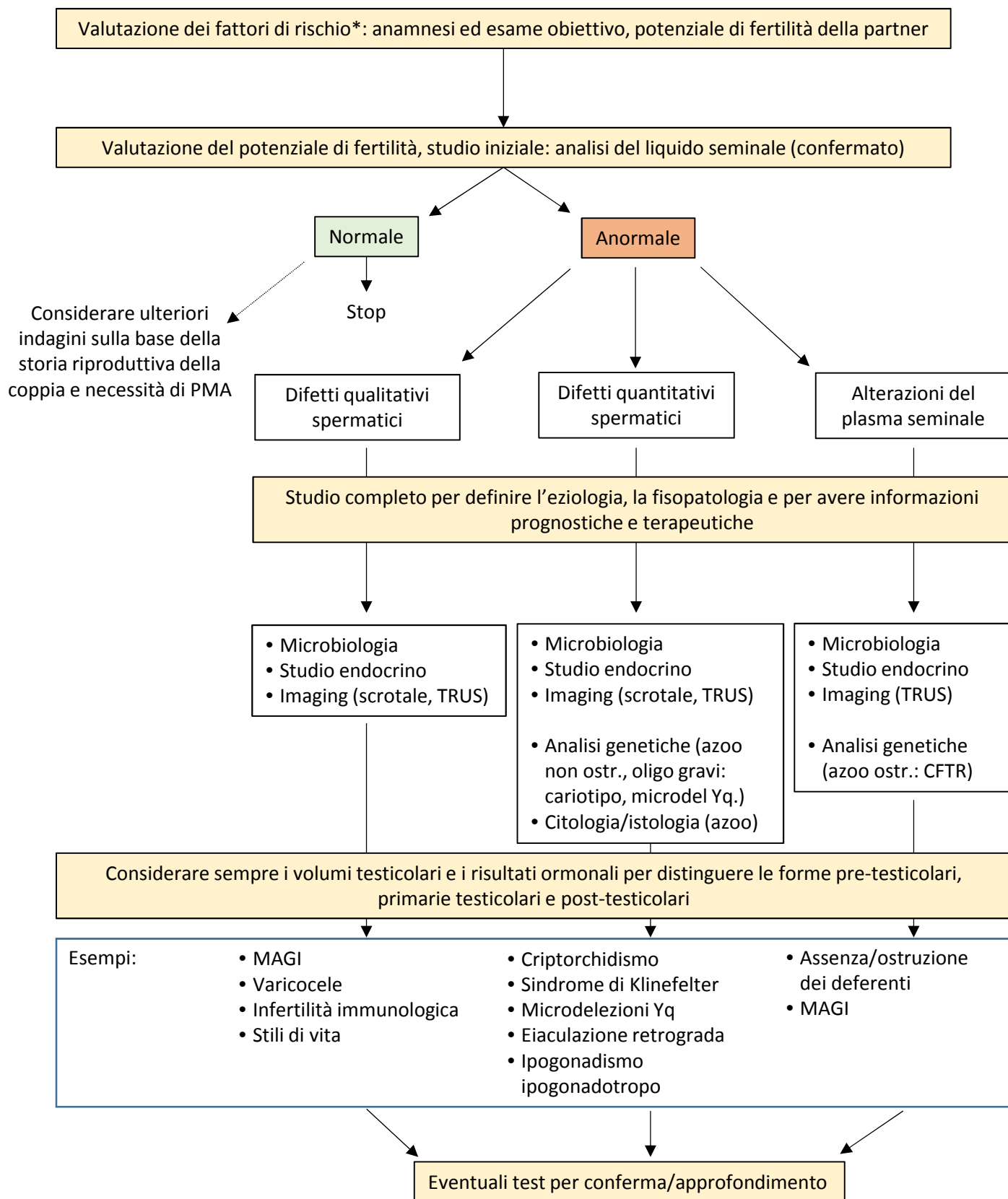


Indice (cliccabile)

1. Flow-chart generale
2. Anamnesi ad esame obiettivo
3. Fattori di rischio introduzione e ipotrofia testicolare
 - a.* Criptorchidismo
 - b.* Tumore del testicolo
 - c.* Infezioni e infiammazioni del tratto urogenitale maschile
 - d.* Il varicocele
 - e.* Fattori di rischio genetici di infertilità maschile
 - f.* La torsione testicolare
 - g.* Cause iatrogene dell'infertilità maschile (I e II parte)
 - h.* Malattie sistematiche ed endocrine
 - i.* Steroidi anabolizzanti
 - j.* Fattori ambientali e occupazionali
 - k.* Aging maschile: quale ruolo nella spermatogenesi e nelle tecniche di procreazione
 - l.* Fumo di tabacco e infertilità
 - m.* Alcool e sostanze d'abuso
 - n.* L'obesità
 - o.* Diabete, farmaci antidiabetici e fertilità maschile
 - p.* Temperatura scrotale
 - q.* Poliabortività - Fattori maschili
4. Esame del liquido seminale
5. Flow chart - Diagnosi microbiologica del maschio infertile
6. Diagnostica ormonale
7. Diagnostica citologica con agoaspirato testicolare
8. Istologia Testicolare
9. Indagini addizionali ed esami di secondo livello sugli spermatozoi
 - a.* Valutazione dell'integrità cromatinica
 - b.* Aberrazioni cromosomiche
 - c.* L'epigenetica nello studio degli spermatozoi
 - d.* Valutazione dei telomeri degli spermatozoi
 - e.* Le rotture a doppia elica nel DNA
 - f.* Ipermotilità
 - g.* Valutazione di alcune funzioni spermatiche
 - h.* Test all'acido ialuronico
10. Imaging del paziente infertile
11. TRUS



*Se sono presenti fattori di rischio, lo studio iniziale dovrebbe già includere una valutazione completa (microbiologia, studio endocrino, imaging, test genetici) appropriata.

Anamnesi ed esame obiettivo maschile

I punti base di un corretto orientamento diagnostico in medicina sono rappresentati dall'anamnesi e dall'esame obiettivo. Ovviamente, il campo della medicina della riproduzione non rappresenta un'eccezione a tale regola e pertanto l'approccio iniziale al paziente infertile dovrà prevedere un'adeguata ed accurata anamnesi generale, andrologica e riproduttiva ed un esame obiettivo internistico ed andrologico specifico che possono aiutare nella definizione della diagnosi e indirizzare negli esami strumentali e di laboratorio più appropriati.

Dopo un inquadramento generale, l'indagine anamnestica andrologica dovrà orientarsi sulla ricerca di eventuali patologie familiari di tipo genetico, metabolico o endocrino, su abitudini di vita (fumo, alcolici, droghe, attività sportive, etc), sull'uso di farmaci, sulle caratteristiche genitali alla nascita e nei primi anni di vita, sullo sviluppo puberale, sulle eventuali patologie pregresse dell'apparato genitale (flogosi, traumi, algie, etc). In generale, dovrebbero essere indagate le cause e i fattori di rischio di infertilità elencati nella tabella X. La presenza di questi elementi all'anamnesi orienta inoltre sull'iter diagnostico, poiché nei pazienti con fattori di rischio può essere utile intraprendere fin dall'inizio un iter diagnostico completo. È utile inoltre approfondire l'anamnesi sessuologica per verificare la frequenza e il timing dei rapporti sessuali e la presenza di possibili problemi sessuali (libido, erezione, eiaculazione) (tabella XX).

L'esame obiettivo andrologico approfondirà le caratteristiche strutturali e morfologiche di pene, testicoli, epididimi, deferenti, strutture funicolari e prostata, oltre che la valutazione dei caratteri sessuali secondari (tabella XXX). Di particolare rilievo è la valutazione (mediante orchidometro) del volume testicolare, che orienta, insieme alle valutazioni successive, sull'origine dell'infertilità (pre-testicolare, primaria testicolare, post-testicolare). È bene condurre, dapprima, una valutazione con paziente in ortostatismo in quanto in tale postura si evidenziano con maggiore facilità le singole strutture della borsa scrotale; inoltre, eventuali varicosità della vena spermatica (varicocele) potranno essere evidenziate e amplificate con la manovra di Valsalva (varicocele con reflusso) solo in questa posizione. Il passaggio in clinostatismo potrà confermare una diagnosi di stasi vascolare (svuotamento del varicocele) e consentire lo studio di altre patologie (idrocele, canale inguinale pervio, criptorchidismo, etc.). La prostata deve essere studiata mediante esplorazione rettale che consente, se correttamente eseguita, di dare notizie preziose sullo "status interno" dell'apparato genitale. L'esplorazione rettale è particolarmente importante nei pazienti con sospette infezioni o infiammazione del tratto riproduttivo o in presenza di particolari anomalie del liquido seminale (alta viscosità, alterazioni del pH, leucocitospermia, anticorpi anti spermatozoo).

Tabella X. Fattori di rischio per infertilità maschile da indagare all'anamnesi e che orientano per un iter diagnostico completo indipendentemente dalla durata della infertilità.

Fattori di rischio maggiori	Fattori di rischio minori
- Criptorchidismo - Ipofonia testicolare - Tumore del testicolo - Fattori genetici noti (per esempio anomalie cromosomiche, fibrosi cistica, talassemia) - Varicocele - Traumi testicolari - Infezioni del tratto riproduttivo - Torsione testicolare - Cause iatrogene (chirurgia pelvica e inguinale, chemioterapia, radioterapia, farmaci) - Malattie sistemiche e/o endocrine (per esempio diabete mellito, malattie renali ed epatiche) - Utilizzo di steroidi anabolizzanti - Disordini della pubertà - Infertilità con precedenti partner	- Esposizione ambientale e/o occupazionale - Aging (>50 anni) - Fumo di sigaretta - Alcool e sostanze da abuso - Obesità - Esposizione ad alte temperature genitali - Storia familiare di infertilità e poliabortività - Poliabortività - Microlitiasi testicolare

Tabella XX. Schema di anamnesi per il soggetto infertile.

Dati generali	- Et� - Religione - Infertilit� primaria o secondaria - Durata della infertilit� - Storia riproduttiva con precedenti partner
Anamnesi familiare	- Infertilit� - Poliabortivit� - Malformazioni fetali - Disordini genetici
Anamnesi patologica remota	- Fattori genetici noti - Tumori e trattamenti connessi - Farmaci - Malattie sistemiche - Patologie endocrine - Utilizzo di steroidi anabolizzanti - Disordini della pubert�
Malattie dell'apparato riproduttivo e urinario	- Critprochidismo - Tumore testicolare - Varicocele - Traumi testicolari - Infezioni del tratto riproduttivo (orchiti, epididimiti, prostatovescicoliti) - Torsione testicolare
Interventi chirurgici	- Chirurgia pelvica e addominale (prostata, vescica) - Chirurgia inguinale (orchidopessi, orchiectomia, ernia inguinale, Varicocelectomia - Idrocele - Vasectomia - Vasovasostomia, vasoepididimostomia
Anamnesi occupazionale e stili di vita	- Esposizione a possibili distruttori endocrine, metalli pesanti, campi elettromagnetici - Fumo di sigaretta - Alcool e sostanze d'abuso - Dieta (dieta ad alto contenuto calorico, consumo di grassi) - Esposizione a fonti di calore genitale (occupazionale, sauna)
Anamnesi sessuologica	- Frequenza e timing dei rapporti sessuali - Libido - Erezione - Eiaculazione

Tabella XXX. Schema dell'esame obiettivo del soggetto infertile.

Esame obiettivo generale	- Altezza, peso, indice di massa corporea, circonferenza vita - Distribuzione massa muscolare e grassa
Esame obiettivo genitale	- Pene (anatomia generale, curvature, placche, meato uretrale, condilomi, infiammazioni del glande) - Testicoli (sede, volume con orchidometro di Prader, consistenza, noduli, idrocele) - Epididimi e deferenti (presenza, calibro, cisti, dolorabilità alla palpazione) - Varicocele palpabile, manovra di Valsalva
Caratteri sessuali secondari	- Ginecomastia - Distribuzione dei peli pubici - Androgenizzazione generale e distribuzione pilifera - Proporzioni scheletriche
Esplorazione rettale	- Prostata (volume, consistenza, noduli, dolorabilità)

Criptorchidismo

Definizione e classificazione

Per criptorchidismo (dal greco *kryptos* e *orchis* “testicolo nascosto”) si intende l’assenza di uno o entrambi i testicoli nella borsa scrotale alla nascita con arresto lungo il fisiologico tragitto di discesa dall’addome. Sebbene il criptorchidismo sia spesso considerato una patologia di lieve entità, in realtà esso rappresenta l’anomalia congenita più frequente dell’apparato urogenitale ed è il più importante fattore di rischio per infertilità e tumore del testicolo in età adulta. Una diagnosi precoce ed una corretta gestione del testicolo criptorchide sono pertanto soprattutto necessari per preservare la fertilità, eseguire un corretto counselling e follow-up del paziente e per ridurre il rischio di trasformazione neoplastica dei testicoli e l’eventuale insorgenza di ipogonadismo.

Il criptorchidismo è bilaterale in un terzo dei casi e monolaterale nei due terzi. I testicoli criptorchidi vengono classificati in base alla loro posizione lungo il tragitto di discesa (sede addominale alta/bassa, sede inguinale, sede soprascrotale, sede alto scrotale), e vengono quindi distinti dai testicoli ectopici, che sono localizzati al di fuori della fisiologica via di discesa. Tuttavia, nella pratica clinica e per indirizzare la terapia risulta utile anche una semplice distinzione tra testicoli palpabili e non palpabili e tra forme bilaterali e monolaterali. Una condizione particolare è rappresentata dall’assenza di uno o entrambi i testicoli, condizione nota come anorchia o sindrome del testicolo evanescente.

Il criptorchidismo può essere un’anomalia isolata o più raramente si può associare ad altre malformazioni dell’apparato uro-genitale o può far parte di sindromi genetiche più complesse. Il criptorchidismo va anche distinto dal testicolo retrattile (testicolo normalmente disceso alla nascita, che risale in canale inguinale e può essere riportato in sede scrotale manualmente da dove risale per riflesso cremasterico), dal criptorchidismo acquisito (testicolo normalmente disceso alla nascita e poi risalito in canale inguinale da dove non è più riposizionabile manualmente nello scroto) e dal testicolo mobile (testicolo non criptorchide alla nascita, che si muove facilmente per effetto del muscolo cremastere fuori dal sacco scrotale ma vi ritorna altrettanto facilmente).

Tabella 1. Classificazione dei difetti di posizione testicolare.

Testicolo in sede	In posizione scrotale, che non risale mai in canale inguinale nemmeno per riflesso cremasterico o con manipolazione
Criptorchidismo congenito	Assenza di uno o entrambi i testicoli nello scroto per arresto lungo il fisiologico tragitto di discesa testicolare
Testicolo in ascensore (<i>ascending testis</i> o criptorchidismo acquisito)	Testicolo non criptorchide alla nascita o testicolo criptorchide disceso spontaneamente e poi risalito stabilmente in canale inguinale (difficile manipolazione).
<i>Gliding testis</i>	Appena sotto l’anello inguinale esterno e posizionabile manualmente solo in sede alto scrotale, da dove risale immediatamente
Testicolo retrattile o alto scrotale	In posizione scrotale alta, posizionabile manualmente in sacca scrotale, dove può rimanere per un certo periodo, e retrattile in sede alta per riflesso cremasterico
Testicolo mobile o migrante	In posizione scrotale, risale in canale inguinale spontaneamente (riflesso cremasterico, rapporti sessuali, freddo, etc) o con manipolazione e ritorna in sacca scrotale spontaneamente o con manipolazione.
Testicolo ectopico	Assenza di uno o entrambi i testicoli nello scroto con localizzazione al di fuori del fisiologico tragitto di discesa testicolare

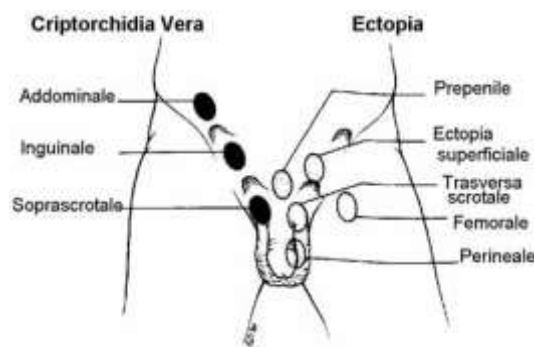


Figura 1. Classificazione del criptorchidismo (arresto lungo il normale tragitto di discesa testicolare) e dell'ectopia testicolare (posizionato fuori dal normale tragitto di discesa).

Epidemiologia

Il criptorchidismo interessa circa il 3-5% dei bambini nati a termine ed il 9-30% dei pretermine. Pertanto in Italia, dove ogni anno vi sono circa 300.000 nati a termine e 200.000 pretermine, si possono ipotizzare dai 10.000 ai 60.000 casi all'anno. Circa la metà dei testicoli criptorchidi alla nascita discende spontaneamente nei primi mesi di vita, soprattutto nei nati pretermine, e pertanto la prevalenza del criptorchidismo ad un anno di vita è circa il 1-2%. Anche il basso peso alla nascita è un importante fattore di rischio per criptorchidismo e la prevalenza nei nati con peso inferiore a 2.5 kg è di circa il 20-25%. La discesa spontanea si verifica in genere entro i 4-6 mesi di vita e la terapia dei testicoli criptorchidi non dovrebbe pertanto iniziare prima del quarto-sesto mese. Tuttavia, è altrettanto importante non intervenire troppo tardi, perché la compromissione della funzione spermatogenetica, e quindi della fertilità, è correlata con l'età dell'intervento.

L'incidenza del criptorchidismo sembra essere aumentata negli ultimi decenni, soprattutto in alcuni paesi, probabilmente come conseguenza dell'esposizione a fattori ambientali con attività simil-ormonale, soprattutto di tipo estrogenico e/o anti-androgenico. Questi dati epidemiologici sarebbero in accordo con un simile incremento anche dell'incidenza di tumore del testicolo, infertilità maschile ed ipospadia e hanno portato all'ipotesi di una sindrome da disgenesia testicolare, conseguenza di un alterato sviluppo gonadico durante la vita fetale per cause ambientali e/o genetiche. In Italia, la prevalenza del criptorchidismo nei nati a termine sembra essersi ridotta da un 4.3% negli anni 1978-1987 al 2.7% negli anni 1988-1997. Tuttavia, la prevalenza ad un anno si è mantenuta simile (1.5% nella prima decade e 1.2% nella seconda decade). Da nostri dati epidemiologici raccolti mediante questionari somministrati a soggetti delle scuole medie superiori della provincia di Padova (Progetto Andrologico – 2000 soggetti) una storia di criptorchidismo viene segnalata dal 3.1% dei soggetti.

Cenni di embriologia

La discesa del testicolo dalla sua posizione originaria in prossimità del rene fino alla borsa scrotale durante la vita fetale è un complesso meccanismo che richiede l'interazione di fattori anatomici, meccanici ed ormonali. Si distinguono due fasi principali, quella trans-addominale (tra la 10^a e la 23^a settimana gestazionale), che porta il testicolo in prossimità dell'orifizio inguinale interno, e quella inguino-scrotale (tra la 26^a-28^a settimana fino alla nascita), che porta il testicolo nella sua posizione definitiva nella borsa scrotale omolaterale.

In questo processo giocano un ruolo fondamentale due legamenti: il legamento sospensore craniale (CSL), che connette la gonade alla parete addominale posteriore, ed il gubernaculum (o legamento genito-femorale caudale), che connette il testicolo e l'epididimo all'anello inguinale interno. La discesa del testicolo è regolata da due ormoni principali prodotti dalle cellule di Leydig, il testosterone e l'Insulin-like factor 3 (INSL3), aiutati dall'ormone anti mulleriano (AMH) prodotto dalle cellule di Sertoli e dal calcitonin-gene related peptide (CGRP) prodotto dal nervo genito-femorale. Durante la fase trans-addominale il testicolo rimane vicino alla futura regione inguinale grazie anche all'allargamento della cavità addominale e alla pressione viscerale. Il CSL regredisce mentre il gubernaculum si sviluppa soprattutto nella sua porzione caudale e protrude nel sacco scrotale in formazione. In tal modo il testicolo viene mantenuto in prossimità dell'anello inguinale interno. Durante la fase inguino-scrotale il gubernaculum si ritrae ed il testicolo può attraversare il canale inguinale.

Il testosterone, sotto l'azione dell'asse ipotalamo-ipofisi-testicoli, oltre ad essere il principale ormone per lo sviluppo in senso maschile del feto e per il corretto sviluppo degli organi genitali esterni, è il maggior attore della fase inguino-scrotale della discesa testicolare grazie alla sua azione principalmente sul CSL ed in parte sul gubernaculum. L'INSL3 invece controlla la differenziazione del gubernaculum ed è quindi il maggior responsabile della fase trans-addominale. L'AMH provoca la regressione dei dotti di Muller.

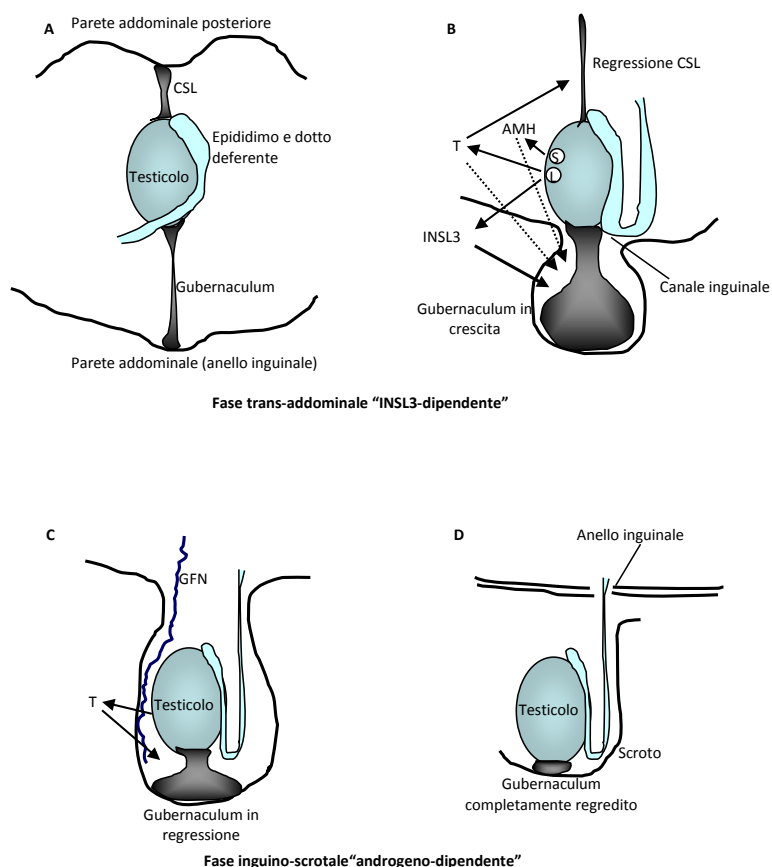


Figura 2. Schema della discesa testicolare. La differenziazione del testicolo dalla gonade indifferenziata in presenza del cromosoma Y (A) porta alla produzione di AMH dalle cellule di Sertoli (S) e di testosterone e INSL3 dalle cellule di Leydig (L) (B). L'effetto diretto e indiretto (attraverso il nervo genitofemorale, GNF, ed il CGRP) di questi due ormoni principalmente sul legamento sospensore craniale (CSL) e sul gubernaculum è alla base del processo bifasico di discesa testicolare. La regressione del CSL è soprattutto sotto il controllo del testosterone, mentre l'INSL3 agisce principalmente sul gubernaculum (B) sul quale agiscono in misura minore l'AMH ed il testosterone, verosimilmente attraverso il nervo genitofemorale ed il CGRP (C).

