastocisti, ma – soprattutto – presentano

la massima proliferazione in risposta alla presenza di **G-CSF** (*Granulocyte-colony Stimulating Factor*, Fattore Stimolante le colonie di Granulociti) (Grimstad et Al., 2016).

L'importanza di questo fattore di crescita risulta sempre più determinante; numerosi studi ne hanno postulato la centralità nel ridurre l'incidenza di abortività (Alijotas-Reig et Al., 2014; La Rocca et Al., 2014; Rahmati et Al., 2014).

La ridotta presenza delle T-Reg è stata osservata – appunto – nelle pazienti con RPL o con infertilità primaria (Jasper et Al., 2006; Jin et Al., 2009; Saito et Al., 2010; Alijotas-Reig et Al., 2014).

Le T-Reg modulano sia le popolazioni Th1 sia le Th2, e sono principalmente produttrici di TGF- β e di IL-10 (Bansal et Al., 2010).

- L'equilibrio funzionale tra queste tipologie linfocitarie è determinante per l'impianto e l'evoluzione del processo gravidico.

L'azione del gruppo Th1, necessario per l'ovulazione e nelle primissime fasi della gravidanza, diventa in seguito tossica per l'embrione (Bansal et Al., 2010); circa il 20% delle donne con RPL idiopa-

tica presenta un'eccessiva risposta del braccio Th1 (Akoum *et Al.*, 2008; Fritz *and Speroff*, 2010).

Il braccio Th1, oltre l'apporto citochinico soprattutto di $INF\gamma$, IL-12 e $TNF\alpha$, stimola le linee cellulari T citotossiche (NK, *Natural Killer*), oltre che le Th17.

Le NK sono le cellule produttrici di citochine più numerose presenti a livello della decidua (endometrio in trasformazione) nelle fasi precoci della gravidanza.

– Richiamate dal corredo antigenico del trofoblasto (Bansal *et Al.*, 2010), costituiscono la popolazione linfocitaria più numerosa nell'utero (circa il 70%) (Christiansen, 2013).

– Le NK, pur svolgendo un'azione eminentemente citotossica, nelle fasi precoci, mediante la produzione di $INF\gamma$, sostengono i processi di angiogenesi e la formazione delle arterie spiraliformi, base funzionale del Sistema circolatorio materno-placentare (Bansal *et Al.*, 2010).

Se non adeguatamente modulate (*down-regolate* dai sistemi HLA) in una fase successiva, svolgono un ruolo embriotossico distruggendo la connessione materno-embriionale (Blaschitz *et Al.*, 2001; Seshadri *et Al.*, 2014; Teles *et Al.*, 2014).

L'equilibrio funzionale tra le popolazioni linfocitarie risulta – quindi – determinante per l'impianto e l'evoluzione del processo gravidico.

La risposta in modulazione viene in questo caso fornita dalla linea cellulare Th2, sotto – appunto – lo stimolo modulante delle T-Reg.

I bracci Th1 e Th2 si inibiscono reciprocamente, entrambi modulati dalle T-Reg: da studi recenti, uno stimolo prolungato Th2 risulta correlato ad uno sviluppo favorevole della gravidanza (Kwak-Kim *et Al.*, 2003; Chaouat *et Al.*, 2007).

La FIG. 2 illustra i rapporti esistenti tra le popolazioni linfocitarie, estremamente determinanti nelle fasi precoci della gravidanza.

Gli effettori dei processi di modulazione, sia in senso di stimolo sia di inibizione, sono, come sempre le "molecole segnale" del Sistema Immunitario: le citochine.

– Importantissimi strumenti di comunicazione intercellulare esprimono la loro efficacia regolatoria a livello recettoriale in termini di bassissime concentra-

zioni, inferiori a quelle dei segnali ormonali (Estrogeni e Progesterone, ad esempio, sono misurati in nanogrammi e picogrammi/ml); il segnale citochinico deve essere modulato in intensità e durata.

Le pazienti con RPL presentano, a livello placentare, uno squilibrio (aumento) nell'espressione di citochine (Fritz *and Speroff*, 2010).

