



# UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI TRIESTE

Sede Amministrativa del Dottorato di Ricerca

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI TORINO

Sede Convenzionata

XXIII Ciclo del

Dottorato di Ricerca in

MEDICINA MATERNO-INFANTILE, PEDIATRIA dello SVILUPPO e  
dell'EDUCAZIONE, PERINATOLOGIA

## VALUTAZIONE DI PARAMETRI NEMASPERMICI NELL'INFERTILITÀ DI COPPIA MEDIANTE CITOMETRIA A FLUSSO

(SETTORE SCIENTIFICO-DISCIPLINARE MED/40)

Dottorando

**Stefania LUPPI**

Responsabile del Dottorato di Ricerca

**Chiar.mo Prof. A. VENTURA**

Università degli Studi di Trieste

Supervisore e Relatore

**Chiar.mo Prof. G. RICCI**

Università degli Studi di Trieste

Correlatore

**Dott.ssa M. GRANZOTTO**

I.R.C.C.S. Burlo Garofolo

Anno Accademico 2009/2010

# SOMMARIO

<b>RIASSUNTO</b> .....	p. 5
<b>ACRONIMI E ABBREVIAZIONI</b> .....	p. 8
<b>INTRODUZIONE</b> .....	p.10
INFERTILITA' E STERILITA'.....	p. 10
Cause di infertilità e sterilità.....	p. 10
INFERTILITA' FEMMINILE.....	p. 12
Cause e fisiopatologia dell'infertilità femminile.....	p. 12
Valutazione dell'infertilità femminile.....	p. 15
INFERTILITA' MASCHILE.....	p. 16
Cause e fisiopatologia dell'infertilità maschile.....	p. 17
Valutazione dell'infertilità maschile.....	p. 20
ESAME DEL LIQUIDO SEMINALE.....	p. 24
Valutazione macroscopica.....	p. 24
Valutazione microscopica.....	p. 25
LA LEUCOCITOSPERMIA.....	p. 29
LA RISPOSTA IMMUNITARIA NEI CONFRONTI DEGLI SPERMATOZOI:	
LA FAGOCITOSI.....	p. 31
TECNICHE DI PROCREAZIONE MEDICALMENTE ASSISTITA.....	p. 34
Stimolazione della crescita follicolare.....	p. 35
Le inseminazioni.....	p. 37
Prelievo degli ovociti.....	p. 38
Fecondazione <i>in vitro</i> .....	p. 39
FIVET.....	p. 39
ICSI.....	p. 40
Lo sviluppo ed il trasferimento embrionale.....	p. 42
LA CITOMETRIA A FLUSSO.....	p. 44
La citometria a flusso nell'analisi del liquido seminale.....	p. 45
<b>SCOPO DELLA RICERCA</b> .....	p. 47
<b>MATERIALI E METODI</b> .....	p. 48
SPERMIOGRAMMA.....	p. 48
CAPACITAZIONE <i>IN VITRO</i> DI SPERMATOZOI.....	p. 48
<i>Swim-up da pellet</i> .....	p. 48

FAGOCITOSI DI SPERMATOZOI.....	p. 49
Casistica.....	p. 49
Linea cellulare THP1 e valutazione del differenziamento.....	p. 49
Colorazione di spermatozoi con pHrodo™, SE.....	p. 50
Fagocitosi ed analisi citofluorimetrica.....	p. 51
ANALISI DEI LEUCOCITI SEMINALI.....	p. 51
Casistica.....	p. 51
Test della perossidasi.....	p. 51
Analisi citofluorimetrica.....	p. 52
TECNICHE DI FECONDAZIONE <i>IN VITRO</i> .....	p. 53
Protocolli di stimolazione ovarica.....	p. 53
Terreni di coltura di ovociti, spermatozoi ed embrioni.....	p. 53
Prelievo ovocitario ecoguidato.....	p. 54
Decoronizzazione degli ovociti.....	p. 55
Metodica di microiniezione (ICSI).....	p. 55
Metodica FIVET.....	p. 55
Controllo della fecondazione.....	p. 56
Classificazione degli embrioni.....	p. 56
Trasferimento degli embrioni in cavità uterina.....	p. 58
Accertamento della gravidanza.....	p. 58
ANALISI STATISTICA.....	p. 58
<b>RISULTATI E DISCUSSIONE.....</b>	<b>p. 59</b>
<b>MESSA A PUNTO DEL PROTOCOLLO <i>IN VITRO</i> DI FAGOCITOSI DI SPERMATOZOI.....</b>	<b>p. 59</b>
Differenziamento <i>in vitro</i> della linea cellulare THP1.....	p. 59
Colorazione di spermatozoi colorati con pHrodo™, SE.....	p. 60
Fagocitosi <i>in vitro</i> di spermatozoi colorati con pHrodo™, SE.....	p. 60
Fagocitosi <i>in vitro</i> di spermatozoi in diversi stati di attivazione.....	p. 62
Fagocitosi <i>in vitro</i> di spermatozoi sottoposti a stress termici e chimici.....	p. 63
<b>FAGOCITOSI <i>IN VITRO</i> DI SPERMATOZOI NELLO STUDIO DELL'INFERTILITA'.....</b>	<b>p. 65</b>
Influenza dello stato di capacitazione degli spermatozoi sulla fagocitosi <i>in vitro</i> .....	p. 65
Correlazione tra alcuni parametri del liquido seminale e la fagocitosi <i>in vitro</i> di spermatozoi non capacitati.....	p. 67
Correlazione tra alcuni parametri del liquido seminale e l'aumento della fagocitosi <i>in vitro</i> di spermatozoi post-capacitati rispetto a spermatozoi capacitati.....	p. 69

<b>EFFETTI DELLA LEUCOCITOSPERMIA SUI PARAMETRI DEL LIQUIDO SEMINALE E SULL'OUTCOME DELLE TECNICHE DI FECONDAZIONE IN VITRO</b> .....	p. 71
Determinazione dei leucociti seminali.....	p. 71
Effetti della leucocitospermia sui parametri del liquido seminale.....	p. 73
Effetti della leucocitospermia sugli esiti delle tecniche di fecondazione <i>in vitro</i> (FIVET e ICSI).....	p. 76
 <b>CONCLUSIONI</b> .....	 p. 79
 <b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	 p. 81

## RIASSUNTO

L'infertilità, a differenza di altre condizioni patologiche in cui è noto l'agente eziologico, è espressione di fattori maschili e/o femminili diversi, spesso asintomatici da un punto di vista clinico. Si ritiene che nei paesi occidentali il tasso di infertilità tra le coppie in età potenzialmente fertile sia del 15-20%. In Italia tale condizione colpisce circa il 20% delle coppie, il 40% delle quali si rivolge ai centri di procreazione medicalmente assistita distribuiti su tutto il territorio italiano.

I fattori che predispongono all'infertilità sono molteplici e in circa il 35% dei casi attribuibili al partner maschile. È possibile valutare il fattore maschile nella quasi totalità dei casi con il riscontro di valori anormali nell'esame del liquido seminale. Lo spermogramma rappresenta la più rilevante indagine dello studio andrologico, che consente di stabilire se il partner maschile di una coppia debba essere effettivamente considerato infertile, se il livello di infertilità è tale da richiedere una procedura di fecondazione assistita ed, infine, verso quale tecnica di fecondazione assistita è opportuno procedere. L'OMS ha pubblicato un dettagliato protocollo di laboratorio, aggiornato nel 1999, definendo i criteri standardizzati di valutazione del liquido seminale. Tuttavia, in molti studi è stata individuata un'alta variabilità inter- e intra-osservatore nei risultati di tale esame, quindi si è cercato di utilizzare altre metodiche per affinare tale indagine.

La citofluorimetria è una metodica che sta prendendo sempre più piede nella pratica clinica dei laboratori di andrologia, in quanto risulta un metodo valido e accurato per l'analisi di alcune caratteristiche del liquido seminale. Tuttavia le linee guida del WHO (1999) non ne prevedono l'utilizzo nella *routine*, in quanto risulta troppo costosa.

In questo lavoro, utilizzando la tecnica citofluorimetrica, sono stati effettuati due studi distinti. In particolare sono state analizzate alcune caratteristiche di liquidi seminali di pazienti infertili rivoltisi alla S.S.D. Procreazione Medicalmente Assistita del I.R.C.C.S. Burlo Garofolo.

In primo luogo, sono state individuate le condizioni sperimentali ottimali per la valutazione della fagocitosi *in vitro* di spermatozoi, processo che avviene normalmente *in vivo* nell'apparato genitale femminile e che non è noto se interferisca o meno con la fecondazione. Non esistono, infatti, molti studi a riguardo, in quanto la maggior parte delle tecniche è insufficiente a garantire risultati oggettivi.

Il protocollo messo a punto in questa ricerca è stato applicato agli spermatozoi di 24 campioni di liquido seminale di pazienti affetti da infertilità idiopatica che, secondo i parametri del WHO, risultavano normali o lievemente alterati dal punto di vista della concentrazione, della motilità e della morfologia degli spermatozoi. Dallo studio è emerso che la presenza di alterazioni, seppur lievi, a carico della motilità e

della morfologia degli spermatozoi rendono questi ultimi maggiormente suscettibili alla fagocitosi rispetto a campioni normali. Inoltre, lo stato di capacitazione degli spermatozoi ha un effetto sulla fagocitosi degli stessi, in particolare, gli spermatozoi allo stato basale sono maggiormente fagocitati rispetto a quelli capacitati *in vitro*. Questo è probabilmente dovuto al fatto che nel campione non capacitato vi è una maggior variabilità cellulare e una maggior presenza di forme nemaspermiche di peggior qualità e quindi più suscettibili alla fagocitosi. La capacitazione, invece, seleziona gli spermatozoi con migliore motilità e morfologia dal campione di liquido seminale di base, e dunque gli spermatozoi dopo la capacitazione risultano di miglior qualità e quindi fagocitati in misura minore. Tuttavia, laddove i parametri nemaspermici del liquido seminale di partenza risultano alterati, in termini di motilità e morfologia, si è osservato una tendenza all'aumento del livello di fagocitosi degli spermi post-capacitati rispetto a quelli capacitati, e ciò potrebbe essere dovuto a caratteristiche intrinseche degli spermatozoi basali che li rendono maggiormente vulnerabili alla fagocitosi anche dopo la capacitazione.

La seconda parte di questa ricerca riguarda lo studio degli effetti della leucocitospermia sui parametri del liquido seminale e sull'*outcome* delle tecniche di fecondazione *in vitro*. Molti autori si sono occupati dell'argomento, ma i dati ottenuti fanno emergere opinioni contrastanti riguardo al ruolo della leucocitospermia nell'infertilità maschile.

Secondo quanto definito dalle linee guida del WHO, la conta dei leucociti seminali di *routine* viene effettuata mediante il test della perossidasi, che tuttavia risulta meno sensibile e meno accurata della metodica citofluorimetrica.

In questo studio sono stati analizzati 150 liquidi seminali di soggetti appartenenti a coppie rivoltesi alla S.S.D. Procreazione Medicalmente Assistita del I.R.C.C.S. Burlo Garofolo. La conta dei leucociti è stata effettuata mediante citofluorimetria e sono stati valutati gli effetti della leucocitospermia sui parametri del liquido seminale e sull'*outcome* delle tecniche di fecondazione *in vitro*. L'originalità di tale lavoro consiste nel fatto che sono stati valutati gli effetti della leucocitospermia utilizzando la tecnica citometrica e conducendo un'indagine distinta tra i campioni destinati alla FIVET e quelli destinati alla ICSI.

Da tale analisi è emerso che complessivamente i parametri di concentrazione e di motilità degli spermatozoi sono influenzati dalla presenza di eccessive concentrazioni di leucociti nel liquido seminale. Se, però, si fa distinzione tra i campioni destinati alle due tecniche, la differenza di motilità degli spermatozoi non risulta più correlata alla leucocitospermia, mantenendo un trend di diminuzione nella ICSI, mentre nella FIVET tende all'aumento, tanto che i risultati sembrano addirittura in contraddizione. Inoltre, la leucocitospermia non ha effetto sui tassi di fertilizzazione degli ovociti, sui tassi di sviluppo degli embrioni e sui tassi di gravidanza, né in seguito a ICSI, né in seguito a FIVET. Dunque, dal momento che la leucocitospermia non

sembra influenzare i parametri del liquido seminale né gli esiti delle tecniche di fecondazione *in vitro*, si può ipotizzare che, in presenza di un'alta concentrazione di leucociti nel liquido seminale, sussista un giusto equilibrio di proporzioni tra i leucociti e la quantità di spermatozoi, tale da non comportare effetti dannosi sulla funzionalità degli spermatozoi e quindi sul successo delle tecniche di fecondazione assistita.

Questi risultati hanno dunque implicazioni sul significato diagnostico della leucocitospermia nel contesto dell'infertilità maschile e della fecondazione assistita e, da ciò, risulterebbe necessario rivalutare il livello soglia del numero di leucociti al di sopra del quale si è di fronte ad una condizione patologica che ha effetti negativi sulla fertilità di un individuo in termini di qualità degli spermatozoi, tassi di fertilizzazione e tassi di gravidanza.

## **ACRONIMI e ABBREVIAZIONI**

APC: AlloPhycoCyanin  
AR: Androgen Receptor  
ASA: Anti-Sperm Antibody  
7-AAD: 7-Amino-Actinomicyn-D  
 $\beta$ -HCG:  $\beta$ -Human Chorionic Gonadotropin  
BMI: Body Mass Index  
CFTR: Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator  
COC: Complesso Ovocita-Cumulo ooforo  
DAB: 3,3' DiAminoBenzidine-tetrahydrochlorite  
DHEAS: DeHydroEpiAndroSterone  
FBS: Fetal Bovine Serum  
FITC: Fluorescein IsoThiocyanate  
FIVET: Fecondazione In Vitro ed Embryo Transfer  
FSC: Forward SCatter light  
FSH: Follicle-Stimulating Hormone  
FSP: Falloppian Sperm Perfusion  
GIFT: Gametes Intra Falloppian Transfer  
GnRH: Gonadotropin Releasing Hormone  
HEPES: 4-(2-HydroxyEthyl)-1-PiperazineEthaneSulfonic acid  
HMG: Human Menopausal Gonadotropin  
IBT: ImmunoBead Test  
ICSI: IntraCytoplasmatic Sperm Injection  
IMDM: Ivscove's Modified Dulbecco's Medium  
IUI: IntraUterine Insemination  
IVF: In Vitro Fertilization  
LH: Luteinizing Hormone  
LPS: LipoPoliSaccaride  
MAR Test: Mixed Antiglobulin Reaction Test  
MESA: Microsurgical Epididymal Sperm Aspiration  
MST: Malattie Sessualmente Trasmessibili  
OMS: Organizzazione Mondiale della Sanità  
PE: Phyco Erythrin  
PerCP: Peridinin Chlorophyll Protein Complex  
PESA: Percutaneous Epididymal Sperm Aspiration  
PMA: Procreazione Medicalmente Assistita  
PMA: Phorbol 12-Myristate 13-Acetate  
PCR: Polymerase Chain Reaction

pHrodo, SE: pHrodo, Succinimidyl Ester  
PMN: PoliMorfoNucleati  
PVP: PoliVinilPirrolidone  
SPM: Sperm Preparation Medium  
SSC: Side SCatter light  
TeSE: Testicular Sperm Extraction  
TET: Transtubaric Embryo Transfer  
TBC: Tubercolosi  
TRUS: TransRectal UltraSonography  
UI: Unità Internazionali  
WHO: World Health Organization  
ZIFT: Zigote IntraFallopian Transfer

# **INTRODUZIONE**

## **INFERTILITÀ E STERILITÀ**

La specie umana si distingue biologicamente per una bassa fertilità. Ad ogni ciclo mestruale, infatti, una coppia al massimo della propria capacità riproduttiva ha circa il 30% di possibilità di concepire.

L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) e l'American Fertility Society sottolineano la distinzione tra infertilità e sterilità (<http://www.who.com>, <http://www.ministerodellasalute.it>, <http://www.iss.it>)(Templeton,2000)(WHO,1999). Una coppia è da considerarsi infertile quando non è in grado di concepire e di avere un bambino dopo un anno o più di rapporti sessuali regolari volutamente fecondi; viceversa, è da considerarsi sterile quella coppia nella quale uno o entrambi i coniugi sono affetti da una condizione fisica permanente che rappresenta un ostacolo alla fecondazione, la cui conseguenza è un'assoluta mancanza della capacità riproduttiva. Il termine sterilità si riferisce quindi ad una condizione più grave e comunque assoluta di infertilità riguardante la coppia e non il singolo membro di essa.

Pur essendo la sterilità un problema che esiste in ogni parte del mondo, rilievi epidemiologici che ne quantizzano l'incidenza nei vari paesi non sono univoci. Si ritiene che nella popolazione generale un'infertilità persistente affligga il 7-8% di tutte le coppie. Secondo alcuni dati dell'OMS nei paesi occidentali il tasso di sterilità tra le coppie in età potenzialmente fertile risulta tra il 15% e il 20%; in particolare in Europa la prevalenza è del 15%, in altri termini colpisce una coppia su sette. La percentuale di coppie che si rivolgono ai centri per la Procreazione Medicalmente Assistita (PMA) è del 4-17%. Alla fine del loro periodo riproduttivo il 3-4% di tutte le coppie non riesce ad avere figli.

La situazione in Italia vede circa 240000 nuovi matrimoni all'anno e a distanza di due anni ben 48000 coppie scoprono di avere difficoltà di concepimento. Si calcola che 50000 coppie ogni anno, per problemi di infertilità o di sterilità o, in genere, per difficoltà ad avere figli, si rivolgono ai consulenti medici e circa 20000 si rivolgono ai centri di PMA.

### **Cause di infertilità e sterilità**

A differenza di altre condizioni patologiche in cui è noto l'agente eziologico, l'infertilità è espressione di fattori maschili e/o femminili diversi, spesso asintomatici da un punto di vista clinico. L'infertilità viene distinta in primaria, nel caso la coppia

non abbia mai concepito, e secondaria se in passato vi è stato un periodo di accertata fertilità.

Esistono diversi fattori che predispongono alla difficoltà di ottenere un concepimento.

- *L'età*. Esiste una forte associazione tra la scarsa fertilità e l'aumento dell'età dei due partners. In particolare, oltre ai 35 anni di età della donna la possibilità di concepimento non supera il 20% e cala ulteriormente al 10% oltre i 40. Il declino della fertilità femminile correlato all'età può anche essere dovuto ad un costante calo della riserva di ovociti a livello ovarico. Recenti evidenze mostrano inoltre che anche la fertilità maschile subisce una diminuzione legata all'età. Inoltre difetti genetici a carico degli spermatozoi e degli ovociti, che possono diminuire la funzionalità dei gameti e dello sviluppo embrionario, aumentano con l'età. Il declino nella probabilità di concepimento spontaneo delle coppie si riflette anche nei risultati ottenibili da tecniche di fecondazione assistita.

- *La durata dell'infertilità*. Coppie con una condizione di infertilità di lunga durata hanno una prognosi riproduttiva sfavorevole. Questo criterio seleziona la prognosi riproduttiva della coppia a prescindere dalla diagnosi di sterilità. È importante dunque stabilire da quanto tempo la coppia ha incominciato ad avere rapporti sessuali miranti ad ottenere una gravidanza. In genere, circa l'85% delle coppie concepisce spontaneamente dopo un anno; se il periodo di infertilità è di durata inferiore a 3 anni, la probabilità di concepimento per una coppia è 1,7 volte maggiore rispetto a coppie infertili da periodi superiori. In caso di infertilità da cause inspiegate, di durata superiore ai tre anni, la possibilità di concepimento per ciascun ciclo sono del 3%. In caso di infertilità secondaria, la probabilità di concepimento è comunque superiore rispetto a quella di coppie con infertilità primaria.

- *La frequenza dei rapporti sessuali*. Le probabilità di concepire dipendono dal numero di rapporti sessuali settimanali e dal periodo del ciclo nel quale si verificano. Si è visto che almeno tre rapporti alla settimana, meglio se a giorni alterni, durante il periodo periovulatorio, presentano un'eccellente efficacia per il concepimento; un solo rapporto settimanale riduce le possibilità del 50% (Dunson, 2002; Schmid et al., 2007; Taylor, 2003).

- *Le malattie sessualmente trasmesse*. Nella donna le flogosi cervico-vaginali alterano le condizioni microambientali locali ed hanno talvolta un effetto spermio-tossico diretto; inoltre, per via ascendente, possono essere responsabili di endometriti e di salpingiti con possibile occlusione tubarica. Negli ultimi decenni la maggiore liberalizzazione dei costumi ed una diversa visione della sessualità ha favorito un incremento delle malattie sessualmente trasmesse; accanto alle malattie veneree comunemente conosciute quali la sifilide e la gonorrea, sono emersi nuovi agenti patogeni, fra i quali, per rilevanza clinica, va ricordata la *Chlamydia* (Workowski et al., 2002).

- Lo stile di vita, le abitudini voluttuarie, l'utilizzo di farmaci, il rischio professionale. L'esercizio fisico, la dieta, le variazioni del peso corporeo sono spesso associati ad irregolarità mestruali nella donna e variazioni dei parametri seminali nell'uomo. In particolare nella donna variazioni del BMI (indice di massa corporea) al di sotto di 20 e sopra i 30 possono determinare alterazioni importanti del quadro ormonale e della funzionalità ovarica. Anche il fumo, l'abuso di alcool e caffè determinano una significativa riduzione delle possibilità di concepimento di una coppia (Homan et al., 2007).

- Le scelte sociali, culturali, economiche. In particolare nei Paesi occidentali l'emancipazione della donna ha portato alla ricerca della gravidanza ad un'età materna più avanzata, portando ad un minore *out-come* riproduttivo delle coppie (Taylor, 2003).

Valutare quale sia l'impatto dei diversi fattori di infertilità è molto difficile. Una stima affidabile, benché relativa solo ad una parte della popolazione, proviene dai dati raccolti dal Registro Nazionale sulla PMA. Le cause di infertilità possono essere così distribuite (<http://www.iss.it>):

- Cause femminili: in 35,5% dei casi
- Cause maschili: in 35,5% dei casi
- Sterilità di coppia: in 15% dei casi, dovuta alla contemporanea presenza di cause femminili e maschili
- Sterilità idiopatica o inspiegata: in tal caso un adeguato iter diagnostico non è stato in grado di dimostrare alcun fattore di impedimento alla fecondazione; la sua incidenza si aggira intorno al 13%.
- Altro: nel 1% dei casi.

## **INFERTILITÀ FEMMINILE**

L'infertilità femminile si presenta all'interno della coppia in una percentuale di casi sovrapponibile a quella delle cause maschili. Il fattore femminile è dunque responsabile di circa il 35% dell'infertilità e contribuisce all'infertilità di coppia in altri 13% dei casi.

Le cause di infertilità femminile sono oggi in parte diverse rispetto al passato per numerose ragioni legate allo stile di vita. Il fattore età, ovvero lo slittamento in avanti della decisione di riprodursi, ha reso più difficile la soluzione delle cause di infertilità femminile, anche con le tecniche terapeutiche più avanzate.

### **Cause e fisiopatologia dell'infertilità femminile**

L'infertilità femminile può essere dovuta ad impossibilità ad avere rapporti sessuali, e in tal caso l'origine può essere psicogena o derivante da malformazioni dell'apparato genitale, oppure è dovuta ad impossibilità a concepire. In quest'ultimo

caso l'infertilità può dipendere da cause sia genitali che extragenitali che hanno danneggiato la funzione riproduttiva. Si considera in tal senso il fattore endocrino, tubarico, uterino, endometriale, cervicale, vaginale ed immunologico.

1) DISFUNZIONE ENDOCRINA: almeno il 30-40% delle sterilità femminili sono dovute ad una disfunzione endocrina, la cui espressione più tipica è la mancanza di ovulazione (infertilità anovulatoria), seguita da un'alterata funzione del corpo luteo o da una secrezione ormonale patologica (Physiopathological determinants of human infertility. *Hum Reprod Update*, 2002, 8, 435-447).

2) FATTORE TUBARICO: il 33% circa dei casi di infertilità femminile è dovuto ad alterazioni congenite o acquisite a carico delle tube di Falloppio. Alterazioni a questo livello disturbano la normale funzione di trasporto degli ovociti, degli spermatozoi o degli embrioni lungo le tube. Le alterazioni anatomiche tubariche di natura congenita sono rare. Nella maggioranza dei casi la sterilità tubarica è una conseguenza di fenomeni infiammatori e/o infettivi degli annessi e del peritoneo circostante che portano a delle modificazioni anatomiche a livello tubarico, fino a provocare la chiusura parziale o completa delle tube in un punto qualsiasi del percorso. Anche le interruzioni volontarie di gravidanza o la presenza di dispositivi intra-uterini anticoncezionali possono essere causa di infezioni tubariche.

3) FATTORE UTERINO: il fattore uterino viene riscontrato solo nel 5-10% dei casi di infertilità femminile e può essere di carattere congenito o acquisito. Alterazioni della cavità uterina ostacolano l'annidamento dell'embrione e lo sviluppo del feto, impedendo l'inizio e il proseguimento della gravidanza.

4) FATTORE CERVICALE: rappresenta il 2% delle cause femminili di infertilità. Il difetto risiede a livello del collo dell'utero e spesso si manifesta come un'incapacità a produrre un normale muco cervicale, nelle quantità e caratteristiche idonee. Altre volte invece si possono trovare nella cervice degli anticorpi anti-spermatozoo che sono in grado di immobilizzare gli spermatozoi stessi, anche in presenza di una quantità e di una consistenza normali del muco cervicale. Tale condizione viene spesso definita "incompatibilità di coppia": si tratta di una forma di infertilità immunologica che in realtà è molto rara.

5) FATTORE VAGINALE: una delle cause più frequenti è data dalla presenza di setti trasversali; in una minoranza di casi si può assistere all'agenesia totale o

parziale della vagina.

6) ENDOMETRIOSI: è rappresentata dalla presenza di cellule endometriali in sedi che non siano la superficie interna della cavità uterina. Queste cellule possono essere presenti a livello ovarico, dove formano delle vere e proprie cisti, tubarico o intestinale. I meccanismi con cui questa patologia può interferire sulla capacità procreativa possono essere di tipo:

meccanico: le lesioni comportano un processo infiammatorio con la conseguente formazione di aderenze che possono interferire con l'espulsione dell'ovocita a livello ovarico o con il suo trasporto a livello tubarico

ormonale ed ovulatorio: alcune sostanze chimiche, prodotte dal processo infiammatorio conseguente all'endometriosi, sembrano in grado di interferire con i livelli di alcuni ormoni ed in particolare con il progesterone e con l'ormone luteinizzante. Il deficit di quest'ultimo, che ha un ruolo fondamentale nel fornire l'impulso ovulatorio, sembra correlato con una mancanza di ovulazione

interferenza con la funzionalità spermatica: la presenza di endometriosi comporta la produzione di alcuni mediatori biochimici e l'attivazione di alcune cellule normalmente coinvolte nei processi di tipo infiammatorio quali i macrofagi. Questi elementi avrebbero un ruolo sia nel ridurre la funzionalità degli spermatozoi riducendone la motilità e la capacità di penetrare l'ovocita, che nel determinare la loro completa eliminazione.

7) CAUSE IMMUNOLOGICHE: il fenomeno dell'autoimmunità, che tende ad avere un'incidenza maggiore nel sesso femminile rispetto a quello maschile, sottende a diverse condizioni patologiche e può contribuire all'infertilità e alla poliabortività. L'autoimmunità sembra essere implicata nella fisiopatologia dell'insufficienza ovarica prematura. Il ritrovamento di anticorpi anti-spermatozoo è un evento abbastanza frequente nella valutazione della coppia con problemi di infertilità.