Eziopatogenesi

Le cause del criptorchidismo sono molteplici, ma nella maggior parte dei casi non si riscontrano fattori eziologici certi. I fattori di rischio più importanti sono rappresentati dalla prematurità e dal basso peso alla nascita, ma sembrano avere un ruolo anche il diabete in gravidanza ed il fumo.

Si riconoscono cause meccaniche, ormonali, genetiche ed ambientali. Le anomalie anatomiche sono frequenti e includono l'impervietà del canale inguinale, l'ernia inguinale, la brevità del funicolo spermatico. Le cause ormonali sono da ricondurre prevalentemente ad un'ipogonadismo ipogonadotropo, ma non sono frequenti. Tuttavia alcuni Autori sostengono che tutti i bambini criptorchidi abbiano un certo grado di ipogonadismo relativo. Le cause genetiche riguardano mutazioni dei geni che codificano per il recettore degli androgeni, per l'INSL3 o il suo recettore (RXFP2), o anomalie cromosomiche, tra le quali la più frequente è la sindrome di Klinefelter (cariotipo 47,XXY). Le cause genetiche sono più frequenti nei casi di criptorchidismo bilaterale e non si associano a discesa spontanea dei testicoli dopo la nascita. In generale circa il 5-10% dei casi di criptorchidismo isolato (non associato ad altre anomalie dell'apparato urogenitale) sono da attribuire a cause genetiche.

Il criptorchidismo può anche far parte del corteo sindromico di molte malattie genetiche complesse, la cui incidenza è comunque molto bassa. Sono stati ipotizzati diversi fattori ambientali, soprattutto sostanze ad azione estrogenica o anti-androgenica e anti-INSL3, ma attualmente non ci sono chiare prove di un loro ruolo nella patogenesi del criptorchidismo nell'uomo, a differenza di quanto osservato sperimentalmente negli animali da laboratorio.

Tabella 2. Cause principali del criptorchidismo.

Idiopatico	
Fattori di rischio maggiori	• basso peso alla nascita • prematurità • piccolo per età gestazionale (SGA)
Cause endocrine: non sono frequenti, ma alcuni Autori sostengono che tutti i bambini criptorchidi abbiano un certo grado di ipogonadismo relativo	• ipogonadismo ipogonadotropo (idiopatico, sindrome di Kallmann, altri difetti genetici) • ipogonadismo ipergonadotropo
Cause genetiche: circa il 5-10% dei casi non associati ad altre anomalie dell'apparato uro-genitale; più frequenti nei casi di criptorchidismo bilaterale, non si associano a discesa spontanea dei testicoli dopo la nascita	• monogeniche: ▪ mutazioni del gene <i>INSL3</i> e del suo recettore (<i>RXFP2</i>) ▪ mutazioni del gene per il recettore degli androgeni • cause cromosomiche e sindromi genetiche complesse: ▪ sindrome di Klinefelter ▪ maschio 46,XX ▪ sindrome da insensibilità agli androgeni ▪ sindrome di Down ▪ sindrome di Noonan ▪ sindrome di Beckwith-Wiedemann ▪ sindrome di Prader-Willi ▪ FG <i>syndrome</i> (o s. di Opitz-Kaveggia) ▪ del 22q11.2 ▪ del 1p36
Fattori materni	• diabete • fumo • alcool • assunzione di sostanze ad attività estrogenica o anti-androgenica in gravidanza
Anomalie anatomiche (frequenti)	• impervietà del canale inguinale • ernia inguinale • brevità del funicolo spermatico

Diagnosi

La diagnosi è volta soprattutto a differenziare il criptorchidismo dalle altre anomalie di discesa e posizione del testicolo, soprattutto dall'anorchia e dall'ectopia. L'anamnesi e l'esame obiettivo possono abbastanza facilmente individuare il testicolo mobile, testicolo che discende spontaneamente nello scroto e risale nel canale inguinale per effetto della trazione del muscolo cremastere. Nella maggior parte di questi casi non è necessaria nessuna terapia, ma il bambino potrà essere controllato annualmente per assicurarsi che la situazione si regolarizzi spontaneamente e in maniera definitiva all'epoca dello sviluppo puberale.

L'esame obiettivo deve essere eseguito con il bambino rilassato e l'ambiente e la mano del medico dovranno essere caldi, ed è indirizzato all'individuazione della posizione del testicolo, del suo volume e consistenza e della sua mobilità verso il sacco scrotale. Quando non si riesce a palpare il testicolo e quindi bisogna differenziare tra criptorchidismo, ectopia e anorchia congenita, sono necessari ulteriori accertamenti. L'anorchia congenita bilaterale può essere sospettata per la frequente coesistenza di micropene e di marcata ipoplasia dello scroto, e va poi confermata con un test all'hCG che documenta una assente risposta del testosterone. In presenza di un tale comportamento al test con hCG, l'esplorazione chirurgica alla ricerca dei testicoli può essere addirittura considerata superflua.

L'esplorazione chirurgica è invece, di regola, determinante per distinguere fra l'agenesia di un solo testicolo ed un criptorchidismo monolaterale completo. Utile come esame di primo livello è anche l'ecografia e solo quando il testicolo non è dimostrabile nemmeno con tale indagine, si può ricorrere alla RMN o, meglio ancora, alla laparoscopia o esplorazione chirurgica.

Solamente in alcuni casi (criptorchidismo bilaterale con testicoli non palpabili, associato o meno ad ipospadia, micropene o genitali ambigui) è necessario un approfondimento endocrinologico e genetico, che include cariotipo, analisi di mutazioni del gene per il recettore degli androgeni, testosterone, LH, FSH, 17-OH-Progesterone, o altre indagini ormonali secondo l'indicazione clinica. Anche i test al GnRH e all'hCG sono necessari solo in una minoranza di casi. L'analisi genetica del gene per il recettore degli androgeni, il gene INSL3 ed il suo recettore (RXFP2) possono essere utili anche nei casi di criptorchidismo monolaterale. In casi selezionati potranno essere utili altre analisi genetiche in base al sospetto clinico (per esempio analisi dei geni dell'ipogonadismo ipogonadotropo).

Terapia

La correzione del criptorchidismo ha lo scopo di riportare i testicoli nella loro sede fisiologica (la borsa scrotale) soprattutto per prevenire (o quantomeno ridurre) la degenerazione della funzione testicolare, e quindi l'infertilità e l'ipogonadismo, e l'insorgenza di tumore testicolare o quantomeno renderne più agevole la diagnosi precoce. Inoltre, il trattamento del testicolo criptorchide previene la possibilità di torsione del testicolo stesso e di traumi testicolari ed ha anche risvolti psicologici legati alla presenza di uno scroto vuoto. La correzione del criptorchidismo è attualmente raccomandata entro il secondo anno di vita, meglio se entro l'anno e mezzo. La terapia ideale del criptorchidismo è chirurgica (orchidopessi), essendo ormai la terapia farmacologica considerata priva di evidenze di efficacia.

Infatti, diversi schemi terapeutici ormonali che utilizzano GnRH e/o gonadotropine sono utilizzati da diversi decenni, ma permangono controversie sulla loro reale efficacia. Il razionale di tali trattamenti è superare quello stato di lieve ipogonadismo che si osserva spesso, o si sospetta, nei bambini criptorchidi e stimolare la proliferazione e maturazione delle cellule germinali. In questo senso alcuni Autori suggeriscono l'impiego della terapia ormonale anche in quei casi in cui la terapia è comunque chirurgica (localizzazione alta o addominale). Gli schemi terapeutici sono sostanzialmente rappresentati dall'hCG in associazione o meno con hMG e dal GnRH in associazione o meno con hMG. Generalmente si può ottenere un successo (testicoli che discendono nello scroto) solo nei casi meno gravi (criptorchidismo monolaterale, in posizione inguinale, palpabile), mentre i casi più gravi (criptorchidismo bilaterale addominale) raramente rispondono a tale trattamento o si osservano frequenti recidive. Le percentuali di successo a lungo termine sono intorno al 15-20% (discesa stabile), senza sostanziali differenze tra i diversi protocolli terapeutici. Ovviamente la

terapia ormonale è inefficace nel caso di ectopia testicolare. Studi recenti suggerirebbero addirittura un effetto negativo della terapia con hCG sulla spermatogenesi poiché alcuni studi hanno documentato un incremento di apoptosi delle cellule germinali.

L'intervento chirurgico è considerato il gold standard della terapia del criptorchidismo. L'orchidopessi consiste in una incisione a livello inguinale attraverso la quale si reperta il testicolo criptorchide che viene poi posizionato nello scroto, ed ha successo definitivo in più del 95% dei casi con una bassa incidenza (1%) di complicanze. L'intervento è stato proposto anche per via laparoscopia. Soltanto nei casi più complessi in cui il testicolo sia molto distante dallo scroto o nei casi di ectopia testicolare può essere necessario ricorrere a tecniche chirurgiche più complesse o più interventi chirurgici. Indicazione assoluta al trattamento chirurgico è il criptorchidismo dopo insuccesso di terapia ormonale, l'ectopia testicolare e il criptorchidismo associato a patologie del canale inguinale. Le linee guida suggeriscono l'intervento di orchidopessi entro i due anni di età, meglio entro l'anno e mezzo. Addirittura le più recenti pubblicazioni suggeriscono l'orchidopessi tra i 6 e i 12 mesi.

Follow up

Rischio di infertilità

Uomini con storia di criptorchidismo sono frequentemente infertili e una storia di criptorchidismo si riscontra in circa il 10% dei soggetti infertili e il 20% di quelli azoospermici. Generalmente i danni alla spermatogenesi sono più gravi nelle forme di criptorchidismo bilaterale e addominale. Tuttavia, anche nei casi di criptorchidismo monolaterale ci può essere un danno spermatogenetico nel testicolo controlaterale. In media, circa il 70-80% dei soggetti con criptorchidismo bilaterale e il 40-50% dei soggetti con criptorchidismo monolaterale presenta una oligozoospermia o azoospermia.

L'età all'orchidopessi ha un'influenza sul successivo deterioramento della spermatogenesi, soprattutto nelle forme monolaterali. Infatti, la malposizione testicolare induce precoci e progressivi danni all'epitelio seminifero secondari a diversi fattori, tra i quali la più elevata temperatura rispetto alla sede fisiologica scrotale. Tuttavia, anche un'orchidopessi precoce, seppur in grado di ridurre il rischio di infertilità, non lo annulla.

Secondo queste considerazioni è utile informare i soggetti con criptorchidismo (e i familiari) circa il rischio di infertilità in età adulta ed eseguire controlli periodici del liquido seminale dai 16-18 anni, con eventuale crioconservazione dello stesso prima che il danno progressivo spermatogenetico sia definitivo.

Rischio di tumore testicolare

Il criptorchidismo rappresenta uno dei principali fattori di rischio per il tumore del testicolo, essendo il rischio relativo 4-8 volte superiore rispetto alla popolazione generale e maggiore per i casi di criptorchidismo bilaterale e per i casi di criptorchidismo addominale. Circa il 5-10% dei casi di tumore testicolare (tumori a cellule germinali) insorgono in soggetti ex-criptorchidi. Le due patologie vengono da alcuni Autori associate nella sindrome della disgenesia testicolare che prevede che fattori genetici e ambientali inducano un alterato sviluppo della gonade durante la vita fetale che si manifesta appunto con criptorchidismo alla nascita associato o meno ad una ipospadia ed infertilità e tumore del testicolo in età adulta. Questa ipotesi è supportata da evidenze epidemiologiche, ma senza chiari elementi patogenetici comuni e dall'evidenza che il tumore del testicolo si può sviluppare anche nel testicolo controlaterale nei casi di criptorchidismo monolaterale (nel 15-20% dei casi). Un'altra ipotesi è che il tumore del testicolo sia in realtà una conseguenza diretta del criptorchidismo. A sostegno di questa ipotesi sta l'evidenza che l'orchidopessi precoce riduce, anche se non annulla, il rischio di carcinogenesi.

Per queste considerazioni è utile eseguire un follow up dei soggetti con storia di criptorchidismo tenendo presente che il tumore del testicolo ha un picco di incidenza tra i 15 e i 40 anni e il rischio di tumore anche

nel testicolo controlaterale nei casi di criptorchidismo monolaterale. In tal senso può essere utile informare i ragazzi ex-criptorchidi (e i familiari) circa l'utilità dell'autopalpazione dei testicoli ed eseguire controlli clinici periodici (visita, ecografia testicolare) con cadenza annuale.

Rischio di ipogonadismo

Sia nei casi di criptorchidismo bilaterale (più frequentemente) che monolaterale (più raramente) esiste spesso un danno testicolare bilaterale, progressivo nel tempo, non completamente influenzato anche da un'orchidopessi precoce, che coinvolge sia la componente spermatogenetica che endocrina. Da un'analisi retrospettiva della nostra casistica di soggetti infertili con storia di criptorchidismo, circa il 70% dei soggetti presenta un ipogonadismo primario ipergonadotropo (conclamato – LH elevato con testosterone basso – nel 40% dei casi, subclinico – LH elevato con testosterone normale – nel 30% dei casi) e il 2% un ipogonadismo secondario ipogonadotropo. I soggetti con criptorchidismo pertanto, indipendentemente dalla sua gravità e timing di correzione, dovrebbero essere considerati soggetti ad alto rischio di ipogonadismo, opportunamente informati di conseguenza e seguiti nel tempo, dallo sviluppo puberale (possibilità di ritardo puberale, ginecomastia) in poi con monitoraggio della crescita testicolare (meglio se con ecografia) e dosaggi ormonali (LH, T, 25(OH)-vitamina D). Nel caso di riscontro di un ipogonadismo andranno poi eseguiti gli approfondimenti specifici (metabolismo glucidico e lipidico, densitometria ossea, etc) e terapia sostitutiva (testosterone, vitamina D) adeguata, tenendo in considerazione l'aspetto riproduttivo.

Tabella 3. Management e follow-up del criptorchidismo.

Età	Schema	Personale coinvolto
Nascita	• Esaminare la posizione dei testicoli, distinguere le diverse forme di anomalie di discesa e posizione, valutare malformazioni associate per possibile DSD • Notare età gestazionale, peso alla nascita, SGA • Possibili fattori materni (diabete, ED/farmaci) • Counselling ai genitori	• Pediatra/endocrinologo pediatrico • Chirurgo/urologo pediatrico • Genetista • Genitori
6-12 mesi	• Verificare discesa spontanea ed eventuale criptorchidismo acquisito • Considerare FSH, LH, testosterone, AMH, hCG-test nel caso di testicoli non palpabili • Considerare cariotipo, analisi genetica INSL3, RXFP2, AR, geni per HH o altre analisi genetiche selezionate • Considerare esplorazione chirurgica • Programmare orchidopessi entro i 2 anni • Counselling ai genitori	• Pediatra/endocrinologo pediatrico • Chirurgo/urologo pediatrico • Genetista • Pediatra di libera scelta • Genitori
Pre-pubertà	• Esame obiettivo dei testicoli ad ogni visita pediatrica • Counselling ai genitori	• Pediatra di libera scelta • Genitori
Pubertà	• Monitorare sviluppo puberale e testicolare → ev. approfondimenti specifici • Counselling al paziente e genitori	• Pediatra/endocrinologo pediatrico • Pediatra di libera scelta • Paziente e genitori
16-18 anni	• Transizione all'endocrinologo dell'adulto/andrologo per valutazione della funzione goadica (esame del liquido seminale → ev. crioconservazione e approfondimenti specifici; ecografia testicolare; FSH, LH, testosterone; etc) • Counselling al paziente e genitori: autopalpazione, rischio di infertilità, tumore e ipogonadismo	• Endocrinologo dell'adulto/andrologo • Paziente e genitori
>18 anni	• Esame obiettivo dei testicoli alle visite MMG e sportive • Presa in carico da parte dell'endocrinologo dell'adulto/andrologo per follow-up annuale	• MMG, medici sportivi • Endocrinologo dell'adulto/andrologo • Paziente

Bibliografia essenziale

- Abaci A, et al. Epidemiology, classification and management of undescended testes: does medication have value in its treatment? J Clin Res Pediatr Endocrinol 2013;5:65-72.
- Bay K, et al. Testicular descent: INSL3, testosterone, genes and the intrauterine milieu. Nat Rev Urol 2011;8:187-96.
- Ferlin A, et al. Genetic alterations associated with cryptorchidism. JAMA 2008;300:2271-6.
- Foresta C, et al. Role of hormones, genes, and environment in human cryptorchidism. Endocr Rev 2008;29:560-80.
- Hutson JM, et al. Cryptorchidism. Semin Pediatr Surg 2010;19:215-24.
- Kolon TF, et al. Evaluation and treatment of cryptorchidism: AUA guideline. J Urol. 2014 May 13. pii: S0022-5347(14)03531-9. doi: 10.1016/j.juro.2014.05.005. [Epub ahead of print]
- Lee PA, et al. Cryptorchidism. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes 2013;20:210-216.
- Ritzén EM. Undescended testes: a consensus on management. Eur J Endocrinol 2008;159 Suppl 1:S87-90.

TUMORI TESTICOLARI

Epidemiologia e fattori di rischio delle neoplasie testicolari

La frequenza della patologia neoplastica testicolare ha un andamento trimodale: un picco in età infantile (1/100.000 nei maschi sotto i 15 anni), uno in età giovane-adulta (11/100.000 tra i 15 e i 29 anni) ed un picco nell'anziano (1/100.000 all'età di 70 anni). L'incidenza nelle ultime decadi si è dimostrata in aumento, infatti, varia da 1/100.000 in Asia e Africa a 9,2/100.000 in Danimarca. Si stima che ogni anno, in Europa vengano diagnosticati circa 24.000 nuovi casi. In Italia l'incidenza totale è pari a 5,4 per 100.000, con un picco di 10,2 per 100.000 nella fascia di età tra i 15 ed i 39 anni.

Un aspetto molto dibattuto è il riscontro di un aumento dell'incidenza di tale patologia in quasi tutto il mondo negli ultimi 40-50 anni (soprattutto USA, Canada, la maggior parte dei paesi Europei, Australia e Nuova Zelanda). Notevole, tuttavia, è che quasi di pari passo all'aumento dell'incidenza, si sia osservata anche una rilevante riduzione della mortalità.

Vengono considerati fattori di rischio per lo sviluppo di neoplasia testicolare oltre a fattori ambientali e ad abitudini voluttuarie (alimentazione, fumo di sigaretta), anche criptorchidismo, familiarità e/o pregresso tumore testicolare controlaterale, microlitiasi testicolare. Il criptorchidismo, ovvero la mancata discesa di uno o di entrambi i testicoli nella borsa scrotale, è probabilmente il fattore di rischio più noto, con un aumento del rischio di insorgenza di tumore stimato tra le quattro e le otto volte, nel testicolo ritenuto. Il meccanismo per il quale ciò avviene non è ancora ben noto, tuttavia, è stato ipotizzato che la mancata discesa testicolare e la tumorigenesi siano due manifestazioni della stessa patologia e, inoltre, nel testicolo non disceso è stata osservata una compromissione dello sviluppo delle cellule germinali già un anno dopo la nascita. Le condizioni ambientali cui è sottoposto il testicolo criptorchide non sono né fisiologiche né idonee, con ripercussioni sulla fertilità futura e con la possibilità di sviluppo di un carcinoma in situ (e quindi di insorgenza di una neoplasia maligna). Una suscettibilità ereditaria per lo sviluppo di neoplasia testicolare è stata osservata in diversi casi familiari con un rischio di insorgenza aumentato fino a 4 volte in caso di padre affetto dalla stessa patologia o perfino incrementato di 8 volte in caso di fratello affetto. Nel corso degli anni sono stati identificati diversi geni o loci genici che indurrebbero una suscettibilità genetica, ma nessun gene in particolare è stato associato in maniera significativa con l'insorgenza di neoplasia e tale mancata evidenza suggerisce come in realtà la suscettibilità alla patologia sia probabilmente legata al contributo di molteplici geni. Una pregressa neoplasia testicolare può essere considerata come un ulteriore fattore di rischio, in quanto viene osservato un aumentato rischio di insorgenza di neoplasie testicolari nel testicolo controlaterale. Tale aumento risulta massimo nei cinque anni successivi alla prima diagnosi; inoltre, l'età di insorgenza della prima neoplasia sembra modulare questo aumento di rischio, che è maggiore per tumori insorti prima dei 30 anni di età. La presenza di minute aree ipercogene "a cielo stellato" nel parenchima testicolare, condizione nota come microlitiasi, è stata anch'essa associata ad aumentata incidenza di neoplasia. L'eziologia di questa condizione non è nota, ma è stata riscontrata con una prevalenza dello 0.5-6.7% nella popolazione generale. Tuttavia, non tutti gli studi concordano su questo aspetto ed, in effetti, le osservazioni cliniche e i pochi studi longitudinali condotti non sempre hanno rilevato aumenti di incidenza significativi rispetto alla popolazione generale: allo stato attuale, pur essendo una condizione di facile riscontro in pazienti affetti da neoplasia testicolare, non esistono evidenze conclusive che permettano di considerare o di escludere la microlitiasi dai fattori di rischio di insorgenza di tumore testicolare.

Nel 1993 Sharpe and Skakkebaek proposero la cosiddetta Sindrome di Disgenesia Testicolare (TDS), la cui eziologia è legata all'esposizione ad estrogeni ambientali, denominati endocrine disruptors (EDCs) o interferenti endocrini, e ad una suscettibilità genetica a queste sostanze chimiche. La disgenesia testicolare insorge durante il primo periodo dello sviluppo fetale, cioè

durante la formazione del tratto riproduttivo maschile e può indurre criptorchidismo, ipospadia e tumore testicolare. Secondo questa ipotesi, la presenza di estrogeni ambientali determina un'alterazione delle cellule primordiali nella cascata differenziativa spermatogenetica; ciò porta alla formazione di cellule che dopo la nascita possono trasformarsi in maligne ed evolvere in carcinoma in situ. Queste cellule, rimangono quiescenti durante l'infanzia, ma durante la pubertà, in seguito a stimoli endocrini, possono cominciare a replicarsi e diffondere nei tubuli seminiferi. I fattori scatenanti che inducono la trasformazione del CIS in neoplasia ancora non sono noti. L'impregnazione di estrogeni può essere secondaria ad una maggiore assunzione di ormoni o causata da uno sbilancio ormonale endogeno.

Classificazione dei tumori del testicolo

Le neoplasie testicolari ricoprono una vasta gamma di tipi istologici, ripartiti in due grandi categorie: tumori delle cellule germinali, che rappresentano circa il 90-95% delle neoplasie testicolari, e tumori della linea non germinale. La maggior parte di queste neoplasie germinali sono molto aggressive e presentano una rapida e diffusa disseminazione metastatica anche se, con le terapie attualmente disponibili, possono essere curate.

I tumori a cellule germinali del testicolo sono classificati sulla base della presenza di uno solo o di più tipi istologici. Quelli che presentano un unico tipo istologico rappresentano circa il 40% di tutte le neoplasie testicolari; nel restante 60% si osserva una commistione di due o più tipi istologici (tumori misti).