– L'**Interleuchina 1**, necessaria nelle fasi ovulatorie e di gravidanza iniziale, se iperespressa sia quantitativamente sia nella durata, produce effetti dannosi sulla gravidanza (Saini *et Al.*, 2011).

– L'**Interleuchina 4** e l'**Interleuchina 10**, sono fattori protettivi nei processi di anidamento ed evoluzione della gravidanza, inibendo l'attivazione delle linee cellulari e delle citochine Th1 (Mincheva-Nilsson *et Al.*, 2003; Saini *et Al.*, 2011).

In particolare, la IL-10 protegge lo sviluppo embrionale dalla reazione cellulare citotossica, garantendo lo sviluppo della tolleranza immunitaria verso il prodotto del concepimento, ed è la prima citochina prodotta dai tessuti em-

FIG. 4

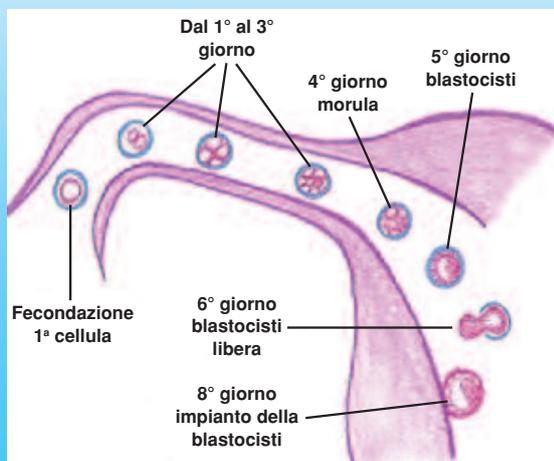
Evoluzione del prodotto del concepimento e produzione di Citochine dalle componenti materne ed embrionali.

Figura elaborata dall'autore.

– Fonti:

Chaouat G. *et Al.*, 2007;
Kwak-Kim J.W. *et Al.*, 2013;
Grimstad F. *et Al.*, 2016.

Stadi dello sviluppo embrionale



Citochine

Fecondazione

$TNF\alpha$ e $INF\gamma$:
inibizione della mobilità dello sperma

Fase embrionale precoce (1°-4° giorno):

Produzione di piccole quantità di $TNF\alpha$ e $INF\gamma$ che diventano tossiche se espresse in concentrazione più elevata

Fase della blastocisti libera:

Trofoectoderma: IL-3, IL-6, IL-10
Bottone cellulare interno: IL-10
Zona pellucida: IL-10

Fase d'impianto

Endometrio: GM-CSF, IL-3, IL-6, IL-10
Mesometrio: IL-1, CSF 1, $TNF\alpha$, $INF\gamma$
Miometro: IL-6, IL-10

brionali (Daher *et Al.*, 2003; Bombell *et Al.*, 2008; Choi *et Al.*, 2008).

– L'**Interleuchina 6** svolge un ruolo ambivalente: si associa in fase precoce all'attività Th1; successivamente, in sinergia con la **IL-4**, promuove la differenziazione delle linee cellulari Th2 (Diehl *et Al.*, 2002); gli studi sull'azione della IL-6 e sull'impatto di quest'ultima nella RPL giungono a risultati contraddittori (Koumantaki *et Al.*, 2001; Arruvito *et Al.*, 2009; Saini *et Al.*, 2011).

Numerosi studi sottolineano la presenza di un polimorfismo nell'espressione della IL-6, con un impatto variabile sulla evoluzione della RPL (Daher *et Al.*, 2003; Koumantaki *et Al.*, 2001).

– Verosimilmente "la IL-6 è una citochina multifunzione contesto-dipendente. La IL-6 è una citochina trans-signaling, potendo agire sia come citochina pro-infiammatoria sia come anti-infiammatoria, in tal caso inibendo IL-1, TNF α ed attivando IL-10" (Milani, 2019); il polimorfismo nella codificazione di questa citochina è la conseguenza e non la causa della differente azione di IL-6.