8) CAUSE GENETICHE: Alterazioni cromosomiche (di numero o di struttura) a carico degli autosomi o cromosomi sessuali possono causare dei problemi nella funzione riproduttiva, in quanto spesso interferiscono con la normale formazione di gameti maschili e/o femminili; certe volte ciò non si accompagna con alterazioni evidenti di altre funzioni e/o strutture dell'individuo. Le

alterazioni genetiche possono infatti insorgere proprio durante la formazione dei gameti, cioè nel corso della loro meiosi. I gameti femminili sono maggiormente esposti ad errori rispetto a quelli maschili, errori nella gametogenesi femminile comportano però solo una diminuzione numerica degli ovociti prodotti.

Nella donna esiste la Sindrome di Turner (45, X0), dove invece di due cromosomi sessuali XX, ne è presente uno solo; queste ragazze sono di bassa statura e soffrono di amenorrea primaria, in quanto le loro ovaie sono assenti o piccolissime, pertanto non possono avere figli.

Anche la menopausa precoce è dovuta a difetti a carico del cromosoma X che regola i complicati meccanismi ovarici. In questo caso si assiste ad un esaurimento precoce degli ovociti e spesso la madre, o altre parenti in linea materna, hanno raggiunto la menopausa in età piuttosto giovane.

### **Valutazione dell'infertilità femminile**

La valutazione del fattore femminile d'infertilità prevede:

- ❖ Raccolta anamnestica
- ❖ Esame obiettivo: deve comprendere un accurato esame ginecologico che deve fornire informazioni riguardo le dimensioni dell'utero e la sua mobilità, la presenza di masse pelviche o addominali, la presenza di nodularità a carico del Douglas, la presenza di alterazioni a carico della vagina o cervice o di secrezioni anomale
- ❖ Pap test ed esame senologico
- ❖ Esami ormonali: dosaggio ematico di LH, FSH, estradiolo, progesterone, testosterone, DHEAS, androstenedione il 3° giorno del ciclo; dosaggio ematico di progesterone e di prolattina il 18° e 21° giorno del ciclo; devono essere inoltre esclusi eventuali segni di distiroidismo e di iperandrogenismo
- ❖ Valutazione dello stato ovulatorio che consiste nella:
  - misurazione della temperatura corporea basale
  - test del muco cervicale
  - dosaggio del progesterone plasmatico in fase medio-luteinica
  - monitoraggio ecografico in un ciclo spontaneo per confermare il dato ormonale di ovulatorietà
  - biopsia endometriale
- ❖ Valutazione infettivologica: tamponi uretro-cervico-vaginali completi per individuare e trattare le infezioni che possono ostacolare il concepimento. Gli agenti patogeni più frequenti sono Miceti, Micoplasmi e *Chlamidia T*. Inoltre

sono di facile riscontro l'*E. coli*, *Strept.agalactiae*, *Enterococco f.* ed altri

- ❖ Valutazione genetica: analisi del cariotipo, analisi del gene Fraxa (la sua alterazione ci dà disfunzione ovarica, disordini del ciclo mestruale, menopausa precoce), analisi del gene Kal 1 (la sua alterazione provoca scarsa stimolazione delle ovaie da parte dell'ipotalamo e l'ipofisi, oltre che anosmia), analisi del gene per la fibrosi cistica
- ❖ Valutazione anatomico-funzionale: isterosalpingografia, isteroscopia, laparoscopia.

## **INFERTILITÀ MASCHILE**

Il problema dell'infertilità maschile cominciò a delinearsi a partire dagli anni '70, mentre prima le cause dell'infertilità erano attribuite prevalentemente alla figura femminile.

Il fattore maschile è responsabile di circa il 35% dei casi di infertilità e contribuisce all'infertilità di coppia in altri 15% dei casi. Circa il 6% degli uomini in età riproduttiva presenta questo problema. Nel 90% dei casi ciò è legato ad alterazioni nel processo della spermatogenesi; nella rimanente percentuale si possono invece individuare dei difetti nel trasporto dello sperma e alterazioni a livello delle ghiandole accessorie del tratto genitale maschile (6%), disturbi erettili (2%), disturbi eiaculatori (1%), nonché alterazioni funzionali riguardanti lo sperma e il coito (1%) (Queiroz and Waissmann, 2006). Qualora sia presente il fattore di infertilità maschile, è possibile valutarlo nella quasi totalità dei casi con il riscontro di valori anormali nell'esame del liquido seminale, sebbene talvolta il fattore maschile può giocare un ruolo determinante nell'infertilità di coppia anche in presenza di valori normali dello spermioγραμμα.

In generale:

- ❑ il 15-20% di uomini infertili è azoospermico
- ❑ il 10% di uomini infertili ha una concentrazione di spermatozoi inferiore ad 1 milione/ml
- ❑ nel 40-60% di uomini infertili non è possibile riconoscere una specifica causa di infertilità; la maggior parte di questi soggetti ha una oligospermia idiopatica
- ❑ cause reversibili e correggibili di infertilità, come la deficienza di gonadotropine, ostruzioni e disturbi coitali, sono presenti solo in una piccola frazione di casi, ciononostante è di fondamentale importanza riconoscerli per avviare un adeguato percorso terapeutico
- ❑ il 10-30% di uomini infertili soffre di varicocele

- il 10% di uomini infertili ha alla base dei disordini della spermatogenesi delle alterazioni genetiche; le più frequenti sono la Sindrome di Klinefelter e la microdelezione del cromosoma Y
- la prevalenza di anticorpi anti-spermatozoo (ASA) negli uomini infertili è superiore rispetto alla popolazione di uomini fertili, anche se il meccanismo con il quale gli ASA concorrono all'infertilità maschile non è ancora del tutto chiaro (Bhasin, 2007).

## **Cause e fisiopatologia dell'infertilità maschile**

La sterilità maschile può essere la conseguenza di un'incapacità ad avere rapporti sessuali, legata a malformazioni dell'apparato genitale maschile oppure all'assenza di erezione, alla cui origine possono contribuire fattori vascolari (ateriosclerosi, diabete), neurologici (traumi della colonna vertebrale, interessamento dei nervi implicati nei meccanismi dell'erezione) o psicologici. Problemi di infertilità nell'uomo possono anche essere dovuti ad impossibilità nel concepimento: in questo caso sono identificabili cause secretorie e cause escretorie.

- 1) ALTERAZIONE SECRETORIA: le vie escretrici sono normali, ma il testicolo non è funzionante. L'infertilità secretoria si caratterizza, in generale, per un'alterazione qualitativa e/o quantitativa dei parametri del liquido seminale. L'alterazione secretoria, a sua volta si divide in:

- a) alterazioni primitive o genetiche:

*anomalie cromosomiche*: 1 uomo su 20 pazienti infertili è portatore di anomalie cromosomiche che nell'80% dei casi coinvolgono i cromosomi sessuali e nel 20% gli autosomi. Il più frequente disordine cromosomico associato all'infertilità è la Sindrome di Klinefelter (cariotipo 47,XXY)

*microdelezioni del cromosoma Y*: a livello del cromosoma Y sono localizzati dei geni che regolano il processo della spermatogenesi; la causa più frequente di azoospermia o severa oligospermia non ostruttiva sono le microdelezioni del cromosoma Y, ragione per cui tutti gli uomini infertili che si presentano con un quadro del genere devono effettuare lo screening genetico attraverso la PCR per la ricerca di queste ultime; la maggior parte di microdelezioni insorge "de novo", anche se sono stati documentati dei casi di trasmissione da padre a figlio attraverso l'ICSI

*altre sindromi genetiche associate all'infertilità maschile*: fibrosi cistica

(il 75% dei maschi con agenesia congenita dei vasi deferenti presenta il gene CFTR mutato, anche in assenza di sintomi polmonari), emocromatosi, anemia falciforme, talassemia major, distrofia miotonica, mutazione del gene AR (Androgen Receptor)

b) alterazioni secondarie, dovute a cause:

*disendocrine* (ipotalamo-ipofisarie, tiroidee, surrenaliche, pancreatiche)

*infiammatorie e infettive* (la parotite in età post-puberale può complicarsi con l'orchite bilaterale, il cui risultato è un'atrofia testicolare irreversibile con azoospermia)

*immunitarie* (presenza di anticorpi anti-spermatozoo nel liquido seminale) (Mazumdar and Levine, 1998)

*vascolari* (varicocele, definito come un'abnorme dilatazione delle strutture venose del plesso pampiniforme, può andare ad interferire con la produzione degli spermatozoi perché innalza la temperatura del testicolo)

*da ectopia* (criptorchidismo, definito come mancata discesa nel sacco scrotale dei testicoli intra-addominali)

*altre cause* (stress, fumo, alcol, calore, radiazioni ionizzanti e microonde, sostanze tossiche esogene, farmaci, droghe) (Tomao et al., 2006).

Le cause sia primitive sia secondarie di sterilità secretoria da un punto di vista funzionale possono essere a loro volta classificate in:

❖ *insufficienze gonadiche periferiche o ipogonadismo ipergonadotropo o primitivo* (alti livelli di FSH), nelle quali rientrano:

la Sindrome di Klinefelter

il criptorchidismo

il varicocele

le alterazioni della composizione del plasma seminale, dovute ad alterazioni delle ghiandole accessorie e dei dotti di deflusso o a modificazioni nei componenti del liquido seminale, quali il fruttosio

le orchiti, le sequele post-traumatiche, i disturbi iatrogeni o secondari ad irradiazione o intossicazione da farmaci o stupefacenti

❖ *insufficienze gonadotrope o ipogonadismo ipogonadotropo o secondario* (bassi livelli di FSH) in caso di patologie ipotalamo- ipofisarie.

2) ALTERAZIONE ESCRETORIA: si ha una normale funzionalità testicolare e produzione di liquido seminale, ma con vescicole seminali e dotti eiaculatori assenti od occlusi. Si ha in tal caso una mancata fuoriuscita di spermatozoi con l'eiaculazione, per un'ostruzione localizzata a qualunque livello delle vie escrettrici e la cui causa può essere di:

a) *natura congenita*: l'assenza congenita bilaterale dei dotti deferenti, associata o meno a quella delle vescichette seminali, rappresenta la causa del 1-2% delle infertilità maschili e il 20-25% delle azoospermie ostruttive. Si riscontra nel 98% dei pazienti con fibrosi cistica; altre anomalie di natura congenita sono anomalie dei canali eiaculatori, difetti tra testa e corpo dell'epididimo, la distrofia multicistica dell'epididimo, l'ipo- ed epispadia, la fimosi

b) *natura acquisita*: in tal caso un ruolo importante è dato da malattie di natura infiammatoria e traumatica, da malattie infettive (parotite epidemica; TBC che può colpire le vie spermatiche, il dotto deferente e l'epididimo causando un'ostruzione non correggibile chirurgicamente), da malattie veneree (MTS, Gonorrea, Mycoplasma, *Chlamydia*), da malattie metaboliche (diabete, distrofia muscolare), da interventi chirurgici (riparazione di ernie, chirurgia del criptorchidismo, vasectomia, chirurgia retroperitoneale).

Di seguito sono riportate le percentuali d'incidenza delle varie patologie nell'infertilità maschile in varie casistiche della letteratura (Tabella 1):

Patologia associata	(Dubin and Amelar, 1971) (%, su 1294 pz)	(van Zyl et al., 1975) (%, su 596 pz)	WHO, 1966 (%, su 7057 pz)	(Behre HM et al., 1994) (%, su 7802 pz)
Infezioni	-	26	6,6	9,0
Varicocele	39	24	12,3	16,6
Anom. cromosom.	3	12	2,1	-
Criptorchidismo	4	3	-	8,5
Endocrinopatie	9	2	0,6	8,9
Ostruzioni	7	3	-	1,5
Idiopatica	38	30	48,5	31,7
Sessuale	-	-	1,7	5,7
Neoplasia testicolo	-	-	-	2,3
Malattie sistemiche	-	-	-	5,0

**Tabella 1. Eziopatogenesi dell'infertilità maschile.**

Le cause che possono portare all'infertilità maschile hanno tuttavia una diversa distribuzione secondo le fasce d'età (Tabella 2):

10 anni	Criptorchidismo, chir. erniaria infantile, malattie genetiche, malformazioni
20 anni	Traumi, torsioni, orchite, steroidi anabolizzanti
30 anni	Infez. genitali, danni da varicocele, orchiepidemiti, MTS
40 anni	Patologie prostatiche, abuso alcool e fumo, farmaci spermotossici, cause professionali

**Tabella 2. Espressività variabile delle cause di infertilità maschile in relazione all'età.**

### **Valutazione dell'infertilità maschile**

L'infertilità maschile può essere dovuta a condizioni diverse, alcune delle quali sono identificabili e potenzialmente reversibili, come l'ostruzione dei dotti deferenti e l'ipogonadismo ipogonadotropo. In altri casi si ha a che fare con condizioni irreversibili, come l'atrofia testicolare bilaterale secondaria ed orchiti di origine virale. Qualora invece non si riesca ad identificare la causa dell'anormalità dell'esame del liquido seminale, come succede in molti pazienti, si parla di infertilità idiopatica.

La valutazione iniziale della coppia con problemi d'infertilità maschile consiste in:

- un'attenta raccolta anamnestica che possa indagare sullo sviluppo e storia sessuale del soggetto, frequenza dei rapporti sessuali, durata dell'infertilità o ipofertilità e precedenti pratiche contraccettive, nonché l'esposizione a assunzione di farmaci o altre sostanze, nonché l'esposizione a fattori potenzialmente tossici, incluso il calore; al momento della consulenza si deve quindi indagare soprattutto sull'esistenza di fattori di rischio per l'infertilità maschile, quali:
  - criptorchidismo pregresso
  - varicocele
  - possibili danni iatrogeni (ernioplastiche, chemioterapie)
  - traumi scrotali
  - pregresse infezioni del tratto uro-genitale
- un esame obiettivo generale con particolare attenzione all'esame obiettivo andrologico ai fini della valutazione del pene e del meato uretrale, dei didimi e degli epididimi, dei vasi deferenti, della presenza di varicocele, valutazione della prostata tramite esplorazione rettale e valutazione dei caratteri sessuali secondari

- un esame del liquido seminale.

E' possibile poi effettuare delle indagini più specialistiche nell'inquadramento dell'infertilità maschile:

- Test post-coitale: è l'unica indagine che consente di studiare *in vivo* le interazioni degli spermatozoi con le secrezioni vaginali e di valutare un'eventuale aggressività del muco cervicale nei confronti degli spermatozoi. Esso consiste nella valutazione quantitativa e qualitativa degli spermatozoi presenti nel muco cervicale periovulatorio a circa 8 ore dal rapporto sessuale. Il prelievo va eseguito a livello vaginale nel fornice posteriore, nell'eso- e nell'endocervice. Ci sono tuttavia molte controversie nei confronti di questa tecnica, in quanto esistono considerevoli variazioni nell'interpretazione del test
- Screening genetico: le alterazioni genetiche sono presenti in circa 15% degli uomini e 10% delle donne infertili e queste includono sia alterazioni cromosomiche sia mutazioni di singoli geni. La ricerca genetica in questo campo ha subito un notevole sviluppo negli ultimi anni ed ha seguito i progressi delle tecniche di fecondazione *in vitro* che rendono possibile la trasmissione di alterazioni genetiche dai genitori ai figli. I dubbi maggiori circa un possibile aumento di malattie genetiche nei figli sono stati suscitati dall'utilizzo dell'iniezione intracitoplasmatica di un singolo spermatozoo (ICSI), poiché essa oltrepassa i normali meccanismi fisiologici della fertilizzazione. Tuttavia il rischio di trasmissione riguarda anche la fertilizzazione in vitro (FIVET) classica e l'inseminazione intrauterina (IUI). L'identificazione dei fattori genetici in una coppia infertile è pertanto obbligatoria sia per una diagnosi ed un trattamento adeguati, sia ai fini prognostici.

Le più frequenti cause genetiche di infertilità maschile sono:

- a) mutazione del gene per la fibrosi cistica che si associa all'assenza congenita dei vasi deferenti
- b) alterazioni cromosomiche che si associano ad un'alterata funzione testicolare
- c) microdelezioni del cromosoma Y che determinano alterazioni nella maturazione degli spermatozoi, riducendone o azzerandone il numero.

L'azoospermia e/o una severa oligospermia sono spesso associate ad alterazioni genetiche. I pazienti affetti da azoospermia non ostruttiva e/o severa oligospermia potrebbero essere portatori di alterazioni cromosomiche o microdelezioni del cromosoma Y, coloro che sono affetti da azoospermia secondaria da agenesia bilaterale dei dotti deferenti potrebbero presentare mutazioni a carico del gene per la fibrosi

cistica (CFTR). Da questa breve trattazione si può dunque evincere che i test genetici per l'infertilità maschile comprendono:

*Analisi del cariotipo:* valuta le alterazioni di numero e struttura dei cromosomi. La frequenza di anomalie del cariotipo è inversamente proporzionale alla conta degli spermatozoi, con una prevalenza del 10–15% nei soggetti azoospermici, circa del 5% negli oligospermici e meno dell'1% nei normospermici. Il 75% di anomalie cromosomiche che si osserva negli uomini infertili è rappresentato dall'aneuploidia dei cromosomi sessuali (Sindrome di Klinefelter)

*Analisi delle microdelezioni del cromosoma Y:* il test è consigliato ai soggetti azoospermici o oligospermici (meno di 10 milioni per ml). È possibile riscontrare microdelezioni del cromosoma Y nel 10–15% di uomini affetti da azoospermia e/o severa oligospermia

*Analisi del gene della fibrosi cistica (CFTR):* il test è consigliato ai soggetti azoospermici e/o oligospermici (meno di 10 milioni per ml). Tutti i soggetti maschi con un quadro clinico di fibrosi cistica sono affetti da agenesia bilaterale dei dotti deferenti, viceversa i soggetti con assenza dei dotti presentano solo nel 60% dei casi una mutazione documentata del gene CFTR

*Analisi del gene Kal:* questo gene regola gli ormoni che stimolano il testicolo (LH e FSH). Alterazioni di questo gene provocano un ridotto sviluppo dei testicoli

*Analisi del gene per il recettore degli androgeni (AR):* il difetto di questo gene consiste in una ridotta sensibilità agli androgeni, con una conseguente infertilità e attenuazione dei caratteri sessuali maschili secondari, fino ad una completa femminilizzazione (testosterone alto e LH alto).

- Valutazione ormonale: i disordini ormonali, soprattutto alterazioni nell'asse ipotalamo-ipofisi-testicoli, sono estremamente rari nel soggetto che presenta dei valori normali dello spermioγραμμα. Se vi sono alterazioni nell'esame del liquido seminale, disfunzione erettile o altri indizi clinici che suggeriscono l'esistenza di specifiche endocrinopatie, risulta necessario eseguire una valutazione dell'assetto ormonale. Tale analisi consiste nella misurazione dell'ormone follicolo-stimolante (FSH) e del testosterone sierico; livelli elevati di FSH sono indice di danno testicolare. Se si riscontrano bassi livelli di testosterone è consigliabile ripetere l'esame effettuando la misurazione del testosterone libero e totale, dell'ormone luteinizzante (LH) e della prolattina. Molti pazienti con anomalie della

spermatogenesi presentano valori normali di FSH sierico, tuttavia un aumento del FSH è caratteristico di un'alterazione nel processo di spermatogenesi

- Analisi delle urine post-eiaculatorie: l'eiaculazione retrograda si presenta con un basso o assente volume dell'eiaculato e può essere dovuta all'ostruzione dei dotti eiaculatori, all'ipogonadismo o all'agenesia bilaterale dei dotti deferenti. Per la diagnosi di una possibile eiaculazione retrograda è consigliata l'esecuzione dell'esame delle urine nella fase post-eiaculatoria per tutti coloro che hanno un volume dell'eiaculato inferiore a 1,0 ml; fanno eccezione solamente i pazienti con diagnosi di ipogonadismo o agenesia bilaterale dei dotti deferenti. Il riscontro di spermatozoi nell'urina post-eiaculatoria in pazienti azoospermici o aspermici è diagnostico per la eiaculazione retrograda
- Ultrasonografia transrettale (TRUS): il riscontro di una dilatazione delle vescichette seminali e dei dotti eiaculatori e/o di strutture cistiche a livello della linea mediana prostatica può suggerire la presenza di un'ostruzione completa o parziale dei dotti eiaculatori. L'ultrasonografia transrettale è indicata nei pazienti azoospermici che presentano un basso volume dell'eiaculato, nei quali è possibile palpare i vasi deferenti. Quest'esame consente di identificare un'eventuale ostruzione dei dotti eiaculatori. Certi specialisti consigliano l'esecuzione della TRUS anche in pazienti oligospermici che presentano basso volume eiaculatorio, palpabilità dei vasi e volume testicolare normale per determinare se è presente, o meno, un'ostruzione dei dotti eiaculatori
- Ultrasonografia scrotale e flussimetria Doppler: un attento esame obiettivo, soprattutto la palpazione, consente di individuare la maggior parte delle patologie presenti a livello scrotale, come il varicocele, lo spermatocele, l'assenza dei vasi, masse testicolari ed epididimali. L'ultrasonografia scrotale permette di valutare il volume e la morfologia testicolare, nonché di identificare, grazie all'applicazione della flussimetria Doppler, varicoceli ancora non palpabili, anche se quest'ultimi risultano essere clinicamente non significativi, di stabilire la natura di eventuali masse testicolari, di stabilire la presenza di idrocele. L'ultrasonografia scrotale può essere anche indicata in quei pazienti, nei quali l'esame obiettivo è difficoltoso o inadeguato oppure in caso di presenza di masse testicolari sospette
- Esami diagnostici invasivi:
  - biopsia testicolare: consiste nel prelevare un pezzo di parenchima testicolare per l'esame istologico
  - deferentovescicolografia: è una diagnostica radiografica che valuta la morfologia e la pervietà delle vie escretrici seminali, cioè ci visualizza il deferente, le ampolle e le vescichette seminali ed i dotti eiaculatori.

## ESAME DEL LIQUIDO SEMINALE

L'esame del liquido seminale o "spermiogramma" rappresenta la più rilevante indagine dello studio andrologico, che consente di stabilire se il partner maschile di una coppia debba essere effettivamente considerato infertile e, quindi, se il livello di infertilità è tale da richiedere una procedura di fecondazione assistita ed infine verso quale tecnica di fecondazione assistita è opportuno procedere.

Tra le cause della sterilità maschile un ruolo di grande importanza è rivestito dalle alterazioni del numero degli spermatozoi, della loro motilità e della loro morfologia. È comunque da tener presente l'alta variabilità dei risultati, per cui in presenza di un esame anomalo esso deve essere ripetuto a distanza di tempo (a distanza di uno o due mesi anche se il primo esame ha dato esito negativo). Vi sono infatti fattori che possono alterare la qualità del liquido seminale, come l'assunzione di antibiotici, periodi di febbre alta precedente l'esame, il trasporto improprio del seme in laboratorio.

L'OMS ha pubblicato un dettagliato protocollo di laboratorio, aggiornato nel 1999, definendo i criteri standardizzati di valutazione del liquido seminale. Questi criteri si basano sullo studio di una popolazione di uomini fertili e sono da considerarsi come valori di riferimento più che come valori di normalità. Utilizzando questi criteri si ha una sensibilità del 89,6% (WHO, 1999).

Per il buon esito dei risultati sono necessari alcuni accorgimenti, ovvero un periodo di astinenza da rapporti sessuali non inferiore a tre giorni e non superiore a cinque giorni, raccolta mediante masturbazione in un contenitore di plastica sterile, possibilmente nella sede del laboratorio, oppure, laddove ciò non sia possibile, il campione deve essere consegnato in laboratorio entro 20 minuti dalla raccolta a temperatura costante di 25-35°C (Gardner, 2004).

Il liquido seminale va valutato da un punto di vista macroscopico e microscopico.

### Valutazione macroscopica

L'analisi macroscopica prende in considerazione le caratteristiche chimico-fisiche e reologiche del liquido seminale (Tabella 3), in particolare si valutano i seguenti parametri:

- ❑ *volume dell'eiaculato*: il volume dell'eiaculato (in condizioni normali da 2 a 5 ml) è un *marker* della funzionalità delle vescichette seminali, in quanto queste producono dal 50 all'80% della componente liquida dello sperma. La prostata contribuisce per il 15-30% e il rimanente è fornito dalle ghiandole uretrali accessorie e dal deferente
- ❑ *pH*: il liquido seminale ha normalmente un pH alcalino, che oscilla tra 7,5 e

7,8, ed è la risultante tra la secrezione basica delle vescichette seminali e la secrezione acida della prostata. Un pH inferiore a 7 è espressione di disfunzione delle vescichette seminali, un pH superiore a 7,8, in presenza di leucociti, indica la presenza di un'infezione

- *aspetto*: il colore del liquido seminale è normalmente grigio opalescente. In un referto di uno spermioγραμμα sarà possibile leggere però anche altre diciture come lattescente, pioide, bruno (ematico). Un aspetto lattescente, specialmente se accompagnato da un ridotto volume ed un pH acido, può riflettere un danno a carico delle vescichette seminali, mentre l'aspetto giallognolo pioide è indice di una contaminazione urinaria, della presenza di granulociti, di una netta prevalenza della componente delle vescichette seminali oppure raramente dalla presenza di bilirubina
- *liquefazione*: appena emesso, lo sperma coagula per poi liquefarsi. La liquefazione si completa nel giro di 30' a temperatura corporea (37 °C). La coagulazione avviene per opera di enzimi prostatici che agiscono sul fibrinogeno prodotto dalle vescichette seminali, andando a creare una fitta maglia molto impaccata. Una mancata coagulazione dello sperma, oltre che uno scarso volume, indica una disfunzione delle vescichette, o una loro agenesia. Gli enzimi che determinano la liquefazione sono secreti dalla prostata
- *viscosità*: tale caratteristica non va confusa con la fluidificazione. Mentre la fluidificazione è un processo dinamico transitorio di dissolvimento di un coagulo, la viscosità è una caratteristica permanente di un determinato liquido seminale. L'eccessiva viscosità impedisce il normale movimento degli spermatozoi.