I tumori a cellule germinali del testicolo originano da una neoplasia intratubulare a cellule germinali - *Intra Tubular Germ Cell Neoplasia, ITGCN*. Tale condizione indica una probabilità del 50% che il testicolo sviluppi un tumore invasivo entro 5 anni. Le cellule germinali neoplastiche si differenziano sulla linea gonadica dando origine al seminoma, o si trasformano in una popolazione di cellule totipotenti che maturano nei tumori non seminomatosi. Queste cellule totipotenti possono rimanere anaplastiche, formando quindi carcinoma embrionario, oppure possono differenziarsi in una linea extraembrionaria determinando la formazione di tumori del sacco vitellino o i coriocarcinomi. Il teratoma, invece, deriva dalla differenziazione delle cellule embrionarie carcinomatose lungo la linea dei tre foglietti embrionali.

Le cellule germinali neoplastiche del testicolo spesso secernono ormoni polipeptidici e alcuni enzimi, che possono essere dosati nel sangue. Tali marcatori biologici comprendono l' α -fetoproteina (AFP), la gonadotropina corionica umana (HCG), la fosfatasi alcalina placentare, l'ormone lattogeno placentare e la lattico deidrogenasi (LDH).

I tumori germinali possono avere anche un'origine extragonadica, principalmente nel mediastino, nel retroperitoneo e nella regione pineale-soprascellare. Tali localizzazioni derivano, verosimilmente, dalla migrazione aberrante di cellule germinali, nelle prime fasi dell'embriogenesi, o in alternativa da alcune cellule staminali precursori comuni delle cellule germinali, delle cellule del timo e dei pinealociti.

I tumori non germinali comprendono i tumori dello stroma e dei cordoni sessuali, con riferimento alle cellule stromali specializzate interstiziali, come quelle del Leydig ed alle cellule stromali dei cordoni sessuali delle prime fasi di differenziazione della gonade, come quelle del Sertoli. Sono generalmente benigni, alcuni dei quali capaci di produrre ed immettere in circolo ormoni steroidei. Con estrema rarità dallo stroma connettivo-vascolare possono originare tumori, generalmente benigni, tra cui angiomi, leiomiomi, neurofibromi, che non si diversificano dagli omonimi tumori di altre sedi. Si possono osservare, in casi rari, tumori della rete testis, adenomi o adenocarcinomi. Il testicolo, inoltre, può essere sede di tumori rari degli annessi e dello stroma, (mesoteliomi della vaginale, rabdo- o leiomiosarcomi) o occasionalmente, di tumori metastatici derivanti da carcinomi prostatici o polmonari.

Diagnosi

La diagnosi di una neoplasia testicolare si basa generalmente sul riscontro durante l'esame obiettivo andrologico o all'autopalpazione di una massa testicolare palpabile, unilaterale, non dolente, di consistenza duro-ligneo. Nella pratica clinica è essenziale un attento esame obiettivo generale al fine di evidenziare linfonodi aumentati di volume o masse addominali. Il dolore (scrotale, lombare o ai fianchi) è un sintomo non frequente nelle neoplasie di piccole dimensioni (circa 1/10 dei casi) e pone il sospetto di patologia disseminata. Una piccola percentuale di pazienti, soprattutto in caso di tumori non seminomatosi, può presentare ginecomastia. L'esame di conferma è l'ecografia testicolare che viene raccomandata anche in caso di tumore clinicamente evidente. Tale esame è utile nel dirimere i casi dubbi e nell'indagare il parenchima del testicolo controlaterale. Inoltre, andrebbe sempre effettuata anche in caso di aumento isolato dei marcatori sierici o di masse retroperitoneali o addominali anche in assenza di una massa scrotale evidente.

Frequentemente la diagnosi di neoplasia viene posta dopo il riscontro incidentale di una massa non palpabile, messa in evidenza durante un esame ecografico effettuato per altri motivi (traumi testicolari, indagini di screening per infertilità, varicocele, ecc). Tali masse generalmente sono inferiori ad 1 cm di diametro. Alcuni autori, se la massa riscontrata è inferiore a 5 mm, priva di vascolarizzazione all'ecodoppler e con markers negativi, consigliano il monitoraggio ecografico della lesione ogni 3 mesi o il ricorso ad ulteriori tecniche di imaging per la diagnosi differenziale. La risonanza magnetica (RMN) con somministrazione di gadolinio è spesso utilizzata per dirimere il quadro clinico nei casi in cui l'ecografia non sia conclusiva. Le immagini acquisite, nelle sequenze in T1 e T2, sono generalmente sufficienti a fornire una caratterizzazione della lesione (dimensioni, forma, localizzazione e rapporti con le strutture anatomiche adiacenti, componenti necrotiche).

La tomografia computerizzata (TC) con mezzo di contrasto iodato trova invece la sua indicazione nei casi in cui la RMN non sia praticabile (claustrofobia, protesi metalliche) e nella stadiazione iniziale della patologia, in quanto in grado di identificare con chiarezza la compromissione di linfonodi retroperitoneali e paraaortici, e le eventuali metastasi epatiche e polmonari.

La tomografia ad emissione di positroni (PET)/TC con somministrazione di ^{18}F -fluorodesossiglucosio ha indicazioni limitate alla valutazione delle masse residue dopo le terapie e nella malattia metastatica.

I marcatori sierici come AFP, hCG e LDH sono molto utilizzati come fattore prognostico, nello staging e come ausilio nella diagnosi. Un loro incremento può essere indicativo di una neoplasia testicolare, ma la loro assenza non è in grado di escluderlo. Tuttavia andrebbero sempre eseguiti in pratica clinica, data la loro utilità nel follow up. Infatti una loro eventuale persistenza o ricomparsa dopo l'escissione del testicolo indica con certezza la persistenza o la ricomparsa della patologia.

Trattamento chirurgico e stadiazione

I pazienti con massa testicolare sospetta per neoplasia sono candidati all'intervento chirurgico di orchifunicolectomia effettuata dopo esplorazione inguinale ed esteriorizzazione del testicolo e della sua tunica, il che è allo stesso tempo un intervento diagnostico, di stadiazione e curativo limitatamente a piccole lesioni. L'orchiectomia inguinale radicale, usando un'incisione inguinale con iniziale legatura del funicolo spermatico fino all'anello inguinale interno, riduce al minimo le recidive locali e la diffusione linfatica anomala. L'orchiectomia trans-scrotale è controindicata, perché lascia intatto il tratto inguinale del funicolo spermatico (dall'anello esterno all'interno) e predispone il paziente allo sviluppo di metastasi sulla cute dello scroto ed ai linfonodi inguinali e pelvici (causate dallo sviluppo di un alterato drenaggio linfatico verso i linfonodi inguinali e pelvici). Se la diagnosi è dubbia, può essere effettuata la semplice enucleazione/biopsia della

lesione per effettuare l'esame istologico che sarà poi dirimente per procedere all'orchifunicolectomia in un secondo tempo in caso di conferma di malignità. In caso di neoplasia sincrona o metacrona al testicolo controlaterale è accettabile effettuare la semplice enucleazione della lesione nel tentativo di preservare la funzionalità dell'organo nel paziente monorchide, purché si rispettino i criteri di radicalità chirurgica.

Il sistema di stadiazione maggiormente utilizzato è il TNM. Inoltre, integrando le informazioni provenienti dall'esame istologico definitivo (istotipo), dagli studi di imaging (lesioni ripetitive a distanza e loro localizzazione), andamento dei marcatori tumorali pre e post intervento chirurgico e pre chemio/radioterapia è possibile categorizzare i pazienti in classi prognostiche (buona, intermedia e cattiva prognosi).

pT	Tumore primitivo
pTx	Tumore primitivo non riscontrato
pT0	Non evidenza di tumore primitivo
pTis	Tumore intratubulare
pT1	Tumore limitato al testicolo e all'epididimo senza invasione vascolare; o tumore con invasione della tunica albuginea ma non la tunica vaginale
pT2	Tumore limitato al testicolo e all'epididimo con invasione vascolare; o tumore con estensione alla tunica vaginale
pT3	Tumore invadente il cordone spermatico
pT4	Tumore invadente lo scroto
pN	Linfonodi loco-regionali
pNx	Linfonodi loco-regionali non valutati
pN0	Non metastasi linfonodali
pN1	Singola o multiple metastasi linfonodali ≤ 2 cm
pN2	Singola o multiple metastasi linfonodali > 2 cm e ≤ 5 cm
pN3	Singola o multiple metastasi linfonodali > 5 cm
M	Metastasi a distanza
Mx	Metastasi a distanza non valutate
M0	No metastasi a distanza
M1	Metastasi a distanza

Terapia dei tumori testicolari

Attualmente la prognosi dei pazienti con tumore testicolare è notevolmente migliorata. Infatti, nel 1970 la sopravvivenza media di questi pazienti era soltanto del 10%, mentre già dal 1990 ha superato il 90%. Questo miglioramento è da attribuire ai notevoli progressi diagnostici e chirurgici nonché a nuovi protocolli radioterapici e farmacologici a cui i tumori testicolari, sono

particolarmente sensibili. I diversi istotipi della neoplasia testicolare mostrano differenti risposte in funzione della terapia. Inoltre, è importante sottolineare che anche quando i pazienti presentano metastasi diffuse alla diagnosi, dovrebbero essere trattati, perché suscettibili di guarigione.

In pazienti affetti da seminoma di stadio I, si rileva la presenza di metastasi subcliniche (soprattutto retroperitoneali) nel 15-20% dei casi. In caso di massa tumorale <4cm ed assenza di invasione della rete testis (pazienti a basso rischio) il tasso di recidiva della patologia è di circa il 6%, in caso di sola sorveglianza. In questa piccola percentuale di pazienti è possibile effettuare chemioterapia o radioterapia con intento curativo. Nel complesso, questo tipo di approccio, permette di raggiungere tassi di sopravvivenza del 97-100% in centri specializzati, pur con la necessità di un follow up più stringente per almeno 5 anni dall'orchietomia. Come alternativa è possibile effettuare una terapia adiuvante con uno o due cicli di carboplatino AUC 7 o con radioterapia alle dosi di 20-24 Gy focalizzata sui linfonodi paraortici ed iliaci. Entrambe le opzioni riducono ulteriormente i tassi di recidiva a circa l'1-3%.

Per quanto riguarda i tumori non seminomatosi di stadio I, in oltre il 30% dei casi sono presenti metastasi subcliniche. Queste causeranno una recidiva in caso di atteggiamento conservativo (solo orchifunicolectomia e sorveglianza clinica), che potrebbe manifestarsi anche come una massa addominale di grandi dimensioni, nonostante uno stretto follow up. Circa 4/5 di questi pazienti avranno una recidiva già entro il primo anno dall'intervento, il 12% entro il secondo anno ed il 6% entro il terzo. Per tale motivo, in questi istotipi, viene effettuata una terapia adiuvante a base di cisplatino, bleomicina ed etoposide, per due o tre cicli complessivi, in grado di abbattere il tasso di recidive attorno al 3%. La radioterapia non viene presa in considerazione in prima istanza a causa della ridotta radiosensibilità di questi istotipi. In alcuni casi, soprattutto per esigenze legate a radicalità chirurgica, viene effettuata la dissezione dei linfonodi retroperitoneali. Questo intervento, spesso gravato da complicanze, non si è dimostrato superiore alla chemioterapia (PEB), tuttavia in associazione ad almeno due cicli di PEB ha ridotto i tassi di recidiva ad un livello <2%.

Per quanto riguarda lo stadio avanzato di patologia, il trattamento post orchietomia è più intenso. Mantenendo la differenziazione tra tumori seminomatosi e non, i primi essendo notevolmente più radiosensibili sono trattati di preferenza con sedute radioterapiche ad alta dose (30-36 Gy) sul distretto paraortico ed iliaco ed eventualmente nelle altre sedi di metastasi linfonodali. In alternativa o in associazione al trattamento radiante, può essere utilizzata la chemioterapia per ridurre il tasso di recidiva negli stadi ad alto rischio (IIB). I tumori non seminomatosi, invece, sono generalmente trattati con tre-quattro cicli di chemioterapia (PEB). Nei casi in cui si riscontrino livelli di markers tumorali persistentemente elevati, si può preferire la dissezione dei linfonodi retroperitoneali se, dopo breve osservazione clinica, le lesioni residue rimangono stabili o risultano in crescita, riservando un atteggiamento più conservativo solo nel caso in cui, dopo 6 settimane, gli eventuali residui non mostrino caratteristiche di malignità.

Bibliografia

- Albers P, Albrecht W, Algaba F, et al: EAU Guidelines on Testicular Cancer : 2011 Update. 2011; **60**: 304–319.
- Albers P, Bokemeyer C, Martin C, et al: The Contemporary Role of Chemotherapy for Advanced Testis Cancer : A Systematic Review of the Literature. 2012; **61**: 1212–1221.
- Manecksha RP and Fitzpatrick JM: BJUI Epidemiology of testicular cancer. 2009: 1329–1333.
- Nigam M and Aschebrook B: Increasing incidence of testicular cancer in the United States and Europe between 1992 and 2009. World J. Urol. 2015: 623–631. Available at: <http://dx.doi.org/10.1007/s00345-014-1361-y>.

- Petrelli F, Coinu A, Cabiddu M, et al: Surveillance or Adjuvant Treatment With Chemotherapy or Radiotherapy in Stage I Seminoma : A Systematic Review and Meta-Analysis of 13 Studies. *Clin. Genitourin. Cancer* 2015; **13**: 428–434. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clgc.2015.04.005>.
- Secil M, Altay C and Basara I: State of the art in germ cell tumor imaging. *Urol. Oncol. Semin. Orig. Investig.* 2015: 1–9. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.urolonc.2015.06.017>.

INFEZIONI E INFIAMMAZIONI DEL TRATTO UROGENITALE MASCHILE

INTRODUZIONE

Le infezioni e le infiammazioni del tratto urogenitale maschile si manifestano con frequenza elevata e vengono inquadrare in una categoria diagnostica, nota come male accessory gland infection (MAGI).

Tale categoria focalizza l'attenzione sullo stato infettivo e/o infiammatorio delle ghiandole sessuali accessorie maschili in grado di causare infertilità maschile.

I meccanismi patogenetici sono multipli e comprendono alterazioni organiche (sebbene le sub-occlusioni e le occlusioni sono rare) e funzionali (alterato svuotamento) del sistema duttale, anatomicamente posto a diversa distanza dalle stazioni ghiandolari drenanti in esso.

Le MAGI sembrano interessare 1,6-15% dei pazienti infertili che si sottopongono al percorso diagnostico per la valutazione del proprio stato di fertilità.

La relazione fra MAGI e infertilità da fattore maschile è, ad oggi, molto forte, in quanto la prima si associa spesso ad alterazione dei principali parametri spermatici e a modifiche strutturali e funzionali delle ghiandole accessorie maschili. Per tale motivo, dunque, le MAGI rappresentano fra tutte, la causa più facilmente identificabile e risolvibile di infertilità maschile.

A causa della scarsa penetrabilità degli antibiotici a livello di tale distretto e del loro andamento per lo più paucisintomatico, le MAGI vengono spesso diagnosticate tardivamente ossia quando il processo infiammatorio si è esteso, per via retro-canalicolare ascendente, a una o più ghiandole sessuali accessorie. La trasmissione può avvenire anche per via ematogena, anche se ciò avviene raramente.

Per lo stesso motivo, la flogosi tende a cronicizzare e ad estendersi mono- o bilateralmente causando, talvolta, serie difficoltà per una sua risoluzione completa; infatti, in alcuni casi il processo infiammatorio può ostruire il tratto escretorio prossimale e/o distale causando alterazioni nemaspermiche durante il transito/permanenza degli spermatozoi a livello delle ghiandole interessate dal processo infiammatorio.

Quindi, ove possibile è necessario identificare e trattare precocemente tale patologia al fine di preservare la fertilità futura.

CLASSIFICAZIONE

Le infiammazioni/infezioni possono interessare solamente il canale uretrale (uretriti) e/o estendersi alle ghiandole sessuali accessorie. Sulla base della loro estensione, le MAGI possono essere distinte in:

- MAGI “non complicate”: prostatiti;
- MAGI “complicate”: prostatite-vesciculiti, prostatite-vescicolo-epididimiti e epididimo-orchiti.

Uretrite

L'uretrite è una patologia infiammatoria a carico dell'uretra prevalentemente a trasmissione sessuale (MTS) sostenuta nella maggior parte dei casi da *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Trichomonas vaginalis*, altri germi comuni e miceti.

Le manifestazioni cliniche comprendono bruciore o sensazione di fastidio a livello uretrale durante la minzione o l'eiaculazione e, a volte, presenza di secrezione purulenta; talvolta, l'uretrite può decorrere in maniera asintomatica con la sola presenza di arrossamento a livello del meato uretrale.

La diagnosi può essere effettuata mediante tampone uretrale.

MAGI “non complicate”

Le prostatiti sono processi infiammatori e/o infettivi localizzati a livello della ghiandola prostatica che presentano una prevalenza compresa fra il 5% e il 14,2% e che sulla base della durata e delle modalità di insorgenza possono manifestarsi in forma acuta o cronica (persistenza in quest'ultimo caso dell'infiammazione/infezione per più di 3 mesi).

Le prostatiti costituiscono solo una parte delle MAGI e si possono manifestare con sintomi sia di natura ostruttiva (lower urinary tract syndrome o LUTS) che di tipo irritativo con o senza infiammazione (flogosi prostatiche).

Il ruolo dello spermioγραμμα nel percorso diagnostico è marginale e viene inserito fra i test opzionali.

La classificazione delle prostatiti più frequentemente utilizzata è quella proposta dal National Institutes of Health (NIH) (Krieger et al. che le suddivide in 4 categorie principali (Tab. 1).

Tabella 1. Classificazione delle prostatiti in base ai criteri del National Institutes of Health (NIH) (Krieger et al., 1999).

Categoria I	Prostatite acuta batterica (1-5%)
Categoria II	Prostatite cronica batterica (5-10%)
Categoria III	Prostatite cronica abatterica/sindrome del dolore pelvico cronico, suddivisa in: • IIIA: infiammatoria (40-65%) • IIIB: non infiammatoria (20-40%)
Categoria IV	Prostatite asintomatica (prostatite istologica)

La prostatite acuta rappresenta il 5% delle forme di prostatite e può manifestarsi con stranguria, dolore sovrapubico, derivazione urinaria sovrapubica e febbre e, a volte, richiede l'ospedalizzazione.

Qualsiasi manovra di tipo diagnostico o terapeutico (massaggio prostatico, cateterizzazione uretrale è **proscritta** per il pericolo di disseminazione batterica.

Le altre forme di prostatite sono più frequenti e, a differenza di quella acuta, sono asintomatiche o paucisintomatiche.

La diagnosi in questo caso è resa più difficile dalla difficoltà nel reperire il germe responsabile e si basa

prevalentemente sulla sintomatologia e sui dati ecografici

Nella prostatite di categoria IV, la diagnosi è istologica e può essere di ausilio per l'identificazione solo l'ecografia transrettale.

Recentemente è stato riportato che i pazienti con prostatite cronica batterica e sindrome del colon irritabile hanno con maggiore frequenza segni e sintomi di MAGI rispetto a pazienti con sola prostatite cronica batterica e che, in tali pazienti, sembrano essere peggiori i parametri del liquido seminale e la prognosi riproduttiva.

MAGI "complicate"

Le altre forme di MAGI rappresentate da prostatici, vescicoliti e prostatico-vescicolo-epididimiti sono di maggiore interesse clinico non tanto per la presentazione clinica, essendo paucisintomatiche o con sintomatologia sovrapponibile a quella delle sindromi prostatiche, quanto per la possibile correlazione di esse con l'infertilità involontaria di coppia.

Infatti, valutare se il processo infiammatorio ha coinvolto altre ghiandole sessuali è importante sia per prevedere la risposta alla terapia medica sia per correlare l'estensione della patologia alle alterazioni seminologiche e, quindi, alla fertilità del paziente.

Uno studio della letteratura su un campione molto ampio di coppie infertili riporta un'incidenza del 13,8% di oligo-asteno-teratozoospermia (OAT) dovuta alla presenza di MAGI.

Secondo uno studio degli Autori in corso di pubblicazioni, l'applicazione di addizionali criteri ecografici nella diagnosi di MAGI consente di avvertire la seguente loro incidenza nelle coppie infertili: prostatite: 40.3%; prostatico-vescicolite: 27.5% e prostatico-vescicolo-epididimite: 32.2%.

Le vescicoliti sono per lo più secondarie a prostatiti, con sequele post-flogistiche organiche e/o funzionali delle vie escretrici spermatiche distali e sono accompagnate da un'elevata percentuale di alterazioni dei parametri seminali.

In Italia, ogni anno i casi di epididimite sono circa 600.000.

Nella fascia di età 19-35 anni, rappresentano una sequela di malattie sessualmente trasmesse (*Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* o altri germi) o di malformazioni congenite dell'apparato uro-genitale (ipospadia, criptorchidismo).

Invece, quando un'epididimite si manifesta in soggetti di età >35 anni, essa è la complicità più frequente di prostatite batterica.

Le epididimiti hanno decorso clinico (acuto, subacuto, cronico) e sintomatologia variabile (da severa a sfumata); talvolta, esse si manifestano con tumefazione e dolore scrotale, solitamente monolaterale, coinvolgendo anche il testicolo nel processo infiammatorio (orchi-epididimite).

Anche in questo caso, un esame utile per l'andrologo risulta l'ecografia del tratto didimo-epididimario che può mettere in evidenza alcune delle caratteristiche strutturali tipiche di MAGI, discusse successivamente.

La prostata, le vescicole seminali e gli epididimi svolgono azioni fisiologiche importanti sulla riserva

spermatica post-testicolare e il tempo di interazione fra gli spermatozoi e tali ghiandole determina la gravità del danno nemaspermico.

MAGI E INFERTILITÀ

Meccanismi patogenetici del danno nemaspermico nelle MAGI

I meccanismi etiopatogenetici con i quali le MAGI possono causare infertilità sono molteplici e agiscono a diversi livelli ma tutti hanno come risultato finale un potenziale danno a livello della cellula nemaspermica. Il processo infettivo/infiammatorio può danneggiare lo spermatozoo in maniera:

- Diretta sia lo spermatozoo maturo che un suo progenitor;
- Indiretta, alterando il microambiente dove gli spermatozoi si formano e maturano o impedendo, a causa della sub-ostruzione del tratto escretorio prossimale e/o distale, il loro transito verso l'esterno.

Il danno a livello nemaspermico può essere a carico dei parametri convenzionali del liquido seminale (numero, motilità e morfologia), ma può interessare anche altri parametri di tipo funzionale della cellula stessa.

A tal proposito, gli studi degli ultimi anni hanno focalizzato l'attenzione sui parametri bio-funzionali dello spermatozoo, attribuendo ad essi un importante ruolo, soprattutto quando i parametri del liquido seminale sono normali in soggetti però con infertilità definita idiopatica.

Fra di essi, ricordiamo le alterazioni che si possono riscontrare a livello della cromatina e/o del DNA nemaspermico, la funzione mitocondriale, il grado di apoptosi nemaspermica e la valutazione della reazione acrosomiale; tali parametri, valutabili con varie metodiche, forniscono importanti informazioni anche se, ad oggi, il loro principale limite è la **mancanza di standardizzazione**.

La cellula nemaspermica può essere danneggiata in maniera diretta da:

- germi sicuramente patogeni (*Gram negativi*, *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum*, ecc.) o prodotti batterici (lipopolisaccaride, ecc.);
- metaboliti tossici prodotti dai microorganismi (H_2O_2 , NH_3 prodotto dall'*Ureaplasma urealyticum*);
- Leucociti seminali;
- Fattori solubili, quali i radicali liberi dell'ossigeno (ROS) e le citochine.