Come sempre risultano decisivi "il quanto e il quando" nella modulazione delle molecole segnale.

La **FIG. 3** evidenzia l'azione delle citochine implicate nel sostegno delle fasi precoci di gravidanza.

È possibile correlare i tempi delle fasi che vanno dall'ovulazione alla fecondazione e all'impianto del prodotto del concepimento, con la produzione dei segnali, espressi come citochine e fattori di crescita, sorta di "cross talk" che vede impegnata ciascuna componente di quello che deve diventare il "complesso materno-fetale".

– Uno scambio di informazioni che mira ad instaurare la "tolleranza immunitaria", chiave di volta per l'evoluzione della gravidanza.

La relazione, qualitativa e cronologica, è sintetizzata in **FIG. 4**.

In pazienti infertili si osserva un'alterazione del rapporto tra IL-1 β e il suo fattore di inibizione.

Akum A. – Fertil Steril. 2008 June 89 (6): 1618-24.

L'aumento del rapporto tra le popolazioni linfocitarie Th1/Th2 è correlato alla riduzione di fertilità.

Horka P. – Am J Reprod Immunol 2011 May; 65 (5): 466-9.

M. Passafaro, 2019

FIG. 5

Due fonti autorevoli di Letteratura.

LE PATOLOGIE DELLA FUNZIONE RIPRODUTTIVA

– UNO SQUILIBRIO NEURO-ENDOCRINO-IMMUNITARIO

È una visione ormai condivisa dai filoni di ricerca più avanzati che gli aspetti patologici della funzione riproduttiva siano espressione di alterata regolazione endocrino-immunitaria (**FIG. 5**).

• È da sottolineare il richiamo, in Matthiesen *et Al.* (2012), ad un possibile impiego terapeutico di IL-10 e soprattutto di **G-CSF**.

G-CSF: un pivot in un ruolo chiave

Numerosissimi studi hanno dimostrato come un fattore di crescita, prodotto dai fibroblasti, monociti, macrofagi e dalle cellule stromali, il **G-CSF**, rivesta un ruolo di rilievo nel successo del processo riproduttivo, dall'ovulazione allo sviluppo embrionale e fetale (Basu *et Al.*, 2002; Effekhar *et Al.*, 2018).

– Scoperto nel 1983 ed isolato nell'uomo nel 1986 (Begley *et Al.*, 1986), il G-CSF si lega a recettori specifici localizzati non solo sulla superficie delle cellule della Linea mieloide, ma anche sulle cellule del trofoblasto e della placenta (Rahmati *et Al.*, 2015).

– Secondo recenti ricerche, il G-CSF non solo favorisce l'impianto embrionale ma anche ottimizza la funzione ova-

rica migliorando la qualità degli ovociti, anche in pazienti con scarsa riserva ovarica: risulta anche un marcatore sensibilmente predittivo per il risultato delle procedure di fecondazione assistita (Gleicher *et Al.*, 2011; Effekhar *et Al.*, 2018).

È stata – infatti – evidenziata una correlazione positiva tra elevati livelli di G-CSF e maggiori probabilità di impianto embrionale e di evoluzione positiva della gravidanza (Salmassi *et Al.*, 2005; Lédée *et Al.*, 2011, 2013).

G-CSF: uno strumento terapeutico?

Il G-CSF ricombinante umano è stato impiegato (Lenograstim 100 mg) nel trattamento della LUF *Syndrome* (Cisti teco-luteinica) con risultati molto soddisfacenti (Makinoda *et Al.*, 2012).

– Numerosi Centri hanno utilizzato il G-CSF ricombinante umano nel trattamento dei ripetuti deficit di impianto (RIF) nelle procedure di FIVET (Barad *et Al.*, 2014; Coughlan *et Al.*, 2014; Aleyasin *et Al.*, 2016).

Analogamente, dalla prima decade degli anni 2000, si iniziò a cercare nel G-CSF una risorsa terapeutica nel trattamento della RPL.