Volume	2-6 ml
PH	7.2-7.8
Aspetto	grigio opalescente
Liquefazione	Fisiologica o completa o normale dopo 30' a RT
Viscosità	Fisiologica o nei limiti o normale

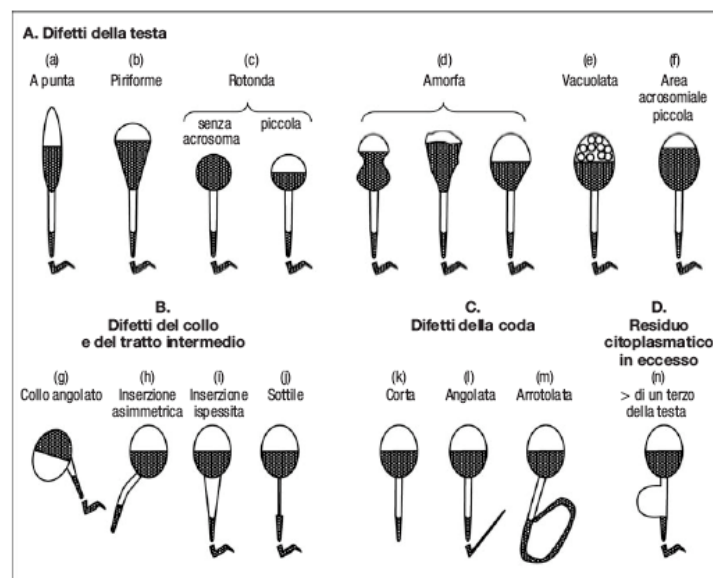
**Tabella 3. Valori di riferimento nell'esame macroscopico del liquido seminale (WHO, 1999).**

### **Valutazione microscopica**

L'analisi microscopica fornisce invece i seguenti parametri (i valori di riferimento sono schematizzati in Tabella 5):

- *Concentrazione degli spermatozoi*: deve essere superiore ai 20 milioni di spermatozoi per ml di liquido seminale

- **Motilità:** tale parametro viene valutato sia da un punto di vista qualitativo, sia da un punto di vista quantitativo, distinguendo i movimenti rettilinei rapidi e progressivi (motilità a) dai movimenti rettilinei lenti e progressivi (motilità b), dai movimenti discinetici (motilità c) per arrivare agli spermatozoi immobili (motilità d). La motilità dipende fisiologicamente dalla durata dell'astinenza (diminuisce dopo il quinto giorno) e può essere influenzata dalla temperatura di conservazione del campione, dall'incompleta liquefazione o dall'aumento della viscosità
- **Morfologia:** gli spermatozoi possono presentare anomalie della testa, del tratto intermedio, della coda e possono presentare anche residui citoplasmatici (Figura 4). In un seme normale devono esserci almeno il 30% di spermatozoi morfologicamente normali



**Figura 4. Rappresentazioni schematiche di alcune forme atipiche di spermatozoi umani.**

- **Vitalità:** si valuta con il test dell'eosina, la presenza di un'ampia percentuale di spermatozoi vitali ma immobili può essere indicativa di alterazioni strutturali del flagello
- **Altre cellule:** l'eiaculato contiene normalmente elementi cellulari diversi dagli spermatozoi, comunemente definiti *round cells* (cellule rotonde). Queste includono le cellule epiteliali del tratto genito-urinario, le cellule dell'epitelio prostatico, le cellule germinali immature ed i leucociti. Come criterio generale un eiaculato non deve contenere un numero di cellule rotonde superiore a  $5 \times 10^6/\text{ml}$

a) *Cellule germinali immature:* esse comprendono spermatidi rotondi, spermatociti e spermatogoni. I differenti tipi di

cellule germinali immature presenti nello sperma sono generalmente indicativi di disordini della spermatogenesi

- b) *Leucociti*: soprattutto neutrofili sono presenti nella maggior parte degli eiaculati umani, il riscontro di un numero elevato di leucociti (leucocitospermia) è stato associato ad alterazioni della funzionalità e della motilità degli spermatozoi, ma può essere anche indice di infezioni o infiammazioni del tratto genitale. Il numero di leucociti non deve essere superiore a  $1 \times 10^6$ /ml e viene valutato mediante il test della perossidasi
- *Zone di spermioagglutinazione*: per agglutinazione degli spermatozoi si intende che gli spermatozoi motili aderiscono l'uno all'altro testa a testa, coda a coda, o in modo misto, testa a coda. L'aderenza tra loro di spermatozoi immobili, e quella degli spermatozoi motili a filamenti di muco e ad altri tipi di cellule o a detriti devono essere considerate come fenomeni di aggregazione non specifica piuttosto che agglutinazione, e pertanto come tali dovrebbero essere registrate. La presenza di agglutinazione suggerisce, ma non è segno determinante, una infertilità di natura immunologica
  - *Ricerca di anticorpi anti-spermatozoo (ASA)*: la presenza di ASA nel liquido seminale sembra essere correlata con un ridotto tasso di gravidanze. Gli ASA si riscontrano anche nel siero, oltre che adesi sulla superficie dello spermatozoo e/o nel plasma seminale. Il ruolo di questi anticorpi, che appartengono quasi esclusivamente alle classi IgG e IgA, nell'infertilità è complesso, in quanto sembra che interferiscano con la motilità degli spermatozoi, con la penetrazione di questi ultimi nel muco cervicale, con la reazione acrosomiale e l'interazione con la zona pellucida dell'ovocita. I test più frequentemente usati per la determinazione di ASA sono l'ImmunoBead Test (IBT) e il Mixed Antiglobulin Reaction Test (MAR Test).

N ° spermatozoi/ml	≥ 20 milioni/ml
N° spermatozoi/eiaculato	≥ 40 milioni
Motilità totale progressiva (a+b)	≥ 50%
Motilità rapidamente progressiva (a)	≥ 25%
Morfologia normale	≥ 30%
Test vitalità	≥ 50%
Elementi cellulari diversi dagli spermatozoi:	≤ 5 milioni/ml
Leucociti	≤ 1 milione/ml
Elementi linea germinativa	Rari
Cellule epiteliali di sfaldamento	Rare
Emazie	Assenti
Zone di spermioagglutinazione	Rare
Corpuscoli prostatici	Rari

**Tabella 5. Valori di riferimento nell'esame microscopico del liquido seminale (WHO, 1999).**

A seguito dell'esecuzione di almeno due esami seminali è possibile distinguere delle alterazioni patologiche che riguardano:

- ❖ alterazioni del volume del liquido seminale:
  - ipoposia* (volume inferiore a 0,5 ml) può essere espressione di una patologia ostruttiva dei dotti eiaculatori, di deficit secretivo delle vescicole seminali o di ridotta secrezione testosteronica primitiva o secondaria
  - iperposia* (volume superiore a 6 ml) può riflettere un'alterazione flogistico-irritativa delle vescicole seminali e della prostata
  - aspermia* (assenza di eiaculato)
- ❖ alterazioni del tempo di liquefazione: l'assenza di liquefazione potrebbe essere indice di agenesia dei vasi deferenti o di processi infiammatori delle vescicole seminali e della prostata)
- ❖ alterazioni del pH seminale: un aumento dell'alcalinità potrebbe essere espressione di patologie flogistiche, mentre un pH seminale più acido potrebbe essere indice di patologie ostruttive
- ❖ alterazioni della concentrazione degli spermatozoi:
  - oligozoospermia*: concentrazione di spermatozoi inferiore a 20 milioni per ml, viene divisa ulteriormente in:
    - lieve (inferiore a 20 milioni/ml, ma superiore a 10)
    - moderata (inferiore a 10 milioni/ml, ma superiore a 5)
    - severa (inferiore a 5 milioni/ml)
  - criptozoospermia*: concentrazione inferiore a 1 milione/ml
  - azoospermia*: assenza di spermatozoi nell'eiaculato, la diagnosi deve essere posta solo dopo un'accurata analisi del sedimento post-centrifugazione a 300 rpm per 15 minuti;
- ❖ alterazioni della motilità:
  - astenozoospermia*: motilità a + b < 50%
    - lieve: compresa tra 30% e 50%
    - moderata: compresa tra 20% e 30%
    - severa: inferiore al 20%
- ❖ alterazioni della morfologia:
  - teratozoospermia*: spermatozoi morfologicamente normali inferiori al 30%.

## LA LEUCOCITOSPERMIA

La presenza dei leucociti è stata evidenziata lungo l'intero tratto riproduttivo maschile e nel liquido seminale (el-Demiry et al., 1987), dove in condizioni fisiologiche rappresentano circa il 5% delle cosiddette *round cells* (Eggert-Kruse et al., 1992). I tre sottotipi di leucociti sono presenti in quantità differenti nell'eiaculato, in particolare i granulociti polimorfonucleati (PMN) rappresentano il 50-60% dell'intero numero di leucociti, i macrofagi il 20-30% e i linfociti T il 5% (Smith et al., 1989; Wolff, 1995). Secondo l'OMS, se la concentrazione di leucociti nel liquido seminale, valutata mediante il test della perossidasi, supera il valore di  $1 \times 10^6$ /ml si è in presenza di una condizione patologica definita "leucocitospermia". Questa condizione colpisce circa il 20% dei maschi infertili, tuttavia in letteratura è ancora controverso e dibattuto il significato clinico di tale condizione nella patogenesi dell'infertilità maschile (Alvarez et al., 2002; Saleh et al., 2002; Sharma et al., 2001).

La leucocitospermia è un frequente reperto seminale, che spesso non si associa ad un quadro di infezioni genito-urinarie microbiologicamente dimostrabili; in questi casi è stato ipotizzato che i leucociti originano dall'epididimo e sembra abbiano effetti favorevoli sulla qualità del liquido seminale, giocando un ruolo importante nella immunosorveglianza e nella fagocitosi degli spermatozoi morfologicamente anomali (Kaleli et al., 2000; Kiessling et al., 1995; Tomlinson et al., 1992) o apoptotici (Ricci et al., 2002). Una produzione eccessiva degli stessi sembra derivare, invece, dalla prostata e riflette la presenza di un'infezione prostatica (Ziyyat et al., 2008)

Mentre alcuni autori non hanno riscontrato alcun effetto dannoso della leucocitospermia sugli spermatozoi (Curi et al., 2003; el-Demiry et al., 1986; Rodin et al., 2003; Tomlinson et al., 1993), altri invece evidenziano conseguenze negative su alcuni parametri del liquido seminale e sull'*outcome* delle tecniche di procreazione medicalmente assistita. Uno dei meccanismi attraverso cui alte concentrazioni di leucociti possono alterare la funzionalità degli spermatozoi è correlato al danno indotto dai radicali liberi dell'ossigeno (ROS) prodotti dai leucociti attivati durante o dopo l'eiaculazione (Aitken et al., 2004). Il danno ossidativo può andare perciò a peggiorare la qualità degli spermatozoi, alterandone alcune caratteristiche come la morfologia, la motilità e la concentrazione e provocando dunque problemi di funzionalità degli spermatozoi che si riflettono sulla fertilità dell'individuo (Zorn et al., 2003; Agarwal et al., 2002)(Kaleli et al., 2000). Sono stati condotti anche alcuni *trial* di trattamento della leucocitospermia mediante antibiotici assumendo che la causa della patologia fosse di tipo infettivo, ma tale terapia non ha portato ad una risoluzione della leucocitospermia e dei suoi effetti su parametri del liquido seminale (Erel et al., 1997; Vicari, 2000). In un altro studio un farmaco *antihistamine-like*, il ketotifen, ha invece migliorato la motilità e la morfologia degli spermatozoi in pazienti infertili leucocitospermici (Oliva and Multigner, 2006).

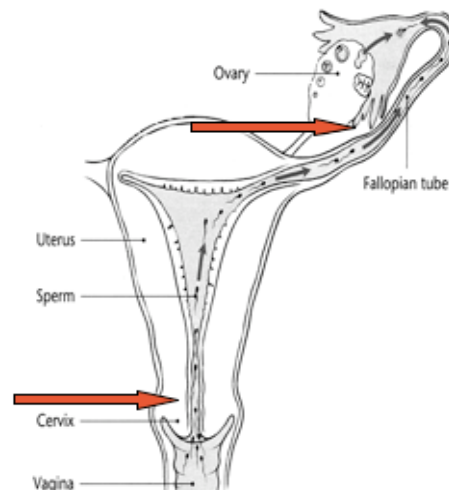
Secondo altri autori, la leucocitospermia influisce negativamente sugli esiti delle tecniche di fecondazione assistita ed in particolare viene messa in luce una riduzione dei tassi di fertilizzazione degli ovociti, del successivo sviluppo degli embrioni ed una riduzione dei tassi di gravidanza (Arata de Bellabarba et al., 2000; Aziz et al., 2004; De Geyter et al., 1994; Sukcharoen et al., 1995; Vicino et al., 1999; Wolff et al., 1990; Yilmaz et al., 2005; Zorn et al., 2003).

Questi dati assieme alla constatazione che vi è una maggior prevalenza di leucociti nei liquidi seminali di pazienti infertili rispetto a quella di soggetti fertili, confermano il fatto che la valutazione della leucocitospermia è un'indagine significativa nell'analisi dell'infertilità maschile.

La conta dei leucociti seminali viene eseguita in laboratorio mediante il test della perossidasi, che rappresenta il metodo standard definito dalla OMS (1999); tuttavia tramite tale tecnica si quantificano solamente i PMN e la conta risulta inappropriata in presenza di basse concentrazioni di leucociti. La citofluorimetria invece, mediante l'utilizzo di anticorpi monoclonali, permette di quantificare e tipizzare i leucociti in modo rapido ed inoltre risulta molto sensibile a basse concentrazioni di leucociti (Ricci et al., 2000).

## LA RISPOSTA IMMUNITARIA NEI CONFRONTI DEGLI SPERMATOZOI: LA FAGOCITOSI

Dopo l'eiaculazione, il liquido seminale e gli spermatozoi in esso contenuti, vanno incontro, nel tratto genitale femminile, ad una serie di modificazioni che permettono agli spermatozoi stessi di acquisire la capacità di raggiungere e fecondare l'ovocita. Tale processo è stato descritto nei mammiferi più di 50 anni fa e viene definito capacitazione. Esso è caratterizzato da un complesso di cambiamenti funzionali e strutturali che iniziano dopo la rimozione del plasma seminale contenente fattori stabilizzanti per gli spermatozoi, continuano durante il transito degli spermatozoi lungo il tratto genitale femminile e vengono considerati completi quando gli spermatozoi acquisiscono la capacità di interagire con il complesso cumulo ooforo-ovocita (COC)(Figura 6)(De Jonge, 2005).



**Figura 6. Rappresentazione grafica del transito degli spermatozoi nel tratto genitale femminile, dalla deposizione del liquido seminale in vagina all'interazione con il COC nella tuba di Falloppio.**

La capacitazione degli spermatozoi comprende la rimozione del plasma seminale, che contiene sostanze che inibiscono tale processo (prostaglandine) e l'eliminazione del colesterolo dalla membrana plasmatica con il conseguente aumento della sua fluidità. A ciò segue l'esposizione sulla membrana degli spermatozoi di recettori in grado di legarsi alle cellule del cumulo dell'ovocita e determinare la reazione acrosomiale (De Jonge, 2005)(Figura 7). Una volta avvenuto il legame spermatozoo-ovocita, lo spermatozoo può penetrare all'interno della cellula uovo e fecondarla.

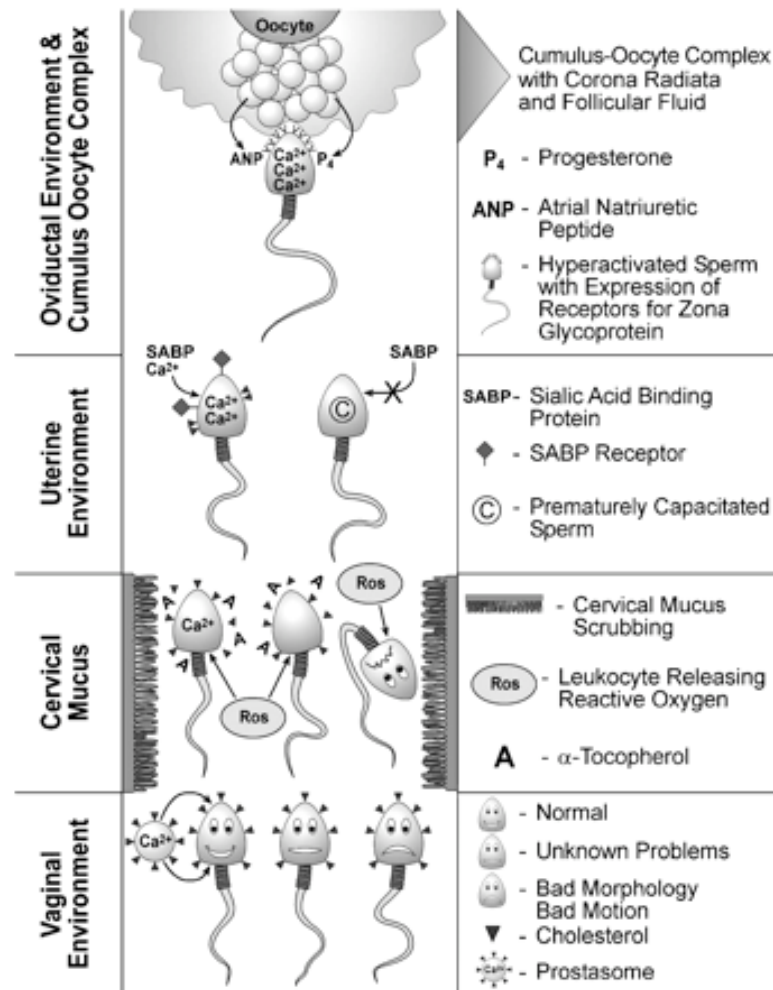


Figura 7. Schema riassuntivo del processo di capacitazione *in vivo* degli spermatozoi (De Jonge, 2005).

Lo stato di capacitazione degli spermatozoi può essere indotto *in vitro* incubando gli spermatozoi in un terreno specifico contenente albumina, che risulta necessaria per l'avviarsi di tale processo. Tale stato risulta però transiente e dura *in vitro* dai 50 minuti alle 4 ore; durante tale periodo le cellule hanno la capacità di rispondere a fattori chemotattici provenienti dai follicoli ovarici (il più importante è il progesterone)(Cohen-Dayag et al., 1995; Oren-Benaroya et al., 2007). Presumibilmente, gli spermatozoi capacitati che non si sono legati ai COC, non vanno incontro a reazione acrosomiale e diventano irreversibilmente non funzionali, e come tali devono essere rimossi in modo "silente e pulito", quindi senza innescare una risposta infiammatoria (Eisenbach, 2003).

In genere, in seguito all'inseminazione, non appena gli spermatozoi si trovano nell'apparato genitale femminile, più precisamente nella vagina e nella cervice uterina, una gran parte di essi viene attaccata e fagocitata dai leucociti residenti (soprattutto macrofagi e neutrofili) e in misura minore anche da parte delle cellule epiteliali vaginali. Per questo fenomeno non esiste ad oggi una spiegazione univoca e non è

chiaro se faccia parte del normale processo di fertilizzazione o se invece possa, in alcuni casi, interferire con esso (Eisenbach, 2003). Una delle possibili spiegazioni può trovare ragione nel fatto che la fagocitosi all'interno dell'apparato genitale femminile serva a rimuovere gli spermatozoi non funzionali e quindi non utili ai fini della fertilizzazione; in particolare in letteratura vengono indicati come spermatozoi post-capacitati quelli più suscettibili ad essere fagocitati. E' stato infatti dimostrato mediante microscopia ottica che gli spermatozoi post-capacitati vengono maggiormente fagocitati rispetto a quelli capacitati (Oren-Benaroya et al., 2007). La rimozione di questi spermatozoi deve avvenire evitando una risposta infiammatoria, e quindi, l'ipotesi è che avvenga in seguito all'apoptosi (e non necrosi) degli spermatozoi post-capacitati con successiva fagocitosi da parte dei leucociti residenti.

Normalmente nell'eiaculato gli spermatozoi sono presenti in diversi stati di capacitazione e ciò consente una presenza costante di spermatozoi capacitati (2-14%) disponibili per molte ore; naturalmente con il passare del tempo il numero di spermatozoi non capacitati diminuisce fino all'esaurimento, mentre quelli post-capacitati vengono continuamente fagocitati. Quindi la fagocitosi non dovrebbe influire sul processo di fertilizzazione, ma il dubbio attuale è che, in alcune coppie infertili o sterili, la causa di tale patologia sia da ricercare in un'alterata fagocitosi ad esempio a causa di una maggiore percentuale di spermatozoi post-capacitati presenti nel liquido seminale.

Attualmente non ci sono molti studi che indichino una reale correlazione tra l'infertilità e la fagocitosi di spermatozoi; uno dei motivi può essere la mancanza di un test riproducibile che sia in grado di analizzare tale fenomeno.

Ade ora, la maggior parte delle diagnosi di infertilità viene effettuata grazie ai test disponibili (come lo spermioγραμμα), ma è possibile che nei casi di infertilità inspiegata, in cui gli esami disponibili non evidenziano alterazioni nella fertilità maschile, un test che analizzi la fagocitosi *in vitro* degli spermatozoi capacitati e post-capacitati possa aggiungere dati significativi per la diagnosi.

# **TECNICHE DI PROCREAZIONE MEDICALMENTE ASSISTITA**

In Italia ricorrono alle tecniche PMA le coppie che hanno problemi riproduttivi derivanti dalla sterilità e dall'infertilità. Le prime notizie di tecniche di fecondazione assistita risalgono già al 18° secolo: la prima inseminazione si applicò al genere umano nel 1799 e si trattò di una donna, il cui marito era affetto da ipospadia, ottenendo così una gravidanza mediante iniezione intravaginale del seme del marito.

Questa tecnica ebbe poi un nuovo impulso in seguito alla descrizione nel 1932 delle fasi del ciclo femminile e del periodo fecondo. Nel 1953 si ottenne la nascita di un bimbo perfettamente normale in seguito all'inseminazione artificiale con liquido seminale criopreservato.

La fecondazione *in vitro* vera e propria, seguita dal trasferimento del suo prodotto (*embryo transfer*), inizia nel 1958 quando i ricercatori McLaren e Biggers riescono a dimostrare che alcune blastocisti di ratto, coltivate *in vitro*, una volta impiantate nell'utero di una madre adottiva, si sviluppano fino a diventare ratti adulti, normali e fertili.

Dieci anni più tardi, nel 1968, il biologo Edwards e il ginecologo Steptoe iniziano quella proficua collaborazione che poi, il 26 luglio del 1978, porta alla nascita di Louise Brown, primo essere umano venuto al mondo grazie alle tecniche di fecondazione extra-corporea di ovociti recuperati per aspirazione follicolare. Il 18 maggio 1984 nasce a Palermo il primo bambino italiano da FIVET. Da quel giorno ad oggi sono più di due milioni le nascite di bimbi concepiti *in vitro*, soprattutto nei paesi occidentali.

In accordo con le linee guida emanate dal Ministero della Salute, sotto la definizione di Procreazione Medicalmente Assistita sono compresi quell'insieme di interventi biomedici finalizzati a dare inizio ad una gravidanza e che si concretizzano in una gamma di opzioni terapeutiche di varia complessità e di diverso grado d'invasività sia tecnica che psicologica sulla coppia.

Gli interventi di PMA possono essere suddivisi in tre livelli (Forabosco, 2005):

## **tecniche di primo livello:**

- ❑ inseminazione sopracervicale in ciclo naturale, eseguita utilizzando tecniche di preparazione del liquido seminale
- ❑ induzione dell'ovulazione multipla associata ad inseminazione sopracervicale, eseguita utilizzando tecniche di preparazione del liquido seminale

### **tecniche di secondo livello:**

- ❑ fecondazione in vitro e trasferimento dell'embrione (FIVET)
- ❑ iniezione intracitoplasmatica dello spermatozoo (ICSI)
- ❑ trasferimento intratubarico dei gameti maschili e femminili (GIFT), zigoti (ZIFT) o embrioni (TET) per via transvaginale ecoguidata o isteroscopica

### **tecniche di terzo livello:**

- ❑ prelievo microchirurgico di gameti dal testicolo (TESE) o dall'epididimo (MESA, PESA)
- ❑ prelievo degli ovociti per via laparoscopica
- ❑ trasferimento intratubarico dei gameti maschili e femminili (GIFT), zigoti (ZIFT) o embrioni (TET) per via laparoscopica

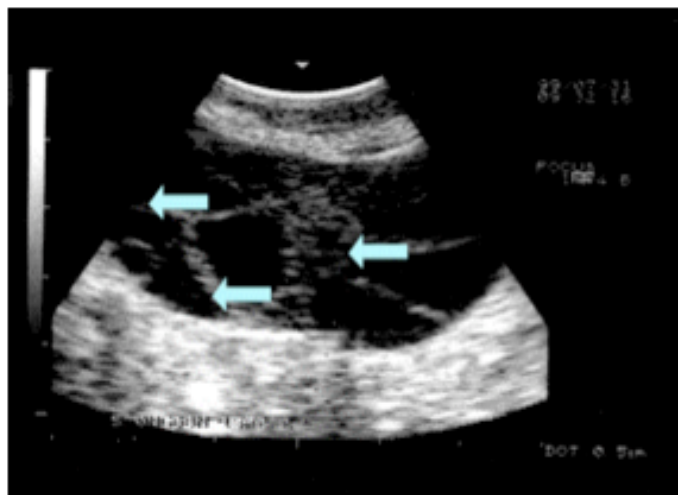
In ottemperanza del concetto di “gradualità terapeutica”, previsto dalla Legge 40 del 2004, legge che definisce le norme in materia di Procreazione Medicalmente Assistita, resta fermo il fatto che bisogna giungere alle tecniche di fecondazione assistita qualora le alternative medico-chirurgiche adottate non abbiano dato gli effetti sperati, nonché quando sono compromesse le reali possibilità di procreare in modo naturale in un tempo ragionevolmente breve ed in relazione all'età riproduttiva della singola coppia. Tutto ciò per evitare il rischio che queste tecniche vengano utilizzate in modo improprio ed esagerato. Una corretta gestione delle coppie prevede dunque un accurato *iter* diagnostico ed un approccio terapeutico multidisciplinare, farmacologico e/o chirurgico, che abbiano come obiettivo di rendere il percorso, che porterà le coppie ad ottenere la gravidanza, il più agevole possibile (Inaudi et al., 2005).

## **Stimolazione della crescita follicolare**

La prima fase per l'avvio delle tecniche di Procreazione Medicalmente Assistita prevede l'induzione della crescita follicolare e la maturazione di più ovociti mediante la somministrazione di farmaci induttori dell'ovulazione (Gardner et al., 2004). In tal modo si ottengono ovociti soprannumerari che permettono di scegliere i migliori da inseminare e quindi di avere maggiori prospettive di gravidanza in seguito al trasferimento in utero, nel caso di tecniche di fecondazione *in vitro* (IVF), di due o tre embrioni di buona qualità.

I farmaci solitamente somministrati durante le procedure di IVF sono le gonadotropine. La dose di gonadotropine impiegata viene stabilita sulla base di programmi individualizzati. In rapporto alle caratteristiche cliniche della paziente la stimolazione è finalizzata alla produzione di un numero di follicoli più elevato possibile: questo perché il rischio di gravidanza plurima dipende essenzialmente dal numero di embrioni che si decide di trasferire successivamente e non dal numero di

ovociti ottenuti. D'altra parte il dosaggio dei farmaci deve essere limitato per ridurre il rischio di insorgenza di importanti effetti collaterali come ad esempio la Sindrome da Iperstimolazione Ovarica. Al fine di evitare una ovulazione prematura in corso di stimolazione ovarica viene eseguita inoltre la cosiddetta "soppressione ipofisaria" che consiste nella somministrazione di farmaci che bloccano l'attività dell'ipofisi (ghiandola deputata alla regolazione dell'attività dell'ovaio), facendo sì che quest'ultima dipenda esclusivamente dai farmaci somministrati in corso di stimolazione. Tali farmaci possono essere somministrati sottoforma di preparati "depot", cioè somministrazioni singole ad effetto prolungato, o sottoforma di preparati ad emivita breve che richiedono somministrazioni giornaliere. Lo sviluppo follicolare viene quindi monitorato mediante controlli ecografici ripetuti (Figura 8) e dosaggi dei livelli di estradiolo fintanto che i follicoli di maggiori dimensioni non abbiano raggiunto un diametro medio superiore ai 17-18 mm. A questo punto viene somministrata una dose di Gonadotropina Corionica (HCG) necessaria per conseguire la maturazione finale degli ovociti. In rapporto alla risposta della paziente alla terapia di stimolazione della funzione ovarica ed in base al livello di picco dell'estradiolo ottenuto nel corso di tale terapia, le pazienti vengono classificate in *high*, *intermediate* and *low responders* e l'appartenenza all'una o all'altra classe sembra essere predittiva dell'esito del ciclo di fecondazione in vitro (Muasher, 1992).