I ROS, causando stress ossidativo e quindi scatenando il fenomeno della lipoperossidazione lipidica delle membrane, alterano i lipidi, le proteine e il DNA danneggiando quindi la membrana degli spermatozoi e dei mitocondri, con conseguente alterazione della motilità, e del DNA nemaspermico 2009.

I ROS possono essere prodotti dai leucociti presenti nel liquido seminale che aumentano in corso di infiammazione o di infezione in risposta alla presenza dei microrganismi e dagli spermatozoi stessi.

Le MAGI, scatenando la risposta infiammatoria, sono in grado di stimolare la risposta immuno-mediata, prevalentemente linfocitaria e, quindi, possono avere un ruolo anche nella formazione di anticorpi anti-spermatozoo (ASA).

Le citochine sono in grado di modulare e di regolare le risposte immunitarie ed infiammatorie e di modificare il comportamento di altre cellule, inducendo nuove attività come crescita, [differenziazione](#) e apoptosi. Quelle maggiormente coinvolte nell'infertilità maschile sono: l'interleuchina (IL)-1, l'IL-2, l'IL-6, l'IL-8, l'interferone- γ e il tumor necrosis factor- α (TNF- α).

Il TNF- α si è dimostrata capace di ridurre la motilità degli spermatozoi e di aumentare la percentuale di spermatozoi con indici precoci e tardivi di apoptosi *in vitro*.

Infine, le MAGI agendo a vari livelli possono danneggiare indirettamente gli spermatozoi alterando la funzione secretoria delle ghiandole sessuali maschili a livello:

- dell'epididimo dove modificano la produzione di α 1-glicosidasi, gliceril-fosforilcolina e carnitina;
- nelle vescicole seminali modificando la produzione di fruttosio;
- nella prostata: modificando la produzione di acido citrico, zinco, fosfatasi acida prostatica e dell'antigene prostatico (PSA).

MAGI e alterazioni dei parametri del liquido seminale

I dati in letteratura sulle alterazioni dei parametri seminali in pazienti con MAGI non sono concordanti. La maggior parte degli studi sembra riconoscere in tale categoria diagnostica un importante fattore di rischio di infertilità maschile in quanto le MAGI, con i meccanismi sopra elencati, sono in grado di alterare i parametri del liquido seminale e la "qualità" dello spermatozoo.

Altri studi, invece, non riportano differenze significative a carico dei parametri del liquido seminale nei pazienti con MAGI rispetto ai controlli.

I parametri del liquido seminale che generalmente si presentano alterati in corso di MAGI sono:

- la concentrazione nemespermaica;
- la motilità progressiva nemespermaica;
- la morfologia nemespermaica.

Però, le MAGI frequentemente si associano anche possono ad alterazioni del pH, del tempo di liquefazione, l'aumento del numero di leucociti e la presenza di macrofagi, spermiofagi, spermio-aggregazioni, spermio-agglutinazioni e detriti; inoltre, si può anche riscontrare un aumento della viscosità del liquido seminale che permette non solo di identificare la presenza della patologia in questione ma può essere utile quale parametro per il monitoraggio dell'efficacia.

Oltre alle alterazioni dei parametri convenzionali del liquido seminale, sembra che le MAGI siano in grado di alterare anche alcuni parametri non convenzionali, quali la funzionalità mitocondriale, l'integrità del DNA

e/o della cromatina e il grado di apoptosi degli spermatozoi.

Un recente studio della letteratura riporta che le MAGI aumentano la percentuale di spermatozoi con DNA frammentato, con basso potenziale di membrana mitocondriale e in apoptosi, e riducono il numero di spermatozoi vitali.

Un altro aspetto da prendere in considerazione è il diverso effetto delle MAGI sui parametri del liquido seminale in relazione all'estensione del processo infiammatorio e, quindi, al numero di ghiandole coinvolte nonché la loro localizzazione mono- o bilaterale.

A tal riguardo, i pazienti con sola prostatite o con prostatite-vescicolite hanno alterazioni marginali dei parametri del liquido seminale, mentre il coinvolgimento flogistico di tutte e tre le ghiandole sessuali accessorie (prostatite-vescicolite-epididimite) è associato ad un più significativo peggioramento della concentrazione, della motilità e della morfologia nemespermaica.

Alcuni studi degli Autori riportano che il quadro seminale risulta ulteriormente peggiorato (soprattutto la concentrazione nemespermaica) quando la prostatite-vescicolite-epididimite si estende bilateralmente e che i pazienti infertili con vescicole seminali ipertrofiche-congestive presentano una qualità spermatica migliore, ma stress ossidativo più elevato rispetto a pazienti con vescicole seminali fibrosclerotiche.

SINTOMATOLOGIA DELLE MAGI

La sintomatologia del paziente affetto da MAGI può essere indagata attraverso un'anamnesi accurata. Recentemente, gli Autori hanno messo a punto un questionario dedicato che con delle domande mirate mette in risalto i principali sintomi che il paziente con MAGI potrebbe presentare.

Nel questionario, che è un'intervista strutturata con 30 domande alle quali si può rispondere con 4 possibili risposte, vengono indagati quattro domini sintomatologici:

- a) Minzione: pollachiuria, nicturia, urgenza minzionale, disuria, stranguria, ecc.;
- b) Eiaculazione: dolore/fastidio durante o dopo l'eiaculazione in sede sovrapubica e/o perineale, riduzione di volume dell'eiaculato, emospermia, dolore pelvico cronico, ecc.;
- c) Sfera sessuale: riduzione della capacità di raggiungere e/o mantenere un grado di rigidità peniena soddisfacente, eiaculazione precoce o ritardata;
- d) Qualità di vita: notevole riduzione della qualità di vita del paziente.

Un altro recente studio degli Autori riporta che i pazienti infertili con prostatite-vescicolite o prostatite-vescicolite-epididimite presentano punteggi più elevati nella compilazione di tali questionari rispetto a pazienti con sola prostatite e che i pazienti con prostatite-vescicolite-epididimite mostrano punteggi più alti relativamente ai domini 2 e 3 rispetto a pazienti con sola prostatite-vescicolite, a testimonianza del fatto che la maggiore estensione del processo infiammatorio correla con la sintomatologia.

CRITERI DIAGNOSTICI DELLE MAGI

Criteri dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO)

I criteri diagnostici enunciati dalla WHO si basano sulla storia clinica del paziente, l'esame obiettivo degli organi genitali maschili, le alterazioni a livello del secreto prostatico e le alterazioni dei parametri del liquido seminale.

Secondo i criteri WHO, la diagnosi di MAGI viene posta in presenza di:

- OAT + 1 fattore Gruppo A + 1 fattore Gruppo B
- OAT + 1 fattore Gruppo A + 1 fattore Gruppo C
- OAT + 1 fattore Gruppo B + 1 fattore Gruppo C
- OAT + 2 fattori Gruppo C

Le caratteristiche di ogni singolo gruppo sono elencate nella Tab. 2.

Tabella 2. Caratteristiche cliniche e laboratoristiche dei tre gruppi di fattori utili per la diagnosi di MAGI secondo i criteri della WHO

Gruppo A
Storia clinica positiva per:
• Infezioni urinarie • Epididimiti • Malattie sessualmente trasmissibili
Esame obiettivo positivo per alterato volume e consistenza :
• Testicolare • Epididimo-deferenziale • Prostatico-vescicolare
Gruppo B
Analisi del secreto prostatico o della prima frazione urinaria dopo massaggio prostatico, con presenza di:
• Leucociti >10 (40X) • Germi 10 volte maggiore vs. il primo mitto
Gruppo C
Segni infiammatori dell'eiaculato
• Leucociti >1x10⁶/ml • Spermiocoltura significativa (>10⁵ cfu/ml) • Alterate proprietà chimico-fisiche

Criteri ecografici

La descrizione ecografica dei pazienti con MAGI nasce dall'esigenza di valutare per prima cosa il coinvolgimento e successivamente l'estensione (mono- e bilaterale) delle ghiandole sessuali accessorie maschili nel processo flogistico.

A tale scopo, di ausilio sono l'ecografia didimo-epididimaria e l'ecografia prostatico-vescicolare per via transrettale.

Utilizzando criteri ecografici ben codificati è possibile valutare le caratteristiche morfostrutturali indicative della presenza del processo flogistico a livello della prostata, delle vescicole seminali e dell'epididimo.

La diagnosi ecografica di prostatite cronica può essere posta quando sono presenti due o più dei seguenti segni:

- Asimmetria ghiandolare;

- Aree di ipoecogenicità;
- Aree di iperecogenicità associate ad aree di calcificazioni;
- Dilatazione del plesso venoso periprostatico.

La diagnosi ecografica di vesciculite cronica può essere posta quando sono presenti due o più dei seguenti segni:

- Incremento mono- o bilaterale del diametro antero-posteriore (DAP) delle vescicole seminali (>14 mm);
- Asimmetria fra i diversi DAP con una differenza >2.5 mm fra una vescicola seminale e la controlaterale (7-14 mm);
- DAP ridotto in almeno una vescicola seminale (<7 mm);
- Presenza di epitelio ghiandolare aumentato di consistenza e/o calcifico;
- Presenza di aree policicliche separate da setti iperecogeni in una o entrambe le vescicole seminali.

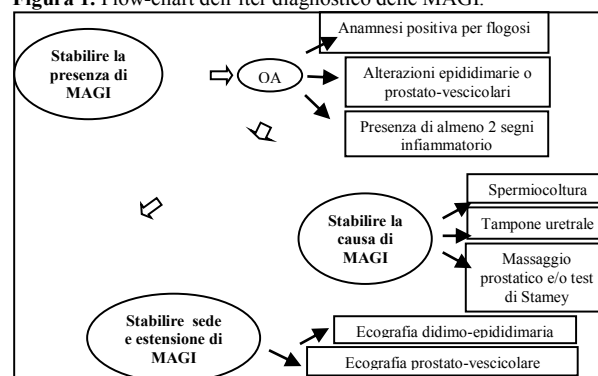
Inoltre, l'esame ecografico permette di identificare una variante flogistica delle vescicole seminali (forma ipertrofica-congestizia) o sclerotica (forma sclero-atrofica) utile per predire la risposta alla terapia medica, che è migliore nella prima forma rispetto alla seconda.

La diagnosi ecografica di epididimite cronica può essere posta quando sono presenti due o più dei seguenti segni:

- Aumento della testa di uno o di entrambi gli epididimi (>12 mm);
- Aumento della coda di uno o di entrambi gli epididimi (>6 mm);
- Presenza monolaterale o bilaterale di microcisti all'interno della testa o della coda dell'epididimo;
- Ipo- o iperecogenicità dell'epididimo stesso;
- Presenza di idrocele mono o bilaterale-

Nel sospetto di MAGI, è dunque necessario seguire un appropriato iter diagnostico come riportato in Fig. 1.

Figura 1. Flow-chart dell'iter diagnostico delle MAGI.



BIBLIOGRAFIA

- Christiansen E, Purvis K. Diagnosis of chronic abacterial prostaticitis by rectal ultrasonography in relation to symptoms and findings. Br J Urol. 1991;67:173-176.
- Krishnan R, Heal MR. Study of the seminal vesicles in acute epididymitis. Br J Urol. 1991;67:632-637.
- Weidner W, Schiefer HG, Krauss H et al. Chronic prostatitis: a through search for etiologically involved microorganism in 1461 patients. Infection 1991;19:119-125.

- Rowe P, Comhaire F, Hargreave TB et al. World Health Organization Manual for the Standardised Investigation and Diagnosis of the infertile Couple. Cambridge University Press, Cambridge, 1993.
- Weidner W, Krause W, Ludwig M. Relevance of male accessory gland infection for subsequent fertility with special focus on prostatitis. *Hum Reprod Update* 1999;5:421- 432.
- Krieger JN, Nyberg L Jr, Nickel JC. NIH consensus definition and classification of prostatitis. *JAMA* 1999;282:236-237.
- Vicari E. Seminal leukocyte concentration and related specific reactive oxygen species production in patients with male accessory gland infections. *Hum Reprod.* 1999;14:2025-2030.
- Vicari E, La Vignera S, Castiglione R et al. Sperm parameter abnormalities, low seminal fructose and reactive oxygen species overproduction do not discriminate patients with unilateral or bilateral post-infectious inflammatory prostatic-vesiculo-epididymitis. *J Endocrinol Invest.* 2006;29:18-25.
- Perdichizzi A, Nicoletti F, La Vignera S et al. Effects of tumour necrosis factor-alpha on human sperm motility and apoptosis. *J Clin Immunol.* 2007;27:152-162.
- Schuppe HC, Meinhardt A, Allam JP et al. Chronic orchitis: a neglected cause of male infertility? *Andrologia.* 2008;40:84-91.
- Lanzafame FM, La Vignera S, Vicari E, et al. Oxidative stress and medical antioxidant treatment in male infertility. *Reprod Biomed Online* 2009;19:638-653.
- Schuppe HC, Pilatz A, Hossain H et al. Orchitis and male infertility. *Urologe A.* 2010;49:629-635.
- Vicari E, Calogero AE, Condorelli RA et al. Male accessory gland infection frequency in infertile patients with chronic microbial prostatitis and irritable bowel syndrome. *Int J Androl.* 2011a. [Epub ahead of print].
- Vicari E, Calogero AE, Condorelli R et al. Male Accessory Gland Infection Frequency in Infertile Patients with Chronic Microbial Prostatitis and Irritable Bowel Syndrome: Transrectal Ultrasound Examination Helps to Understand the Links. *J Androl.* 2011b. [Epub ahead of print]
- La Vignera S, Condorelli RA, Vicari E et al. Hyperviscosity of semen in patients with male accessory gland infection: direct measurement with quantitative viscosimeter. *Andrologia.* 2011a. [Epub ahead of print].
- La Vignera S, Condorelli R, D'Agata R et al. Semen alterations and flow-citometry evaluation in patients with male accessory gland infections (MAGI). *J Endocrinol Invest.* 2011b. [Epub ahead of print]
- La Vignera S, Vicari E, Condorelli R et al. Hypertrophic-congestive and fibro-sclerotic ultrasound variants of male accessory gland infection have different sperm output. *J Endocrinol Invest.* 2011c;34:330-335.
- La Vignera S. Male accessory gland infections: anatomical extension of inflammation and severity of symptoms evaluated by an original questionnaire. *Andrologia.* 2011d. [Epub ahead of print]
- La Vignera S, Calogero AE, Condorelli RA et al. Ultrasonographic evaluation of patients with male accessory gland infection. *Andrologia.* 2011e [Epub ahead of print]
- Vicari E, La Vignera S, Calogero AE. Oxidative stress and infection. In: Agarwal A, Aitken J, Alvarez J, Eds. *Oxidative stress and male infertility.* New York, NY: Springer Editor 2012 (in corso di stampa).

Il varicocele

Epidemiologia

Il varicocele rappresenta, anche in considerazione della sua elevata prevalenza, un importante fattore di rischio di infertilità maschile. Il varicocele è definito come un'abnorme dilatazione delle vene del plesso pampiniforme associata a reflusso venoso ed è presente in circa il 15% della popolazione maschile e in circa il 40% degli uomini infertili. Nella maggior parte dei casi (78-93%) interessa l'emiscroto sinistro, meno frequentemente interessa l'emiscroto destro e raramente è bilaterale.

Oltre al varicocele riscontrato negli uomini adulti in seguito agli approfondimenti per infertilità, la diagnosi e il trattamento del varicocele, per la possibile influenza sulla futura fertilità del paziente, costituiscono uno degli argomenti più interessanti e dibattuti in ambito andrologico pediatrico. Infatti, il varicocele, raro in ragazzi di età inferiore ai 10 anni (Tanner I: 0-3%), tende ad aumentare di frequenza in età compresa tra i 10 e i 14 anni (Tanner 2-4: 3-7%) per raggiungere poi la prevalenza del 15%, sovrapponibile a quella dell'adulto, in età superiore ai 15 anni (Tanner 5), suggerendo la natura progressiva della patologia.

Eziologia

Considerando la predominanza del varicocele sinistro e l'anatomia della vena spermatica sinistra sono state postulate diverse teorie per spiegare l'eziologia del varicocele: l'incompetenza del sistema valvolare venoso, la differente pressione idrostatica lungo la vena spermatica sinistra, più lunga della destra, l'effetto "schiaccianoci" dato dallo schiacciamento della vena renale nel compasso aorta mesenterico e l'incremento del flusso arterioso testicolare durante la pubertà che, superando la capacità venosa, ne determinerebbe l'ectasia.

Fisiopatologia del danno testicolare

Il meccanismo con cui il varicocele può indurre un danno testicolare non è ancora del tutto chiaro e soprattutto il problema principale che non ha ancora trovato piene spiegazioni è perché il varicocele abbia un effetto dannoso sulla spermatogenesi solo in alcuni uomini e non in altri. Di conseguenza non c'è accordo in letteratura su quali pazienti con varicocele trattare e quali invece seguire nel tempo ed, inoltre, su quali siano i parametri migliori da considerare per tale decisione (29).

Numerosi sono i meccanismi fisiopatologici ipotizzati quali causa del danno testicolare: ipossia e occlusione dei piccoli vasi, dovuti alla stasi venosa, con conseguente disfunzione delle cellule germinali e del Leydig, ipertermia scrotale e testicolare, disfunzioni ormonali (ridotta secrezione di gonadotropine e androgeni), reflusso di metaboliti renali e surrenali lungo la vena spermatica, autoimmunità, stress ossidativo, alterazioni della lamina propria e matrice extracellulare dell'epitelio germinale, apoptosi, aumentata secrezione di Ossido Nitrico (NO) lungo la vena spermatica ectasica. In generale, l'aumento della pressione idrostatica nel sistema di drenaggio venoso testicolare (27-28) sembra svolgere il ruolo centrale, che in cronico determina ristagno di sangue con ipossia parenchimale e quindi atrofia e fibrosi dell'organo (26). Infatti nel testicolo il flusso ematico è possibile solo in direzione della pressione negativa, perciò, quando la pressione idrostatica del sistema venoso di drenaggio supera la pressione del microcircolo arteriolare intratesticolare (18-20 mmHg), compare ristagno venoso a livello scrotale con una relativa ipossia del parenchima testicolare. Lo stato ipossico-ischemico che si viene a creare determina quindi un'alterazione a carico dei tubuli seminiferi, delle cellule del Sertoli e delle cellule germinali responsabili dei quadri di lieve, moderata o grave oligoastenoteratozoospermia associati al varicocele. L'esito finale, se mantenuto nel corso degli anni, determina la comparsa di ipotrofia testicolare mono- o bilaterale (16).

In realtà tali alterazioni non compaiono in tutti i soggetti affetti da varicocele, ma solo in alcuni di essi. In un recente lavoro sono stati studiati i flussi vascolari intratesticolari di soggetti affetti da varicocele sinistro mediante mezzo di contrasto gassoso ed è stato individuato che il tempo di transito medio del mezzo nel

testicolo sinistro di tali soggetti rappresenta un parametro predittivo indipendente di oligozoospermia, suggerendo un possibile ruolo del varicocele sinistro, in assenza di altri fattori di rischio di infertilità, nelle alterazioni del microcircolo intratesticolare e quindi dei parametri seminali (30).

Diagnosi

Il varicocele può essere individuato attraverso l'esame clinico o, in modo molto più accurato per lo studio della fertilità, con la valutazione EcoColorDoppler.

Poiché il varicocele è asintomatico nella maggior parte dei soggetti, la diagnosi viene posta generalmente in seguito agli approfondimenti relativi alla infertilità o durante visite mediche effettuate per altri motivi. Saltuariamente il sospetto viene dal paziente stesso con l'autopalpazione. Più raramente (<5% dei casi) il paziente riferisce senso di peso o algie scrotali, accentuate dalla permanenza in ortostatismo o dall'attività sportiva prolungata, che tendono a regredire con il riposo o il clinostatismo.

L'esame obiettivo deve essere svolto in clinostatismo, per valutare la posizione e le dimensioni delle gonadi e successivamente in ortostatismo a riposo e durante manovra di Valsalva per riuscire a rilevare anche varicoceli di piccole dimensioni. Il varicocele viene apprezzato come un plesso di vene, con consistenza simil "sacca di vermi", adiacente al testicolo che tende a decomprimersi con il clinostatismo.

Sulla base dell'esame obiettivo il varicocele viene graduato mediante la classificazione di Dubin e Amelar in:

- Grado 0: Varicocele subclinico (non rilevabile mediante esame obiettivo ma rilevato mediante esame ecografico o venografico)
- Grado I: Varicocele piccolo, rilevabile solamente durante manovra di Valsalva in ortostatismo
- Grado II: Varicocele moderato, rilevabile anche senza manovra di Valsalva
- Grado III: Varicocele voluminoso, rilevabile anche all'ispezione scrotale

Parametro morfologico importante che può orientare la gestione clinica sia dell'adulto e soprattutto dell'adolescente con varicocele è il volume testicolare. Durante la preadolescenza infatti, il volume testicolare rimane costante, mentre, con l'inizio della pubertà, si assiste ad un rapido incremento della volumetria testicolare che anticipa i cambiamenti fenotipici caratteristici di questa età. Nell'adolescente, la rapida crescita volumetrica dei testicoli in età compresa tra gli 11 e i 16 anni, può essere influenzata negativamente dalla presenza del varicocele determinando un'asimmetria tra le due gonadi. Il volume testicolare deve quindi essere sempre valutato durante la visita ambulatoriale mediante l'utilizzo di un orchidometro di Prader o mediante un'ecografia scrotale che ha una maggior sensibilità nell'individuare e quantificare differenza volumetriche tra le due gonadi tanto da essere consigliata annualmente in adolescenti con varicocele.

La valutazione EcoColorDoppler scrotale del soggetto infertile affetto da varicocele deve prevedere: la valutazione della volumetria, ecostruttura e vascolarizzazione del parenchima testicolare ed epididimale, la valutazione della presenza di ectasie venose, di reflussi venosi patologici e la loro estensione endoscrotale.

Lo studio viene effettuato dapprima in clinostatismo e successivamente in ortostatismo. La valutazione B-Mode permette di rilevare la presenza di vasi venosi ectasici (diametro > 3mm) lungo il canale inguinale o all'interno della sacca scrotale, mentre l'indagine colordoppler (ECD) fornisce informazioni sulla presenza o meno di un reflusso e se quest'ultimo è presente in condizioni basali e/o dopo aumento della pressione endoaddominale (manovra di Valsalva). A tal fine, dopo aver studiato la regione peritesticolare in condizioni basali, si invita il paziente ad eseguire un ponzamento progressivo, non brusco ed un reflusso viene considerato patologico quando si prolunga per oltre due secondi. Reflussi di minore durata, se la manovra di Valsalva è eseguita correttamente, sono considerati non patologici.

Se lo studio in B-Mode non rileva varicosità peritesticolari, si dovrà indagare la regione funicolare sovratesticolare con le stesse modalità descritte in precedenza (17).

Quando non siano visibili vasi dilatati anche in questa sede e l'ECD non percepisca segnali, si passerà all'esame del funicolo all'emergenza scrotale. Per essere sicuri di aver localizzato il funicolo, con la sonda puntata verso l'anello inguinale superficiale, si centra l'arteria testicolare e si invita il paziente ad eseguire la manovra di Valsalva evidenziando la presenza o meno di reflusso prolungato. Naturalmente dopo aver esplorato il plesso pampiniforme sinistro, anche in caso di reperti negativi, andrà esaminato anche il plesso pampiniforme controlaterale con le medesime modalità.