Scarpellini *et Al.* (2009) impiegarono, in 35 pazienti con RPL idiopatica, un'infusione e.v. di 1g/kg/die di Filgrastim dalla fase luteinica fino alla fine della me-

struazione o fino alla nona settimana di gravidanza: rispetto a un Gruppo di controllo (33 pazienti) trattato con placebo, il Gruppo trattato ottenne un risultato positivo molto superiore (82.8% vs 48.5%).

Il costo di questo strumento terapeutico, impiegato in dosi farmacologiche, risiede negli effetti collaterali consistenti e frequenti; "artralgie, stato di affaticamento, cefalea, inappetenza, nausea e vomito" i più frequenti (Effekhar et Al., 2018), ma anche meno frequenti e più gravi (dispnea, dolore toracico, episodi anafilattici e sincope) (Khoury et Al., 2000).

G-CSF: un intervento "low dose"?

L'impiego di principi attivi a basse dosi trova ormai attenzione e risonanza anche nella Medicina Convenzionale: è il paradigma centrale della Medicina Fisiologica di Regolazione (PRM).

– Con il supporto della Letteratura e della ricerca più recenti è stato esposto nei paragrafi precedenti come aspetti fisiologici o patologici di alcune funzioni specifiche, come ad esempio il processo riproduttivo, siano il frutto di un equilibrio o di una disregolazione di almeno due Sistemi: il Sistema Neuro-Endocrino e il Sistema Immunitario.

La regolazione o la sua perdita dipendono da segnali sincronici e ubiquitari portati attraverso molecole segnale qua-

li neuropeptidi, citochine, fattori di crescita e ormoni normalmente attivi a concentrazioni fisiologicamente basse (nanogrammi/picogrammi).

La Farmacologia *low dose* prevede la somministrazione delle stesse molecole segnale o di sostanze naturali farmacologicamente attive a concentrazioni comprese tra nanogrammi e femtogrammi/millilitro, mirando ad una "sensibilizzazione recettoriale" così da "attivare meccanismi di autoregolazione", veicolando "informazioni all'intera unità PNEI" (Perra et Al., 2017).

LA MEDICINA LOW DOSE – TERAPIA POSSIBILE NELLE PATOLOGIE DELLA RIPRODUZIONE

Prima di esporre i nostri *case report* relativi al trattamento della RPL, è doveroso citare un importante studio clinico sull'impiego dei farmaci *low dose* nel trattamento di pazienti affette da infertilità.

– Il *trial* clinico è stato condotto dal Gruppo diretto dal Prof. G. Menaldo, presso l'Istituto di Medicina della Riproduzione e Ginecologia S. Carlo di Torino, su pazienti sottoposte ad una speciale procedura di fecondazione assistita (ICSI).

Le pazienti, suddivise in 2 Gruppi, trattamento e controllo, sono state seguite

per complessivi 40 cicli di procedure per Gruppo. Il Gruppo trattato assumeva **Guna-Interleukin 4 4CH** e **Guna-GCSF 4CH** (femtogrammi/ml/die).

– La differenza dei risultati a favore del Gruppo trattato (17 gravidanze su 40 cicli di ICSI vs 8 su 40 cicli di ICSI nel Gruppo di controllo) è risultata dal punto di vista statistico molto significativa ($P < 0.001$) (Menaldo et Al., 2012).

Anche questo studio clinico, significativo per sostenere l'efficacia di un approccio *low dose*, deriva dalla comprensione del profondo nesso esistente tra fisiopatologia dei processi riproduttivi e regolazione endocrino-immunitaria.

È ormai acquisito che lo squilibrio sia quantitativo sia cronologico tra le citochine pro-infiammatorie e anti-infiammatorie in pazienti con RPL è un fattore chiave per il mancato sviluppo di una sede endometriale favorevole (Banerjee et Al., 2013).

– Il G-CSF, unitamente agli estrogeni materni ed alla β -HCG, stimola le T-Reg a virare verso il braccio Th2, con successiva produzione modulatrice di IL-10 e di IL-4 (Effekhar et Al., 2018).