**Figura 8. Immagine ottenuta da un'ecografia transvaginale dove sono evidenziati i follicoli in crescita (frecce azzurre).**

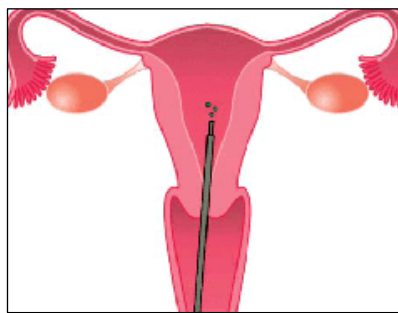
La stimolazione ed il monitoraggio ecografico sono finalizzati a garantire le condizioni per la fecondazione. Questa può avvenire *in vivo*, come nei protocolli di inseminazione intrauterina (IUI), oppure può avvenire *in vitro*, come nella Fecondazione *In Vitro* ed *Embryo Transfer* (FIVET) o nella iniezione intracitoplasmatica dello spermatozoo (ICSI). Qualora la tecnica utilizzata per il programma di fecondazione sia una FIVET o una ICSI, si effettua il prelievo degli ovociti tramite ecografia transvaginale.

## Le inseminazioni

Le inseminazioni, con o senza induzione multipla dell'ovulazione, consistono nel trasferimento degli spermatozoi che, a seconda dell'indicazione, vengono depositati a livello:

- intrauterino (IUI) (Figura 9)
- tubarico, mediante perfusione tubarica (FSP)

La tecnica è estremamente semplice e viene eseguita a livello ambulatoriale. Il momento più giusto per effettuare l'inseminazione viene identificato mediante monitoraggio follicolare ed eventualmente dosaggio ormonale.



**Figura 9. Inseminazione intra-uterina (IUI).**

Le condizioni essenziali per il successo di questa tecnica sono:

- ovulazione regolare
- buona vitalità degli spermatozoi
- buona funzionalità tubarica
- adeguato trasporto dell'embrione lungo le tube

Le *chances* di gravidanza variano dal 10% al 20% per tentativo a seconda della patologia di base e dell'età della paziente. Poco prima o subito dopo l'ovulazione, un campione di seme fresco, ottenuto nella stessa giornata mediante masturbazione, viene preparato con tecniche diverse al fine di mimare *in vitro* la capacitazione degli spermatozoi, tappa necessaria a permettere allo spermatozoo di fecondare l'ovocita. Tra queste metodiche le più comuni sono lo *Swim-up* e il *Mini-Percoll* ed hanno l'obiettivo di separare attraverso centrifugazioni successive, gli spermatozoi con migliore capacità fecondante dal resto del liquido seminale. In questo modo gli spermatozoi con migliore motilità e morfologia sono pronti per l'utilizzo e attraverso la IUI o la FSP, possono penetrare direttamente in cavità uterina e nella tuba di Falloppio rispettivamente. Generalmente se dopo 4-6 cicli di inseminazione non intercorre una gravidanza bisogna rivalutare il caso ed eventualmente utilizzare altre tecniche di fecondazione assistita.

## Prelievo degli ovociti

Il prelievo degli ovociti, comunemente definito *pick-up* (PU), viene effettuato dopo circa 36 ore dalla somministrazione del HCG, che ha lo scopo di indurre la maturazione finale degli ovociti. Durante tale procedura, eseguita previa anestesia locale o sedazione profonda, un apposito ago montato su una sonda ecografica transvaginale viene utilizzato per aspirare il fluido follicolare con conseguente raccolta degli ovociti in esso contenuti. Il liquido follicolare viene recuperato in una provetta mantenuta a 37°C, che viene in seguito consegnata all'embriologo per l'identificazione degli ovociti (Figura 11). Il contenuto della provetta viene svuotato in appositi contenitori e allo stereomicroscopio l'embriologo inizia la ricerca degli ovociti (Figura 10). L'ovocita recuperato è circondato da cellule della granulosa che formano un complesso detto cumulo ooforo. La parte interna di questo cumulo, a stretto contatto con l'ovocita, viene detta corona radiata. Quindi in definitiva, al momento del *pick-up* vengono recuperati i complessi cumulo ooforo-ovocita (COC)(Figura 11).

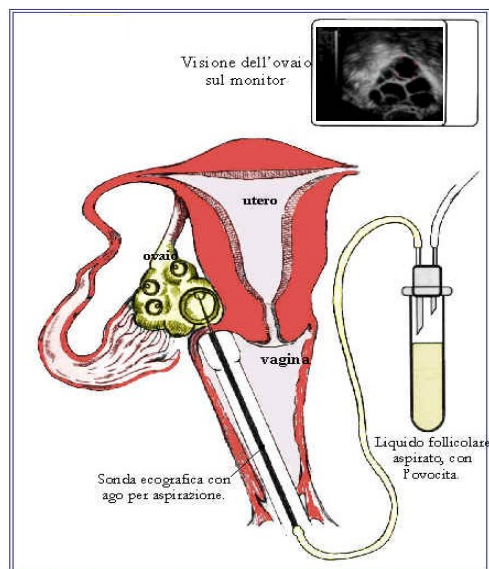


Figura 10. Immagine riassuntiva del pick-up.



Figura 11. COCs allo stereo microscopio.

## **Fecondazione *in vitro***

In laboratorio gli ovociti vengono osservati al microscopio per valutarne lo stadio di maturazione; la cellula uovo infatti per poter essere fecondata deve aver raggiunto lo stadio di Metafase II, in cui il corredo cromosomico risulta apolide. In questa fase di maturazione è presente il fuso meiotico. Gli ovociti prescelti vengono posti in coltura in incubazione per circa 4 ore prima dell'inseminazione.

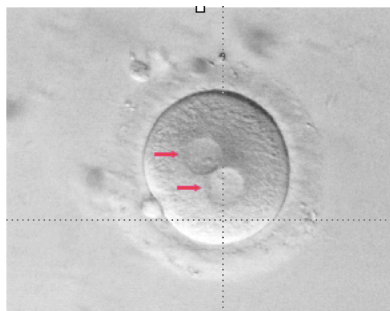
Nel frattempo il liquido seminale del partner viene valutato e trattato mediante capacitazione *in vitro*. In rapporto al tipo di procedura di laboratorio distinguiamo due tipi di fecondazione *in vitro*: la Fecondazione *In Vitro* ed *Embryo Transfer* (FIVET) e la *Intra-Cytoplasmatic Sperm Injection* (ICSI)(vedi Materiali e Metodi).

## **FIVET**

La FIVET è stata introdotta negli anni Ottanta e i bambini nati in tutto il mondo grazie a questa tecnica sono attualmente oltre trecentomila. I requisiti per l'ammissione alla FIVET sono (Forabosco, 2005):

- patologia tubarica
- infertilità maschile di grado lieve o moderato, quando il trattamento medico-chirurgico o le inseminazioni intrauterine non hanno dato risultati o sono stati giudicati non appropriati
- endometriosi
- infertilità idiopatica

Quando viene scelta come metodica di fecondazione la FIVET, i COC identificati al *pick-up* vengono inseminati con un determinato numero di spermatozoi capacitati. Dopo 16-18 ore di incubazione si procede al controllo dell'avvenuta fecondazione all'invertoscopio, ossia si valuta la presenza di due pronuclei accostati che contengono rispettivamente il patrimonio genetico maschile e femminile prima che si fondano per completare la fecondazione e divenire zigote (Figura 12). In genere il 65-75% degli ovociti si feconda; nel caso in cui la FIVET non dia risultati, si può ricorrere alla ICSI.



**Figura 12. Ovocita fertilizzato (le frecce rosse indicano la presenza dei due pronuclei).**

## ICSI

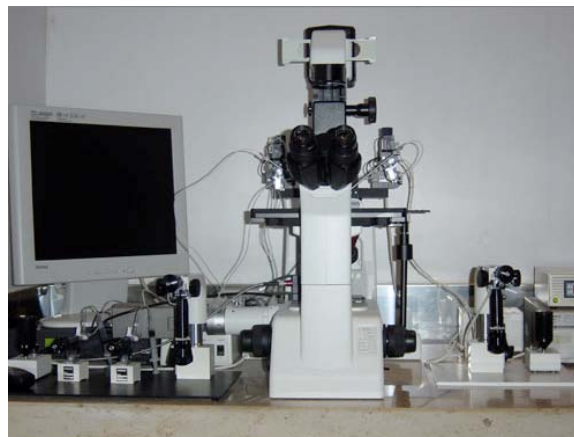
La ICSI è una tecnica di recente introduzione (prima metà degli anni Novanta) e si è sviluppata come trattamento di prima scelta per l'infertilità maschile idiopatica e per quei casi fino a poco tempo fa intrattabili. Essa si differenzia dalla FIVET solo nelle procedure di laboratorio, mentre per la coppia i tempi e le procedure rimangono gli stessi della FIVET.

Le indicazioni attuali per la ICSI sono:

- infertilità maschile di grado severo
- azospermia ostruttiva e secretiva (utilizzo di spermatozoi prelevati chirurgicamente dal testicolo o dall'epididimo)
- fecondazione con spermatozoi congelati
- mancata o ridotta fertilizzazione in precedenti cicli di FIVET
- limitato numero di ovociti disponibili da inseminare

L'aspetto innovativo di tale tecnica consiste nella microiniezione diretta di un singolo spermatozoo nel citoplasma dell'ovocita. Gli ovociti vengono iniettati utilizzando delle sofisticate apparecchiature che comprendono l'utilizzo di un microscopio a forte ingrandimento, dei microaghi ed un micromanipolatore (Figura 13).

La ICSI è la tecnica che più ha rappresentato l'evoluzione della PMA: basti pensare alla sua applicazione più estrema ossia quando essa viene applicata quale trattamento delle azoospermie, infatti nei casi in cui non siano evidenziabili spermatozoi nel liquido seminale a causa di patologie ostruttive dei dotti deferenti, è possibile prelevare spermatozoi dall'epididimo (MESA: *Microsurgical Epididymal Sperm Aspiration*, PESA: *Percutaneous Epididymal Sperm Aspiration*) ed utilizzarli per la metodica ICSI. Se non fossero presenti spermatozoi nemmeno nell'epididimo, c'è la possibilità di prelevare gli spermatozoi direttamente dal testicolo (TESE: *TEsticular Sperm Extraction*).



**Figura 13. Micromanipolatore.**

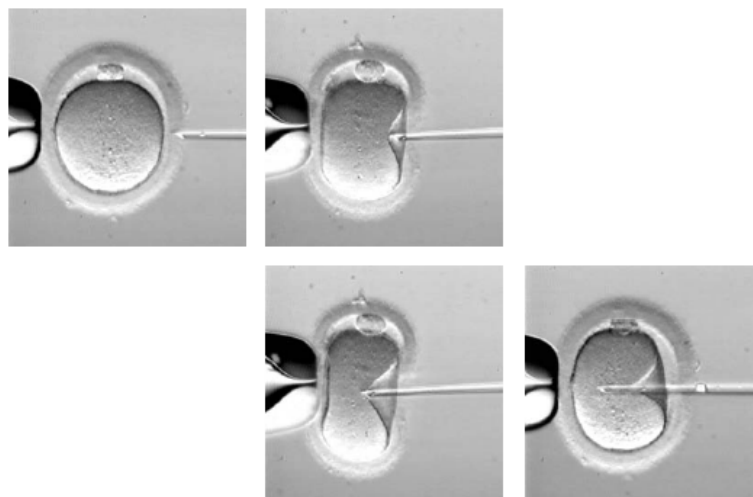
A differenza della FIVET in questo caso è necessario, prima dell'inseminazione, attuare la rimozione del cumulo ooforo e della corona radiata che circondano l'ovocita, mediante mezzi meccanici ed enzimatici. Dopo questa fase è possibile valutare il grado di maturità degli ovociti e la loro qualità morfologica. Solo gli ovociti maturi in Metafase II della seconda divisione meiotica che presentano il primo globulo polare estruso vengono fecondati mediante ICSI (Figura 14).



**Figura 14. ovocita in metafase II.**

Il citoplasma ovocitario può presentare diversi polimorfismi: granulosità, presenza di organelli o vescicole, accumulo di cisterne del reticolo endoplasmatico liscio, presenza di aree del citoplasma con organelli e/o vacuoli. È stata dimostrata una correlazione tra alcune di queste caratteristiche e la capacità di sviluppo degli ovociti (Rienzi et al., 2008). Quindi gli ovociti vengono selezionati non solo in base alla loro maturità, ma anche in base alla loro qualità. Nel frattempo, il liquido seminale viene sottoposto a capacitazione *in vitro* e successivamente utilizzato per l'inseminazione.

Uno spermatozoo viene iniettato mediante la micropipetta *injecting* all'interno del citoplasma di un'ovocita maturo fissato con una pipetta chiamata *holding*. Per evitare il danneggiamento del fuso mitotico l'ovocita viene posizionato con il globulo polare a ore 6 o a ore 12 in modo che il fuso sia lontano dal punto di entrata dell'ago (a ore 3) contenente lo spermatozoo (Rienzi et al., 2003)(Figura 15). Dopo 16-18 ore di incubazione viene controllata l'avvenuta fecondazione (Figura 12).



**Figura 15. Tecnica ICSI.**

## Lo sviluppo ed il trasferimento embrionale

In seguito alla fusione tra lo spermatozoo e l'ovocita, si innesca una cascata di eventi che porta allo sviluppo dell'embrione. Nelle primissime fasi dello sviluppo embrionale si susseguono delle divisioni cellulari che danno origine ai pre-embrioni, ciascuno formato da 2-8 blastomeri. Gli stadi di sviluppo successivi sono la morula e la blastocisti. Gli embrioni a 2 cellule si sviluppano a circa 24 ore dal prelievo ovocitario, gli embrioni a 4 e 8 rispettivamente a circa 48 e 72 ore (per cui in seconda e terza giornata), mentre la morula e la blastocisti a circa 96 e 120 ore dal prelievo ovocitario (per cui in quarta e quinta giornata)(Figura 16).

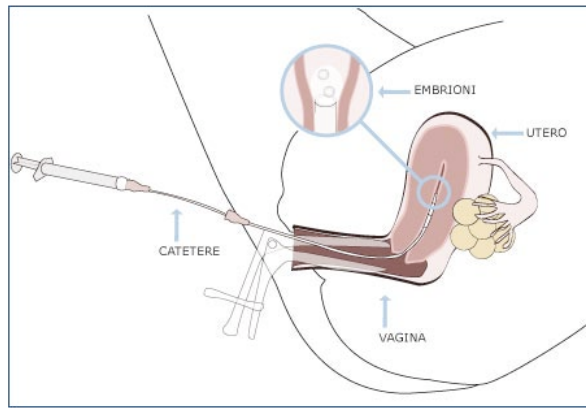


**Figura 16. Le diverse fasi di sviluppo embrionale: embrione a 2 cellule, a 4 cellule, a 8 cellule, morula e blastocisti.**

Lo sviluppo di ciascun embrione viene valutato quotidianamente e prevede una valutazione morfologica basata sulla simmetria dei blastomeri, sulla presenza dei nuclei all'interno di ciascun blastomero, sulla presenza di frammenti e sui tempi di sviluppo o clivaggio (numero di blastomeri).

Il giorno del *transfer* degli embrioni in utero essi vengono classificati in base alle loro caratteristiche e vengono loro assegnati dei gradi di qualità che vanno da 1 a 5, dove 1 sta ad indicare un embrione di ottima qualità e 5 di pessima qualità. Il *transfer* viene effettuato a 48 o 72 o 120 ore dal pick-up ovocitario, quindi quando gli embrioni dovrebbero trovarsi allo stadio di 4 o 8 cellule o allo stadio di blastocisti (Figura 17).

In seguito al *transfer* l'esito del trattamento dipende da due fattori: qualità degli embrioni e capacità dell'utero di accoglierli.



**Figura 17. Rappresentazione schematica del *transfer* embrionario.**

15 giorni dopo la fecondazione *in vitro* l'esito del trattamento viene valutato tramite il dosaggio quantitativo del  $\beta$ -HCG sierico.

## LA CITOMETRIA A FLUSSO

La citometria a flusso (citofluorimetria) è una tecnologia che permette di misurare simultaneamente diverse caratteristiche fisiche di singole particelle, con una dimensione che va da 0,2 a 150  $\mu\text{m}$ , quando queste attraversano, in un mezzo fluido, un raggio laser incidente (Figura 18 e Figura 19). Queste caratteristiche vengono determinate utilizzando un sistema ottico-elettronico accoppiato che registra la deviazione da parte delle cellule del raggio laser incidente e l'emissione di fluorescenza, che vengono, quindi, convertiti in impulsi elettronici processati infine dal computer. Ciascuna cellula che passa attraverso la luce incidente viene registrata come un evento. La deviazione del raggio luminoso detto *scatter* dipende dalla dimensione e dalla complessità interna della cellula; i fattori che condizionano lo *scatter* sono la membrana cellulare, il nucleo e il materiale granuloso presente nel citoplasma. Lo strumento misura due tipi di *scatter*: *Forward Scatter light* (FSC) o diffusione frontale che è proporzionale alle dimensioni della cellula e il *Side Scatter light* (SSC), rilevata a 90° rispetto al fascio radiante, che è invece proporzionale alla granulosità e alla complessità interna della cellula.

Le cellule possono inoltre essere marcate artificialmente per mezzo di anticorpi coniugati con fluorocromi. Quando questi assorbono energia luminosa questo eccesso di energia viene rilasciato come emissione di fluorescenza. Sono disponibili in commercio diversi tipi di fluorocromi, ognuno dei quali presenta una caratteristica lunghezza d'onda per l'eccitazione e l'emissione.

L'intensità del segnale fluorescente rilevato è proporzionale al numero di molecole fluorocrome presenti sulla particella. Generalmente i fluorocromi utilizzati sono coniugati ad anticorpi monoclonali specifici per antigeni presenti sulla membrana, nel citoplasma o nel nucleo delle cellule in esame. Oltre all'utilizzo di anticorpi monoclonali marcati con fluorocromi, è possibile utilizzare coloranti che penetrano nella cellula o nei diversi compartimenti cellulari o che si legano alla membrana cellulare ed hanno specifiche caratteristiche di emissione. Il colorante pHrodo™, SE (*Succinimidyl Ester*, vedi Materiali e Metodi), ad esempio, è una molecola derivata dalla rodamina che ha la particolarità di modificare lo spettro di emissione in base al pH.

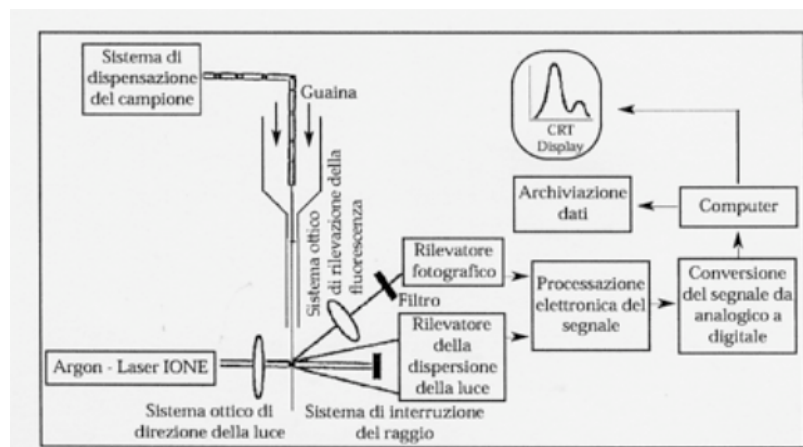
Gli anticorpi monoclonali coniugati e i coloranti possono essere utilizzati simultaneamente, sfruttando i diversi picchi di assorbimento ed emissione per identificare diverse popolazioni cellulari all'interno di una coltura, e quindi per effettuare analisi multiparametriche in maniera rapida, semplice e accurata.

Ci sono degli accorgimenti che facilitano l'interpretazione dei dati ottenuti. Ad esempio, si possono scegliere il numero di eventi da acquisire, l'amplificazione del segnale e la soglia che deve essere superata per trasformare un segnale in un evento. Un altro accorgimento adottato per restringere l'analisi ad una specifica popolazione

all'interno di un campione è l'utilizzo di delimitatori, i cosiddetti "gate", numerici, grafici e immunologici, che definiscono le caratteristiche di *scatter* o di fluorescenza delle particelle da includere.



**Figura 18. Citometro a flusso (citofluorimetro).**



**Figura 19. Componenti di un citometro a flusso.**

## **La citometria a flusso nell'analisi del liquido seminale**

Nel 1999 l'OMS ha stilato delle linee guida che vengono modificate periodicamente per la standardizzazione dell'esame del liquido seminale. Tuttavia, in molti studi è stata individuata un'alta variabilità inter- e intra-osservatore nei risultati dell'analisi di base del liquido seminale (Keel, 2004). A tal proposito sono stati proposti diversi metodi per rendere più attendibile l'analisi, come il *Coulter counter* (Brotherton and Barnard, 1974), il Velocimetro laser-doppler (Brotherton, 1988) e il *Computer-Assisted Semen Analysis* (CASA), ma finora l'applicazione di queste metodiche nella *routine* non si è dimostrata utile.

Negli ultimi anni ha preso piede nella pratica clinica dei laboratori di andrologia la citofluorimetria ed è stata utilizzata per valutare diverse caratteristiche

del liquido seminale come la struttura della cromatina (Spano and Evenson, 1993), la vitalità (Ferrara et al., 1997; Garner and Johnson, 1995), la funzionalità mitocondriale e l'integrità dell'acrosoma (Graham et al., 1990), la presenza di anticorpi anti-spermatozoo (Ke et al., 1995) e di difetti spermatogenetici (Levek-Motola et al., 2005), la concentrazione di leucociti (Ricci et al., 2000) e la concentrazione di spermatozoi vitali ed apoptotici (Perticarari et al., 2007). Questa tecnica, dunque, se utilizzata in combinazione con anticorpi monoclonali e/o coloranti fluorescenti permette di effettuare un'analisi rapida, riproducibile, semplice, multiparametrica e accurata di diversi parametri del liquido seminale.

## SCOPO DELLA RICERCA

La necessità di effettuare diagnosi sempre più accurate di infertilità e il rapido espandersi delle tecniche di citofluorimetria nei laboratori di andrologia, hanno permesso in questi ultimi anni di condurre indagini più precise e maggiormente riproducibili sulle caratteristiche del liquido seminale.

Le linee guida proposte dal WHO del 1999, considerati i costi, escludono però l'utilizzo di tale metodica nella pratica clinica. Tuttavia, la citometria a flusso rappresenterebbe una soluzione pratica per molti laboratori di seminologia in quanto il suo impiego risulta rapido ed accurato e fornisce simultaneamente molti dati.

Con questo lavoro si è voluto:

- ❖ mettere a punto un test in citometria a flusso che sia in grado di quantificare la fagocitosi con un metodo semplice e riproducibile al fine di poter analizzare qualsiasi campione di liquido seminale anche a scopo diagnostico. La fagocitosi è un processo che può interferire con la fecondazione dell'ovocita *in vivo*, quindi l'indagine della predisposizione degli spermatozoi ad essere fagocitati potrebbe rappresentare un fattore predittivo del mancato concepimento
  
- ❖ studiare gli effetti della leucocitospermia su alcuni parametri del liquido seminale e sull'*outcome* delle tecniche di procreazione medicalmente assistita FIVET e ICSI in pazienti di coppie infertili. In letteratura sono presenti vari studi che cercano di attribuire un significato clinico alla leucocitospermia in termini di fertilità, tuttavia non si è ancora giunti ad una conclusione univoca.

# MATERIALI E METODI

## SPERMIOGRAMMA

L'analisi delle caratteristiche reologiche e dei parametri dei liquidi seminali dei pazienti arruolati in questo studio è stata effettuata attenendosi alle procedure descritte nelle linee guida dell'Organizzazione Mondiale della Sanità del 1999 (WHO. *Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction*, Cambridge University Press, 1999). In particolare, sono stati presi in considerazione la concentrazione, la motilità, la morfologia degli spermatozoi e la concentrazione dei leucociti (più precisamente polimorfonucleati) del campione di liquido seminale di base. In tabella 20 sono riportati i limiti di normalità dei parametri analizzati in questo studio:

Concentrazione spermatozoi	≥ 20 milioni/ml
Motilità totale progressiva (a+b)	≥ 50%
Morfologia normale	≥ 30%
Elementi cellulari diversi dagli spermatozoi ( <i>round cells</i> )	≤ 5 milioni/ml
Leucociti	≤ 1 milione/ml

**Tabella 20. Parametri analizzati nello spermioγραμμα e limiti di normalità.**

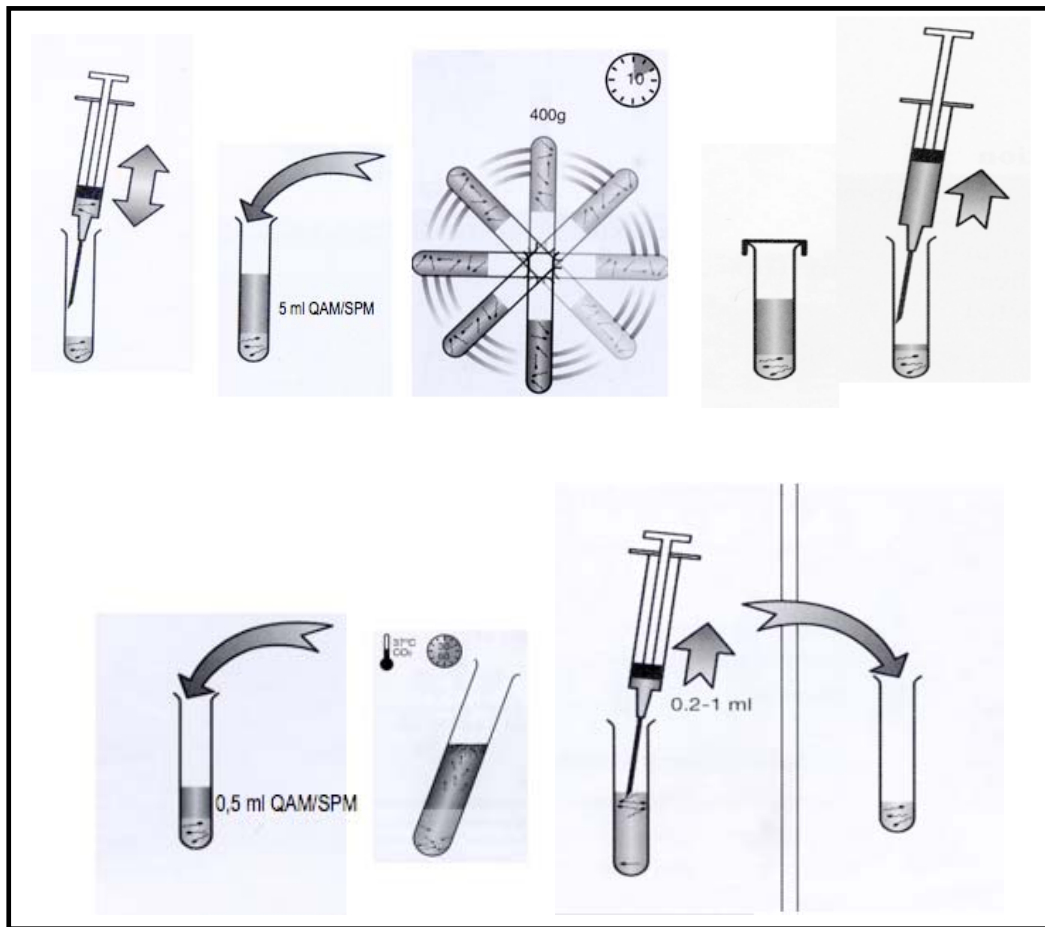
## CAPACITAZIONE *IN VITRO* DI SPERMATOZOI

Il processo di capacitazione è una tecnica che viene adottata per simulare *in vitro* ciò che accade *in vivo* nelle vie genitali femminili. Mediante questo procedimento si ottiene la separazione degli spermatozoi dal plasma seminale e un arricchimento in spermatozoi morfologicamente normali e motili, privo di detriti e cellule non vitali.