Sulla base dei reperti ottenuti mediante le suddette procedure possiamo ottenere informazioni sulla presenza o meno di varicocele, sull'entità e localizzazione dei reflussi venosi patologici (Fig. 20) e sull'eventuale sofferenza testicolare.

La classificazione ecografica che, a nostro parere, sembra più completa per la definizione del varicocele e la sua influenza sulla fertilità, è quella introdotta da Sarteschi e coll. (17):

- Grado 1: non si osservano varicosità in B-mode. L'ECD, con sonda posizionata all'emergenza scrotale, evidenzia un prolungato reflusso venoso.
- Grado 2: si osservano piccole varicosità posteriori, spesso accompagnate da un tronco venoso rettilineo ventrale, che però non scendono al di sotto del livello del polo superiore del testicolo. Le varicosità incrementano di diametro in maniera più o meno apprezzabile con la manovra di Valsalva eseguita in B-Mode. Lo studio con ECD rivela la presenza di reflusso venoso nella regione sovratesticolare.
- Grado 3: in ortostatismo i vasi venosi si dilatano prontamente durante manovra di Valsalva in B-Mode, raggiungendo il polo inferiore del testicolo. L'ECD non evidenzia reflusso in condizioni basali ma dimostra reflussi prolungati durante manovra di Valsalva.
- Grado 4: i vasi venosi del funicolo appaiono dilatati in B-Mode a livello funicolare peritesticolare; la manovra di Valsalva determina un ulteriore allargamento dei calibri venosi. Lo studio ECD documenta presenza di reflussi patologici già in condizioni basali, incrementabili durante manovra di Valsalva. Spesso può essere presente ipotrofia del testicolo omolaterale.
- Grado 5: i vasi venosi appaiono estremamente dilatati in B-Mode a livello funicolare e peritesticolare, talvolta in maniera abnorme. La manovra di Valsalva determina aumento del calibro venoso. L'ECD dimostra un reflusso patologico presente in condizioni basali che comunque non incrementa o incrementa pochissimo durante l'esecuzione delle manovre funzionali. Talvolta possono essere presenti varici intratesticolari. Può, inoltre, coesistere ipotrofia del testicolo omolaterale.

Figura 20. A) Valutazione diametro plesso pampiniforme, B) valutazione Doppler con riscontro di reflusso di base accentuato dalla manovra del Valsalva. C) riscontro di reflusso con esame Color che si estende in regione intratesticolare.

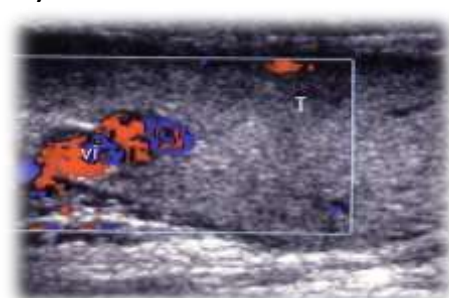
A)



B)



C)



Nel caso di rilievo di varicocele monolaterale destro è necessario studiare la presenza di reflusso venoso nel corrispondente canale inguinale. Infatti se si dimostrano in questa sede vasi venosi con segnali di reflusso, è possibile escludere che il varicocele destro sia sostenuto da collaterali prepubiche o transrettali.

Nel sospetto clinico di varicocele secondario, è necessario affrontare lo studio ecografico delle logge renali, del fegato e del retroperitoneo nella ricerca di cause ostruttive venose, congenite o acquisite (17).

Prevenzione dell'infertilità associata a varicocele: gestione clinica degli adolescenti con varicocele

Nell'adulto la gestione clinica del varicocele è finalizzata a preservare la fertilità. Per gli adolescenti è invece finalizzata alla conservazione del potenziale di fertilità che, a differenza degli adulti, è sconosciuto al momento della diagnosi. Poiché l'80% degli adolescenti con varicocele in età adulta sarà fertile è necessario un approccio selettivo alla terapia scleroembolica o chirurgica.

A tal proposito vari studi hanno cercato di caratterizzare la progressione clinica del varicocele nell'adolescente e di individuare dei parametri che permettano di identificare i pazienti che possono trarre beneficio dal trattamento del varicocele. In particolare si è valutata l'influenza del grado del varicocele, l'asimmetria testicolare e, più recentemente i parametri seminali.

In letteratura l'importanza del grado del varicocele è controverso per la presenza di alcuni vecchi studi che mettevano in correlazione il grado del varicocele con la presenza di una maggior asimmetria testicolare. Un recente studio del Children Hospital di Boston ha tuttavia riscontrato che il grado del varicocele e l'asimmetria testicolare sono due variabili indipendenti. Questo dato viene avvalorato da uno studio in cui si è dimostrato che non vi sono differenze nei parametri seminali in adolescenti con varicocele di II e III grado.

Attualmente possiamo quindi affermare che l'alto grado del varicocele, da solo, non è un'indicazione al trattamento del varicocele.

Storicamente negli adolescenti con varicocele, in mancanza di parametri oggettivi per valutare la fertilità come nell'adulto (esame del liquido seminale), l'asimmetria testicolare rappresenta la principale variabile per dare indicazione al trattamento del varicocele. Tuttavia recenti studi hanno dimostrato che seguendo nel tempo i soggetti con asimmetria testicolare negli anni successivi si può assistere ad una riduzione o ad una accentuazione di tale parametro.

Sulla base di questi studi è auspicabile che il paziente venga osservato per almeno un anno prima di eseguire l'intervento poiché si può rilevare una riduzione spontanea dell'asimmetria testicolare.

Il grado di asimmetria che deve essere considerato di significato fisiologico è stato materia di dibattito per parecchi anni. Un recente studio del Children Hospital di Boston ha correlato, in adolescenti in stadio V di Tanner, il grado di asimmetria con la motilità spermatica osservando che in ragazzi con grado di asimmetria superiore al 20% il 59% aveva problemi di motilità spermatica mentre nei soggetti con grado di asimmetria compreso tra il 10 e 20% solo l'11% aveva un'alterazione della motilità spermatica.

Come conseguenza si ritiene che in adolescenti in stadio Tanner I-IV, la presenza di un'asimmetria testicolare superiore al 20% che permane per più di un anno, sia una condizione sufficiente per consigliare il trattamento del varicocele.

Tuttavia, malgrado la presenza di un'asimmetria testicolare superiore al 20% possa servire come markers di una potenziale alterazione del liquido seminale, se possibile, è sempre preferibile valutare lo spermiogramma prima di trattare il varicocele in quanto la presenza di un normale spermiogramma giustifica un approccio osservazionale.

Tale atteggiamento viene giustificato poiché in letteratura non vi è evidenza che nell'adolescente, posticipare di alcuni anni il trattamento del varicocele, possa determinare un peggior recupero funzionale.

L'aumentata utilizzo dell'EcoColorDoppler scrotale per valutare la presenza del varicocele e di altre patologie scrotali ha determinato un maggior riscontro di varicocele subclinico (non palpabile ma rilevabile ecograficamente). Nell'adolescente con varicocele subclinico si consiglia valutazione annuale in quanto nel 28% dei casi può evolvere in varicocele clinicamente apprezzabile ed influenzare la potenziale fertilità del paziente.

Infine, se alla valutazione clinica e all'esame EcoColorDoppler scrotale, si rilevano segni di una endocrinopatia e/o uno sviluppo testicolare bilateralmente ridotto per l'età sarà necessario eseguire un dosaggio ematico dell'LH, dell'FSH, del Testosterone, dell'Estradiolo e della Prolattina.

Fattori di rischio genetici di infertilità maschile

Epidemiologia

Le alterazioni genetiche rappresentano un rilevante fattore di rischio per l'infertilità maschile. In circa il 15% dei soggetti maschi infertili è possibile individuare un'anomalia genetica responsabile della compromissione della funzione riproduttiva. Tale valore è una sottostima della reale quota di pazienti infertili per causa genetica se si considera, come oramai è accordo, che vi siano fattori genetici ad oggi non noti anche alla base della maggior parte dei casi di infertilità idiopatica. Si stima una tendenza all'aumento della prevalenza dell'infertilità maschile genetica nelle future generazioni, considerato che il soggetto infertile da causa genetica, superando il proprio limite alla procreazione fisiologica grazie alla fecondazione assistita, rischia di trasmettere determinate anomalie genetiche alla prole.

Eziologia

Esistono molteplici condizioni genetiche motivo di infertilità nel sesso maschile, che spaziano dai più frequenti quadri clinici di infertilità isolata ai più rari quadri sindromici complessi nei quali sussistono segni e sintomi ulteriori rispetto alle problematiche riproduttive.

Le basi genetiche dell'infertilità maschile sono eterogenee e vedono coinvolti interi cromosomi (alterazioni di numero o di struttura dei cromosomi) o parte di essi (disturbi genomici da microdelezione), singoli geni (malattie mendeliane da mutazioni puntiformi), il DNA mitocondriale (mtDNA), il concomitare di molteplici mutazioni genetiche di predisposizione nelle infertilità da meccanismo genetico multifattoriale.

La differente eziologia molecolare di ciascuna infertilità genetica condiziona un diverso rischio riproduttivo per il soggetto che superi - mediante il ricorso alla fecondazione assistita - il proprio limite alla procreazione.

Le anomalie genetiche suddette sono da intendersi come *costituzionali*, vale a dire presenti nel genoma di ciascuna cellula dei diversi tessuti del soggetto affetto, incluso il DNA degli spermatozoi. Ciò comporta che siano difetti trasmissibili alla prole (con modalità dipendenti dal tipo di ereditarietà del singolo difetto) e che siano facilmente indagabili dal DNA dei linfociti del sangue periferico.

La maggior parte dei casi è secondaria ad alterazioni a carico dei cromosomi sessuali (generalmente variazioni di numero, ovvero le aneuploidie dei cromosomi X ed Y) o degli autosomi (in genere alterazioni della struttura dei cromosomi dall'1 al 22), seguono le microdelezioni del braccio lungo del cromosoma Y e in ultimo le alterazioni a singolo gene, tra le quali sono più comuni le mutazioni del gene *CFTR*. Le altre anomalie genetiche motivo di infertilità maschile sono sicuramente più rare, consistono per lo più in mutazioni puntiformi di geni specifici, presentano trasmissione mendeliana e quadri clinici più complessi rispetto alle infertilità isolate.

Le aneuploidie cromosomiche possono essere individuate anche nelle cellule germinali di soggetti infertili non per causa genetica, in tal caso l'alterazione riguarda esclusivamente il DNA degli spermatozoi e non è costituzionalmente presente in tutti gli altri tessuti del soggetto. Alla pari, sono confinate esclusivamente alle cellule germinali le anomalie della metilazione associate ad infertilità (come la metilazione aberrante del gene *H19*).

Tabella 1. Cause genetiche più frequenti di infertilità maschile

Alterazioni cromosomiche (omogenee o in mosaico)

Cromosomi sessuali

47,XXY (sindrome di Klinefelter)

47,XYY e altre aneuploidie YY

Maschi 46,XX e 45,X

Alterazioni strutturali del cromosoma Y

Delezioni

Y ring

Isocromosomi
Inversioni
Traslocazioni

Autosomi

Traslocazioni (Robertsoniane, reciproche)
Inversioni
Altre alterazioni strutturali
Sindromi cliniche
Trisomia 21
Duplicazioni e delezioni parziali

Mutazioni geniche

Y-linked

Microdelezioni Yq

X-linked

Sindrome di Kallmann
Sindrome da insensibilità agli androgeni (gene AR)

Autosomi

Cause genetiche rare di infertilità maschile: v. tab.2
Sindromi genetiche complesse in cui l'infertilità è una manifestazione minore: v. tab.2
Condizioni genetiche in cui l'infertilità è la manifestazione principale:
CFTR
Geni per FSH-beta, LH-beta, FSHR, LHR

Tabella 2. Esempi di cause genetiche rare di infertilità maschile o sindromi in cui l'infertilità è una manifestazione minore

Distrofia miotonica
Rene policistico autosomico dominante (gene PKD1)
Anemia di Fanconi
Beta talassemia
Anemia Falciforme
Deficit enzimatici (es. 21 idrossilasi, aromatasi, 5 alfa reduttasi, etc.)
Difetti genetici della biosintesi, del metabolismo e dell'azione degli steroidi
Ipogonadismi genetici, difetti ipofisari e delle gonadotropine
Atassia cerebellare con ipogonadismo ipogonadotropo
Mutazioni dei geni DNAI1, DNAH5, DNAH11 (Sindrome di Kartagener o discinesia ciliare primitiva o astenozoospermia)
Malattie da accumulo (es. Emocromatosi, etc.)
Mutazioni gene CATSPER1 (11q13.1)
Sindrome genetiche da ipoacusia-infertilità, es.:

- Delezione 15q15.3 (sindrome da geni contigui STRC e CATSPER2)
- Sindrome di Usher

Sindromi genetiche associate a determinazione e sviluppo del sesso:

- NR5A1/SF1 (disgenesia gonadica parziale 46, XY "pseudoermafroditismo")
- SOX9, SRY, NROB1/DAX1 (disgenesia gonadica parziale 46, XY "reversione sessuale")
- WT1 (sindrome di Denys-Drash)
- SRD5A, SRD5A2 (ipospadia pseudo vaginale perineo scrotale)
- AMH, AMHR (sindrome da persistenza dei dotti mulleriani)
- STAR, CYP21, TDD, CYP17 (biosintesi degli steroidi)

Sindromi genetiche polimalformative senza disabilità intellettiva, es.:

- Sindrome di Noonan (gene PTPN11)
- Sindrome di Prune-Belly (gene CHRM3)
- Sindrome di Beckwith-Wiedemann (11p15.5)

Sindromi genetiche polimalformative con disabilità intellettiva, es.:

- Sindrome di Bardet-Biedl (gene BBS1)
- Sindrome di Prader-Willi (15q11.2)

Alterazioni cromosomiche

Le anomalie cromosomiche nella popolazione dei maschi infertili hanno una prevalenza che varia tra il 2 e l'8%, significativamente superiore alla prevalenza delle anomalie cromosomiche alla nascita nella popolazione generale, stimata tra lo 0.5 e lo 0.7% (circa 1:150 individui). Nelle coppie che si sottopongono a PMA le anomalie cromosomiche sono più frequentemente riscontrate nel partner maschile (2% delle ICSI). Nella sottopopolazione dei maschi azoospermici la prevalenza di anomalie cromosomiche raggiunge il 15%, l'aneuploidia 47, XXY (Sindrome di Klinefelter) è quella maggiormente rappresentata (circa il 10% dei maschi con azoospermia non ostruttiva) ed in generale sono più frequenti le anomalie di tipo numerico a carico dei cromosomi sessuali. Anche l'aneuploidia XYY può condizionare un certo grado di compromissione della fertilità, difficile da quantificare. Si noti che, a differenza delle trisomie autosomiche T13, T18, T21 più frequentemente ereditate per via materna e legate all'età materna, le trisomie dei cromosomi sessuali 47,XXY e 47,XYY e le alterazioni strutturali sono ereditate soprattutto per via paterna.

Nei maschi infertili si possono riscontrare anche diverse anomalie strutturali degli autosomi, che includono le traslocazioni Robertsoniane e traslocazioni reciproche, inversioni, duplicazioni e delezioni cromosomiche.

Anche i soggetti infertili apparentemente normozoospermici possono presentare alterazioni cromosomiche, con un'incidenza variabile tra l'1 e il 3%, prevalentemente aneuploidie dei cromosomi sessuali (per esempio 47,XXY e mosaicismi) e anomalie strutturali bilanciate.

Le anomalie cromosomiche strutturali, oltre ad essere un'importante causa di infertilità maschile, poiché le rotture cromosomiche possono localizzarsi in corrispondenza di geni per la spermatogenesi o possono determinare un "effetto posizione" su geni funzionalmente importanti per la spermatogenesi, aumentano il rischio di esiti avversi della gravidanza, rappresentando la più comune causa genetica di aborti spontanei ripetuti e aumentando il rischio di nati morti e di trasmissione di anomalie cromosomiche alla prole, a causa della produzione di un numero più alto di spermatozoi con corredo genetico sbilanciato.

Gli studi più recenti in tema di rapporti tra citogenetica e infertilità maschile hanno permesso di chiarire alcuni concetti e di rivedere certi luoghi comuni, tra i quali è opportuno sottolineare:

- L'aneuploidia 47,XXY, sindrome di Klinefelter, non si associa obbligatoriamente a sterilità. Circa il 10% di questi soggetti presenta spermatozoi nell'eiaculato e nel 30-50% dei casi sono presenti focolai di spermatogenesi intratesticolare. Tali percentuali sono maggiori nelle forme in mosaicismo. In questi casi possono essere prodotti gameti normali, ma esiste un rischio significativamente aumentato di formare gameti aneuploidi. Questo aumento del rischio deve essere chiarito prima che il paziente sia avviato ad un programma ICSI.
- Gli ESAC *Extra Satellite marker Chromosomes* possono comportare una ridotta fertilità, non sempre quantificabile preventivamente.
- Solo alcune traslocazioni cromosomiche causano infertilità. In generale gli eterozigoti per queste anomalie producono una percentuale di gameti a corredo sbilanciato superiore a quello dei maschi a cariotipo normale. In alcuni casi i gameti sbilanciati sono sottoposti a selezione pre-zigotica nel concepimento naturale, meccanismo che può venir meno con le tecniche di fecondazione assistita.
- Il riscontro di mosaicismo per un'anomalia cromosomica non consente di stabilire univoche correlazioni genotipo-fenotipo.
- I rapporti tra alcuni eteromorfismi (variazioni nelle dimensioni e nella posizione delle regioni eterocromatiniche pericentromeriche, variazioni nelle dimensioni della regione eterocromatinica del braccio lungo del cromosoma Y, variazioni nella regione dei satelliti, etc.) e l'infertilità hanno solo un fondamento aneddotico e, di fatto, queste alterazioni non costituiscono di regola un meccanismo di infertilità.

Microdelezioni del braccio lungo del cromosoma Y

La più frequente causa genetica di infertilità maschile grave è rappresentata dalle microdelezioni del braccio lungo del cromosoma Y, la cui prevalenza nei soggetti infertili è stimata attorno al 10%. Le delezioni *de novo* Yq sono una delle più frequenti anomalie cromosomiche nell'uomo, si stabiliscono a

causa di eventi di ricombinazione intracromosomica tra lunghi tratti di sequenze altamente ripetute di DNA nel corso della meiosi o nelle fasi precoci di sviluppo prima dell'impianto. Le microdelezioni Yq sono alterazioni destinate a trasmettersi ai maschi delle future generazioni, considerato che ogni figlio maschio generato grazie all'ausilio della fecondazione assistita erediterà dal padre il cromosoma Y alterato.

Nella regione Yq si riconoscono tre loci, noti come "*azoospermia factors*" AZF a, b e c, all'interno dei quali mappano diversi geni. Le delezioni coinvolgono più frequentemente la regione AZF c (circa il 70% dei casi), seguono la AZF b (circa il 15%) e la AZF a (circa il 5%). Il corrispettivo clinico delle microdelezioni Yq è rappresentato da una grave testicolopatia che si esprime con azoospermia non ostruttiva o con quadri di grave oligozoospermia (<5 milioni di spermatozoi/ml). Molto raramente si riscontrano microdelezioni nei soggetti con numero di spermatozoi > 5 mil sperm/ml, e non sono mai state individuate in soggetti normozoospermici.

Le delezioni complete AZFa, AZFb, AZFbc o AZFabc sono generalmente incompatibili con la produzione spermatica. In particolare, le delezioni dell'intera regione AZFa comportano invariabilmente la sindrome delle sole cellule del Sertoli (SCOS), con diagnosi di azoospermia e virtuale impossibilità al recupero di spermatozoi per eseguire ICSI. Alle delezioni complete AZFb e AZFbc corrisponde un aspetto istologico di SCOS o di arresto spermatogenetico, in pochissimi casi è stata riscontrata cripto/oligozoospermia. La spiegazione biologica del fenotipo inusuale resta non chiara, potrebbero incidere sia il diverso *background* genetico, che fattori ambientali, che differenze nell'esatta estensione delle delezioni. Delezioni più piccole possono ad esempio permettere la conservazione di geni siti in AZFb, (come *XKRY*, *CDY2* e *HSFY*). È stato proposto perciò che il fenotipo sia più grave in caso di completa rimozione della regione AZFb e che, salvo rarissime eccezioni riportate in letteratura, la diagnosi di delezione completa di AZFb e AZFbc implichi impossibilità al recupero di spermatozoi testicolari anche con micro-TESE. Le delezioni della regione AZFc, contenente il gene *DAZ*, si associano invece a fenotipo clinico e istologico variabile e sono in generale compatibili con un certo grado di spermatogenesi residua; sono state individuate anche in uomini con oligozoospermia grave e, in rari casi, sono state trasmesse alla prole con fecondazione spontanea. C'è un 50% di possibilità per i soggetti con delezione AZFc di recuperare spermatozoi mediante TESE e possono concepire con ICSI.

In caso di trasmissione della microdelezione Yq alla prole, non essendoci dunque una stretta correlazione genotipo-fenotipo, non è possibile esprimersi circa il fenotipo riproduttivo da attendersi nel figlio (se azoospermia o se oligozoospermia grave). È pertanto consigliato eseguire uno spermiogramma al figlio in età precoce (16-18 anni) per poter procedere con eventuale terapia medica o crioconservazione degli spermatozoi, informando della possibilità che la microdelezione eserciti un danno alla spermatogenesi progressivo nel tempo.

Nei pazienti con microdelezioni Yq viene segnalata un'aumentata incidenza di aneuploidie spermatiche, con incremento teoricamente del rischio abortivo e maggior probabilità di generare prole 45,XO (Sindrome di Turner) e 47,XXY (Sindrome di Klinefelter).

L'analisi molecolare delle microdelezioni dell'Yq dovrebbe far parte dell'iter diagnostico dei pazienti con azoospermia non ostruttiva e dei pazienti con grave oligozoospermia (concentrazione spermatica <5-10 mil/ml). È consigliabile ad ogni modo eseguirla quando questi pazienti si sottopongano ad ICSI, come suggerito dalle linee guida internazionali e dalle linee guida 2008 della legge 40. Non c'è al contrario indicazione al test in soggetti con più di 5-10 milioni di spermatozoi/ml. In assenza di una corretta selezione clinica dei pazienti da sottoporre al test, la *detection rate* della ricerca di microdelezione Yq si riduce dal 10% all'1-2% circa.

Mutazioni monogeniche: gene *CFTR*

L'agenesia bilaterale dei vasi deferenti (CBAVD) è una condizione che comporta infertilità per ostruzione meccanica delle vie seminali e riconosce una natura genetica nell'alterazione del gene *CFTR* nel 70-80% dei casi. Il gene coinvolto è il medesimo gene responsabile della fibrosi cistica (FC) e il quadro clinico di CBAVD in questi pazienti rappresenta una forma lieve o incompleta di mucoviscidosi.

L'analisi molecolare di I livello del gene CFTR consiste in un pannello di ricerca di un numero variabile di mutazioni note. Nei soggetti con azoospermia ostruttiva da CBAVD questo test identifica nel 30-40% dei casi la presenza di una mutazione (soggetto eterozigote portatore di fibrosi cistica); in un ulteriore 30-40% dei pazienti vengono individuate due mutazioni diverse, una mutazione FC classica ed una mutazione "mild" (soggetto eterozigote composto); nel 20-30% dei casi è presente il solo "allele 5T". Il polimorfismo 5T dell'introne 8 è una variazione del gene CFTR specificatamente associata a quadri di CBAVD (l'allele normale in questa posizione ha un numero di ripetizioni nucleotidiche pari a 7T o 9T), che causa la mancata trascrizione dell'esone 9 e bassi livelli di espressione della proteina CFTR. L'allele 5T non è da considerarsi variante patogenetica per fibrosi cistica, ma può esserlo per CBAVD in omozigosi o in eterozigosi composta con una variante patogenetica o anche con una variante ad incerto significato.