CASISTICA

Con il supporto di queste evidenze bibliografiche e delle indicazioni emerse dal *trial* clinico di Menaldo et Al. abbiamo trattato un Gruppo di **6 pazienti** presentanti **RPL**, focalizzando la nostra attenzione sul ruolo della IL-4 (FIG. 6).

Unitamente alla IL-10, la IL-4 è un fattore determinante la stimolazione della conversione verso un ambiente Th2, protettivo per lo sviluppo della gravidanza e modulante in inibizione l'attivazione delle fasi Th1 (Chaouat et Al., 2007; Grimstad et Al., 2016).

Ottenuto il consenso informato dalle pazienti, abbiamo proposto l'assunzione di **Guna-GCSF 4CH** e **Guna-Interleukin 4 4CH**, entrambe 20 gtt. x 2 vv./die (FIG. 7).

La Casistica

6 pazienti – Età media: 38,16 anni \pm 2,04

Storia ostetrica:

**1 paziente con pregressa gravidanza a termine
14 aborti entro la 6^a settimana (2,33 \pm 0,51 per paziente)**

**2 pazienti (3 RPL ciascuna) in Procedure di
Fecondazione Assistita**

(Casistica personale: inizio 2018 - in corso)

FIG. 6

M. Passafaro, 2019

Casistica: dati anamnestici e clinici delle pazienti sottoposte a terapia *low dose*.

Protocollo terapeutico

Guna-GCSF 4CH - 20 gtt. x 2 vv./die
Guna-Interleukin 4 4CH - 20 gtt. x 2 vv./die
Lilium compositum (-Heel) - 1 fl. i.m./sett.

Risultati

6 gravidanze entro 60 giorni di terapia
(media 56,66 ± 20,41)
2 pazienti su 6 in Procedure di Fecondazione Assistita
2 gravidanze a termine (1 spontanea, 1 con FMA)
4 gravidanze in corso al 3° trimestre (>24ª settimana)
(3 spontanee, 1 con FMA)

FIG. 7

M. Passafaro, 2019

Protocollo terapeutico e risultati.

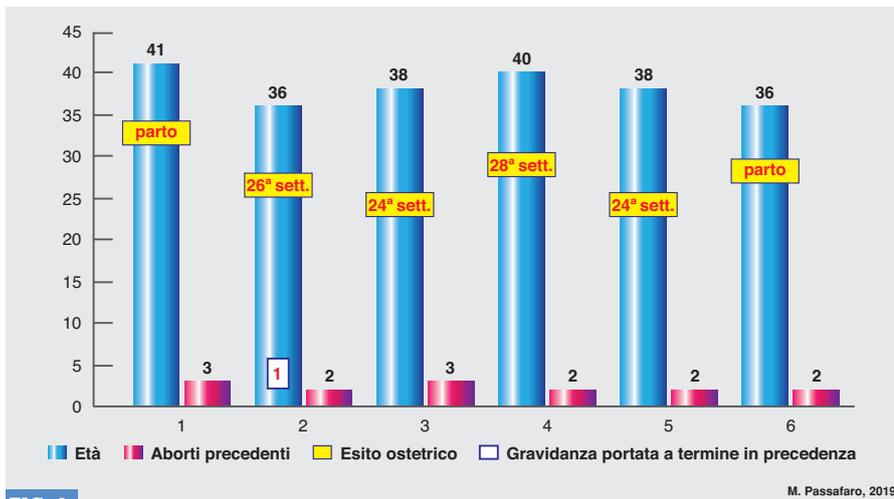


FIG. 8

M. Passafaro, 2019

Le 6 pazienti. Storia individuale e risultato della terapia.

La terapia con molecole segnale è stata implementata con la somministrazione di **Lilium compositum** (-Heel), 1 fl. i.m./sett.