La metodica utilizzata in tutti gli esperimenti descritti in questo lavoro è quella dello *Swim-Up* da *pellet* (Kerin et al., 1984)(Figura 21).

### ***Swim-Up* da *pellet***

Il liquido seminale appena raccolto è stato lasciato a 37°C per circa 20-30 minuti, al fine di permetterne la liquefazione. Il campione è stato diluito con un egual volume di terreno di lavaggio SPM (Origio MediCult Media, Denmark) preriscaldato a 37°C e centrifugato a 400 x g per 10 minuti; il sopranatante è stato eliminato e il *pellet* stratificato con 0,5 ml di terreno IVF contenente albumina al 5% (Origio MediCult, Denmark) preriscaldato a 37°C (5% di CO<sub>2</sub>). Dopo un'incubazione di 30-45 minuti a 37°C al 5% di CO<sub>2</sub>, lo strato superiore contenente gli spermatozoi capacitati, è stato prelevato e analizzato.



**Figura 21. Rappresentazione schematica del procedimento di capacitazione *in vitro* mediante la metodica dello *Swim-Up da pellet* (Kerin et al., 1984).**

## FAGOCITOSI DI SPERMATOZOI

### Casistica

In questo studio sono stati considerati i liquidi seminali di 24 pazienti appartenenti a coppie infertili afferenti consecutivamente alla S.S.D. PMA del I.R.C.C.S. Burlo Garofolo, previo consenso informato.

Tutti i campioni di liquido seminale sono stati raccolti mediante masturbazione all'interno di un contenitore sterile dopo 3-4 giorni di astinenza sessuale e sono stati trasportati in laboratorio entro 30 minuti dall'eiaculazione.

### Linea cellulare THP1 e valutazione del differenziamento

Per lo studio della fagocitosi degli spermatozoi è stata utilizzata la linea cellulare THP1 (ATCC TIB-202™), isolata da leucemia monocitica acuta umana. Queste cellule esprimono il recettore della porzione Fc delle IgG e il recettore del C3b, ma non esprimono immunoglobuline di membrana e citoplasmatiche (Tsuchiya et al.,

1980). Rispetto ad altre linee monocitiche, queste, una volta differenziate (ad esempio in presenza di esteri del forbolo)(Schwende et al, 1996), assumono un comportamento molto simile a quello dei macrofagi nativi. L'utilizzo di una linea cellulare stabilizzata tende a garantire una maggiore riproducibilità di risultati rispetto a monociti-macrofagi purificati da sangue intero e differenziati *in vitro*.

Le cellule sono state mantenute in sospensione e alla concentrazione di  $3-5 \times 10^5$  cellule/ml in flask a 37°C (5% CO<sub>2</sub>) in un mezzo di coltura costituito da una parte di RPMI 1640 (Biochrom AG) ed una parte di IMDM (Euroclone), completato con 10% di FBS, 100 U/mL di penicillina/streptomina e 200 mM finale di L-Glutamina.

Uno dei metodi descritti in letteratura per attivare *in vitro* il loro differenziamento a macrofago, prevede la stimolazione con PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate)(Schwende et al., 1996). Per verificare l'effetto di quest'ultima sulle THP1, sono state usate due concentrazioni di PMA,  $0,5 \times 10^{-8}$ M e  $10^{-8}$ M, e tempi di coltura di 24, 48 e 72 ore. La differenziazione è stata analizzata mediante citometria a flusso, valutando l'espressione di marcatori di superficie quali il CD14 (identifica il co-recettore dell'LPS, espresso soprattutto dai macrofagi), il CD11b (identifica il recettore del C3), il CD33 (riconosce il recettore transmembrana dell'acido sialico espresso prevalentemente dalle cellule della linea mieloide).

### **Colorazione di spermatozoi con pHrodo™, SE**

Per studiare la fagocitosi degli spermatozoi, è stato necessario pensare ad un metodo che fosse in grado di valutare un numero elevato di cellule per ogni test, e di discriminare le cellule fagocitate, ovvero internalizzate nel macrofago, da quelle semplicemente adese alla membrana. Gli spermatozoi, quindi sono stati marcati con il pHRodo™, SE (Succinimidyl Ester, Molecular Probes, Invitrogen), molecola derivante dalla rodamina che ha la particolarità di modificare lo spettro di emissione in base al pH. Infatti, a pH neutro, tale molecola non è fluorescente, mentre a pH acido emette fluorescenza rossa. Il pH acido del fagosoma rende le cellule fagocitate fluorescenti e quindi identificabili in citometria a flusso, mentre le cellule semplicemente adese alla membrana dei fagociti non risultano visibili.

Per il test di fagocitosi sono stati utilizzati  $0,8 \times 10^6$  e  $1,6 \times 10^6$  spermatozoi, previamente lavati con PBS addizionato di Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup> a 300 x g per 10 minuti, e  $1 \times 10^5$  cellule macrofagiche in modo che il rapporto con le THP1 fosse 8:1 e 16:1. È stata valutata la concentrazione ottimale di pHrodo da utilizzare per la colorazione testando due diverse concentrazioni: 50 ng/ml e 100 ng/ml. La colorazione è stata valutata dopo un'incubazione al buio per 30 minuti. Al termine di tale periodo, gli spermatozoi sono stati lavati per due volte con una soluzione di PBS e BSA all'1% a 300 x g per 10 minuti per eliminare il colorante in eccesso e per risospenderli nel terreno utilizzato per il test con le cellule THP1.

## **Fagocitosi ed analisi citofluorimetrica**

La fagocitosi è stata studiata rispetto a spermatozoi in diversi stati di attivazione, cioè non capacitati, capacitati (mediante *Swim-up* da *pellet*) e post-capacitati (campione mantenuto a 37°C per 24 ore).

Gli spermatozoi marcati e le cellule THP1 sono stati incubati per una e due ore a 37°C in agitazione, quindi lavati con terreno RPMI a 300 x g per 10'.

I campioni ottenuti dai diversi esperimenti sono stati valutati mediante citofluorimetro (FacsCalibur, Becton Dickinson, CA). Per ogni campione sono stati acquisiti almeno 30000 eventi. Le analisi sono state eseguite per mezzo dei *softwares* CellQuest e FlowJo (TreeStar).

## **ANALISI DEI LEUCOCITI SEMINALI**

### **Casistica**

In questo studio sono stati valutati 150 liquidi seminali di partner appartenenti a coppie infertili sottoposte a tecniche di fecondazione *in vitro* (FIVET, ICSI) consecutivamente accolte presso la S.S.D. PMA dell'I.R.C.C.S. Burlo Garofolo e previo consenso informato.

Tutti i campioni di liquido seminale sono stati raccolti mediante masturbazione all'interno di un contenitore sterile dopo 3-4 giorni di astinenza sessuale e sono stati trasportati in laboratorio entro 30 minuti dall'ejaculazione. Di ciascun campione sono state valutate, secondo le linee guida del WHO del 1999, la concentrazione, la motilità progressiva rapida e lenta degli spermatozoi e la concentrazione di *round cells*.

I campioni di liquido seminale sono stati suddivisi in base alla tipologia di fecondazione *in vitro* effettuata (FIVET o ICSI). Ciascun gruppo, a sua volta, è stato suddiviso in due sottogruppi in base alla concentrazione di leucociti in essi presente determinata mediante citofluorimetria, ovvero leucocitospermici se la concentrazione è  $\geq 1 \times 10^6$ /ml e non leucocitospermici se la concentrazione è  $< 1 \times 10^6$ /ml.

### **Test della perossidasi**

Il protocollo utilizzato è stato adattato da quello di Endtz (Endtz, 1974). La soluzione di lavoro usata per il test si ottiene aggiungendo 1  $\mu$ l di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 20  $\mu$ l di soluzione stock di 3,3' Diaminobenzidina-tetrahydrochlorite, (DAB, Isopac Sigma, Milano, Italia) allo 0,09% in etanolo 40%. In ogni test, 20  $\mu$ l di liquido seminale sono stati incubati con 20  $\mu$ l di soluzione di lavoro in un tubo Eppendorf per 5 minuti a temperatura ambiente. Prima di allestire il vetrino, sono stati aggiunti 40  $\mu$ l di PBS. Le cellule perossidasi-positive si colorano di giallo-rosso bruno, mentre quelle

perossidasi-negative rimangono incolori. Sono state contate al microscopio ottico ad un ingrandimento 400X almeno 100 *round cells* ed è stata valutata la percentuale di cellule perossidasi-positive e negative. La conta totale dei leucociti viene espressa in milioni/ml di liquido seminale.

### **Analisi citofluorimetrica**

Per eseguire la conta assoluta dei leucociti, 100 µl di ciascun liquido seminale liquefatto sono stati incubati con una miscela contenente: Syto-16 *Green Fluorescent nucleic acid stain* per identificare la popolazione di spermatozoi ed escludere i detriti (concentrazione finale 200 nM, Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA), 7-Amino-Actinomicina D (7-AAD Via-Probe, BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) per valutare la vitalità, anti-CD45-APC per il riconoscimento dei leucociti, anti-CD16-PE per il riconoscimento dei PMN. L'aggiunta di 100 µl di fluorosfere Flow-Count™ (Beckmann-Coulter, Fullerton, CA, USA) alla concentrazione di 1034 biglie/ml ha permesso di effettuare la conta assoluta dei leucociti al citofluorimetro. Dopo un'incubazione al buio di 20 minuti a temperatura ambiente è stato aggiunto 1 ml di PBS e il campione è stato analizzato al citofluorimetro (FacsCalibur, Becton Dickinson, San José, CA, USA). Per ogni test sono stati acquisiti 100000 eventi. I dati ottenuti sono stati successivamente analizzati utilizzando una strategia di *gating* già descritta in precedenza (Ricci et al., 2000).

## **TECNICHE DI FECONDAZIONE *IN VITRO***

### **Protocolli di stimolazione ovarica**

Per la stimolazione ovarica delle pazienti sottoposte alle tecniche di fecondazione *in vitro*, sono stati utilizzati due protocolli. Il primo prevede la soppressione ipofisaria con Triptorelina 0,1 mg/die a partire dal 21° giorno del ciclo precedente. Dopo 14 giorni di trattamento sono stati effettuati il dosaggio dell'estradiolo plasmatico ed un'ecografia. Se il valore dell'estradiolo risultava inferiore a 30 pg/ml e non venivano evidenziate formazioni follicolari a livello ovarico con un diametro maggiore ai 5 mm, veniva considerato raggiunto il blocco ipofisario, quindi si dava inizio alla stimolazione ovarica. In base alle caratteristiche della paziente (età, BMI, esito dei cicli precedenti) è stata somministrata una dose giornaliera di FSH o HMG, o di entrambi, variabile dalle 75 alle 450 UI. Al quinto giorno di trattamento, è stato eseguito un primo controllo ormonale ed ecografico, utile per adattare la dose di gonadotropine in funzione della risposta ovarica. Ulteriori controlli sono stati eseguiti a giorni alterni. La presenza di almeno 3 follicoli di diametro superiore a 18 mm, con valori di estradiolo di almeno 1000 pg/ml, ha comportato la sospensione della terapia con gonadotropine, ed è stata prescritta la somministrazione di 5000-10000 UI di HCG. Quest'ultima iniezione è stata eseguita 35-36 ore prima del prelievo ovocitario.

Il secondo protocollo prevede l'inizio della somministrazione di gonadotropine alle stesse dosi del precedente il primo o il secondo giorno del ciclo mestruale. I controlli successivi sono stati eseguiti con le stesse modalità del precedente protocollo. Dal 7° giorno del ciclo, o in presenza di un follicolo di diametro maggiore o uguale a 14 mm, è stata iniziata la somministrazione di una fiala di antagonista del GnRH (0,25 mg), fino all'induzione dell'ovulazione, in base ai criteri sopra descritti. La somministrazione dell'antagonista è stata quindi sospesa, è stato somministrato il HCG e programmato il recupero ovocitario, secondo le stesse modalità del primo protocollo. A partire dal giorno del prelievo ovocitario, è stato somministrato il progesterone naturale per via intramuscolare alla dose di 50 mg/die. Dopo 15 giorni dal pick-up la paziente è stata sottoposta ad un prelievo ematico per il dosaggio del  $\beta$ -HCG. Se il ciclo ha avuto successo, il progesterone è stato somministrato fino alla decima settimana di gestazione, altrimenti è stato sospeso.

### **Terreni di coltura di ovociti, spermatozoi ed embrioni**

I diversi terreni utilizzati per le tecniche di fecondazione *in vitro* sono quelli prodotti dalla ditta Origio, e il loro utilizzo è di tipo sequenziale, è previsto, cioè, l'utilizzo di terreni specifici per ciascuna fase dello sviluppo embrionale (gameti, zigoti, embrioni e blastocisti).

Alcuni terreni (Sperm Preparation Medium, Flushing Medium) sono addizionati con HEPES (soluzione tampone), mentre altri non lo sono (IVF, ISM1, Blast Assist,

UTM) e quindi sono stati preparati il giorno precedente e pre-equilibrati in incubatore a 37°C al 5% di CO<sub>2</sub>.

### **Prelievo ovocitario ecoguidato**

L'uso di sonde endoluminali di piccole dimensioni ha portato a molti vantaggi nel recupero degli ovociti attraverso i fornic vaginali, così come l'utilizzo di trasduttori ad alta frequenza ha permesso di avere immagini più chiare. Questi miglioramenti consentono di aspirare il contenuto dei follicoli ovarici con diametro ridotto senza dover eseguire la replezione vescicale, individuando con maggior precisione i vasi pelvici. (Kerin et al., 1983; Rossavik and Gibbons, 1986). Gli aghi utilizzati in questa tecnica hanno diametri che variano da 16 a 18 Gauge e caratteristiche che consentono una buona visualizzazione sullo schermo ecografico. La sonda, introdotta in vagina, è stata orientata verso l'ovaio e una volta individuato il follicolo sotto la traccia luminosa del monitor è stato inserito l'ago e aspirato il fluido follicolare, conseguentemente raccolto in una provetta sterile. Il fluido follicolare è stato versato in una piastra Petri ed osservato allo stereo microscopio per individuare l'eventuale presenza dei complessi ovocita-cumulo ooforo (COC). I COC sono stati trasferiti in terreno IVF e mantenuti in incubatore a 37°C al 5% di CO<sub>2</sub> fino al momento della loro inseminazione. Prima di effettuare ICSI, gli ovociti sono stati sottoposti a decoronizzazione per poterne valutare la maturità e le caratteristiche morfologiche. Tale procedura non è stata eseguita sui COC destinati alla FIVET. Questi ultimi sono stati scelti in base all'aspetto del cumulo ooforo, della corona radiata, del citoplasma e del globulo polare (Tabella 22).

Tutti gli ovociti recuperati e classificati sono stati incubati a 37°C in atmosfera al 5% di CO<sub>2</sub> per un periodo definito "maturativo" che varia a seconda della maturità dell'ovocita.

	Cumulo Ooforo	Corona radiata	Citoplasma	Globulo Polare
Vescicola germinale	Compatto	ristretta	Omogeneo con vescicola	Assente
immaturo	Compatto	ristretta	Omogeneo	Aassente
matturo	Lasso e omogeneo	A raggera ben delineata	Omogeneo	Presente
Post matturo	Disperso con cellule scure	Irregolare e scura	Irregolare con granulazioni	Presente talvolta in degenerazione

**Tabella 22. Stadi maturativi dell'ovocita determinati mediante la valutazione del cumulo ooforo, della corona radiata, del citoplasma e del globulo polare.**

Vengono così distinti i diversi stadi maturativi dell'ovocita:

Vescicola germinale: stadio genetico profase 1, l'ovocita è estremamente immaturo.

Immaturo: stadio genetico metafase 1 (privo di globulo polare), l'ovocita è immaturo.

Maturo: stadio genetico metafase 2 della II divisione meiotica, corredo cromosomico apolide, corretto ai fini dell'inseminazione.

Post maturo: stadio genetico metafase 2, l'ovocita è in degenerazione.

### **Decoronizzazione degli ovociti**

Gli ovociti recuperati, prima di essere sottoposti a ICSI, sono stati privati delle cellule del cumulo ooforo e della corona radiata. Tale procedura è stata eseguita mediante mezzi meccanici e sostanze chimiche. I COC sono stati posti mediante una pipetta *Pasteur* in una soluzione di IVF contenente 20 IU di enzima ialuronidasi (SynVitro®Hyadase Origio) per circa 30 secondi, quindi trasferiti in terreno IVF e manipolati con una micropipetta con un diametro interno di 140 µm, fino alla completa eliminazione delle cellule della cumulo ooforo e della corona radiata. Gli ovociti sono stati quindi osservati all'invertoscopio per valutarne il grado di maturazione e la qualità ed incubati fino al momento dell'inseminazione.

### **Metodica di microiniezione (ICSI)**

Questa tecnica è stata eseguita con l'ausilio di un micromanipolatore Narisighe montato su un invertoscopio Leica DMIRB. Il micromanipolatore è uno strumento usato per posizionare e movimentare delle micropipette in maniera estremamente precisa nelle tre dimensioni ed è indispensabile per poter micromanipolare ovociti e spermatozoi.

La ICSI consiste nella microiniezione di un singolo spermatozoo direttamente nel citoplasma ovocitario, mediante l'ausilio di due micro pipette (*holding* per immobilizzare l'ovocita e *injecting* per iniettare lo spermatozoo). Le micropipette sono state posizionate sul micromanipolatore. Gli spermatozoi sono stati sottoposti a capacitazione *in vitro* mediante la metodica dello *Swim-up* da *pellet* e al momento dell'inseminazione sono stati depositati nel PVP (poli-vinil-pirrolidone). Tale soluzione è di tipo colloidale e rallenta la motilità degli spermatozoi. Gli ovociti, invece, sono stati depositati in gocce di terreno tamponato. Con la pipetta da microiniezione è stato scelto ed aspirato lo spermatozoo in base alle caratteristiche di motilità e morfologia. Quindi è stato immobilizzato prima di procedere all'iniezione. L'immobilizzazione è un passaggio molto importante in quanto induce l'attivazione dello spermatozoo, cioè la permeabilizzazione della membrana plasmatica e la successiva decondensazione della cromatina. Lo spermatozoo è stato aspirato all'interno del microago quindi iniettato all'interno dell'ovocita precedentemente immobilizzato con la pipetta *holding*. L'ovocita è stato posizionato con il globulo polare a ore 6 o a ore 12 per evitare di danneggiare il fuso meiotico.

### **Metodica FIVET**

I complessi ovocita-cumulo ooforo (COC) sono stati lasciati in incubazione a

37°C in atmosfera al 5% di CO<sub>2</sub> prima di effettuare la FIVET. Nel frattempo è stata effettuata la capacitazione *in vitro* degli spermatozoi mediante la metodica dello *Swim-up* da *pellet*. È stata valutata la concentrazione e la motilità degli spermatozoi capacitati e stimata la maturità degli ovociti osservando i COC all'invertoscopio. I COC prescelti sono stati posizionati separatamente in gocce di 50 µl di terreno poste su una capsula Petri ricoperta d'olio. A ciascuna goccia sono stati aggiunti circa 15000 spermatozoi capacitati e successivamente la capsula Petri è stata posta in incubazione a 37°C (5% CO<sub>2</sub>) per permettere la fertilizzazione.

### **Controllo della fertilizzazione**

La fertilizzazione è stata controllata dopo 16-18 ore dall'inseminazione. Per valutare la fertilizzazione degli ovociti in seguito a FIVET sono state rimosse le cellule del cumulo ooforo e della corona radiata, mediante l'utilizzo di micro pipette di diametro pari a 140 µm.

Osservando l'ovocita, l'avvenuta fertilizzazione è stata confermata valutando la presenza di due pronuclei, uno derivante dall'ovocita ed uno dallo spermatozoo, e due globuli polari. Il secondo globulo polare viene estruso dopo l'attivazione dell'ovocita, e va a completare la seconda divisione meiotica (Figura 12).

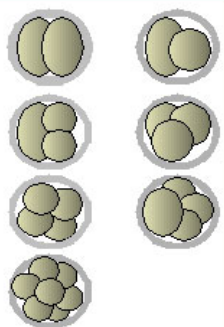



Gli zigoti che presentavano 1 o 3 pronuclei, contenenti quindi un alterato corredo cromosomico, sono stati eliminati, mentre gli zigoti derivanti da una normale fertilizzazione sono stati classificati in base alla morfologia dei pronuclei e alla disposizione dei nucleoli quindi depositati nelle piastre di terreno fresco e mantenuti in incubatore a 37°C (5% CO<sub>2</sub>).

In questo studio il tasso di fertilizzazione (%) è stato calcolato per ogni coppia dividendo il numero di ovociti fertilizzati per il numero di ovociti inseminati.

### **Classificazione degli embrioni**

Gli embrioni sono stati trasferiti in utero in seconda, terza o quinta giornata dal prelievo ovocitario. Sono stati osservati e classificati dal punto di vista morfologico quotidianamente dal giorno dopo il pick-up al momento del transfer e, successivamente al transfer, quelli non trasferiti fino alla quinta giornata. In tale giornata gli embrioni che hanno raggiunto lo stadio di sviluppo di blastocisti, sono stati congelati, gli altri eliminati in quanto non vitali. La classificazione è stata effettuata in base ad una valutazione morfologica dell'embrione che dipende dalla regolarità delle dimensioni dei blastomeri, dalla presenza di frammenti, dai tempi di clivaggio e dalla presenza del nucleo in ogni blastomero (Rienzi et al., 2002)(Figura 23).

### Classificazione degli embrioni

Dimensione dei blastomeri	Percentuale di frammentazioni anucleate	Multinucleazione
	<p>&lt;10%    10-30%    30-50%</p> 	
	<p>Qualità citoplasmatica</p> 	

**Figura 23. Classificazione degli embrioni fino allo stadio di 8 cellule.**

Altre caratteristiche, come la presenza di vacuoli e granulazioni nel citoplasma dei blastomeri, peggiorano la qualità degli embrioni.

La classificazione sopra riportata si riferisce solo ad embrioni con meno di 8 blastomeri. Quando l'embrione raggiunge lo stadio di 12 cellule si definisce pre-morula e quando raggiunge lo stadio di 16 cellule si definisce morula. A questo punto diventa complicato effettuare un'accurata analisi morfologica e talvolta l'embrione può essere confuso con un embrione molto frammentato o in degenerazione. La zona pellucida si assottiglia, il citoplasma dei blastomeri appare disomogeneo e scuro e i blastomeri risultano molto compatti. Successivamente iniziano a formarsi dei piccoli spazi intercellulari e l'accrescersi di tali spazi porta allo stadio di blastocisti cavitata (al 5° giorno dal pick-up) e da lì a poco avverrà la rottura della zona pellucida con la fuoriuscita della blastocisti stessa (*hatching*). La qualità delle blastocisti è stata definita in base alla presenza del blastocele, alla presenza di frammenti e alla compattazione dei blastomeri.

In definitiva, a ciascun embrione è stato assegnato un grado di qualità che va da 1 a 5, attribuendo un valore più elevato agli embrioni di qualità peggiore.

Il tasso di sviluppo embrionale di ogni coppia è stato calcolato dividendo il numero di embrioni sviluppati al giorno del *transfer* per il numero di ovociti fertilizzati. Sono stati esclusi da tale analisi i campioni in cui il tasso di fertilizzazione era pari allo 0%.

I tassi di sviluppo di embrioni di buona qualità e di cattiva qualità, sono stati calcolati per ogni coppia, sommando gli embrioni di grado 1,2 e 3 nel primo caso, e gli embrioni di grado 4 e 5 nel secondo caso. I valori ottenuti sono stati divisi per il numero di embrioni sviluppati il giorno del *transfer* e quindi espressi sottoforma di percentuale.

## **Trasferimento degli embrioni in cavità uterina**

In seguito alla valutazione della qualità degli embrioni, i migliori sono stati trasferiti in utero, nel numero stabilito insieme alla coppia. In particolare, gli embrioni sono stati aspirati nel catetere da *transfer* mediante una siringa. Il ginecologo ha introdotto una guida fino all'orifizio uterino interno, quindi l'embriologo ha inserito il catetere all'interno della guida fino alla cavità uterina, dove sono stati rilasciati gli embrioni.

## **Accertamento della gravidanza**

Dopo quindici giorni dalla fecondazione *in vitro*, la gravidanza è stata confermata in base ai livelli ematici di  $\beta$ HCG. Un valore  $\geq 15$  mIU/ml di  $\beta$ HCG indica una gravidanza positiva. I tassi di gravidanza nei diversi gruppi analizzati sono stati calcolati, quindi, dividendo il numero di  $\beta$ HCG positivi per il numero di transfer totali effettuati.

## **ANALISI STATISTICA**

I dati ottenuti dai test di fagocitosi sono stati analizzati mediante il test *t* di Student per dati appaiati.

Tutti i dati demografici nello studio della leucocitospermia sono stati presentati come mediana (25° e 75° quartile). Le differenze sono state analizzate per mezzo di un test non-parametrico per campioni indipendenti (test U di Mann-Whitney) in quanto non si può supporre una distribuzione normale dei dati vista la numerosità piccola del campione. Per il tasso di gravidanza è stato applicato il test del  $\chi^2$ .

Le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando metodiche standard contenute nel software Prism 4 GraphPad.

## RISULTATI E DISCUSSIONE

### MESSA A PUNTO DEL PROTOCOLLO *IN VITRO* DI FAGOCITOSI DI SPERMATOZOI

#### Differenziamento *in vitro* della linea cellulare THP1

Il differenziamento delle cellule THP1 a macrofagi prevede la stimolazione con PMA (Schwende et al., 1996). Per mettere a punto il protocollo, le cellule sono state mantenute in coltura in sospensione a 37°C (5% CO<sub>2</sub>) ad una concentrazione di 3-5x10<sup>5</sup>/ml per 24, 48 e 72 ore con o senza l'aggiunta di PMA 0,5x10<sup>-8</sup> M e 10<sup>-8</sup> M al mezzo di coltura.

Il differenziamento in senso macrofagico delle cellule THP1 è stato osservato al microscopio ottico e mediante citofluorimetria. Già dopo 24 ore, in presenza di PMA alla concentrazione di 0,5x10<sup>-8</sup> M, ma anche in assenza di PMA, le cellule assumono una morfologia macrofagica. Tale attivazione è stata confermata dall'analisi immunofenotipica: l'espressione di CD11b e CD14, molecole specifiche dei macrofagi, aumenta notevolmente già dopo le prime 24 ore, come mostrato in figura 24.