Poiché l'analisi molecolare del gene CFTR nei maschi infertili viene eseguita a scopo diagnostico - e non quale test di screening per malattia fibrocistica - è raccomandabile includere nell'indagine di I livello la ricerca del suddetto polimorfismo dell'introne 8. Quando lo studio del gene individui una variante patogenetica, i pazienti CBAVD sono da considerarsi comunque come eterozigoti composti / omozigoti affetti ed è opportuno procedere con la ricerca della seconda mutazione mediante analisi di II livello del gene CFTR (sequenziamento estensivo del gene). Le mutazioni del gene CFTR possono associarsi altresì ad agenesia monolaterale dei dotti deferenti (CUAVD) con oligozoospermia o normozoospermia.

Inoltre, nei maschi infertili che non presentino CUAVD/CBAVD si osserva una prevalenza delle mutazioni CFTR del 6%, leggermente più elevata rispetto al 4% di prevalenza nella popolazione generale.

Le mutazioni del gene CFTR non compromettono la normale spermatogenesi, pertanto i soggetti con mutazioni possono fare ricorso alla ICSI impiegando i propri spermatozoi testicolari o epididimali. In tal caso va tenuta presente l'importanza della consulenza genetica relativa alle eventuali manifestazioni cliniche collegate alla trasmissione alla prole maschile della mutazione CFTR paterna e ai rischi riproduttivi della coppia a seconda del genotipo della partner.

Nel caso di partner portatrice di mutazione CFTR (nella popolazione caucasica gli eterozigoti portatori asintomatici sono 1:25) sussiste il rischio del 25% per ogni gravidanza di concepire prole omozigote mutata. Esistono più di 1500 diverse mutazioni a carico di questo gene e il quadro clinico è correlato al tipo di mutazione e alla quantità di proteina che viene prodotta; con buona approssimazione è possibile definire correlazioni genotipo-fenotipo, quanto meno per le mutazioni più comuni. I fenotipi possono variare da quello normale, all'azoospermia ostruttiva, alle bronchiectasie disseminate, all'aspergillosi polmonare, alla pancreatite cronica, alla poliposi nasale, alle rino-sinusiti croniche, alla fibrosi cistica conclamata, con o senza insufficienza pancreatica, ad esordio tardivo o congenita.

Mutazioni monogeniche: gene AR

Circa il 2-3% dei soggetti con azoospermia e oligozoospermia grave non ostruttiva possono presentare una mutazione nel gene AR, codificante il recettore degli androgeni. La funzionalità di AR è un requisito essenziale per l'espressione del fenotipo maschile e per una normale spermatogenesi. Sono note centinaia di diverse mutazioni, per molte delle quali non è facile stabilire una correlazione genotipo-fenotipo. Le mutazioni di AR possono causare diversi gradi di insensibilità dei tessuti agli androgeni: mutazioni che inattivano completamente il gene provocano forme di insensibilità completa in soggetti con fenotipo femminile e cariotipo 46, XY (Sindrome di Morris); mutazioni che non compromettono totalmente la funzione di AR possono dare forme parziali di insensibilità con ipospadia, micropene, criptorchidismo, o forme lievi di fenotipo maschile con infertilità, eventualmente associato a segni di ipoandrogenismo quali ginecomastia o ridotta virilizzazione. Dal punto di vista clinico, un segno laboratoristico suggestivo di insensibilità agli androgeni, è rappresentato dall'elevato valore del prodotto LH x Testosterone (indice di sensibilità agli androgeni).

Per determinare l'espressione del normale fenotipo maschile, l'azione degli androgeni è mediata dal recettore AR che, in seguito al legame con il rispettivo ligando, trasloca fino al nucleo della cellula dove regola l'espressione dei geni responsivi agli androgeni. La cascata di segnali che da esso si innesca nel testicolo è essenziale per la spermatogenesi, il recettore non è espresso nelle linee cellulari germinali in via di sviluppo e si ritiene che eserciti i suoi effetti attraverso le cellule del Sertoli e le cellule mioidi peritubulari. Alcuni studi indicano che le sostituzioni aminoacidiche missenso nel dominio di legame del

recettore AR con il ligando inducano infertilità maschile attraverso un meccanismo nuovo che vede coinvolta una difettosa interazione tra le proteine del dominio recettoriale e le proteine di coattivazione.

Nei soggetti che riescano a concepire, la mutazione paterna non verrà data in eredità alla prole maschile, essendo il gene *AR* localizzato sul cromosoma X, mentre sarà necessariamente trasmessa alla prole femminile (che non avrà manifestazioni cliniche ma potrà a sua volta trasmettere il fenotipo infertile ad eventuali figli maschi).

Mutazioni monogeniche: geni associati al criptorchidismo

È noto un gruppo di geni associati allo sviluppo di criptorchidismo, non necessariamente all'infertilità. Tra questi i più importanti sono il gene *INSL3* (19p13.11), che codifica per l'ormone *Insulin-like 3*, ed il gene codificante per il suo recettore *RXFP2* (13q13.1), *Relaxin family peptide 2*, la cui normale funzionalità consente la corretta fase trans-addominale di discesa del testicolo nella borsa scrotale in epoca fetale ed i fisiologici processi di spermatogenesi.

Nella popolazione italiana di sesso maschile, la presenza della mutazione T222P nel gene *RXFP2* conferisce un rischio moderato di andar incontro a criptorchidismo e alterazioni della spermatogenesi, fino alla completa assenza di cellule germinali. La medesima mutazione è stata anche individuata in soggetti con normale discesa testicolare e normali parametri seminali, pertanto non si ritiene che esista un preciso rapporto di causa-effetto tra genotipo mutato e fenotipo patologico e si ipotizza che ulteriori fattori genetici e ambientali contribuiscano a determinare l'insorgenza o meno dei problemi testicolari. Tuttavia sussiste un 50% di possibilità di trasmettere la mutazione alla prole: i figli maschi mutati ereditano il rischio di presentare criptorchidismo o alterata spermatogenesi; le figlie femmine mutate sono solo portatrici sane dell'alterazione genetica, ma possono trasmetterla, a loro volta, al 50% dei figli maschi, conferendo loro il rischio di essere affetti da criptorchidismo e/o alterazioni della spermatogenesi. Nel caso la coppia generi prole maschile, sarà indicato il monitoraggio della discesa testicolare nei primi anni di vita, poiché le tempistiche dell'orchidopessi (da eseguirsi entro i due anni di vita) risultano cruciali per evitare la permanenza del testicolo al di fuori della sacca scrotale con danni strutturali irreversibili che possano compromettere la futura fertilità del soggetto; inoltre la corretta gestione del testicolo non disceso aumenta le possibilità diagnostiche precoci di malignità gonadiche.

Il recettore dell'ormone *INSL3* svolge un ruolo importante nel metabolismo osseo e le mutazioni di *RXFP2* sono state correlate a riduzione della massa ossea in età giovane adulta; è pertanto raccomandabile sottoporre i pazienti con la mutazione a densitometria ossea e relativo follow-up.

Mutazioni monogeniche: geni associati ad ipogonadismo ipogonadotropo

Gli ipogonadismi ipogonadotropici congeniti (CHH) sono dei disordini rari provocati da una deficitaria produzione, secrezione o azione dell'ormone di rilascio delle gonadotropine (GnRH), il principale ormone che regola l'asse riproduttivo. Sono condizioni geneticamente eterogenee, per le quali ad oggi sono stati individuati più di 25 diversi geni causativi, e si manifestano clinicamente con assenza della pubertà o infertilità.

Circa il 50% dei CHH sono rappresentati dalla Sindrome di Kallmann (KS), una patologia genetica dovuta ad un difetto della migrazione embrionale dei neuroni che sintetizzano GnRH a livello dell'ipotalamo e dell'epitelio olfattivo. Il quadro clinico prevede pertanto l'associazione tra ipogonadismo ipogonadotropo e ipo/anosmia per ipoplasia/aplasia dei bulbi olfattivi. La prevalenza della KS, probabilmente sottostimata, è di 1/8.000 maschi e 1/40.000 femmine. I geni-malattia sono *KAL1* (Xp22.32) per la forma legata all'X; *FGFR1* (8p12), *FGF8* (10q25-q26), *CHD7* (8q12.2) e *SOX10* (22q13.1) per la forma AD; *PROKR2* (20p12.3), e *PROK2* (3p21.1), per le forme AR e oligogeniche.

Altre mutazioni monogeniche rare

Ad oggi sono oltre 200 le condizioni genetiche in cui si annoveri la presenza di infertilità maschile (database *OMIM*, *On Line Mendelian Inheritance in Man*: <http://www.ncbi.nlm.gov>). Per molte di esse l'infertilità compare tra le manifestazioni cliniche della sindrome ma non ne costituisce il segno principale o il problema che porta il paziente dal medico. Altre alterazioni geniche invece possono causare infertilità come segno principale nel contesto di uno quadro clinico specifico; prese singolarmente tali condizioni hanno una prevalenza molto bassa e i relativi test genetici vanno richiesti solamente quando vi sia indicazione stringente sulla base di un fondato sospetto clinico.

In seguito alla diffusione su larga scala delle tecnologie più avanzate di analisi molecolare emergono sempre nuovi fattori di rischio genetici dell'infertilità maschile, sebbene le conoscenze in merito restino ancora limitate.

È stato individuato sul braccio corto del cromosoma 3 (regione 3p24) un omologo autosomico del gene *DAZ* (che mappa invece nella regione AZFc del cromosoma Y), denominato *DAZL* (*DAZ-like*); si ipotizza che alterazioni a suo carico possano incidere sui difetti della spermatogenesi.

Nei casi di storia riproduttiva di aneuploidie ricorrenti nei prodotti del concepimento, in presenza di normale cariotipo parentale, è possibile ipotizzare una causa genetica di predisposizione allo sviluppo di errori di segregazione meiotica dei cromosomi al momento della formazione dei gameti. L'ipotesi prevalente in letteratura è che, alla base di storie riproduttive di questo tipo, vi sia un possibile disordine poligenico, dipendente dalla concomitanza di più fattori genetici e di fattori ambientali, o una mutazione costituzionale di un singolo gene importante per la segregazione meiotica dei cromosomi. Alcuni studi condotti su popolazioni di origine diversa suggerirebbero che variazioni a carico del gene *SYCP3* – codificante per una componente essenziale del complesso sinaptonemale, struttura fondamentale nell'interazione tra cromosomi omologhi – possano conferire una maggior suscettibilità alla non disgiunzione dei cromosomi durante la profase della prima divisione meiotica, alterando il normale appaiamento degli stessi, con la formazione di prodotti del concepimento aneuploidi, determinando un aumento del rischio di aneuploidie embrionali.

Mutazioni di geni codificanti per la catena respiratoria mitocondriale

Le diverse componenti della catena respiratoria mitocondriale sono sintetizzate a partire da geni in parte nucleari e in parte del genoma mitocondriale (mtDNA). Considerata l'elevata richiesta di ATP degli spermatozoi, le mutazioni che compromettono la catena respiratoria esercitano un profondo impatto sulla motilità spermatica, provocando infertilità maschile.

Sul braccio lungo del cromosoma 15 (regione 15q25) mappa il gene *POLG* codificante per la DNA polimerasi gamma con ruolo chiave nell'elongazione e nel riparo del DNA mitocondriale, mutazioni a suo carico favoriscono l'accumulo di danni ossidativi e alterazioni del genoma mitocondriale dello spermatozoo con infertilità maschile.

Mosaicismi somatici e gonadici

I portatori di mosaicismo per riarrangiamenti sbilanciati possono mostrare deficit riproduttivo, infertilità e storia di ISG ricorrenti con la partner. Le condizioni di mosaicismo somatico/gonadico (situazione in cui l'anomalia genetica non è omogeneamente presente nell'individuo ma coinvolge solo talune linee cellulari) per riarrangiamenti cromosomici strutturali degli autosomi, per quanto rare, possono determinare interruzioni spontanee ripetute di gravidanza nei soggetti portatori. L'identificazione del mosaicismo gonadico è molto problematica, essendo asintomatico e criptico per il portatore. Ad oggi non sono stati pubblicati dati circa il profilo citogenetico dei riarrangiamenti cromosomici strutturali in mosaico e poco è noto in merito al *timing*, al meccanismo di formazione e di mantenimento degli stessi, né è stata stabilita la prevalenza dei pazienti che ne sono portatori. In letteratura sono stati identificati finora poco più di 100 casi di mosaicismo per riarrangiamenti non centromerici in cui sia stato specificato il sesso del portatore. Si osserva una leggera predominanza maschile tra i portatori di mosaicismo per riarrangiamenti bilanciati, mentre emerge una forte predominanza femminile tra i portatori di mosaicismo per riarrangiamenti sbilanciati, suggerendo una selezione specifica per l'uomo contro le cellule anomale

piuttosto che la compromissione della gametogenesi maschile, e quindi una prognosi migliore per feti di sesso maschile.

Per completezza e a livello più strettamente didattico, è possibile annoverare tra i fattori genetici maschili (ma non esclusivamente maschili) causativi di aborti ripetuti l'eventuale presenza di condizioni di mosaicismo germinale (ovvero mutazione genetica confinata unicamente al DNA degli spermatozoi) per specifiche malattie autosomiche dominanti e X-linked a fenotipo tanto grave da compromettere lo sviluppo embrio-fetale, condizionando l'interruzione spontanea e ripetuta della gravidanza. Nel caso invece di patologie genetiche a trasmissione autosomica recessiva, all'eventuale fattore maschile dato dallo stato di portatore sano eterozigote di mutazione recessiva (sia in forma omogenea che in forma di mosaico coinvolgente le cellule germinali) dovrà combinarsi un evento mutazionale sulla copia allelica materna, o come evento "de novo" generatosi al momento della generazione dell'embrione o come condizione ereditata dal genoma materno (partner femminile portatrice sana). E' raro che sul DNA del materiale abortivo vengano eseguiti approfondimenti molecolari diversi rispetto al cariotipo standard. Esami genetici mirati, come la ricerca di CNV (copy number variation) e la ricerca di mutazioni puntiformi su singolo gene, vengono svolti solo in alcuni centri e su specifico sospetto clinico postulato in base alle notizie anamnestiche familiari e relative alla gravidanza e ad eventuali segni clinici embrio-fetali, inclusi quelli raccolti mediante lo studio dismorfologico del prodotto del concepimento svolto al momento dell'espulsione. Non sono pertanto disponibili dati relativi all'impatto che le malattie monogeniche e i disturbi genomici da microdelezione/microduplicazione cromosomica possano avere negli aborti ripetuti, né se esista una predominanza degli stessi nei gameti maschili o femminili.

Infertilità genetica maschile e rischio riproduttivo

In generale, questi pazienti hanno un rischio riproduttivo superiore rispetto alla popolazione generale, in particolare per anomalie dei cromosomi sessuali. A tal proposito non si è ancora raggiunto un pieno consenso in merito, ma la proposta prevalente sarebbe di sottoporre ad analisi del cariotipo ciascun soggetto infertile (sia esso azoo- oligo o normospermico) con duplice finalità: a scopo diagnostico dell'infertilità e con finalità di screening, considerata la possibilità che alterazioni cromosomiche "più lievi" (47,XXY, traslocazioni, etc.) non diano effetti evidenti all'analisi del liquido seminale ma portino alla presenza di spermatozoi con corredo genetico sbilanciato.

Bibliografia

- Aittomäki K, Wennerholm UB, Bergh C, Selbing A, Hazekamp J, Nygren KG. Safety issues in assisted reproduction technology: should ICSI patients have genetic testing before treatment? A practical proposition to help patient information. *Hum Reprod* 2004;19:472-6.
- Ars E, Lo Giacco D, Bassas L, Nuti F, Rajmil O, Ruiz P, Garat JM, Ruiz-Castan  E, Krausz C. Further insights into the role of T222P variant of RXFP2 in non-syndromic cryptorchidism in two Mediterranean populations. *Int J Androl*. 2011;34(4):333-8.
- Dohle GR, Colpi GM, Hargreave TB, Papp GK, Jungwirth A, Weidner W; The EAU Working Group on Male Infertility. EAU guidelines on male infertility. *Eur Urol* 2005;48:703-11.
- Ferlin A, Arredi B, Speltra E, Cazzadore C, Selice R, Garolla A, Lenzi A, Foresta C. Molecular and clinical characterization of Y chromosome microdeletions in infertile men: a 10-year experience in Italy. *J ClinEndocrinolMetab* 2007;92:762-70.
- Ferlin A¹, Vinanzi C, Garolla A, Selice R, Zuccarello D, Cazzadore C, Foresta C. Male infertility and androgen receptor gene mutations: clinical features and identification of seven novel mutations. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2006 Nov;65(5):606-10.
- Foresta C, Ferlin A, Gianaroli L, Dallapiccola B. Guidelines for the appropriate use of genetic tests in infertile couples. *Eur J Hum Genet* 2002;10:303-12.
- Foresta C, Garolla A, Bartoloni L, Bettella A, Ferlin A. Genetic abnormalities among severely oligospermic men who are candidates for intracytoplasmic sperm injection. *J ClinEndocrinolMetab* 2005;90:152-6.
- Gazvani R, Lewis-Jones I. Cystic fibrosis screening in assisted reproduction. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2006;18:268-72.
- Gekas J, Thepot F, Turleau C, Siffroi JP, Dadoune JP, Briault S, Rio M, Bourouillou G, Carr -Pigeon F, Wasels R, Benzacken B; Association des Cytog n ticiens de Langue Francaise. Chromosomal factors of infertility in candidate couples for ICSI: an equal risk of constitutional aberrations in women and men. *Hum Reprod* 2001;16:82-90.
- Gjerris AC, Loft A, Pinborg A, Christiansen M, Tabor A. Prenatal testing among women pregnant after assisted reproductive techniques in Denmark 1995-2000: a national cohort study. *Hum Reprod* 2008;23:1545-52.
- Hudson G, Chinnery F. P. Mitochondrial DNA polymerase-gamma and human disease. *Hum Mol Genetics*, 2006. R 244-252.
- Kavita Shah, Gayathri Sivapalan, Nicola Gibbons, Helen Tempest and Darren K. Griffin. The genetic basis of infertility. *Reproduction* (2003) 126, 13-25.
- Krausz C, Hoefsloot L, Simoni M, T ttelmann F. EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions: state-of-the-art 2013. *Andrology*. 2014; 2(1): 5-19.

Li X¹, Li H², Jia L³, Li X⁴, Rahman N⁵. Oestrogen action and male fertility: experimental and clinical findings. *Cell Mol Life Sci*. 2015 Oct;72(20):3915-30.

Li, Chao-Liang Hao, Qian Wang, Xiao-Mei Yi, Zhi-Sheng Jiang. H19 gene methylation status is associated with male infertility. *Exp Ther Med*. 2016;12(1): 451-456.

Male Infertility Best Practice Policy Committee of the American Urological Association; Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Report on optimal evaluation of the infertile male. *FertilSteril* 2006;86:S202-9.

Morea A, Cameran M, Rebuffi AG, Marzenta D, Marangon O, Picci L, Zacchello F, Scarpa M. Gender-sensitive association of CFTR gene mutations and 5T allele emerging from a large survey on infertility. *Mol Hum Reprod* 2005;11:607-14.

Nie X¹, Arend LJ. Pkd1 is required for male reproductive tract development. *Mech Dev*. 2013;130(11-12):567-76.

O'Hara L, Smith LB. Androgen receptor roles in spermatogenesis and infertility. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2015;29(4):595-605.

Peschka B, Leygraaf J, Van der Ven K, Montag M, Scharmann B, Schubert R, van der Ven H, Schwanitz G. Type and frequency of chromosome aberrations in 781 couples undergoing intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1999;14:2257-63.

Poongothai J, Gopenath TS, Manonayaki S. Genetics of human male infertility. *Singapore Med. J*. 2009; 50(4): 336-47.

Riccaboni A, Lalatta F, Calari I, Bonetti S, Somigliana E, Ragni G. Genetic screening in 2,710 infertile candidate couples for assisted reproductive techniques: results of application of Italian guidelines for the appropriate use of genetic tests. *FertilSteril* 2008;89:800-8.

Sazegari A, Kalantar SM, Pashaiefar H, Mohtaram S, Honarvar N, Feizollahi Z, Ghasemi N. The T657C polymorphism on the Sycp3 gene is associated with recurrent pregnancy loss. *J Assist Reprod Genet* 2014; 31:1377-1381.

Smith-Whitley K¹. Reproductive issues in sickle cell disease. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2014;2014(1):418-24.

Stupia L, Antonucci I, Binni F, Brandi A, Grifone N, Colosimo A, De Santo M, Gatta V, Gelli G, Guida V, Majore S, Calabrese G, Palka C, Ravani A, Rinaldi R, Tiboni GM, Ballone E, Venturoli A, Ferlini A, Torrente I, Grammatico P, Calzolari E, Dallapiccola B. Screening of mutations in the CFTR gene in 1195 couples entering assisted reproduction technique programs. *Eur J Hum Genet* 2005;13:959-64.

Xiao-Ping Yong EL, Loy CJ, Sim KS. Androgen receptor gene and male infertility. *Hum Reprod Update*. 2003;9(1):1-7.

www.orpha.net

La torsione testicolare

La torsione testicolare consiste nella torsione del funicolo spermatico attorno al proprio asse. Rappresenta una vera e propria urgenza urologica ed è tipicamente associata a un quadro clinico di rapida insorgenza e allarmante. Quando il disturbo viene trascurato, non curato o sottovalutato le conseguenze possono essere irreversibili sino all'atrofia del testicolo.

La torsione insorge quasi sempre per particolari alterazioni anatomiche favorenti, come una lunghezza eccessiva del funicolo spermatico o un difetto di ancoraggio del didimo nella borsa scrotale.

La torsione testicolare è una patologia che si verifica principalmente nella giovane età, con il 66% dei pazienti che lamenta questo disturbo tra i 12 e i 18 anni, ma che può insorgere a qualsiasi età. Si stima che si verifichi in un maschio ogni 14.000 di età inferiore a 25 anni.

Le cause che sono alla base della torsione del testicolo presentano per lo più origine congenita. Sembra che la causa risieda in un'anomalia anatomica riguardante l'innesto della tunica vaginale sul cordone spermatico. In questo caso si parla di torsione intravaginale del testicolo, responsabile del 90% dei casi di torsione. In caso di rotazione testicolare nell'età neonatale, le cause risiedono nell'eccessiva mobilità del testicolo all'interno della sacca scrotale, dunque nell'imaturità dei sistemi di ancoraggio testicolare: in simili frangenti si presenta, generalmente, la mancanza di strutture anatomiche specifiche di sostegno, che provoca una torsione extravaginale.

Le cause non congenite non sono attualmente individuabili con certezza. Ad ogni modo, sono stati ipotizzati alcuni possibili fattori di rischio tra cui i traumatismi ripetuti, l'attività sessuale, l'incremento volumetrico testicolare e le neoplasie a carico del didimo.