Questa scelta è supportata da recentissime evidenze; infatti, oltre allo stimolo specifico fornito dai 5 derivati d'organo suino *low dose* (Ovarium D8, Placenta D10, Uterus D10, Salpinx uteri D10 e Hypophysis D13 – l'Opoterapia rientra nella tradizione della Medicina convenzionale), i principi attivi contenuti nella componente polisaccaridica idrosolubile di *Lilium tigrinum* (N.d.R.: *Lilium tigrinum*, termine usato solo in Omeopatia, è sinonimo obsoleto di *Lilium lancifolium* Thunb.) aumentano l'espressione

del *Toll-like Receptor 4* e modulano l'espressione del NF-κB, intervenendo nelle relazioni Recettori/Nucleo con effetti di immunomodulazione (Pan *et Al.*, 2017).

RISULTATI

Le 6 pazienti trattate hanno avviato una gravidanza **entro 2 mesi** dall'inizio della terapia; 2 delle 6 hanno avuto successo nel loro (terzo) ciclo di FIVET.

Due gravidanze sono state condotte a termine (1 FIVET); 4 gravidanze hanno superato, a marzo 2019, la 24ª settimana (1 FIVET).

Questi dati sono esposti in **FIGG. 7, 8**; la **FIG. 8** espone, per ciascuna paziente, l'età, la storia ostetrica (gli aborti precedenti e, nel riquadro bianco, l'unica gravidanza portata a termine in precedenza).

CONCLUSIONI

Pur considerando il numero limitato dei casi trattati, i risultati ottenuti ed i riscontri di Letteratura costituiscono un'ulteriore conferma a supporto dell'approccio clinico e farmacologico della Medicina Fisiologica di Regolazione nella terapia delle patologie del processo riproduttivo.

– Risulta ormai evidente che, come tutti i processi fisiologici, anche la funzione riproduttiva richiede un equilibrio neuroendocrino ed immunitario frutto di continua regolazione reciproca.

Ogni processo fisiologico è uno scambio di segnali in termini precisi, quantitativamente e cronologicamente: quanto più rapida è la modulazione, tanto più bassa deve essere la concentrazione.

– La Fisiologia... agisce in termini "low dose".

Bibliografia

- Akoum A. *et Al.* – Imbalance in the peritoneal levels of IL 1 and its decoy inhibitory receptors type II in endometriosis women with infertility and pelvic pain. *Fertil Steril*, Jun.89(6):1618-24; **2008**.
- Aleyasin A. *et Al.* – Granulocyte colony-stimulating factor in repeated IVF failure, a randomized trial. *Reproduction*, 151:637-42; **2016**.
- Alijotas-Reig J. *et Al.* – Potentiating maternal immune tolerance in pregnancy: a new challenging role for regulatory T cells. *Placenta*, 35(4):241-8; **2014**.
- Arruvito L. *et Al.* – IL-6 trans-signaling and the frequency of CD4+ FOXP3+ cells in women with reproductive failure. *J Reprod Immunol*, 82(2):158-65; **2009**.
- Banerjee R. *et Al.* – Proinflammatory cytokines induced altered expression of cyclooxygenase-2 gene results in unreceptive endometrium in women with idiopathic recurrent spontaneous miscarriage. *Fertil Steril*, Jan 99 (1):179-87; **2013**.
- Bansal A.S. *et Al.* – Joining the immunological dots in recurrent miscarriage. *Am J Reprod Immunol*, 64(5):307-15; **2010**.