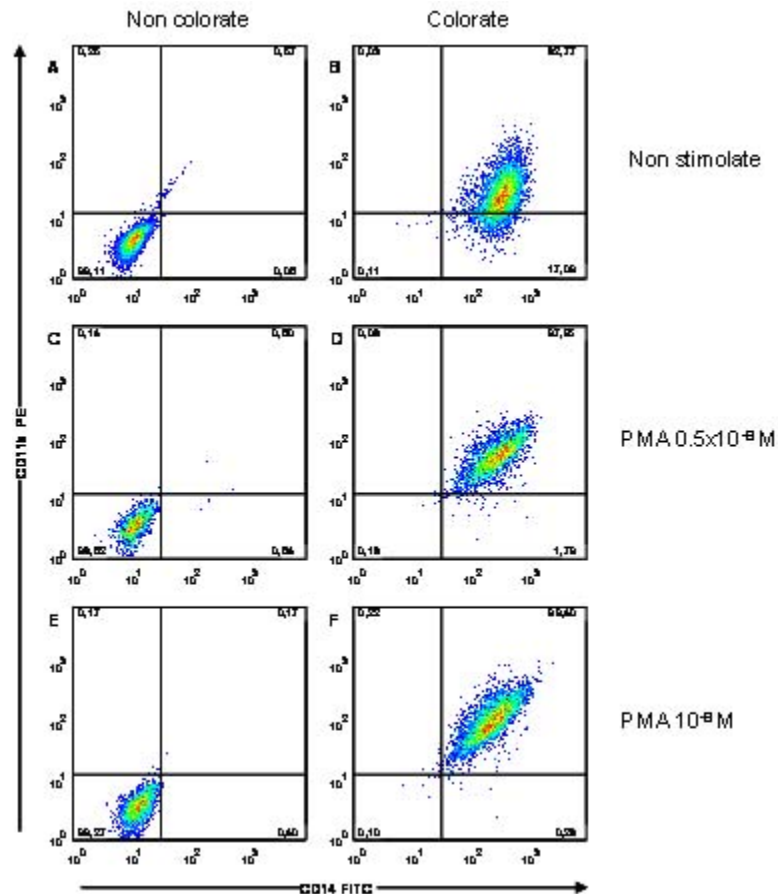


Figura 24. Espressione di CD14 e CD11b di cellule THP1 mantenute in coltura per 24 ore senza stimolo differenziativo (B) e con stimolo differenziativo PMA alla concentrazione di 0,5x10<sup>-8</sup> M (D) e 10<sup>-8</sup> M (F). Per ogni campione sono state valutate anche le cellule non marcate come controllo negativo (A,C,E).

Da questo studio è emerso, inoltre, che la stimolazione con PMA delle cellule THP1 favorisce il loro differenziamento, ma influisce negativamente sull'interpretazione dei risultati, a causa dello *scatter* che assumono le cellule dopo il trattamento (dati non riportati). Infatti, cellule THP1 non stimolate con PMA, nonostante presentino una minor percentuale di fagocitosi (comunque ben evidenziabile), portano a risultati maggiormente riproducibili rispetto a quelle trattate.

### Colorazione di spermatozoi con pHrodo™, SE

Il pHrodo è un colorante che a pH acido emette fluorescenza, rilevabile mediante citometria. L'acidificazione del terreno a pH 4,5 mediante HCl, che mima l'ambiente acido dei fagosomi presenti nei macrofagi, induce un aumento dell'intensità di fluorescenza emessa dagli spermatozoi marcati. Per valutare quale sia la concentrazione ottimale di colorante per il trattamento delle cellule nemaspermiche, sono state testate due concentrazioni di pHrodo (50 ng/ml e 100 ng/ml) che a pH neutro (figura 25) producono un picco di emissione che risulta distinto dal picco di fluorescenza emessa in ambiente acido (pH 4,5).

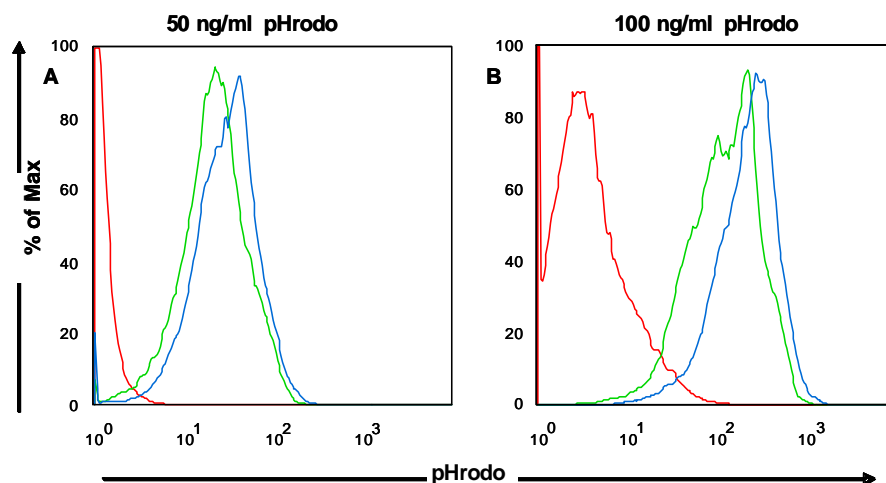


Figura 25. Emissione di fluorescenza di spermatozoi non marcati (linea rossa), marcati con pHrodo (linea verde) e marcati con pHrodo in ambiente acido a pH 4,5 (linea blu). Sono state utilizzate le concentrazioni di pHrodo 50 ng/ml (sinistra) e 100 ng/ml (destra).

Poiché l'intensità di segnale risulta già molto buona a 50 ng/ml, si preferisce questa concentrazione per gli esperimenti di fagocitosi.

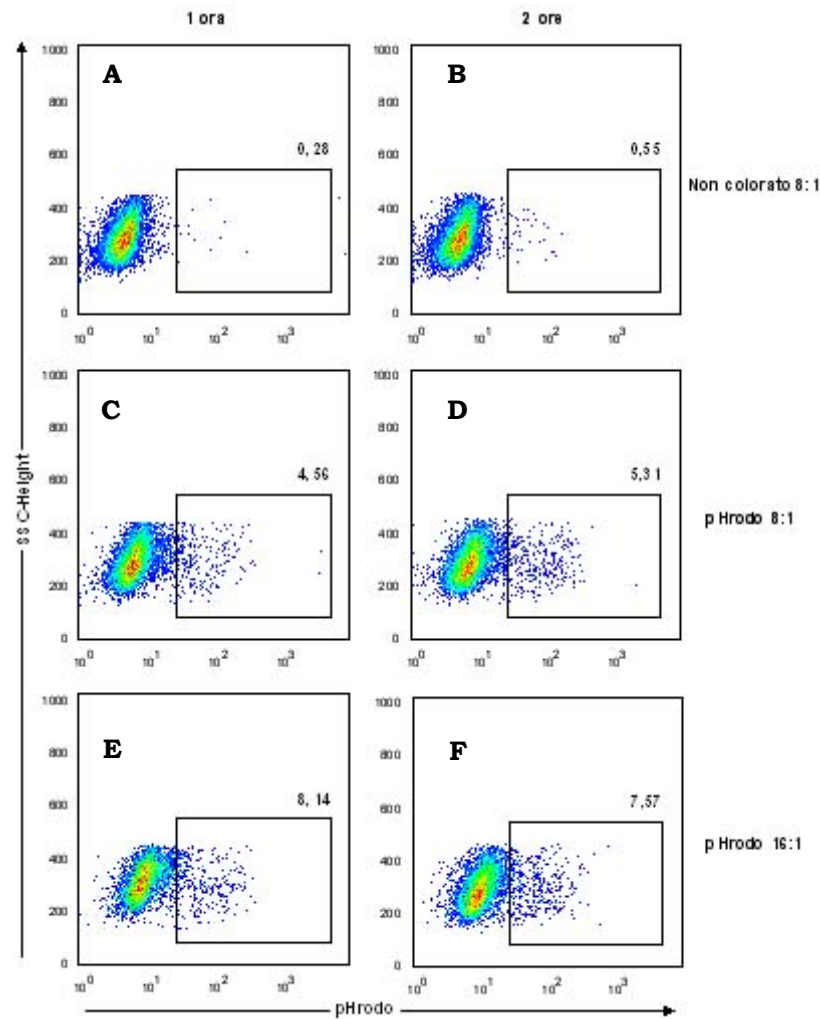
### Fagocitosi *in vitro* di spermatozoi colorati con pHrodo™, SE

Per lo studio della fagocitosi, sono state inizialmente impiegate due concentrazioni di cellule THP1 al fine di avere un rapporto 8:1 e 16:1 spermatozoi/THP1. Le cellule sono state, inoltre, incubate per una e due ore a 37°C.

I risultati ottenuti (figura 26) dimostrano che un aumento della concentrazione

degli spermatozoi comporta un incremento della percentuale di fagocitosi da parte delle cellule THP1. Ciò è evidenziato da un aumento della fluorescenza emessa dalle cellule macrofagiche, in seguito all'internalizzazione degli spermatozoi marcati e successiva processazione degli stessi all'interno dei lisosomi.

La seconda variabile presa in considerazione, ovvero il tempo di incubazione per consentire la fagocitosi, non rappresenta un fattore determinante, in quanto non si osserva un incremento del processo al protrarsi del tempo.



**Figura 26. Studio della fagocitosi con rapporti diversi di THP1/spermatozoi marcati con pHrodo (50 ng/ml). Spermatozoi, in rapporto 8:1 con le cellule THP1, non marcati dopo 1 h (A) e 2 h (B) di incubazione; spermatozoi marcati con pHrodo, in rapporto 8:1 con le cellule THP1, dopo 1 h (C) e 2 h di incubazione (D); spermatozoi marcati con pHrodo, in rapporto 16:1 con le THP1 dopo 1 h (E) e 2 h di incubazione (F).**

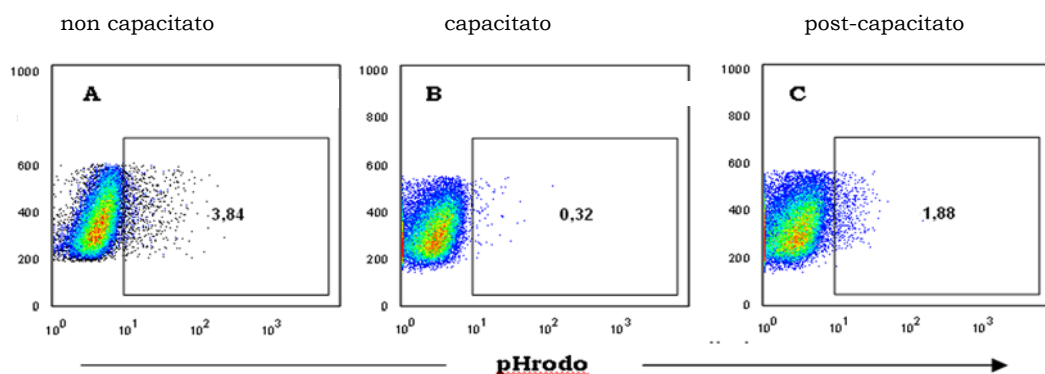
Gli esperimenti preliminari finora descritti hanno permesso di definire il protocollo di fagocitosi *in vitro* di spermatozoi marcati con pHrodo: per ciascun test di fagocitosi sono stati utilizzati spermatozoi e cellule THP1 in rapporto 16:1; gli spermatozoi sono stati colorati con pHrodo ad una concentrazione pari a 50 ng/ml, mentre le cellule THP1 non sono state trattate con PMA e il periodo di incubazione necessario al processo di fagocitosi è di 1 ora.

## Fagocitosi *in vitro* di spermatozoi in diversi stati di attivazione

Dopo aver messo a punto il protocollo, la metodica è stata utilizzata per evidenziare possibili differenze nei livelli di fagocitosi in campioni prima e dopo la capacitazione *in vitro* degli spermatozoi. Per lo studio sono stati presi in considerazione campioni di liquido seminale basale (spermatozoi non capacitati), capacitati e dopo 24 ore a 37°C dalla capacitazione (spermatozoi post-capacitati).

L'esperimento preliminare è stato eseguito con 3 campioni di liquido seminale. In figura 27 sono riportati i risultati ottenuti dall'analisi di un singolo campione esemplificativo che evidenziano come la percentuale di fagocitosi sia strettamente dipendente dallo stato di attivazione dello spermatozoo. Le percentuali di fagocitosi misurate nei tre esperimenti sono piuttosto esigue (1-5%), tuttavia le variazioni del processo in seguito alla capacitazione *in vitro* risultano riproducibili ed in linea con quanto atteso. I risultati, infatti, evidenziano come la capacitazione influisca sulla suscettibilità degli spermatozoi alla fagocitosi: la percentuale di fagocitosi da parte delle cellule THP1 di spermatozoi non capacitati è superiore rispetto a quelle di spermatozoi negli altri due stati di attivazione (3,84% vs 0,32% e 1,88%). Ciò è spiegato probabilmente dal fatto che il campione di spermatozoi non capacitati, ossia il campione di liquido seminale di base, risulta eterogeneo dal punto di vista della vitalità e dei tipi cellulari in esso presenti.

Inoltre, il minor tasso di fagocitosi viene riscontrato, come atteso, prendendo in esame gli spermatozoi capacitati. Ciò è senza dubbio dovuto al fatto che i campioni, essendo ottenuti con la tecnica dello *Swim-up*, che permette un recupero migliore dal punto di vista della motilità e della morfologia, sono arricchiti di spermatozoi vitali e motili.

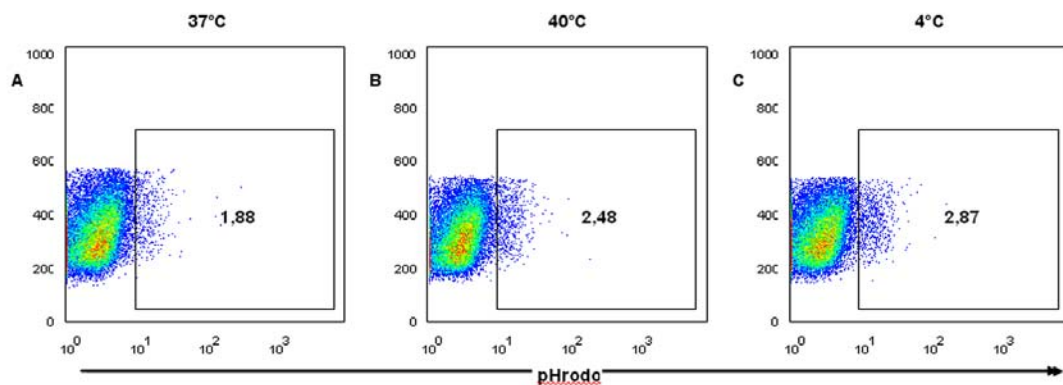


**Figura 27. Fagocitosi *in vitro* di spermatozoi marcati con il pHrodo non capacitati (A), capacitati (B), post-capacitati (C).**

Lo stato di attivazione degli spermatozoi a distanza di 24 ore dalla capacitazione comporta, invece, una maggior fagocitosi rispetto agli spermatozoi capacitati dopo 30 minuti dalla raccolta. Ciò è presumibilmente dovuto al fatto che, come riportato in letteratura, *in vivo* gli spermatozoi post-capacitati, a causa della loro perdita di funzionalità, vanno incontro ad eliminazione (Eisenbach, 2003).

## Fagocitosi *in vitro* di spermatozoi sottoposti a stress termici e chimici

Per valutare se la differenza di fagocitosi di spermatozoi non capacitati, capacitati e post-capacitati da parte delle cellule THP1 (figura 27) non sia il risultato di artefatti sperimentali, ma indichi realmente una diversa suscettibilità degli spermatozoi alla fagocitosi, i campioni post-capacitati sono stati sottoposti a stress termici e chimici. In particolare, prima di eseguire il test di fagocitosi, dopo la colorazione con pHrodo, gli spermatozoi post-capacitati sono stati mantenuti per 30 minuti a tre temperature differenti: 37°C, 40°C e 4°C. Come riportato in figura 28, i livelli di fagocitosi di spermatozoi variano a seconda della temperatura a cui sono mantenuti: 1,88% a 37°C, 2,48% a 40°C e 2,87% a 4°C. L'aumento della percentuale di fagocitosi a temperature inferiori e superiori a quella fisiologica è probabilmente dovuto ad alterazioni che compromettono la funzionalità degli spermatozoi rendendoli maggiormente suscettibili alla fagocitosi.



**Figura 28. Fagocitosi *in vitro* di spermatozoi mantenuti a diverse temperature (37°C, 40°C e 4°C).**

In un secondo esperimento, gli spermatozoi non capacitati sono stati trattati con acido betulinico alla concentrazione di 60 ng/ml, che ha la capacità di indurre l'apoptosi mitocondrio-mediata (Grunewald et al., 2005). In seguito al trattamento, gli spermatozoi apoptotici sono stati marcati con Syto-16 e 7-AAD (Perticarari et al., 2007). I dati ottenuti dimostrano come gli spermatozoi in seguito ad uno stimolo apoptotico, che ne altera le caratteristiche, siano maggiormente vulnerabili alla fagocitosi (dati non riportati).

Gli esperimenti preliminari finora descritti hanno permesso, dunque, di mettere a punto un protocollo *in vitro* di fagocitosi di spermatozoi da parte di cellule THP1. Il test di fagocitosi fornisce risultati riproducibili e permette di valutare cambiamenti di suscettibilità alla fagocitosi in singoli campioni di liquido seminale. In letteratura è riportato un unico lavoro che, mediante la visualizzazione su vetrino in microscopia ottica, ha dimostrato la diversa predisposizione alla fagocitosi di spermatozoi non

capacitati, capacitati e post-capacitati (Oren-Benaroya et al., 2007). Tuttavia tale metodica risulta poco attendibile, in quanto non vi è la certezza assoluta che gli spermatozoi visualizzati al microscopio si trovino effettivamente all'interno del macrofago piuttosto che semplicemente adesi alla sua superficie.

Il test messo a punto in questo lavoro, invece, è in grado di distinguere specificamente la fagocitosi degli spermatozoi, in quanto solo l'internalizzazione degli stessi da parte del macrofago, attraverso l'emissione di fluorescenza del pHrodo, viene rilevata mediante citofluorimetria. Infatti, gli spermatozoi non fagocitati, o solamente adesi ai macrofagi, non vengono rilevati poichè, in ambiente neutro, il pHrodo non è fluorescente.

## **FAGOCITOSI *IN VITRO* DI SPERMATOZOI NELLO STUDIO DELL'INFERTILITÀ**

Il protocollo di fagocitosi è stato, quindi, applicato allo studio della fagocitosi *in vitro* degli spermatozoi di pazienti afferenti alla S.S.D. Procreazione Medicalmente Assistita del Burlo Garofolo. Nello specifico, i soggetti appartengono a coppie a cui è stata diagnosticata una infertilità idiopatica. In questo studio sono stati analizzati 24 campioni di liquido seminale.

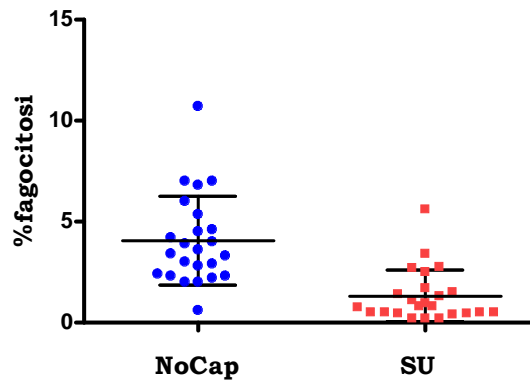
### **Influenza dello stato di capacitazione degli spermatozoi sulla fagocitosi *in vitro***

Di ciascun liquido seminale preso in esame è stato eseguito lo spermioγραμμα, secondo le linee guida del WHO del 1999, valutando in particolare la concentrazione, la motilità progressiva rapida e lenta e la morfologia. I valori ottenuti dai parametri analizzati permettono di definire i liquidi seminali presi in esame in questo studio, come normali o lievemente alterati.

Un'aliquota di ciascun campione è stata utilizzata per il test di fagocitosi e successiva analisi citometrica, mentre un'altra è stata sottoposta a capacitazione *in vitro*. Sia con i campioni capacitati che con quelli post-capacitati (dopo 24h a 37°C) è stato eseguito il test di fagocitosi.

Il grafico in Figura 29, mostra come la suscettibilità degli spermatozoi ad essere fagocitati dipenda strettamente dallo stato di capacitazione in cui si trovano. Infatti la fagocitosi di spermatozoi non capacitati (NoCap) è di  $4.035 \pm 2.2$ , rispetto a quella di spermatozoi capacitati (SU) che risulta essere  $1.304 \pm 1.2$  ( $p < 0.0001$ ). Questa differenza probabilmente è dovuta al fatto che la capacitazione *in vitro* permette la selezione di spermatozoi vitali con caratteristiche migliori sia dal punto di vista della motilità che della morfologia. È un processo che risulta indispensabile *in vitro*, e probabilmente anche *in vivo*, affinché avvenga l'interazione spermatozoo-ovocita. Gli spermatozoi capacitati, infatti, sono cellule che hanno raggiunto lo stadio maturativo che gli permette di legarsi all'ovocita, penetrare in esso e fertilizzarlo (De Jonge, 2005)(Jaiswal et al., 2002) e dunque, come tali, devono persistere lungo la via genitale femminile fino al momento della fecondazione.

I campioni non capacitati, invece, sono costituiti da una popolazione mista di cellule e spermatozoi con diverse caratteristiche di motilità e morfologia, anche non vitali, che quindi mostrano una maggiore predisposizione ad essere fagocitati, in quanto costituiti da forme nemaspermiche non efficaci ai fini della fecondazione.

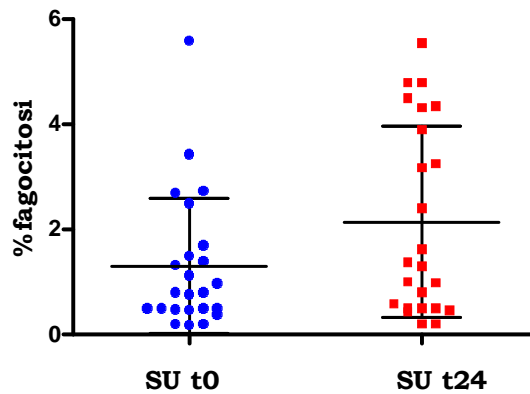


**Figura 29. Fagocitosi (%) di spermatozoi non capacitati (NoCap) e degli stessi dopo capacitazione (SU) ( $p < 0,0001$ ).**

Gli spermatozoi capacitati sono in grado di raggiungere e fertilizzare l'ovocita, ma lo stato capacitato di uno spermatozoo si protrae per un periodo limitato, che dura da 1 a 4 ore *in vitro*, al termine del quale esso inizia a perdere in modo irreversibile la sua funzionalità, mantenendo intatto l'acrosoma (Cohen-Dayag et al., 1995; Giojalas et al., 2004). Il suo riconoscimento ed eliminazione da parte dei macrofagi è, dunque, importante *in vivo* in quanto può interferire con il normale processo di fertilizzazione messo in atto dagli spermatozoi capacitati. La fecondazione, infatti, avviene *in vivo* nell'arco delle 24-36 ore successive all'inseminazione, per cui in queste ore vi è un continuo reclutamento di spermatozoi capacitati e la rimozione di quelli post-capacitati. I post-capacitati presumibilmente vengono riconosciuti ed eliminati dai macrofagi uterini affinché non interferiscano con gli spermatozoi attivati. Tuttavia, non è ancora stato identificato il marker molecolare attraverso cui solo gli spermatozoi meno efficienti vengono riconosciuti e rimossi dai macrofagi.

È stato ipotizzato da alcuni autori che a circa 24 ore dalla capacitazione *in vitro*, il campione si arricchisce di spermatozoi post-capacitati, quindi privi di funzionalità (Eisenbach, 2003; Oren-Benaroya et al., 2007). È stata confrontata, dunque, la fagocitosi degli spermatozoi capacitati ( $SU_{t_0}$ ) con quella di spermatozoi dopo 24 ore dalla capacitazione *in vitro*, ed è stato osservato (Figura 30), un livello maggiore di fagocitosi dei secondi ( $SU_{t_{24}}$ ) rispetto ai primi ( $SU_{t_0}$ ) ( $2.147 \pm 1.8$  vs.  $1.3 \pm 1.3$ ;  $p < 0.05$ ).

Tale differenza risulta statisticamente significativa e probabilmente è dovuta al fatto che terminato il periodo in cui gli spermatozoi risultano attivati, quindi capacitati, si instaurano dei meccanismi molecolari che fanno sì che gli spermatozoi meno efficienti, definiti post-capacitati, vengano riconosciuti ed eliminati dalle cellule THP1.

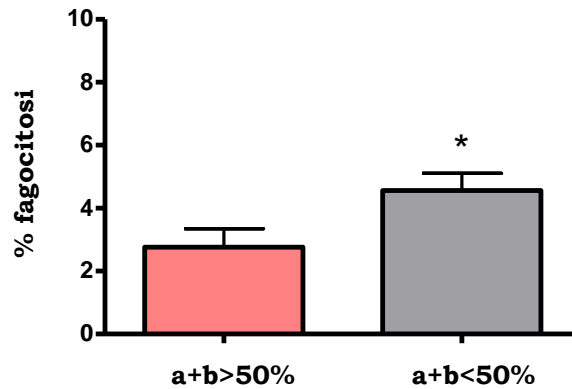


**Figura 30. Fagocitosi di spermatozoi capacitati (SU t<sub>0</sub>) e degli stessi post-capacitati (SU t<sub>24</sub>)(p-value<0,05).**

### **Correlazione tra alcuni parametri del liquido seminale e la fagocitosi *in vitro* di spermatozoi non capacitati**

È stata, inoltre, valutata l'influenza di alcuni parametri nemaspermici quali motilità e morfologia, sul processo di fagocitosi di spermatozoi allo stato basale.

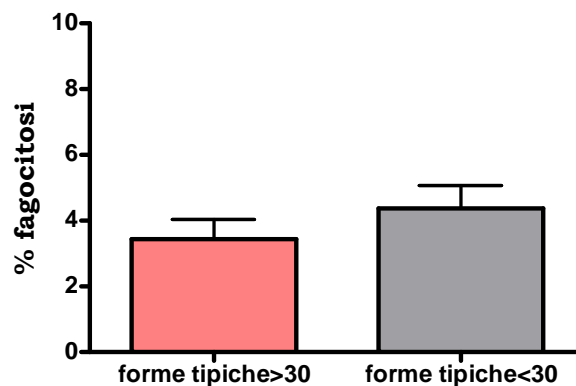
Per quanto concerne la motilità, i campioni sono stati suddivisi in due gruppi: normali, se la percentuale di spermatozoi con motilità rettilinea rapida e lenta (a+b) era  $\geq 50\%$ ; astenozoospermici, se la percentuale di spermatozoi con motilità rettilinea rapida e lenta (a+b) era  $< 50\%$  (WHO, 1999). Dal confronto dei risultati ottenuti dagli esperimenti di fagocitosi degli spermatozoi appartenenti ai due diversi gruppi emerge, come illustrato in Figura 31, che tale processo avviene in misura preponderante nei liquidi seminali in cui la motilità degli spermatozoi risulta alterata. La differenza del tasso di fagocitosi risulta statisticamente significativa ( $2.764 \pm 0.58$  vs.  $4.559 \pm 0.55$   $p < 0,05$ ), e da ciò si può dedurre che il parametro nemaspermico analizzato è una variabile determinante la suscettibilità alla fagocitosi. La motilità è, infatti, una delle caratteristiche fondamentali dello spermatozoo. Essa è acquisita mediante un complesso processo di maturazione e permette allo spermatozoo di raggiungere l'ovocita. Dunque campioni in cui la motilità di una gran percentuale di spermatozoi risulta alterata mostrano maggiori livelli di fagocitosi probabilmente perché la bassa motilità è riflesso di una bassa funzionalità e quindi in campioni astenozoospermici vi è una maggior concentrazione di spermatozoi poco funzionali.