Il percorso diagnostico inizia con la valutazione anamnestica, di fondamentale importanza in questo tipo di patologia. Se infatti il paziente è in età prepubere nella diagnosi differenziale l'andrologo tenderà a propendere per una sospetta torsione testicolare piuttosto che per una orchiepididimite. La regola vuole infatti che un dolore acuto scrotale di eziologia incerta in età prepubere richieda sempre una esplorazione chirurgica.

La anamnesi del paziente deve sempre essere integrata da un accurato esame obiettivo durante il quale l'andrologo deve cercare di individuare i segni tipici della torsione testicolare, peraltro molto simili a quelli della orchiepididimite, quali tumefazione, arrossamento e dolore. Segno caratteristico della torsione e non della orchiepididimite, è invece il sollevamento del testicolo affetto rispetto al controlaterale, dovuto all'accorciamento del funicolo spermatico secondario alla torsione. Si aggiungono a questo altri segni ancillari in grado di aiutare l'andrologo nella diagnosi differenziale tra queste due patologie:

- il riflesso cremasterico in caso di torsione è generalmente assente o molto ridotto.
- il segno di Prehn è caratterizzato da una riduzione del dolore al sollevamento dello scroto ed è presente in caso di orchiepididimite.
- il segno di Gouverneur, in cui il testicolo è attratto verso l'anello inguinale esterno e orizzontalizzato, che è positivo in caso di torsione.
- Il paziente può presentare una deformazione visibile tipica, come quella del "testicolo a batacchio di campana", risultato di una orizzontalizzazione del didimo nel contesto scrotale per una lassità del gubernaculum testis, spesso apprezzabile bilateralmente.

L'eco-color-doppler testicolare permette la valutazione della ecostruttura del didimo e del flusso sanguigno ai testicoli. Si tratta di un esame certamente di grande rilevanza nel percorso

diagnostico della torsione, non è tuttavia da considerarsi completamente attendibile anche qualora accertasse la presenza di un flusso arterioso al didimo interessato. La torsione testicolare, infatti, non sempre è tanto severa da causare una immediata ostruzione del flusso arterioso, ma accade spesso che vi sia una iniziale ostruzione venosa, seguita da una congestione diffusa, che porta infine anche a una ostruzione arteriosa. Qualora l'esame fosse svolto prima della definitiva ostruzione venosa, potrebbe determinare un falso negativo nel processo diagnostico.

Quando il problema non viene curato tempestivamente, il danno è tale da atrofizzare permanentemente il testicolo. Il rischio è rappresentato dalla necrosi tissutale locale, con conseguente ed inevitabile distruzione del testicolo stesso.

I tubuli seminiferi possono subire lesioni permanenti già dopo pochissime ore dall'esordio dei sintomi: talvolta, il danno parenchimale insorge appena quattro ore dopo la manifestazione dei sintomi e, due ore più tardi, il testicolo non è vitale.

In caso di presunta torsione del testicolo, si consiglia di effettuare una visita medica nel più breve tempo possibile, cercando di non temporeggiare. Si è osservato, infatti, che la probabilità di guarigione completa aumenta notevolmente quando si interviene con rapidità.

Più precisamente, si stima che la probabilità di preservare il testicolo si aggiri intorno al 90% quando la detorsione avviene entro 6 ore dall'esordio dei sintomi, al 50% dopo 12 ore e al 10% dopo le 24 ore. A tal proposito, si parla di probabilità di recupero testicolare tempo dipendente. La conseguenza più grave della ischemia testicolare è la atrofia del didimo affetto. Tuttavia, che il testicolo venga rimosso o salvato, l'infertilità resta una delle sequele più significative della torsione testicolare. Nel monorchide o nei casi in cui la torsione sia bilaterale, vi sarà infertilità per danno diretto al tessuto spermatogenetico. Nelle torsioni unilaterali con testicolo controlaterale sano, l'infertilità può conseguire a diversi motivi, tra i quali l'instaurarsi di processi apoptotici anche nel testicolo sano e/o la formazione di anticorpi antispermatozoo che configurano un quadro di infertilità su base immunologica.

Gli anticorpi antispermatozoo sono infatti considerati da alcuni autori come possibile causa di infertilità, rilevandosi a titoli significativi fino al 5-15% degli uomini infertili.

Esiste una correlazione tra anticorpi antispermatozoi e torsione testicolare. Vi è inoltre una associazione tra aumentati livelli di anticorpi antispermatozoi e il prolungamento della ischemia testicolare in corso di torsione. Uno studio su dieci orchietomie monolaterali, dopo danneggiamento irreversibile del didimo, ha dimostrato come i valori di questi anticorpi si innalzino e restino elevati fino a un minimo di 26 settimane dopo la procedura chirurgica.

Gli spermatozoi sono "estranei" all'organismo perché, diversamente da tutte le altre cellule, contengono solo la metà del corredo cromosomico (23 cromosomi contro i 46 del corredo cromosomico normale), ovvero sono aploidi anziché diploidi. Quando lo spermatozoo entra in contatto con il sangue è perciò in grado di scatenare una reazione immunitaria che consiste nella produzione di anticorpi antispermatozoi. Proprio per questa ragione la spermatogenesi ha luogo dietro la "barriera immunitaria" rappresentata dai testicoli.

In condizioni normali i testicoli contengono una membrana basale, la barriera testicoli-sangue, che agendo come uno strato protettivo previene il contatto, all'interno del tratto riproduttivo maschile, tra le cellule immunitarie e gli spermatozoi. Questa barriera può rompersi a causa di eventi traumatici del tratto riproduttivo, cosicché le cellule immunitarie entrano in contatto con gli spermatozoi, attaccandoli e distruggendoli.

Nell'infertilità immunologica maschile gli anticorpi antisperma si attaccano a diverse parti dello spermatozoo e interferiscono con la fertilità in diversi modi, ma principalmente ostacolando la motilità degli spermatozoi. Gli anticorpi presenti sul flagello tendono a immobilizzare e a far agglutinare tra di loro gli spermatozoi, mentre gli anticorpi che aderiscono alla testa degli

spermatozoi possono impedire l'attraversamento efficiente del muco cervicale femminile, e anche quando l'ovocita venga infine raggiunto, possono rendere critica o impossibile la fecondazione. Al microscopio è possibile osservare in questi casi come questi anticorpi causino l'agglutinazione degli spermatozoi, compromettendone seriamente la motilità e provocando l'infertilità. Alcuni autori ritengono che la prevalenza degli anticorpi antispermatozoi aumenti con l'età del soggetto. Le indagini di laboratorio impiegate consentono di effettuare una valutazione quantitativa e qualitativa della immuno-reazione, di definire la classe immunoglobulinica e di individuare il sito di reazione antigene-anticorpo. Gli ASA (*antisperm antibodies*) possono essere rilevati nel siero ematico e nel plasma seminale con test "indiretti" o, sulla superficie nemaspermica, con test "diretti". Le indagini più utilizzate nella ricerca degli ASA sono:

il gelatin agglutination test (GAT)

il tray agglutination test (TAT)

l'immuno-bead test (IBT)

il mixed antiglobulin reaction test (MAR test)

Il GAT viene considerato clinicamente significativo se il titolo anticorpale nel siero ematico è uguale o superiore a 1:32 e/o se quello nel liquido seminale è 1:16. L'IBT e il MAR test vengono considerati clinicamente significativi se la percentuale di legame è superiore al 50%. La citoflussimetria è stata impiegata come metodica sia qualitativa (isotipo IgG) sia quantitativa (titolo ASA), ma non essendo in grado di dare informazioni sulla specificità regionale degli ASA, non è utilizzata nel percorso diagnostico dell'autoimmunità antispermatozoo.



Fig 1



Fig 2

Fig 1: Torsione testicolare extravaginale

Fig 2: Torsione testicolare intravaginale



Fig 3: Torsione del testicolo destro, che appare attratto verso l'anello inguinale esterno

Bibliografia:

1. Role of p97/Valosin-containing protein (VCP) and Jab1/CSN5 in testicular ischaemia-reperfusion injury.
Cayli S, Ocakli S, Senel U, Eyerci N, Delibasi T
J Mol Histol. 2016 Feb;47(1):91-100
2. Antisperm-antibodies induced by testicular torsion and its influence on testicular function.
Fu GB, Qian LX, Cui YG, Xu ZY, Xuan HB, Zhu JG, Zhang W
Zhonghua Nan Ke Xue. 2006 Nov;12(11):988-91
3. Late hormonal levels, semen parameters, and presence of antisperm antibodies in patients treated for testicular torsion
Arap MA, Vicentini FC, Cocuzza M, Hallak J, Athayde K, Lucon AM, Arap S, Srougi M.
J Androl. 2007 Jul-Aug;28(4):528-32
4. Antisperm immunity in natural and assisted reproduction.
Lombardo F, Gandini L, Dondero F, Lenzi A.
Hum Reprod Update. 2001 Sep-Oct;7(5):450-6
5. Antisperm immunity in assisted reproduction.
Lombardo F, Gandini L, Lenzi A, Dondero F.
J Reprod Immunol. 2004 Jun;62(1-2):101-9
6. Antisperm antibodies in young boys.
Lenzi A, Gandini L, Lombardo F, Cappa M, Nardini P, Ferro F, Borrelli P, Dondero F
Andrologia. 1991 May-Jun;23(3):233-5

7. The biomorphological basis of antisperm immune reaction.
Dondero F, Lenzi A, Gandini L, Claroni F, Lombardo F, Anticoli-Sforza L, Alfano P, Caggiati A.
Prog Clin Biol Res. 1989;296:249-54
8. Pregnancy Rates after Testicular Torsion.
Gielchinsky I, Suraqui E, Hidas G, Zuaite M, Landau EH, Simon A, Duvdevani M, Gofrit ON, Pode D, Rosenberg S.
J Urol. 2016 Sep;196(3):852-5
9. The hypoxic testicle: physiology and pathophysiology.
Reyes JG, Farias JG, Henríquez-Olavarrieta S, Madrid E, Parraga M, Zepeda AB, Moreno RD.
Oxid Med Cell Longev. 2012;2012:929285
10. Late hormonal function after testicular torsion.
Romeo C, Impellizzeri P, Arrigo T, Antonuccio P, Valenzise M, Mirabelli S, Borruto FA, Scalfari G, Arena F, De Luca F.
J Pediatr Surg. 2010 Feb;45(2):411-3
11. Antisperm antibodies modify plasma membrane functional integrity and inhibit osmosensitive calcium influx in human sperm.
Rossato M, Galeazzi C, Ferigo M, Foresta C
Hum Reprod. 2004 Aug;19(8):1816-20. Epub 2004 Jun 17

CAUSE IATROGENE DELL'INFERTILITA' MASCHILE

L'infertilità maschile riconosce un' eziologia pre-testicolare (alterato funzionamento dell'asse ipotalamo-ipofisi-testicolo riducendo la secrezione delle gonadotropine e del testosterone e portando come conseguenza alla mancata produzione o riduzione del numero di spermatozoi), un' eziologia testicolare (patologie primitive testicolari) e post testicolare (da ostacolato trasporto spermatico, da fattore immunologico, o da alterata biofunzionalità nemaspermica). Tra i principali fattori di rischio dell'infertilità maschile dobbiamo annoverare però le cause iatrogene che possono agire determinando un'alterazione dei parametri seminali coinvolgendo il numero e/o la qualità delle cellule nemaspermiche. Le cause iatrogene a eziologia pre-testicolare sono da ricondurre all'assunzione di Androgeni ed Estrogeni, quelle ad eziologia testicolare comprendono invece interventi chirurgici e terapie antineoplastiche mentre le post testicolari comprendono ostruzioni acquisite delle vie seminali e disfunzioni eiaculatorie come aneiaculazione, eiaculazione precoce e retrograda. Numerosi farmaci, oltre alla loro azione positiva e terapeutica sulle patologie per cui si assumono, possono alterare l'equilibrio del sistema riproduttivo maschile influenzando la qualità del liquido seminale. Questo effetto negativo può essere temporaneo o permanente ed avviene attraverso l'alterazione di alcune funzioni fondamentali per la corretta produzione e maturazione degli spermatozoi da parte dell'apparato riproduttivo maschile.

Farmaci di comune impiego come antibiotici, antiipertensivi, antidepressivi e antiepilettici, antiemetici, e immunosoppressori possono alterare la fertilità maschile agendo a vari livelli sulla spermatogenesi.

La Sulfasalazina, comunemente usata nel trattamento della malattia infiammatoria intestinale, determina oligozoospermia , riduzione della motilità degli spermatozoi e alterazione della qualità dei parametri seminali (Levi et al., 1979). Gli stessi effetti sono stati osservati dopo l'assunzione di antibiotici appartenenti al gruppo dei Macrolidi (eritromicina, spiramicina e neomicina) (Timmermans, 1974); lo stesso autore ha anche dimostrato che la somministrazione di antibiotici appartenenti al gruppo della penicillina (penicillina G, ampicillina e dicloxacillina) causano un blocco della spermatogenesi (Timmermans, 1974). L' Ampicillina provoca una significativa diminuzione della motilità e della capacità fecondante in modelli animali (Wilcox e Shorb, 1958), così come la dicloxacillina provoca la diminuzione della motilità degli spermatozoi (Berndtson e Foote, 1976). Raji et al. (2006) hanno inoltre dimostrato che ampicillina e cloxacillina causano una

alterazione delle strutture anatomiche con significativa riduzione del volume testicolare, degli epididimi, delle vescicole seminali e della prostata. Alle stesse conclusioni giungono Khaki et al (2008), Gaczarzewicz et al (2016) effettuando studi su gentamicina, neomicina e streptomicina, antibiotici amino glicosidici. Allo stesso modo l'assunzione di nitrofurantoina, antibiotico usato nelle flogosi batteriche urinarie, può causare arresto di maturazione dello spermatozoo. Anche i chinolonici, che rappresentano una classe di antibiotici a largo spettro d'azione ed utilizzati solitamente per trattare le patologie infettive dell'apparato genito-urinario, possono alterare la fertilità maschile. È stato dimostrato in particolare che ofloxacin, perfluoxacin e ciprofluoxacin possono ridurre la percentuale di spermatozoi giornalieri prodotti e la motilità degli stessi (Arash 2015). Inoltre lo stesso autore ha dimostrato che la somministrazione di streptomicina produce effetti meno negativi sui parametri seminali e sul tratto riproduttivo maschile. Anche i farmaci antimicotici possono produrre una diminuzione, della motilità degli spermatozoi, mentre il metronidazolo, farmaco di uso frequente nel trattamento delle infezioni parassitarie, può determinare invece importanti alterazioni morfologiche dello spermatozoo (Kumari et al 2015).

In quasi tutti i casi la reversibilità degli effetti negativi è correlata alla riduzione e/o sospensione della terapia, con tempi di recupero diversi a seconda del farmaco. Dal punto di vista pratico si consiglia di far passare almeno 30 giorni dalla fine della terapia antibiotica prima di effettuare uno spermogramma per non avere interferenze negative sull'esito dell'esame. Anche le comunissime statine possono provocare cambiamenti sulla funzione spermatogenetica, anche se a tutt'oggi non ci sono dati conclusivi.

Un altro importante meccanismo di danno farmacologico alla fertilità è legato alla somministrazione di molecole ad attività ormonale in grado di alterare l'asse ipotalamo-ipofisi-testicolo e che vede principalmente coinvolti i farmaci ad attività androgenica (testosterone e anabolizzanti), estrogeni, progestinici, gli agonisti o antagonisti dell'ormone di rilascio delle gonadotropine (GnRH), glucocorticoidi e farmaci psichiatrici. La conseguenza più immediata di una somministrazione non terapeutica di questi ormoni è il blocco della funzione ipofisaria e della funzione testicolare sia come spermatogenesi che come steroidogenesi, con una sintomatologia caratterizzata da riduzione del volume testicolare, forte contrazione della spermatogenesi fino alla azoospermia e calo del desiderio sessuale. Ancora una possibile riduzione della fertilità è stata segnalata in soggetti maschi che assumono farmaci ad attività ormonale, quali finasteride (caduta dei capelli) e domperidone (disturbi digestivi): in entrambi i casi però alla sospensione della terapia si associa un recupero della fertilità.

Alcuni studi hanno messo in evidenza che anche gli analgesici e gli immunosoppressori possono bloccare la spermatogenesi, ma in questo caso i dati non sono ancora affidabili e certi. Dantas da Silva Júnior et al 2014 e Latif et al 2008, hanno dimostrato un' associazione tra diversi farmaci antipertensivi e la riduzione della fertilità maschile in modello murino. Ahmadnia et al nel 2016 hanno valutato l'associazione tra l'abuso di droghe e la funzione sessuale in modelli animali, come il possibile impatto dell'utilizzo cronico di morfina sulla spermatogenesi e sui livelli degli ormoni sessuali. Gli autori hanno dimostrato che la media del numero di spermatozoi e la percentuale media della motilità erano significativamente più bassi nei ratti maschi a cui era stata somministrata morfina. Altri studi hanno dimostrato che l'utilizzo orale di oppiacei determina una diminuzione delle gonadotropine (FSH e LH) e di diidrotestosterone con conseguente ipogonadismo nell'89% dei consumatori di droga (Daniell 2002). Allo stesso modo Teusch et al 1995 hanno dimostrato che nei consumatori di droga si manifesta una prevalenza di disfunzione erettile e una diminuzione della libido. Inoltre Cicero et al 1976 hanno mostrato che l'abuso di morfina e altri stupefacenti diminuiscono livelli di testosterone.

Alterazioni della fertilità possono anche essere conseguenza di interventi chirurgici, quali la resezione del collo vescicale per via endoscopica che può comportare una eiaculazione retrograda, mentre la adenoidectomia transvescicale e la prostatectomia radicale determinano una azoospermia escretoria.

Considerando che gli effetti delle terapie farmacologiche sull'infertilità maschile interessano e preoccupano il mondo scientifico, è necessario sviluppare nuovi studi osservazionali e randomizzati sull'uomo che possano dimostrare l'eventuale associazione e gli effetti reversibili o permanenti di ciascun farmaco.

BIBLIOGRAFIA CAUSE IATROGENE

Arash Khaki Ph.D. Assessment on the adverse effects of Aminoglycosides and Flouroquinolone on sperm parameters and male reproductive tissue: A systematic review Iran J Reprod Med Vol. 13. No. 3. pp: 125-134, March 2015 Systematic review

Berndtson WE, Foote RH Survival and fertility of antibiotic treated bovine spermatozoa. 1976 J. Dairy Sci. 59: 2130-2133.

Cicero TJ, Wilcox CE, Bell RD, Meyer ER. Acute reductions in serum testosterone levels by narcotics in the male rat: stereospecificity, blockade by naloxone and tolerance. J Pharmacol Exp Ther. 1976;198(2):340–6.

Daniell HW. Hypogonadism in men consuming sustained-action oral opioids. J Pain. 2002;3(5):377–84.

Dantas da Silva Júnior E, Palmieri de Souza B, Rodrigues JQD, Caricati-Neto A, Jurkiewicz A, Jurkiewicz NH. Effects of clonidine in the isolated rat testicular capsule. Eur J Pharmacol. 2014; 726: 16-26.

Gączarzewicz D, Udała J, Piasecka M, Błaszczuk B, Stankiewicz T. Bacterial Contamination of Boar Semen and its Relationship to Sperm Quality Preserved in Commercial Extender Containing Gentamicin Sulfate. Pol J Vet Sci. 2016 Sep 1;19(3):451-459. doi: 10.1515/pjvs-2016-0057.

Hasan Ahmadnia,¹ Alireza Akhavan Rezayat,^{2,*} Mahmood Hoseyni,³ Nooriye Sharifi,⁴ Mohhammad Khajedalooee,⁵ and Arash Akhavan Rezayat⁶. Short-Period Influence of Chronic

Morphine Exposure on Serum Levels of Sexual Hormones and Spermatogenesis in Rats. *Nephrourol Mon.* 2016 July; 8(4):e38052.

Khaki A1, Novin MG, Khaki AA, Nouri M, Sanati E, Nikmanesh M. Comparative study of the effects of gentamicin, neomycin, streptomycin and ofloxacin antibiotics on sperm parameters and testis apoptosis in rats. 2008 Jul 1 *Pak J Biol Sci.*;11(13):1683-9.

Latif R, Lodhi GM, Aslam M. Effects of amlodipine on serum testosterone, testicular weight and gonado-somatic index in adult rats. *J Ayub Med Coll Abbottabad.* 2008; 20(4): 8-10.

Levi AJ, Fisher AM, Hughes L, Hendry WF, Male infertility due to sulphasalazine. 1979 *Lancet*, 2: 276-278.

Mrinalini Kumari and Poonam Singh ,*Tribulus terrestris* ameliorates metronidazole-induced spermatogenic inhibition and testicular oxidative stress in the laboratory mouse. *Indian J Pharmacol.* 2015 May-Jun; 47(3): 304–310.

Nelson WO, Bunge RG ,The effect of therapeutic dosage of nitrofurantoin (furadantin) upon spermatogenesis in man. 1957 *J. Urol.* 77: 275-279.

Paul MF, Paul HE, Kopko F, Bryson MJ, Harrington C , Inhibition by furacin of citrate formation in testis preparation. 1954 *J. Biol. Chem.* 206: 491-499.

Raji Y, Awobajo FO, Kunle-Alabi OT, Gbadegesin MA, Bolarinwa AF In vivo and in vitro reproductive toxicity assessment of ampicillin and cloxacillin in mammalian models. 2006 *Int. J. Pharmacol.* 2:9-14.

Teusch L, Scherbaum N, Bohme H, Bender S, Eschmann-Mehl G, Gastpar M. Different patterns of sexual dysfunctions associated with psychiatric disorders and psychopharmacological treatment. Results of an investigation by semistructured interview of schizophrenic and neurotic patients and methadone-substituted opiate addicts. *Pharmacopsychiatry.* 1995;28(3):84–92.

Timmermans L Influence of antibiotics on spermatogenesis. *J.Urol.* 1974 112: 384-389.

Wilcox FH, Shorb MS The effect of antibiotics on bacteria in semen and on motility and fertilizing ability of chicken spermatozoa. 1958 Am. J. Vet. Res. 19: 945-948.

CAUSE IATROGENE DI INFERTILITA'

Cause mediche di infertilità

I farmaci in grado di compromettere la fertilità maschile sono numerosi, e in grado di incidere sulla qualità del liquido seminale con meccanismi fisiopatologici variegati.

Tra gli effetti avversi più comuni dei farmaci chemioterapici, rientra la tossicità gonadica. Il meccanismo d'azione della maggior parte degli agenti chemioterapici è l'interferenza con processi cellulari obbligatori, quali la sintesi del DNA, ovviamente tale effetto è tanto più rilevante quanto maggiore è l'attività replicativa della cellula esposta al farmaco. Le cellule tumorali, in virtù del loro elevato indice mitotico sono suscettibili al danno citotossico, così come lo sono tutte le cellule non tumorali che subiscono una rapida divisione. Le cellule dell'epitelio germinativo del testicolo presentano elevati indici mitotici e meiotici, motivo per il quale risultano vulnerabili in corso di chemioterapia. È molto più probabile che i farmaci citotossici alterino la spermatogenesi, piuttosto che la produzione di testosterone, perché l'epitelio germinale del testicolo è più sensibile ai danni da farmaci citotossici rispetto alle cellule di Leydig. Il grado di danneggiamento dell'epitelio germinale è influenzato dallo stadio di maturazione sessuale del testicolo. In generale, il testicolo postpuberale sembra essere più suscettibile a danni rispetto a quello prepuberale. L'entità dell'effetto sulla produzione di spermatozoi è farmaco e dose-dipendente.