- Barad D.H. *et Al.* – A randomized clinical trial of endometrial perfusion with granulocyte colony-stimulating factor in in vitro fertilization cycles: Impact on endometrial thickness and clinical pregnancy rates. *Fertil Steril*, 4;101:710-5; **2014**.
- Basu S. *et Al.* – G-CSF: Function and modes of action (Review). *Int J Mol Med*, 2002;10:3-10; **2002**.
- Begley C.G. *et Al.* – Purified colony stimulating factors enhance the survival of human neutrophils and eosinophils in vitro: a rapid and sensitive micro assay for colony-stimulating factors. *Blood*, 68:162-6; **1986**.
- Blaschitz A. *et Al.* – HLA Class I protein expression in the human placenta. *Early Pregnancy*, 5(1): 67-9; **2001**.
- Bombell S. *et Al.* – Cytokine polymorphisms in women with recurrent pregnancy loss: meta-analysis. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*, 48(2):147-54; **2008**.
- Branch D.W. *et Al.* – Clinical practice. Recurrent miscarriage. *N Engl J Med*, 363(18):1740-7; **2010**.
- Chaouat G. *et Al.* – The Th1/Th2 paradigm: still important in pregnancy? *Semin Immunopathol*, 29(2):95-113; **2007**.
- Choi Y.K. *et Al.* – Cytokine gene polymorphisms in recurrent spontaneous abortions: a comprehensive review. *Am J Reprod Immunol*, 60(2):91-110; **2008**.
- Christiansen O.B. – Reproductive Immunology. *Mol Immunol.*, 55(1): 8-15; **2013**.
- Coughlan C. *et Al.* – Recurrent implantation failure: Definition and management. *Reprod Biomed Online*, 28:14-38; **2014**.
- Daher S. *et Al.* – Associations between cytokine gene polymorphisms and recurrent pregnancy loss. *J Reprod Immunol*, 58(1):69-77; **2003**.
- Diehl S. *et Al.* – The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. *Mol Immunol*, 39(9):531-6; **2002**.
- Effekhar M. *et Al.* – Role of granulocyte colony-stimulating factor in human reproduction. *J Res Med Sci*, Jan 29; 23:7; **2018**.
- Fritz M. *and* Speroff L. – Clinical gynecologic endocrinology and infertility. Philadelphia: Lippincott William and Wilkins; **2010**.
- Gleicher N. *et Al.* – Successful treatment of unresponsive thin endometrium. *Fertil Steril*, 95: 2123.e13-7; **2011**.
- Grimstad F. *et Al.* – Immunogenetic contributions to recurrent pregnancy loss. *J Asist Reprod Genet*, Jul 33(7): 833-47; **2016**.
- Haller-Kikkatalo K. *et Al.* – Autoimmune activation toward embryo implantation is rare in immune-privileged human endometrium. *Semin Reprod Med*, 32(5): 376-84; **2014**.
- Jasper M.J. *et Al.* – Primary unexplained infertility is associated with reduced expression of T-regulatory cell transcription factor Foxp3 in endometrial tissue. *Mol Hum Reprod*, 12(5):301-8; **2006**.
- Jin L.P. *et Al.* – The CD4+ CD25 bright regulatory T cells and CTLA-4 expression in peripheral and decidual lymphocytes are down-regulated in human miscarriage. *Clin Immunol*, 133(3): 402-10; **2009**.
- Khoury H. *et Al.* – Adverse side-effects associated with G-CSF in patients with chronic myeloid leukemia undergoing allogeneic peripheral. *Bone Marrow Transplant*, 25:1197-201; **2000**.
- Koumantaki Y. *et Al.* – Detection of interleukin-6, interleukin-8, and interleukin-11 in plasma from women with spontaneous abortion. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 98(1):66-71; **2001**.
- Krieg S. *et Al.* – Immune function and recurrent pregnancy loss. *Semin Reprod Med*, 33(4):305-12; **2015**.
- Kwak-Kim J.W. *et Al.* – Increased T helper 1 cytokine responses by circulating T cells are present in women with recurrent pregnancy loss and in infertile women with multiple implantation failures after IVF. *Hum Reprod*, 18(4):767-73; **2013**.
- La Rocca C. *et Al.* – The Immunology of pregnancy: Regulatory T-cells control maternal immune tolerance toward the fetus. *Immunol Lett*, 162(1 Pt A): 41-8; **2014**.