**Figura 31. Fagocitosi *in vitro* di spermatozoi non capacitati con motilità a+b≥50% (normali) e con motilità a+b<50% (astenozoospermici) (p value<0,05).**

È stata analizzata, inoltre, la correlazione tra la morfologia degli spermatozoi ed i livelli di fagocitosi *in vitro* degli stessi. A tale scopo i campioni sono stati ripartiti in due gruppi: normali, se la percentuale di spermatozoi con morfologia tipica risultava ≥30%; teratozoospermici se la percentuale di spermatozoi con morfologia tipica risultava <30% (WHO, 1999).

Come riportato in Figura 32, nonostante la differenza nei livelli di fagocitosi tra i due gruppi analizzati non sia significativa (3.426±0.59 *vs.* 4.371±0.68; p>0.05.), si può osservare come tale processo sia lievemente più accentuato nei liquidi seminali teratozoospermici rispetto ai campioni normozoospermici. Questa differenza potrebbe, probabilmente, assumere una rilevanza statistica, qualora aumentasse il numero dei campioni in esame. Si può, dunque, supporre che anche la morfologia sia una caratteristica fondamentale dello spermatozoo che, se alterata, attiva qualche meccanismo che favorisce la rimozione dello stesso mediante fagocitosi.



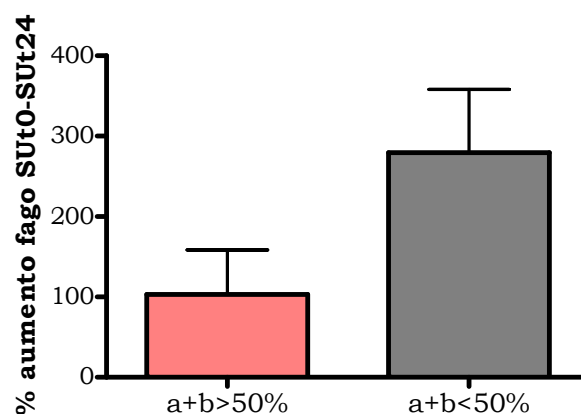
**Figura 32. Fagocitosi *in vitro* di spermatozoi di liquidi seminali normozoospermici (forme tipiche≥30%) e teratozoospermici (forme tipiche<30%) (p>0.05.).**

## **Correlazione tra alcuni parametri del liquido seminale e l'aumento della fagocitosi *in vitro* di spermatozoi post-capacitati rispetto a spermatozoi capacitati**

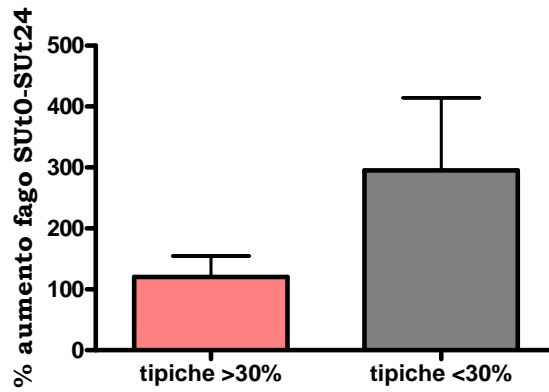
La capacitazione *in vitro* permette la selezione dall'eiaculato di spermatozoi vitali (Henkel and Schill, 2003) con migliori caratteristiche di morfologia e motilità, quindi liquidi seminali astenozoospermici e teratozoospermici di partenza, teoricamente in seguito alla capacitazione vengono privati delle forme anomale dal punto di vista della motilità e della morfologia e quindi contengono solo spermatozoi di buona qualità.

È stato ipotizzato che l'aumento di fagocitosi del campione post-capacitato rispetto al capacitato (figura 30) fosse legato ad anomalie in termini di motilità e di morfologia del campione di partenza che quindi rendono gli spermatozoi capacitati e post-capacitati più suscettibili alla fagocitosi.

Dall'analisi statistica dei livelli di fagocitosi *in vitro* degli spermatozoi capacitati ( $SU_{t0}$ ) e degli stessi mantenuti a 37°C per 24 ore ( $SU_{t24}$  post-capacitati) e raggruppando gli stessi in base alla motilità e alla morfologia degli spermatozoi del campione di base, emerge che laddove il parametro di motilità o di morfologia risultano alterati (per cui la percentuale di spermatozoi con motilità progressiva a+b è <50%, o la percentuale di spermatozoi con morfologia normale è <30%) si ha un maggior aumento di fagocitosi del post-capacitato rispetto al campione capacitato (279,6±78,6 vs. 103,3±55,4 Figura 33, 295,2±119,3 vs. 120,2±34,31 Figura 34,). Tale aumento, non risulta significativo, ma potrebbe assumere una rilevanza statistica qualora aumentasse il numero di campioni presi in esame.



**Figura 33. Aumento (%) di fagocitosi *in vitro* di spermatozoi post-capacitati in relazione alla motilità degli spermatozoi del liquido seminale di base (a+b < 50% e a+b > 50%)(p value n.s.).**



**Figura 34. Aumento (%) di fagocitosi *in vitro* di spermatozoi post-capacitati in relazione alla morfologia degli spermatozoi del liquido seminale di base (forme tipiche < 30% e > 30%)(p value ns.).**

I campioni che in partenza erano teratozoospermici e astenozoospermici, nonostante la selezione degli spermatozoi migliori mediante capacitazione, potrebbero presentare qualche caratteristica intrinseca, come l'espressione di specifiche proteine sulla membrana, che persiste anche dopo la capacitazione. Questo potrebbe spiegare il maggior aumento di fagocitosi del post-capacitato rispetto al capacitato.

# **EFFETTI DELLA LEUCOCITOSPERMIA SUI PARAMETRI DEL LIQUIDO SEMINALE E SULL'OUTCOME DELLE TECNICHE DI FECONDAZIONE *IN VITRO***

## **Determinazione dei leucociti seminali**

La leucocitospermia è definita dall'Organizzazione Mondiale della Sanità come la condizione in cui il numero di leucociti supera il valore di  $1 \times 10^6$  su millilitro di liquido seminale. Tale condizione ha un'incidenza nei maschi infertili di circa il 20% (Wolff, 1995). Tuttavia, la valutazione degli effetti di un'eccessiva concentrazione di leucociti nel liquido seminale su alcuni parametri dello stesso e sugli esiti delle tecniche di fecondazione *in vitro* rappresenta un argomento ancora dibattuto.

A tal proposito, sono stati studiati i liquidi seminali di 150 pazienti provenienti da coppie infertili sottoposte alle tecniche di procreazione medicalmente assistita di secondo livello (FIVET e ICSI) presso il centro del I.R.C.C.S. Burlo Garofolo.

Al momento del prelievo degli ovociti, prima della fecondazione *in vitro*, sono state valutate, per ciascun campione di liquido seminale, la concentrazione di spermatozoi, la motilità progressiva rapida e lenta, la concentrazione di cellule rotonde ed è stata effettuata la conta dei PMN mediante il test della perossidasi (Figura 35) secondo le linee guida stabilite dalla WHO nel 1999 e descritte nei materiali e metodi. Un'aliquota di ciascun liquido seminale è stata utilizzata per la conta e la tipizzazione dei leucociti mediante citofluorimetria.

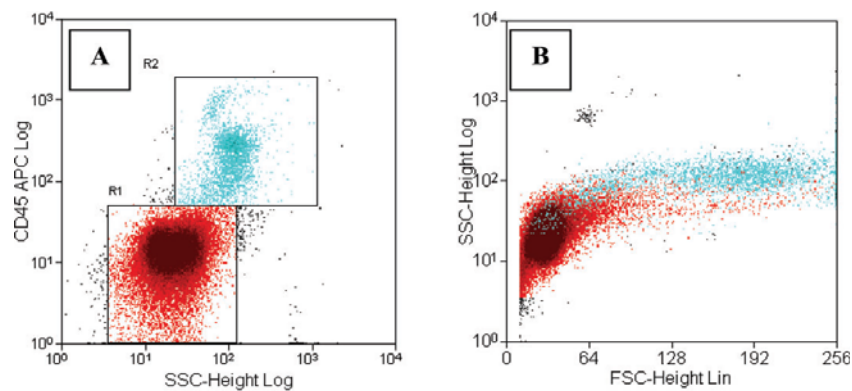


**Figura 35. Cellula perossidasi-positiva (P, rossa) e cellula perossidasi-negativa (N, incolore) su uno striscio di liquido seminale osservato al microscopio ottico ad un ingrandimento 400X.**

Il test della perossidasi per la valutazione della leucocitospermia, è una metodica economica, rapida, ma imprecisa e soprattutto dipendente dall'operatore che effettua la conta al microscopio; inoltre, la sensibilità del test si riduce in presenza di basse concentrazioni di leucociti nel liquido seminale (Ricci, 2000). In letteratura sono

riportati degli studi che mettono in relazione la conta dei leucociti seminali effettuata mediante il test della perossidasi o mediante tecniche che prevedono l'uso di anticorpi monoclonali che riconoscono i leucociti, da cui è emerso che il metodo standard risulta inaccurato e le due tecniche non paragonabili. Il metodo standard infatti non identifica circa il 50% dei pazienti che invece risultano leucocitospermici con il metodo di immunofluorescenza (Henkel et al., 2003; Villegas et al., 2002).

Il test citometrico, invece, è sicuramente un test più costoso, ma più oggettivo, permette di distinguere con precisione le diverse popolazioni leucocitarie (monociti, polimorfonucleati ed anche linfociti) sulla base dell'espressione del CD45 e, con l'ausilio delle biglie e di alcuni marcatori nucleari (Syto16) e leucocitari, consente anche una conta assoluta e distinta di tutte le cellule presenti (leucociti e spermatozoi) in ciascun campione preso in esame (Figura 36).



**Figura 36. Analisi rappresentativa della presenza di leucociti nel liquido seminale. I dot plots A e B mostrano un campione in cui i leucociti sono marcati con anti-CD45 APC (elementi in azzurro), mentre gli spermatozoi con Syto-16 (elementi in rosso). (Perticarari et al. 2007)**

I campioni analizzati al citometro sono stati suddivisi in 36 leucocitospermici e 114 non leucocitospermici in relazione alla concentrazione di leucociti; 46 liquidi seminali sono stati sottoposti a FIVET, di cui 9 leucocitospermici e 37 non leucocitospermici, mentre 104 liquidi seminali ad ICSI, di cui 27 leucocitospermici e 77 non leucocitospermici. La mediana della concentrazione (tabella 37) dei leucociti nei 36 pazienti leucocitospermici è di  $1,8 \times 10^6/\text{ml}$  (1-3,4) e nei 114 non leucocitospermici  $0,18 \times 10^6/\text{ml}$  (0,09-0,3) ( $p < 0,0001$ ). A parità di dati ottenuti nei pazienti non leucocitospermici sottoposti alle due metodiche FIVET ( $0,2 \times 10^6/\text{ml}$ ) ed ICSI ( $0,18 \times 10^6/\text{ml}$ ), la leucocitospermia risulta, invece, più elevata nel gruppo di liquidi sottoposti a FIVET ( $2,3 \times 10^6/\text{ml}$ , 1,25-3), rispetto a quelli sottoposti a ICSI ( $1,7 \times 10^6/\text{ml}$ , 1-4,6).

## **Effetti della leucocitospermia sui parametri del liquido seminale**

I parametri del liquido seminale presi in considerazione per la valutazione degli effetti della leucocitospermia sono la concentrazione e la motilità progressiva rapida (a%) e lenta (b%) degli spermatozoi.

Sono stati analizzati 150 campioni di liquido seminale di pazienti infertili sottoposti alle tecniche di fecondazione *in vitro*, e come descritto in Tabella 37, è emerso che alte concentrazioni di leucociti correlano negativamente sia con la concentrazione che con la motilità degli spermatozoi. In particolare la concentrazione degli spermatozoi dei non leucocitospermici risulta essere  $31,5 \times 10^6/\text{ml}$  (8,7-70), e nei leucocitospermici  $2,5 \times 10^6/\text{ml}$  (1-26,5) ( $p < 0,001$ ), mentre la motilità progressiva rapida e lenta varia dal 30% (15-40) al 20% (10-35) rispettivamente ( $p < 0,05$ ).

I risultati qui riportati sono in linea con quanto descritto da alcuni autori. Aziz et al. (2004) hanno analizzato i liquidi seminali di pazienti infertili e di donatori fertili ed hanno osservato che la motilità è influenzata dalla presenza di elevate concentrazioni di leucociti nel liquido seminale. Più recentemente Yilmaz et al. (2005) hanno valutato gli effetti della leucocitospermia sugli spermatozoi di pazienti infertili sottoposti a ICSI, da cui è emerso che la motilità è compromessa in presenza di alti livelli di leucociti nel liquido seminale. In un modello di leucocitospermia *in vitro*, inoltre, l'aggiunta di polimorfonucleati e batteri *E.coli* a spermatozoi comporta una riduzione della motilità progressiva degli spermatozoi (Diemer et al., 2003).

Tuttavia, se i campioni sottoposti a FIVET e ICSI, dello studio presentato in questa ricerca, vengono presi in esame separatamente, si può osservare come la differenza di motilità degli spermatozoi non risulti più correlata in maniera significativa alla leucocitospermia. In particolare, nel gruppo ICSI, il livello di motilità progressiva rapida e lenta si riduce con la presenza di concentrazioni di leucociti superiori al livello di normalità (20% nei non leucocitospermici *vs.* 15% nei leucocitospermici)(Tabella 39).

Nel gruppo FIVET, invece, non solo non c'è una differenza statisticamente significativa, ma la motilità progressiva rapida e lenta tende all'aumento in presenza di alte concentrazioni di leucociti (40% *vs.* 50%)(Tabella 38). Questa diversa tendenza nei gruppi ICSI e FIVET può derivare dal fatto che, generalmente, i parametri nemaspermici dei campioni destinati alla FIVET risultano migliori rispetto a quelli dei campioni destinati alla ICSI, basti osservare i diversi valori di motilità nei due gruppi. Inoltre, in questo studio, i campioni FIVET mostrano un tasso di leucocitospermia superiore a quello dei campioni ICSI ( $2,3 \times 10^6/\text{ml}$  *vs.*  $1,7 \times 10^6/\text{ml}$ ) ed alcuni autori hanno dimostrato che concentrazioni di leucociti di gran lunga superiori al valore definito di normalità possono avere un effetto positivo sulla motilità degli spermatozoi (Kaleli et al., 2000). Tale effetto può essere dovuto alla fusione dei prostasomi con gli spermatozoi in ambiente acido (Arienti et al., 2004) e al fatto che processi infiammatori cronici delle vescichette seminali possono abbassare il pH del liquido

<b>FIVET+ICSI</b>	<b>LEUCOCITOSPERMICI</b>		<b>NON LEUCOCITOSPERMICI</b>	<b>p</b>
	n=36		n=114	
concentrazione leucociti ( $\times 10^6/ml$ )	1,8 (1-3,4)		0,18 (0,09-0,3)	<0,0001
concentrazione spermatozoi ( $\times 10^6/ml$ )	2,5 (1-26,5)		31,5 (8,7-70)	<0,001
motilità progressiva a+b (%)	20 (10-35)		30 (15-40)	<0,05
tasso di fecondazione (%)	66 (50-80)		73,2 (50-100)	n.s.
sviluppo embrionale (%)	100 (80-100)		100 (93,7-100)	n.s.
sviluppo embrioni buona qualità (%)	100 (40-100)		100 (50-100)	n.s.
sviluppo embrioni cattiva qualità (%)	0 (0-33,3)		0 (0-33,3)	n.s.
tasso di gravidanza (%)*	35,7 (20,6-54,2)		31,2 (22,8-41,1)	n.s.

**Tabella 37. Confronto tra concentrazione di leucociti, parametri seminali ed esiti di FIVET e ICSI in campioni leucocitospermici e non leucocitospermici. I valori sono rappresentati come mediane e range interquartili. Il test usato è il Mann-Whitney. Il tasso di gravidanza è rappresentato come media ed è stato usato il  $\chi^2$  per il confronto tra i tassi.**

<b>FIVET</b>	<b>LEUCOCITOSPERMICI</b>		<b>NON LEUCOCITOSPERMICI</b>	<b>p</b>
	n=9		n=37	
concentrazione leucociti ( $\times 10^6/ml$ )	2,3 (1,25-3)		0,2 (0,08-0,3)	<0,0001
concentrazione spermatozoi ( $\times 10^6/ml$ )	80 (41,5-157,5)		60 (38,5-97,5)	n.s.
motilità progressiva a+b (%)	50 (40-55)		40 (30-50)	n.s.
tasso di fecondazione (%)	66 (35-81,6)		75 (50-91,6)	n.s.
sviluppo embrionale (%)	100 (77,5-100)		100 (75-100)	n.s.
sviluppo embrioni buona qualità (%)	100 (56,2-100)		66,67 (40-100)	n.s.
sviluppo embrioni cattiva qualità (%)	0 (0-37,5)		0 (0-55)	n.s.
tasso di gravidanza (%)*	57,1 (25-84,2)		31,2 (17,8-48,7)	n.s.

**Tabella 38. Confronto tra concentrazione di leucociti, parametri seminali ed esiti della FIVET in campioni leucocitospermici e non leucocitospermici. I valori sono rappresentati come mediane e range interquartili. Il test usato è il Mann-Whitney. Il tasso di gravidanza è rappresentato come media ed è stato usato il  $\chi^2$  per il confronto tra i tassi.**

<b>ICSI</b>	<b>LEUCOCITOSPERMICI</b>		<b>NON LEUCOCITOSPERMICI</b>	<b>p</b>
	n=27		n=77	
concentrazione leucociti ( $\times 10^6/ml$ )	1,7 (1-4,6)		0,18 (0,1-0,7)	<0,0001
concentrazione spermatozoi ( $\times 10^6/ml$ )	10 (2-18)		17 (4-50)	n.s.
motilità progressiva a+b (%)	15 (5-25)		20 (10-35)	n.s.
tasso di fecondazione (%)	66 (50-80)		70 (50-100)	n.s.
sviluppo embrionale (%)	100 (85-100)		100 (100-100)	n.s.
sviluppo embrioni buona qualità (%)	100(40-100)		100 (66,7-100)	n.s.
sviluppo embrioni cattiva qualità (%)	0 (0-33,3)		0 (0-55)	n.s.
tasso di gravidanza (%)*	28,6 (13,5-50,2)		31,2 (21,2-43,4)	n.s.

**Tabella 39. Confronto tra concentrazione di leucociti, parametri seminali ed esiti della ICSI in campioni leucocitospermici e non leucocitospermici. I valori sono rappresentati come mediane e range interquartili. Il test usato è il Mann-Whitney. Il tasso di gravidanza è rappresentato come media ed è stato usato il  $\chi^2$  per il confronto tra i tassi.**

seminale e dunque provocare tale fusione, favorendo così un aumento della motilità degli spermatozoi (Glezerman et al., 1993). Anche le poliammine, un importante gruppo di enzimi ritrovato nella secrezione prostatica, sembra incrementare la motilità degli spermatozoi (Morales et al., 2003).

Il secondo parametro analizzato in questo studio è la concentrazione degli spermatozoi. Considerando tutti i 150 campioni di liquido seminale, è emerso che anche tale parametro è correlato alla leucocitospermia ( $31,5 \times 10^6/\text{ml}$  vs.  $2,5 \times 10^6/\text{ml}$ ,  $p < 0,001$ ) (Tabella 37), cioè alte concentrazioni di leucociti nel liquido seminale comportano una riduzione della concentrazione degli spermatozoi. Questo dato risulta in linea con quello ottenuto da altri autori (Hammadeh et al., 2008; Lemkecher et al., 2005; Wolff et al., 1990; Yilmaz et al., 2005). L'effetto negativo sulla concentrazione degli spermatozoi potrebbe essere dovuto ad un rilascio di radicali liberi dell'ossigeno da parte dei leucociti, che risulta superiore alla capacità di eliminazione dei normali meccanismi antiossidanti presenti nel seme, rendendoli dunque maggiormente suscettibili alla fagocitosi e quindi alla loro rimozione da parte dei macrofagi (Menkveld, 2004) (Pasqualotto et al., 2008; Pelliccione et al., 2009).

Al contrario, altri autori non trovano alcuna correlazione in proposito (Aziz et al., 2004b; Henkel et al., 2003; Lackner et al., 2008; Rodin et al., 2003; Ziyat et al., 2008) e anche nello studio descritto in questo lavoro, se i campioni destinati a FIVET vengono esaminati distintamente da quelli destinati a ICSI, si può notare come la leucocitospermia non abbia alcun effetto sul parametro nemaspermico analizzato (Tabella 38 e Tabella 39). In particolare, sebbene la differenza non sia significativa, nei campioni leucocitospermici destinati a ICSI la concentrazione degli spermatozoi è inferiore a quella dei non leucocitospermici (rispettivamente  $10$  vs.  $17 \times 10^6/\text{ml}$ ); mentre nei campioni FIVET la situazione risulta invertita, per cui c'è una tendenza all'aumento della concentrazione degli spermatozoi nei leucocitospermici rispetto ai non leucocitospermici ( $80$  vs.  $60 \times 10^6/\text{ml}$ ). Sebbene i campioni ICSI non siano stati distinti da quelli FIVET, un risultato analogo è stato ottenuto da Lackner et al. e da Kaleli et al. (Kaleli et al., 2000; Lackner et al., 2008): il primo studio non individua una correlazione statisticamente significativa, forse a causa del ridotto numero di campioni presi in esame, tuttavia acquisisce significatività nel secondo lavoro, dove il numero di liquidi seminali analizzati risulta molto elevato ( $n=219$ ).

Dunque, analogamente a quanto descritto per la motilità, in questo studio si osserva una diversa tendenza tra i campioni ICSI e i campioni FIVET nei confronti della concentrazione degli spermatozoi in assenza o in presenza di alte concentrazioni di leucociti (diminuisce nella ICSI, mentre aumenta nella FIVET). Questa differenza potrebbe trovare, ancora una volta, una spiegazione nel fatto che i campioni FIVET leucocitospermici presentano una concentrazione di leucociti superiore a quella dei campioni ICSI leucocitospermici ( $2,3 \times 10^6/\text{ml}$  vs.  $1,7 \times 10^6/\text{ml}$ ), ed inoltre nel fatto che in generale i campioni FIVET sono più ricchi di spermatozoi rispetto a quelli ICSI.

Nella FIVET, dunque, alte concentrazioni di spermatozoi comportano una maggior presenza di forme anomale, le quali potrebbero attirare un maggior numero di leucociti che comporterebbero la loro eliminazione attraverso la fagocitosi, migliorando quindi la qualità del liquido seminale, sia in termini di motilità che di concentrazione degli spermatozoi (Kiessling et al., 1995). Kaleli dimostra a tal proposito che all'aumentare della concentrazione dei leucociti nel liquido seminale aumenta anche la concentrazione degli spermatozoi (Kaleli et al., 2000).

In conclusione da questo studio è emerso che, in generale, la leucocitospermia esercita effetti negativi sui parametri del liquido seminale. Tuttavia risulta necessario effettuare un'analisi distinta tra i campioni FIVET e ICSI perché i campioni FIVET includono, come presupposto alla metodica di fecondazione *in vitro*, campioni di liquido seminale con caratteristiche migliori rispetto a quelli ICSI. Analizzando distintamente i campioni, è dunque emersa una tendenza opposta nella variazione dei parametri nemaspermici nei due gruppi FIVET e ICSI in risposta alla leucocitospermia. È inoltre da tenere in considerazione che il numero di campioni FIVET analizzati è inferiore a quello dei campioni ICSI (46 *vs.* 104), dunque la mescolanza delle due tecniche porta a risultati che non esprimono una reale differenza tra campioni leucocitospermici e non, ma che potrebbe essere il risultato di un diverso peso dei due gruppi FIVET e ICSI sull'analisi statistica.

La discrepanza dei dati riportati nei vari studi presenti in letteratura e nello studio qui descritto, può essere dovuta ai diversi metodi utilizzati per la valutazione della concentrazione dei leucociti seminali (test della perossidasi, metodi immunocitochimici, citofluorimetrici, ecc.), alle diverse caratteristiche delle popolazioni studiate, alle cause di infiltrazione leucocitaria nei campioni analizzati, alle caratteristiche ambientali e geografiche.

### **Effetti della leucocitospermia sugli esiti delle tecniche di fecondazione *in vitro* (FIVET e ICSI)**

I parametri presi in considerazione nell'analisi dell'influenza della leucocitospermia sull'*outcome* delle tecniche di fecondazione *in vitro* sono i tassi di fertilizzazione, i tassi di sviluppo embrionale, i tassi di sviluppo di embrioni di buona qualità, i tassi di sviluppo di embrioni di cattiva qualità e i tassi di gravidanza.

Vi sono pochi studi che valutano gli effetti della leucocitospermia sugli esiti delle tecniche di fecondazione *in vitro*. Alcuni analizzano solo campioni ICSI, altri campioni FIVET e ICSI assieme. Questo studio, invece, è il primo in cui sono stati valutati gli effetti della leucocitospermia sugli esiti delle tecniche IVF analizzando i campioni leucocitospermici ICSI e FIVET assieme, ma anche valutando i risultati provenienti dall'analisi distinta dei campioni utilizzati per le due tecniche.

Analizzando i tassi di fertilizzazione, come riportato nelle Tabelle 37, 38 e 39,

emerge che alte concentrazioni di leucociti nel liquido seminale non influenzano in maniera significativa la fertilizzazione degli ovociti. Ciò è in linea con quanto riportato in letteratura da alcuni autori (Henkel et al., 2003; Lackner et al., 2008). Tuttavia, sia nei campioni FIVET che nei campioni ICSI si nota una tendenza alla diminuzione del tasso di fertilizzazione in presenza di alte concentrazioni di leucociti. In particolare, i campioni FIVET presentano un tasso di fertilizzazione che varia da 75% (50-91,6) in assenza di leucocitospermia a 66% (35-81,6) in presenza di leucocitospermia (p-value n.s.), mentre nei campioni ICSI il tasso di fertilizzazione varia rispettivamente da 70% (50-100) a 66% (50-80)(p-value n.s.).

Alcuni lavori suggeriscono che il tasso di fertilizzazione è influenzato dalla concentrazione dei leucociti. De Geyter et al. dimostrano che il tasso diminuisce nella FIVET solo in presenza di concentrazioni di leucociti superiori a  $6 \times 10^6$ /ml, e Vicino et al. confermano tale risultato anche in ICSI (De Geyter et al., 1994; Vicino et al., 1999). Yilmaz et al. ottengono un risultato analogo, ma analizzando solo i campioni ICSI. Dunque, i risultati ottenuti nel lavoro qui riportato, sembrano essere verosimili, in quanto è noto che campioni leucocitospermici causano uno stress ossidativo tale da danneggiare il DNA degli spermatozoi e quindi la loro funzionalità (Sharma et al., 2001), inoltre la percentuale di spermatozoi con DNA frammentato sembra essere correlata negativamente con i tassi di fertilizzazione in seguito a FIVET (Sun et al., 1997) e ICSI (Lopes et al., 1998).

Dall'analisi congiunta dei gruppi FIVET e ICSI non emerge alcuna correlazione tra la leucocitospermia e il tasso di sviluppo embrionale (Tabella 37), che risulta pari a 100% (80-100) nei leucocitospermici e 100% (93,7-100) nei non leucocitospermici (p-value n.s.). Gli stessi risultati sono stati ottenuti analizzando distintamente i campioni FIVET da quelli ICSI (Tabelle 38 e 39), i primi, infatti, presentano un tasso di sviluppo embrionale pari a 100% (77,5-100) in presenza di leucocitospermia e 100% (75-100) in assenza di tale condizione (p-value n.s.). Alcuni autori sostengono che la presenza di concentrazioni elevate di leucociti influenza lo sviluppo embrionale (Vicino et al., 1999; Yilmaz et al., 2005), ma quest'ultimo parametro è stato calcolato in maniera diversa da quella presentata in questa ricerca, ossia tenendo conto del numero totale di ovociti inseminati.

Per quanto riguarda i tassi di sviluppo di embrioni di buona e di cattiva qualità, da questo lavoro non emerge alcuna correlazione con la presenza di eccessive concentrazioni di leucociti. Non c'è differenza significativa tra campioni ICSI e FIVET leucocitospermici e non leucocitospermici sulla qualità degli embrioni (Tabella 37)(rispettivamente 100% vs. 100% per embrioni di buona qualità e 0% vs. 0% per embrioni di cattiva qualità, p-value n.s.) e ciò si riscontra anche prendendo in considerazione separatamente i due gruppi FIVET e ICSI (nel primo gruppo 100% nei leucocitospermici vs. 66,6% nei non leucocitospermici per embrioni di buona qualità e 0% vs. 0% per embrioni di cattiva qualità, p-value n.s., Tabella 38; nel secondo gruppo

100% nei leucocitospermici *vs.* 100% nei non leucocitospermici per embrioni di buona qualità e 0% *vs.* 0% per embrioni di cattiva qualità, p-value n.s., Tabella 39). Questi risultati confermano quanto dimostrato da Tesarik, che afferma che, nonostante il tasso di spermatozoi con danno al DNA sia più elevato in presenza di leucocitospermia (Erenpreiss et al., 2002), tuttavia questo non ha apparentemente alcun effetto negativo sullo sviluppo e sulla qualità degli embrioni (Tesarik et al., 2004).

Nonostante il numero esiguo di lavori presenti in letteratura che valutano le percentuali di gravidanza in relazione alla leucocitospermia, le conclusioni risultano concordi con l'assenza di una correlazione statisticamente significativa (Henkel et al., 2003; Lackner et al., 2008; Yilmaz et al., 2005). Anche i risultati ottenuti in questo lavoro sono in linea con quanto riportato in letteratura. Infatti, i tassi di gravidanza non variano in relazione alla presenza di leucociti né analizzando i campioni FIVET e ICSI assieme (Tabella 37, 35,7% nei leucocitospermici *vs.* 31,2% nei non leucocitospermici, p-value n.s.), né analizzando i campioni FIVET (Tabella 38, 57,1% *vs.* 31,2%, p-value n.s.), né analizzando i campioni ICSI (Tabella 39, 28,6% *vs.* 31,2%, p-value n.s.). Tale fenomeno potrebbe essere dovuto al fatto che, dal momento che la fecondazione è avvenuta e gli embrioni si sono sviluppati, non c'è ragione per cui la leucocitospermia possa avere effetti negativi sulla gravidanza.

## CONCLUSIONI

La citometria a flusso è una tecnica valida e precisa per l'analisi di alcune caratteristiche del liquido seminale, tuttavia le linee guida del WHO (1999) non ne prevedono l'utilizzo nella *routine* della clinica andrologica.

In questo lavoro sono stati analizzati mediante tale tecnica alcuni parametri del liquido seminale in due studi distinti. In particolare sono stati studiati la fagocitosi *in vitro* degli spermatozoi e la presenza di leucociti in campioni di liquido seminale di pazienti affetti da infertilità.

La fagocitosi degli spermatozoi è un processo che avviene normalmente *in vivo* nell'apparato genitale femminile e non è noto se tale processo interferisca o meno con la fecondazione. In letteratura non sono presenti molti studi a riguardo a causa dei limiti delle tecnologie applicabili. Pertanto, in questo lavoro sono state individuate, in primis, le condizioni sperimentali ottimali per la valutazione del processo di fagocitosi *in vitro* di spermatozoi; successivamente, la metodica è stata applicata per valutare spermatozoi di liquidi seminali appartenenti a pazienti affetti da infertilità idiopatica. Dai dati ottenuti è emerso che la presenza di alterazioni, seppur lievi, a carico della motilità e della morfologia degli spermatozoi rendono questi ultimi maggiormente suscettibili alla fagocitosi rispetto a campioni normali. Inoltre lo stato di capacitazione degli spermatozoi influisce sulla fagocitosi degli stessi, in particolare, gli spermatozoi allo stato basale sono maggiormente fagocitati rispetto a spermatozoi capacitati *in vitro* e post-capacitati. La capacitazione *in vitro* seleziona dal campione di liquido seminale di partenza gli spermatozoi con migliore motilità e morfologia, e rappresenta una pratica fondamentale nelle tecniche di procreazione medicalmente assistita. Tuttavia, laddove i parametri nemaspermici risultano alterati, si è osservato un aumento del livello di fagocitosi dei post-capacitati rispetto ai capacitati, e ciò è probabilmente dovuto a cambiamenti molecolari o caratteristiche intrinseche degli spermatozoi basali, ancora non noti, che li rendono maggiormente vulnerabili alla fagocitosi anche dopo la capacitazione.

Il secondo studio qui riportato riguarda l'analisi degli effetti della leucocitospermia sui parametri del liquido seminale e sull'*outcome* delle tecniche di fecondazione *in vitro*. L'originalità di tale lavoro consiste nel fatto che sono stati valutati gli effetti della leucocitospermia utilizzando la tecnica citometrica e conducendo un'indagine distinta tra i campioni destinati alla FIVET e quelli destinati alla ICSI.

Da tale analisi è emerso che i parametri di concentrazione e di motilità degli spermatozoi sono influenzati negativamente dalla presenza di eccessive concentrazioni di leucociti nel liquido seminale; se, però, si fa distinzione tra i campioni destinati alle due tecniche, la differenza di motilità degli spermatozoi non risulta più correlata alla

leucocitospermia, mantenendo un trend di diminuzione nella ICSI, mentre nella FIVET tende all'aumento, tanto che i risultati sembrano addirittura in contraddizione.

Inoltre, la leucocitospermia non ha effetti sui tassi di fertilizzazione degli ovociti, sui tassi di sviluppo degli embrioni e sui tassi di gravidanza, né se la tecnica utilizzata è la ICSI né se è la FIVET. Tale fenomeno potrebbe essere dovuto al fatto che, dal momento che la fertilizzazione è avvenuta e gli embrioni si sono sviluppati, non c'è ragione per cui la leucocitospermia possa avere effetti negativi sulla gravidanza.

Infine, dal momento che la leucocitospermia non sembra avere effetto sui parametri del liquido seminale né sugli esiti delle tecniche di fecondazione *in vitro*, si potrebbe ipotizzare che, in presenza di un'alta concentrazione di leucociti nel liquido seminale, sussista un giusto equilibrio di proporzioni tra i leucociti e la quantità di spermatozoi, tale da non comportare effetti dannosi sulla funzionalità degli spermatozoi e quindi sul successo delle tecniche di fecondazione assistita.

In futuro si potrebbe pensare a rivalutare il livello soglia per cui è definibile un campione come leucocitospermico e al di sopra del quale si è di fronte ad una condizione patologica che ha effetti negativi sulla fertilità di un individuo in termini di qualità degli spermatozoi, di tassi di fertilizzazione e tassi di gravidanza.

## BIBLIOGRAFIA

Definitions and indicators in family planning maternal and child health and reproductive health used in the WHO Regional office for Europe. <http://www.who.com>.

Linee guida contenenti le indicazioni delle procedure e delle tecniche di Procreazione Medicalmente Assistita. <http://www.ministerodellasalute.it>, Art.7 – Legge 40/2004.

Registro Nazionale Procreazione Medicalmente Assistita. <http://www.iss.it>.

Alvarez, J.G., Sharma, R.K., Ollero, M., Saleh, R.A., Lopez, M.C., Thomas, A.J., Jr., Evenson, D.P. and Agarwal, A. (2002) Increased DNA damage in sperm from leucocytospermic semen samples as determined by the sperm chromatin structure assay. *Fertil Steril*, **78**, 319-329.

Agarwal, A., Saleh, R. (2002) Role of oxidants in male infertility: rationale, significance, and treatment. *Urol Clin North Am*, **29**, 817-827.

Arata de Bellabarba, G., Tortolero, I., Villarroel, V., Molina, C.Z., Bellabarba, C. and Velazquez, E. (2000) Nonsperm cells in human semen and their relationship with semen parameters. *Arch Androl*, **45**, 131-136.

Arienti, G., Carlini, E., Saccardi, C. and Palmerini, C.A. (2004) Role of human prostasomes in the activation of spermatozoa. *J Cell Mol Med*, **8**, 77-84.

Aziz, N., Agarwal, A., Lewis-Jones, I., Sharma, R.K. and Thomas, A.J., Jr. (2004a) Novel associations between specific sperm morphological defects and leukocytospermia. *Fertil Steril*, **82**, 621-627.

Aziz, N., Saleh, R.A., Sharma, R.K., Lewis-Jones, I., Esfandiari, N., Thomas, A.J., Jr. and Agarwal, A. (2004b) Novel association between sperm reactive oxygen species production, sperm morphological defects, and the sperm deformity index. *Fertil Steril*, **81**, 349-354.

Bhasin, S. (2007) Approach to the infertile man. *J Clin Endocrinol Metab*, **92**, 1995-2004.

Brotherton, J. (1988) Determination of human sperm count and sperm motility using a laser beam and the Doppler effect (LAZYMOT machine). *Andrologia*, **20**, 33-43.

Brotherton, J. and Barnard, G. (1974) Estimation of number, mean size and size distribution of human spermatozoa in oligospermia using a Coulter counter. *J Reprod Fertil*, **40**, 341-357.

Cohen-Dayag, A., Tur-Kaspa, I., Dor, J., Mashiach, S. and Eisenbach, M. (1995) Sperm capacitation in humans is transient and correlates with chemotactic responsiveness to follicular factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 11039-11043.

Curi, S.M., Ariagno, J.I., Chenlo, P.H., Mendeluk, G.R., Pugliese, M.N., Sardi Segovia, L.M., Repetto, H.E. and Blanco, A.M. (2003) Asthenozoospermia: analysis of a large population. *Arch Androl*, **49**, 343-349.

De Geyter, C., De Geyter, M., Behre, H.M., Schneider, H.P. and Nieschlag, E. (1994)

- Peroxidase-positive round cells and microorganisms in human semen together with antibiotic treatment adversely influence the outcome of in-vitro fertilization and embryo transfer. *Int J Androl*, **17**, 127-134.
- De Jonge, C. (2005) Biological basis for human capacitation. *Hum Reprod Update*, **11**, 205-214.
- Diemer, T., Huwe, P., Ludwig, M., Schroeder-Printzen, I., Michelmann, H.W., Schiefer, H.G. and Weidner, W. (2003) Influence of autogenous leucocytes and *Escherichia coli* on sperm motility parameters in vitro. *Andrologia*, **35**, 100-105.
- Dubin, L. and Amelar, R.D. (1971) Etiologic factors in 1294 consecutive cases of male infertility. *Fertil Steril*, **22**, 469-474.
- Dunson, D.B. (2002) Changes with age in the level and duration of fertility in the menstrual cycle. *Hum Reprod*, **17**, 1399-1403.
- Eggert-Kruse, W., Bellmann, A., Rohr, G., Tilgen, W. and Runnebaum, B. (1992) Differentiation of round cells in semen by means of monoclonal antibodies and relationship with male fertility. *Fertil Steril*, **58**, 1046-1055.
- Eisenbach, M. (2003) Why are sperm cells phagocytosed by leukocytes in the female genital tract? *Med Hypotheses*, **60**, 590-592.
- el-Demiry, M.I., Hargreave, T.B., Busuttil, A., Elton, R., James, K. and Chisholm, G.D. (1987) Immunocompetent cells in human testis in health and disease. *Fertil Steril*, **48**, 470-479.
- el-Demiry, M.I., Young, H., Elton, R.A., Hargreave, T.B., James, K. and Chisholm, G.D. (1986) Leucocytes in the ejaculate from fertile and infertile men. *Br J Urol*, **58**, 715-720.
- Endtz, A.W. (1974) A rapid staining method for differentiating granulocytes from "germinal cells" in Papanicolaou-stained semen. *Acta Cytol*, **18**, 2-7.
- Erel, C.T., Senturk, L.M., Demir, F., Irez, T. and Ertungealp, E. (1997) Antibiotic therapy in men with leukocytospermia. *Int J Fertil Womens Med*, **42**, 206-210.
- Erenpreiss, J., Hlevicka, S., Zalkalns, J. and Erenpreisa, J. (2002) Effect of leukocytospermia on sperm DNA integrity: a negative effect in abnormal semen samples. *J Androl*, **23**, 717-723.
- Ferrara, F., Daverio, R., Mazzini, G., Bonini, P. and Banfi, G. (1997) Automation of human sperm cell analysis by flow cytometry. *Clin Chem*, **43**, 801-807.
- Forabosco Antonio, *Medicina della Procreazione Medicalmente Assisita*, Ulisse Ed. 2005.
- Gardner, D.G., Weissman, A., Howlwa, C.M., Shoham, Z. *Textbook of Assisted Reproductive Techniques, Laboratory and Clinical Perspectives*, Taylor & Francis Goup, 2004.
- Garner, D.L. and Johnson, L.A. (1995) Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. *Biol Reprod*, **53**, 276-284.
- Giojalas, L.C., Rovasio, R.A., Fabro, G., Gakamsky, A. and Eisenbach, M. (2004) Timing of sperm capacitation appears to be programmed according to egg availability in the female genital tract. *Fertil Steril*, **82**, 247-249.

- Glezerman, M., Bartoov, B. Semen analysis. In: Insler V., Lunenfeld, B. editors, *Infertility: Male and Female*, London: Churchill Livingstone, 1993, 285-316.
- Graham, J.K., Kunze, E. and Hammerstedt, R.H. (1990) Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. *Biol Reprod*, **43**, 55-64.
- Grunewald, S., Paasch, U., Said, T.M., Sharma, R.K., Glander, H.J. and Agarwal, A. (2005) Caspase activation in human spermatozoa in response to physiological and pathological stimuli. *Fertil Steril*, **83 Suppl 1**, 1106-1112.
- Hammadeh, M.E., Al Hasani, S., Rosenbaum, P., Schmidt, W. and Fischer Hammadeh, C. (2008) Reactive oxygen species, total antioxidant concentration of seminal plasma and their effect on sperm parameters and outcome of IVF/ICSI patients. *Arch Gynecol Obstet*, **277**, 515-526.
- Henkel, R., Maass, G., Hajimohammad, M., Menkveld, R., Stalf, T., Villegas, J., Sanchez, R., Kruger, T.F. and Schill, W.B. (2003) Urogenital inflammation: changes of leucocytes and ROS. *Andrologia*, **35**, 309-313.
- Henkel, R.R. and Schill, W.B. (2003) Sperm preparation for ART. *Reprod Biol Endocrinol*, **1**, 108.
- Homan, G.F., Davies, M. and Norman, R. (2007) The impact of lifestyle factors on reproductive performance in the general population and those undergoing infertility treatment: a review. *Hum Reprod Update*, **13**, 209-223.
- Inaudi P., Petrilli S, *Gradualità delle tecniche; Alle porte della vita*, D'Amato G., Borini A., Ubaldi A , Syllabus, 2005.
- Jaiswal, B.S., Eisenbach, M. Capacitation. In: Hardy DM (ed.). *Fertilization*. San Diego: Academic Press, 2002, 57-117.
- Kaleli, S., Ocer, F., Irez, T., Budak, E. and Aksu, M.F. (2000) Does leukocytospermia associate with poor semen parameters and sperm functions in male infertility? The role of different seminal leukocyte concentrations. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, **89**, 185-191.
- Ke, R.W., Dockter, M.E., Majumdar, G., Buster, J.E. and Carson, S.A. (1995) Flow cytometry provides rapid and highly accurate detection of antisperm antibodies. *Fertil Steril*, **63**, 902-906.
- Keel, B.A. (2004) How reliable are results from the semen analysis? *Fertil Steril*, **82**, 41-44.
- Kerin, J.F., Warnes, G.M., Quinn, P., Jeffrey, R., Godfrey, B., Broom, T.J., McEvoy, M., Kirby, C., Johnson, M. and Cox, L.W. (1983) The effect of clomid induced superovulation on human follicular and luteal function for extracorporeal fertilization and embryo transfer. *Clin Reprod Fertil*, **2**, 129-142.
- Kerin, J.F., Warnes, G.M., Quinn, P., Kirby, C., Jeffrey, R., Matthews, C.D., Seamark, R.F., Texler, K., Antonas, B. and Cox, L.W. (1984) In vitro fertilization and embryo transfer program, Department of Obstetrics and Gynecology, University of Adelaide at the Queen Elizabeth Hospital, Woodville, South Australia. *J In Vitro Fert Embryo Transf*, **1**, 63-71.
- Kiessling, A.A., Lamparelli, N., Yin, H.Z., Seibel, M.M. and Eyre, R.C. (1995) Semen leukocytes: friends or foes? *Fertil Steril*, **64**, 196-198.

- Lackner, J.E., Mark, I., Sator, K., Huber, J. and Sator, M. (2008) Effect of leukocytospermia on fertilization and pregnancy rates of artificial reproductive technologies. *Fertil Steril*, **90**, 869-871.
- Lemkecher, T., Dartigues, S., Vaysse, J., Kulski, O., Barraud-Lange, V., Gattegno, L. and Wolf, J.P. (2005) [Leucocytospermia, oxidative stress and male fertility: facts and hypotheses]. *Gynecol Obstet Fertil*, **33**, 2-10.
- Levek-Motola, N., Soffer, Y., Shochat, L., Raziell, A., Lewin, L.M. and Golan, R. (2005) Flow cytometry of human semen: a preliminary study of a non-invasive method for the detection of spermatogenetic defects. *Hum Reprod*, **20**, 3469-3475.
- Lopes, S., Sun, J.G., Jurisicova, A., Meriano, J. and Casper, R.F. (1998) Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*, **69**, 528-532.
- Menkveld, R. (2004) Leucocytospermia. *International Congress Series*, **1266**, 528-532.
- Morales, M.E., Rico, G., Bravo, C., Tapia, R., Alvarez, C. and Mendez, J.D. (2003) [Progressive motility increase caused by L-arginine and polyamines in sperm from patients with idiopathic and diabetic asthenozoospermia]. *Ginecol Obstet Mex*, **71**, 297-303.
- Oliva, A. and Multigner, L. (2006) Ketotifen improves sperm motility and sperm morphology in male patients with leukocytospermia and unexplained infertility. *Fertil Steril*, **85**, 240-243.
- Oren-Benaroya, R., Kipnis, J. and Eisenbach, M. (2007) Phagocytosis of human post-capacitated spermatozoa by macrophages. *Hum Reprod*, **22**, 2947-2955.
- Pasqualotto, F.F., Sharma, R.K., Pasqualotto, E.B. and Agarwal, A. (2008) Poor semen quality and ROS-TAC scores in patients with idiopathic infertility. *Urol Int*, **81**, 263-270.
- Pelliccione, F., D'Angeli, A., Cordeschi, G., Mihalca, R., Ciociola, F., Necozone, S., Francavilla, F. and Francavilla, S. (2009) Seminal macrophages in ejaculates from men with couple infertility. *Int J Androl*, **32**, 623-628.
- Perticarari, S., Ricci, G., Granzotto, M., Boscolo, R., Pozzobon, C., Guarnieri, S., Sartore, A. and Presani, G. (2007) A new multiparameter flow cytometric method for human semen analysis. *Hum Reprod*, **22**, 485-494.
- Physiopathological determinants of human infertility. (2002) *Hum Reprod Update*, **8**, 435-447.
- Queiroz, E.K. and Waissmann, W. (2006) Occupational exposure and effects on the male reproductive system. *Cad Saude Publica*, **22**, 485-493.
- Ricci, G., Perticarari, S., Fragonas, E., Giolo, E., Canova, S., Pozzobon, C., Guaschino, S. and Presani, G. (2002) Apoptosis in human sperm: its correlation with semen quality and the presence of leukocytes. *Hum Reprod*, **17**, 2665-2672.
- Ricci, G., Presani, G., Guaschino, S., Simeone, R. and Perticarari, S. (2000) Leukocyte detection in human semen using flow cytometry. *Hum Reprod*, **15**, 1329-1337.
- Rienzi, L., Ubaldi, F., Iacobelli, M., Ferrero, S., Minasi, M.G., Martinez, F., Tesarik, J. and Greco, E. (2002) Day 3 embryo transfer with combined evaluation at the

- pronuclear and cleavage stages compares favourably with day 5 blastocyst transfer. *Hum Reprod*, **17**, 1852-1855.
- Rienzi, L., Ubaldi, F., Martinez, F., Iacobelli, M., Minasi, M.G., Ferrero, S., Tesarik, J. and Greco, E. (2003) Relationship between meiotic spindle location with regard to the polar body position and oocyte developmental potential after ICSI. *Hum Reprod*, **18**, 1289-1293.
- Rienzi, L. Ubaldi, F. M., Iacobelli, M., Minasi, M. G., Romano, S., Ferrero, S., Sapienza, F., Baroni, E., Litwicka, K., Greco, E. (2008) Significance of metaphase II human oocyte morphology on ICSI outcome. *Fertil Steril*, **90**, 1692-1700.
- Rodin, D.M., Larone, D. and Goldstein, M. (2003) Relationship between semen cultures, leukospermia, and semen analysis in men undergoing fertility evaluation. *Fertil Steril*, **79 Suppl 3**, 1555-1558.
- Rossavik, I.K. and Gibbons, W.E. (1986) Growth curve analyses of follicular growth in the in vitro fertilization program. *Fertil Steril*, **45**, 834-838.
- Saleh, R.A., Agarwal, A., Kandirali, E., Sharma, R.K., Thomas, A.J., Nada, E.A., Evenson, D.P. and Alvarez, J.G. (2002) Leukocytospermia is associated with increased reactive oxygen species production by human spermatozoa. *Fertil Steril*, **78**, 1215-1224.
- Schmid, T.E., Eskenazi, B., Baumgartner, A., Marchetti, F., Young, S., Weldon, R., Anderson, D. and Wyrobek, A.J. (2007) The effects of male age on sperm DNA damage in healthy non-smokers. *Hum Reprod*, **22**, 180-187.
- Schwende, H., Fitzke, E., Ambs, P. and Dieter, P. (1996) Differences in the state of differentiation of THP-1 cells induced by phorbol ester and 1,25-dihydroxyvitamin D3. *J Leukoc Biol*, **59**, 555-561.
- Sharma, R.K., Pasqualotto, A.E., Nelson, D.R., Thomas, A.J., Jr. and Agarwal, A. (2001) Relationship between seminal white blood cell counts and oxidative stress in men treated at an infertility clinic. *J Androl*, **22**, 575-583.
- Smith, D.C., Barratt, C.L. and Williams, M.A. (1989) The characterisation of non-sperm cells in the ejaculates of fertile men using transmission electron microscopy. *Andrologia*, **21**, 319-333.
- Spano, M. and Evenson, D.P. (1993) Flow cytometric analysis for reproductive biology. *Biol Cell*, **78**, 53-62.
- Sukcharoen, N., Keith, J., Irvine, D.S. and Aitken, R.J. (1995) Predicting the fertilizing potential of human sperm suspensions in vitro: importance of sperm morphology and leukocyte contamination. *Fertil Steril*, **63**, 1293-1300.
- Sun, J.G., Jurisicova, A. and Casper, R.F. (1997) Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. *Biol Reprod*, **56**, 602-607.
- Taylor, A. (2003) ABC of subfertility: extent of the problem. *Bmj*, **327**, 434-436.
- Templeton, A. (2000) Infertility and the establishment of pregnancy--overview. *Br Med Bull*, **56**, 577-587.
- Tesarik, J., Greco, E. and Mendoza, C. (2004) Late, but not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation. *Hum Reprod*, **19**, 611-615.

- Tomao, F., Miele, E., Spinelli, G.P. and Tomao, S. (2006) Anticancer treatment and fertility effects. Literature review. *J Exp Clin Cancer Res*, **25**, 475-481.
- Tomlinson, M.J., Barratt, C.L. and Cooke, I.D. (1993) Prospective study of leukocytes and leukocyte subpopulations in semen suggests they are not a cause of male infertility. *Fertil Steril*, **60**, 1069-1075.
- Tomlinson, M.J., White, A., Barratt, C.L., Bolton, A.E. and Cooke, I.D. (1992) The removal of morphologically abnormal sperm forms by phagocytes: a positive role for seminal leukocytes? *Hum Reprod*, **7**, 517-522.
- Tsuchiya, S., Yamabe, M., Yamaguchi, Y., Kobayashi, Y., Konno, T. and Tada, K. (1980) Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer*, **26**, 171-176.
- van Zyl, J.A., Menkveld, R., van Kotze, T.J., Retief, A.E. and van Niekerk, W.A. (1975) Oligozoospermia: a seven-year survey of the incidence, chromosomal aberrations, treatment and pregnancy rate. *Int J Fertil*, **20**, 129-132.
- Vicari, E. (2000) Effectiveness and limits of antimicrobial treatment on seminal leukocyte concentration and related reactive oxygen species production in patients with male accessory gland infection. *Hum Reprod*, **15**, 2536-2544.
- Vicino, M., Loverro, G., Simonetti, S., Mei, L. and Selvaggi, L. (1999) [The correlation between idiopathic leukocytospermia, embryo quality and outcome in the FIVET and ICSI procedures]. *Minerva Ginecol*, **51**, 413-420.
- Villegas, J., Schulz, M., Vallejos, V., Henkel, R., Miska, W. and Sanchez, R. (2002) Indirect immunofluorescence using monoclonal antibodies for the detection of leukocytospermia: comparison with peroxidase staining. *Andrologia*, **34**, 69-73.
- WHO. *Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction*, Cambridge University Press, 1999.
- Wolff, H. (1995) The biologic significance of white blood cells in semen. *Fertil Steril*, **63**, 1143-1157.
- Wolff, H., Politch, J.A., Martinez, A., Haimovici, F., Hill, J.A. and Anderson, D.J. (1990) Leukocytospermia is associated with poor semen quality. *Fertil Steril*, **53**, 528-536.
- Workowski, K.A., Levine, W.C. and Wasserheit, J.N. (2002) U.S. Centers for Disease Control and Prevention guidelines for the treatment of sexually transmitted diseases: an opportunity to unify clinical and public health practice. *Ann Intern Med*, **137**, 255-262.
- Yilmaz, S., Koyuturk, M., Kilic, G., Alpak, O. and Aytoz, A. (2005) Effects of leucocytospermia on semen parameters and outcomes of intracytoplasmic sperm injection. *Int J Androl*, **28**, 337-342.
- Ziyyat, A., Barraud-Lange, V., Sifer, C., Ducot, B., Wolf, J.P. and Soufir, J.C. (2008) Paradoxical increase of sperm motility and seminal carnitine associated with moderate leukocytospermia in infertile patients. *Fertil Steril*, **90**, 2257-2263.
- Zorn, B., Vidmar, G. and Meden-Vrtovec, H. (2003) Seminal reactive oxygen species as predictors of fertilization, embryo quality and pregnancy rates after conventional in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Int J Androl*, **26**, 279-285.