- Laird S.M. *et Al.* – A review of immune cells and molecules in women with recurrent miscarriage. *Hum Reprod Update*, 9(2): 163-74; **2003**.
- Lédée N. *et Al.* – Levels of follicular GCSF and interleukin-15 appear as noninvasive biomarkers of subsequent successful birth in modified natural in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil Steril*, 95:94-8. **2011**.
- Lédée N. *et Al.* – Impact of follicular G-CSF quantification on subsequent embryo transfer decisions: A proof of concept study. *Hum Reprod*, 28:406-13; **2013**.
- Makinoda S. *et Al.* – An effective treatment against luteinized unruptured follicle (luf) using granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF). *Int J Gynecol Obstet*, 119:S412-S3; **2012**.
- Matthiesen L. *et Al.* – Multiple pregnancy failures: an immunological paradigm. *Am J Reprod Immunol*, 67(4): 334-40; **2012**.
- Menaldo G. *et Al.* – Comparison of ICSI outcome using microdose of G-CSF and IL-10. 17th World Congress on Controversies in Obstetrics, Gynecology & Infertility (COGI). Lisbona: Z. Ben-Rafael; **2011**.
- Milani L. – Lettere al Direttore. *La Med. Biol.*, **2019/1**; 63-69.
- Mincheva-Nilsson L. *et Al.* – Pregnancy and gamma/delta T cells: taking on the hard questions. *Reprod Biol Endocrinol*, 1:120; **2003**.
- Pan G. *et Al.* – Immune-enhancing effects of polysaccharides extracted from *Lilium lancifolium* Thunb. *Int Immunopharmacol*, Nov 52:119-126; **2017**.
- Park D.W. *et Al.* – Hormonal Regulation of uterine chemokines and immune cells. *Clin Exp Reprod Med*, 38(4): 179-85; **2011**.
- Perra A. *et Al.* – Low Dose Medicine. Highlights sulla ricerca di base e clinica. Guna Ed., Milano; **2017**.
- Rahmati M. *et Al.* – Granulocyte-colony stimulating factor related pathways tested on an endometrial ex-vivo model. *PLoS One*, 9(9): e102286; **2014**.
- Rahmati M. *et Al.* – Colony stimulating factors 1, 2, 3 and early pregnancy steps: From bench to bedside. *J Reprod Immunol*, 109:1-6; **2015**.
- Ruiz-Alonso M. *et Al.* – The genomics of human endometrium. *Biochim Biophys Acta*, 1822(12):1931-42; **2012**.
- Rull K. *et Al.* – Genetics of recurrent miscarriage: challenges, current knowledge, future directions. *Front Genet*, 3: 34; **2012**.
- Saini V. *et Al.* – Cytokines in recurrent pregnancy loss. *Clin Chim Acta.*, 412(9-10):702-8; **2011**.
- Saito S. *et Al.* – Th1/Th2/Th17 and Regulatory T cells paradigm in pregnancy. *Am J Reprod Immunol*, 63(6):601-10; **2010**.
- Salmassi A. *et Al.* – Is granulocyte colony-stimulating factor level predictive for human IVF outcome? *Hum Reprod*, 5;20:2434-40; **2005**.
- Scarpellini F. *et Al.* – Use of granulocyte colony-stimulating factor for the treatment of unexplained recurrent miscarriage: A randomised controlled trial. *Hum Reprod*, 24:2703-8; **2009**.
- Seshadri S. *et Al.* – Natural Killer cells in female infertility and recurrent miscarriage: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update*, 429-38; **2014**.
- Stephenson M. *et Al.* – Evaluation and management of recurrent early pregnancy loss. *Clin Obstet Gynecol*, 50(1):132-45; **2007**.
- Teles A. *et Al.* – How cells of the immune system prepare the endometrium for implantation. *Semin Reprod Med*, 32(5): 358-64; **2014**.

Testo elaborato dalla relazione dell'autore presentata al Club A.M.I.O.T. - 19° edizione, Rimini, 30-31 marzo 2019.

Riferimento bibliografico

PASSAFARO M. – G-CSF *low dose* SKA nell'abortività spontanea ricorrente. *La Med. Biol.*, **2019/3**; 11-18.

autore

Dr. Maurizio Passafaro

– Specialista in Ginecologia e Ostetricia

Viale Mugello, 7
I – 20137 Milano