I chemioterapici con effetto più deleterio sulla fertilità maschile sono gli agenti alchilanti, quali ciclofosfamide, clorambucile, cisplatino, e busulfano. L'effetto di tali farmaci è età e dose dipendente. I pazienti che ricevono più di quattro cicli di chemioterapia a base di platino (ad esempio, superiore a 400 mg/m² o una dose cumulativa > 850 mg di cisplatino) hanno una probabilità del 50% di andare incontro ad azoospermia.

Gli agenti non alchilanti, come metotrexate, doxorubicina, 5-fluorouracile, fludarabina e taxani, hanno un effetto, generalmente reversibile, sulla produzione di spermatozoi. In letteratura sono descritti anche casi di azoospermia irreversibile dopo terapia con idrossiurea.

Il rischio di sviluppare azoospermia, nei pazienti affetti da patologia neoplastica, è in relazione non solo con i chemioterapici, ma anche con il trattamento radioterapico. La probabilità di sviluppare infertilità dipende dal dosaggio, dalla protezione, dal frazionamento della dose e dall'area d'irradiazione. La radioterapia alla dose cumulativa di 20 Gy può causare tossicità gonadica che porta ad azoospermia permanente (Albers et al, 2005). Sebbene le cellule del Leydig siano relativamente radioresistenti, la radioterapia può essere seguita da riduzione della produzione di testosterone. Confrontando diversi tipi di radioterapia addomino-pelvica, le dosi più alte che raggiungono il testicolo si osservano nei pazienti trattati per cancro del retto. Questa esposizione mette i pazienti ad alto rischio di sviluppare infertilità permanente a causa della riduzione dei livelli di testosterone. La spermatogenesi sembra essere solo in minima parte inibita dopo brachiterapia per cancro alla prostata.

Alte dosi d'irradiazione della pelvi possono causare disfunzione endoteliale ed ispessimento subendoteliale dell'intima nelle arterie pelviche (Basavaraju e Easterly, 2002) e nei microvasi, responsabili del flusso sanguigno penieno. Ciò potrebbe causare una stenosi del lume e ipovascolarizzazione dei corpi cavernosi, dando origine ad una disfunzione erettile a lungo termine, come ad esempio nei pazienti sottoposti a radioterapia per il cancro della prostata.

Gli antidepressivi possono causare frammentazione del DNA dello spermatozoo, in uno studio condotto su volontari sani, la somministrazione di paroxetina per cinque settimane ha comportato frammentazione del genoma senza, però, un effetto misurabile a carico dei parametri seminali.

Negli uomini, tutti gli androgeni sopprimono la secrezione di gonadotropine e la funzione testicolare endogena, sia in termini di produzione di testosterone che di spermatozoi. L'uso

prolungato di androgeni esogeni può comportare una riduzione del volume testicolare e causare una soppressione dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi persistente anche dopo la sospensione del farmaco. Le gonadotropine e la secrezione di testosterone rimangono soppressi per un paio di mesi, in genere i tempi di recupero sono inversamente proporzionali all'età del paziente, mentre il numero di spermatozoi, di solito, ritorna alla normalità entro quattro mesi dalla sospensione, ma può essere necessario più di un anno.

Gli antiandrogeni sono inibitori competitivi degli androgeni per i loro specifici recettori e vengono classificati sulla base della loro struttura chimica e del meccanismo d'azione in antiandrogeni steroidei (ciproterone acetato) e non steroidei (flutamide, nilutamide, bicalutamide). Gli antiandrogeni steroidei vengono utilizzati, in associazione con agonisti del GnRH nel trattamento del carcinoma prostatico. Il ciproterone acetato è un progestinico con attività antagonista sul recettore per il testosterone, ma che causa anche inibizione della secrezione delle gonadotropine, contribuendo quindi, anche in modo indiretto, all'effetto antiandrogenico. La finasteride, invece, agisce come inibitore delle 5 alfa reduttasi di tipo 2, la dutasteride come inibitore misto delle isoforme 1 e 2 della 5 alfa reduttasi. Tutti gli antiandrogeni possono causare, come effetto avverso, impotenza, ma la finasteride, anche a basse dosi, può causare riduzione del numero degli spermatozoi, motivo per il quale deve essere interrotta negli uomini con oligospermia, e usato con cautela negli uomini che desiderano la fertilità.

Gli antibiotici possono alterare la fertilità maschile. È stato dimostrato che la gentamicina, la neomicina e la streptomina, antibiotici aminoglicosidici, hanno un effetto negativo sulla spermatogenesi, alterando il numero, la motilità e la morfologia degli spermatozoi.

L'assunzione di nitrofurantoina, antibiotico usato in alcune infezioni urinarie, può causare arresto della maturazione degli spermatozoi nei testicoli. Anche i chinolonici, che rappresentano una classe di antibiotici a largo spettro d'azione ed utilizzati solitamente per trattare le infezioni dell'apparato genito-urinario, possono alterare la fertilità maschile. È stato dimostrato, in particolare, che l'ofloxacina, la perfloxacina e la ciprofloxacina possono alterare in senso negativo la percentuale di spermatozoi giornalieri prodotti e la motilità degli stessi.

Per quanto riguarda alcuni farmaci antimicotici, usati per esempio nelle infezioni da Candida, possono produrre una diminuzione, dipendente anche dalla durata della terapia, della motilità degli spermatozoi. Il metronidazolo, farmaco di uso frequente nel trattamento delle infezioni parassitarie, può determinare invece importanti alterazioni morfologiche dello spermatozoo.

In quasi tutti i casi, gli effetti negativi di questa categoria di farmaci svaniscono dopo la sospensione della terapia, con tempistiche diverse a seconda del farmaco. Dal punto di vista pratico si consiglia di far passare almeno un mese dalla fine della terapia antibiotica prima di effettuare uno spermioγραμμα per non avere interferenze negative sull'esito delle analisi.

Esistono poi molti farmaci che, tra gli effetti collaterali presentano, calo della libido e disfunzione erettile, determinando impotenza coeundi quali: diuretici (tiazidici, spironolattone), anti-ipertensivi ad azione centrale (metildopa, clonidina), alfa-bloccanti (terazosina), beta-bloccanti (propanololo, atenololo, metoprololo), antidepressivi (amitriptilina, imipramina, clorimipramina), antipsicotici (aloperidolo, clorpromazina), FANS (naprossene, indometacina), antiaritmici (amiodarone), inotropi positivi (digossina).

Cause chirurgiche di infertilità

L'infertilità iatrogena può essere correlata anche a trattamenti chirurgici. È ovvia conseguenza in caso di orchietomia bilaterale, ma può manifestarsi come complicanza nella chirurgia dell'ernia inguinale, per lesione delle strutture vascolari o nervose del funicolo spermatico, così come per la

comparsa di eiaculazione retrograda negli interventi di prostatectomia, nella linfadenectomia retroperitoneale e negli interventi di plastica a livello uretrale. Chirurgicamente è possibile anche rendere discontinue le vie urogenitali, in tal caso, con la finalità stessa di generare infertilità, attraverso la vasectomia, ovvero la resezione, dopo legatura, dei dotti deferenti.

- J.H. Mydlo, B. Lebed. Does brachytherapy of the prostate affect sperm quality and/or fertility in younger men. *Scand. J. Urol. Nephrol.*, 38 (2004)
- Rivkees SA, Crawford JD The relationship of gonadal activity and chemotherapy-induced gonadal damage. *JAMA*. 1988.
- Schilsky RL, Lewis BJ, Sherins RJ, Young RC. Gonadal dysfunction in patients receiving chemotherapy for cancer. *Ann Intern Med*. 1980.
- Brydøy M, FossåSD, Klepp O, Bremnes RM, Wist EA, Wentzel-Larsen T, Dahl O. Paternity following treatment for testicular cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2005.
- Rowley MJ, Leach DR, Warner GA, Heller CG. Effect of graded doses of ionizing radiation on the human testis. *Radiat Res*. 1974
- R.M. Hermann, K. Henkel, H. Christiansen, et al. Testicular dose and hormonal changes after radiotherapy of rectal cancer. *Radiother. Oncol.*, 75 (2005).
- S.R. Basavaraju, C.E. Easterly. Pathophysiological effects of radiation on atherosclerosis development and progression, and the incidence of cardiovascular complications. *Med. Phys.*, 29 (2002).
- [Samplaski](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Samplaski%20MK%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24012200) [HYPERLINK](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Samplaski%20MK%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24012200)
["https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Samplaski%20MK%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24012200"](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Samplaski%20MK%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24012200) [HYPERLINK](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Samplaski%20MK%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24012200)
["https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Samplaski%20MK%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24012200"](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Samplaski%20MK%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24012200) [HYPERLINK](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Samplaski%20MK%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24012200)
["https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Samplaski%20MK%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24012200"](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Samplaski%20MK%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24012200) [HYPERLINK](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Samplaski%20MK%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24012200)
["https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Samplaski%20MK%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24012200"](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Samplaski%20MK%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24012200) [HYPERLINK](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Samplaski%20MK%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24012200)
["https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Samplaski%20MK%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24012200"](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Samplaski%20MK%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24012200) [HYPERLINK](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Samplaski%20MK%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24012200)
["https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Samplaski%20MK%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24012200"](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Samplaski%20MK%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24012200) [HYPERLINK](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Samplaski%20MK%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24012200)
["https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Samplaski%20MK%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24012200"](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Samplaski%20MK%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24012200) [HYPERLINK](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Samplaski%20MK%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24012200)
["https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Samplaski%20MK%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24012200"](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Samplaski%20MK%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24012200) [HYPERLINK](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Samplaski%20MK%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24012200)
["https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Samplaski%20MK%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24012200"](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Samplaski%20MK%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24012200) [HYPERLINK](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Samplaski%20MK%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24012200)
["https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Samplaski%20MK%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24012200"](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Samplaski%20MK%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24012200) [HYPERLINK](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Samplaski%20MK%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24012200)
["https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Samplaski%20MK%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24012200"](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Samplaski%20MK%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24012200) [HYPERLINK](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Samplaski%20MK%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24012200)
["https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Samplaski%20MK%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24012200"](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Samplaski%20MK%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24012200) [HYPERLINK](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Samplaski%20MK%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24012200)
["https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Samplaski%20MK%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24012200"](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Samplaski%20MK%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24012200) [HYPERLINK](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Samplaski%20MK%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24012200)
["https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Samplaski%20MK%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24012200"](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Samplaski%20MK%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24012200) [HYPERLINK](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Samplaski%20MK%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24012200)
["https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Samplaski%20MK%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24012200"](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Samplaski%20MK%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24012200) [HYPERLINK](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Samplaski%20MK%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24012200)
["https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Samplaski%20MK%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24012200"](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Samplaski%20MK%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24012200) [HYPERLINK](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Samplaski%20MK%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24012200)
["https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Samplaski%20MK%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24012200"](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Samplaski%20MK%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24012200) [HYPERLINK](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Samplaski%20MK%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24012200)
["https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Samplaski%20MK%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24012200"](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Samplaski%20MK%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24012200) [HYPERLINK](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Samplaski%20MK%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24012200)
["https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Samplaski%20MK%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24012200"](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Samplaski%20MK%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24012200) [HYPERLINK](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Samplaski%20MK%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24012200)
["https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Samplaski%20MK%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24012200"](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Samplaski%20MK%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24012200) [HYPERLINK](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Samplaski%20MK%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24012200)
["https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Samplaski%20MK%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24012200"](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Samplaski%20MK%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24012200) [HYPERLINK](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Samplaski%20MK%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24012200)
["https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Samplaski%20MK%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24012200"](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Samplaski%20MK%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24012200) [HYPERLINK](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Samplaski%20MK%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24012200)
["https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Samplaski%20MK%5BAuthor%5D](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Samplaski%20MK%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24012200)

&cauthor_uid=24012200" E, Jarvi HYPERLINK
"https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Jarvi%20K%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24012200" HYPERLINK
"https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Jarvi%20K%5BAuthor%5D" HYPERLINK
"https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Jarvi%20K%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24012200"& HYPERLINK
"https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Jarvi%20K%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24012200"cauthor=true HYPERLINK
"https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Jarvi%20K%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24012200"& HYPERLINK
"https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Jarvi%20K%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24012200"cauthor_uid=24012200" HYPERLINK
"https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Jarvi%20K%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24012200" K. Finasteride use in the male infertility population: effects on semen and hormone parameters. Fertil Steril. 2013 Dec

INFLUENZA DELLE PATOLOGIE SISTEMICHE ED ENDOCRINE SULLA FERTILITA' MASCHILE

Aldo E. Calogero, Rosita A. Condorelli, Angela Alamo, Laura Cimino,
Michele Compagnone, Rossella Cannarella, Sandro La Vignera

Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università degli Studi di Catania

Premessa

In letteratura appare crescente l'interesse per le possibili relazioni esistenti tra infertilità maschile e ruolo delle patologie sistemiche. Il razionale di una visione internistica nei pazienti con alterazione di uno o più parametri spermatici convenzionali viene confermato da studi recenti che evidenziano una stretta associazione tra indicatori statistici di comorbidità e incapacità riproduttiva. In particolare, lo studio di Eisenberg ha evidenziato, su un campione di 9387 uomini con età media di 38 anni, che il 44% di essi presentassero in anamnesi almeno una condizione medica non direttamente associata ad infertilità maschile (Eisenberg et al., 2015). Un altro studio, pubblicato sulla stessa rivista, nel corso dello stesso anno, ha rilevato che pazienti con concentrazione spermatica <45.6 milioni/ml abbiano un rischio significativamente aumentato di presentare un valore >1 al Charlson comorbidity index, considerato lo strumento dotato di maggiore specificità per l'identificazione di pazienti con elevato rischio di patologie a carattere sistemico.

Nel presente capitolo vengono illustrate le possibili relazioni esistenti tra condizioni patologiche con elevata frequenza nella pratica clinica (epatopatie, nefropatie, patologie immunitarie, oncopatie, endocrinopatie) e l'infertilità maschile.

Le epatopatie

Le epatopatie croniche sono associate ad alterazione dei parametri spermatici indipendentemente dalla causa sottostante di disfunzione epatica. Nel caso delle epatiti virali croniche sostenute da HCV e HBV diversi studi hanno evidenziato alterazioni del volume dell'eiaculato, della concentrazione spermatica, della percentuale di motilità, sia totale che progressiva, e della percentuale di spermatozoi con normale morfologia (Lee et al., 2010; Lorusso et al., 2010; Chen et al., 2011; Oger et al., 2011; Zhou et al., 2011; La Vignera et al., 2012; Hussein et al., 2016; Li Qian et al., 2016). Uno studio recente ha rilevato una frequenza di infertilità maschile significativamente aumentata nei pazienti con HBV rispetto ai controlli (Fu-Hsiung et al., 2014). Non sono state riportate correlazioni tra epatiti virali croniche e capacità di impianto e tassi di gravidanza dopo tecnica di fecondazione assistita (Zhou et al., 2009; Lee et al., 2010; Lin Shi et al., 2014; Lin Yang et al., 2015).

Anche il trattamento farmacologico nei casi di infezione da HCV, con ribavirina e interferone peghilato, può influenzare negativamente i parametri spermatici (Shouval, 2010). In particolare, la percentuale di spermatozoi con motilità totale e progressiva è risultata ridotta dopo trattamento, mentre il rapporto cellule rotonde/spermatozoi, è risultato aumentato (Pecou et al., 2009; Harald et al., 2010). In uno

studio “case report” è stato segnalato un aumento significativo dei tassi di frammentazione del DNA spermatico, con alterazioni persistenti per diversi mesi dopo la sospensione del trattamento. Gli autori nelle conclusioni dello studio suggeriscono di prolungare il periodo di contraccezione a 7-8 mesi dopo la fine della terapia (Pecou et al., 2009).

Le principali patologie epatiche croniche sono caratterizzate da uno stato infiammatorio persistente, talvolta caratterizzato da produzione di autoanticorpi, come nel caso dell’infezione sostenuta da HCV, capace di interferire con la motilità degli spermatozoi (Levy et al., 2002; Zini et al., 2010; Hussein et al., 2016), e da una condizione pro-ossidativa sostenuta da sovrapproduzione di radicali liberi di ossigeno (La Vignera et al., 2012) e attivazione citochinica che può avviare fenomeni a cascata di natura apoptotica per attivazione delle caspasi 3, 8 e 9, instabilità di membrana a causa della lipoperossidazione (Kang et al., 2012), danno mitocondriale con effetti sulla motilità (Zhou et al., 2011), maggiore frammentazione del DNA con danni a singola e a doppia elica (La Vignera et al., 2012; Deng et al., 2013) e aumento del tasso di aberrazioni cromosomiche (Huang et al., 2002). I livelli di glutatione risultano ridotti, così come quelli di enzimi con funzione antiossidante (Kang et al., 2012; Li Qian et al., 2016). Nel caso di HBV la presenza di radicali di ossigeno sinergizza i danni diretti del virus, capace di integrarsi al genoma dell’ospite (Kang et al., 2012; Garolla et al., 2013).

Le concentrazioni seminali di alcune interleuchine pronfiammatorie (IL-17, IL-18), ed i livelli di malondialdeide (MDA) nei soggetti con infezione da HBV sono risultati significativamente aumentati rispetto i controlli (Kang et al., 2012), inoltre è stata dimostrata relazione lineare tra livelli di MDA con livelli seminali di IL-17 e IL-18 (Li Qian et al., 2016). I fenomeni infiammatori, come la cirrosi, associati a rilascio di citochine ad azione pro-infiammatoria, possono determinare effetti di disregolazione del rilascio degli ormoni ipotalamici ed ipofisari, con conseguente ipofunzione testicolare (Jones et al., 1993; Zietz et al., 2003; Sinclair et al., 2015). Nel caso della cirrosi da eccessivo consumo di alcool, accanto alle alterazioni ipotalamo-pituitarie, può verificarsi anche un danno testicolare di tipo diretto (Mowat et al., 1976).

Inoltre le epatopatie croniche, compresa la steatoepatite non alcolica (Tarantino et al., 2010; Chen et al., 2011; Burra, 2013; Avni et al., 2015), sono associate ad importanti alterazioni ormonali, in particolare: riduzione della quota libera del testosterone (Meeker et al., 2007) con conseguente riduzione della libido e della funzione erettile (El-Atrebi et al., 2011). È stato dimostrato che la riduzione delle concentrazioni sieriche di testosterone possa rappresentare un marcatore prognostico sfavorevole nei pazienti con cirrosi (Zietz et al., 2003). In corso di patologie epatiche croniche sono state riportate anche alterazioni dei livelli sierici di prolattina, associate ad alterazione di concentrazione e morfologia spermatica (Mauboussin et al., 2004; Hofny et al., 2011); significativa riduzione delle concentrazioni di DHEA-S, con relazione inversa rispetto al grado di fibrosi (Mauboussin et al., 2004; El-Serafi et al., 2016); aumento dei livelli di estrogeni (La Vignera et al., 2012) per via dell’aumentata aromatizzazione periferica (Zietz et al., 2003) e aumento dei livelli di SHBG (McDonald et al., 1993; La Vignera et al., 2012), almeno durante le prime fasi della patologia, a causa dell’aumento dei livelli degli estrogeni circolanti (Zietz et al., 2003).

Le principali alterazioni presenti nelle epatopatie croniche e i relativi meccanismi d'azione sono riassunti nella tabella 1.

Tabella 1 Meccanismi fisiopatologici di infertilità

Patologie	Meccanismo d'azione						
	Alterata spermatogenesi	Danno mitocondrial e con effetti sulla motilità	Danno ossidativo	Frammentazione del DNA	Infiammazione e Apoptosi	Danno da alterazioni ormonali	Danno mediato da Anticorpi
HCV	X	X	X	X	X	X	X
HBV	X	X	X	X	X	X	
EPATITE ALCOLICA	X		X		X	X	
EPATITE NON ALCOLICA			X		X	X	
CIRROSI			X		X	X	

X= Presenza di danno correlato alla patologia.

Le nefropatie

L'insufficienza renale cronica (IRC) è associata alla compromissione della steroidogenesi e della gametogenesi, ad elevati livelli sierici di gonadotropine ed alterazione funzionale dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi (Handelsman et al., 1993; Palmer, 2003). In particolare nelle condizioni di IRC si verifica, un'alterazione del rilascio ciclico e una riduzione di ampiezza dei polsi secretori di GnRH, con conseguente compromissione del rilascio pulsatile delle gonadotropine. Tali alterazioni sono da attribuire ad una ridotta clearance renale di GnRH ed LH. Nella maggior parte dei pazienti con IRC le concentrazioni ematiche di LH sono elevate, causate dal ridotto catabolismo e dalla perdita dell'inibizione del GnRH da parte del testosterone (conseguenza delle basse concentrazioni sieriche). Non è ancora chiaro se la riduzione sierica del testosterone sia dovuta alla compromissione della sintesi, all'alterazione del suo catabolismo o ad entrambi questi aspetti disfunzionali (Kuczera et al., 2015).

Uno studio condotto su 74 pazienti con IRC in emodialisi ha mostrato livelli medi di testosterone più bassi e livelli significativamente più alti di SHBG, LH, FSH e PRL rispetto a 41 controlli sani (Zachoval et al., 2015). Un altro studio condotto su 20 pazienti con IRC ha mostrato una riduzione significativa dei livelli di AMH rispetto ai controlli, suggerendo una disfunzione delle cellule del Sertoli (Eckersten et al., 2015).

Oltre alle alterazioni ormonali suddette, uno studio condotto su 120 pazienti in emodialisi ha mostrato una riduzione significativa del volume testicolare medio bilaterale dei pazienti affetti da IRC rispetto ai controlli (31.7 vs. 36.4 ml, $p < 0.01$). Nello stesso studio l'aumento delle concentrazioni sieriche di ferritina correlava inversamente con il volume testicolare (Shiraishi et al., 2008).

Inoltre, coesistono altre condizioni associate all'IRC che potrebbero ridurre la capacità riproduttiva dei pazienti affetti. Tali cause addizionali potrebbero essere correlate alla condizione di malnutrizione proteica (complicanza frequente nell'IRC associata ad insufficienza delle cellule di Leydig e una riduzione

dei livelli di testosterone) (Smith et al., 1975) e alle complicanze extra-renali della patologia primaria, ad esempio la sindrome del rene policistico (PKD).

La PDK è una malattia ereditaria sistemica caratterizzata dalla presenza di cisti renali multiple bilaterali con conseguente IRC. Le cisti epatiche sono la più comune manifestazione extra-renale. In uno studio realizzato su 104 uomini con PDK la prevalenza di cisti epididimarie, a carico delle vescicole seminali e/o regione prostatica è risultato rispettivamente essere del 18%, 39% e 7% (Belet et al., 2002).

Sebbene la PDK non è considerata causa di infertilità, diversi studi in passato hanno riportato un'aumentata prevalenza di infertilità negli uomini con PDK (Hendry et al., 1998; Peces&Venegas, 2005; Shefi et al., 2009). Torra e coll. hanno riportato che il 28.5% di 28 pazienti con IRC riferivano infertilità (Torra et al., 2008). Tuttavia, Belet ha riportato una prevalenza di infertilità del solo 5% in uno studio prospettico su 104 pazienti affetti da IRC (Belet et al., 2002). In contrasto, in uno studio retrospettivo di 4108 pazienti valutati per infertilità (non tutti mediante valutazione ecografica), solo 6 pazienti risultavano affetti da PKD (Fang&Baker, 2003).

L'associazione tra PDK ed infertilità appare verosimilmente attribuibile alla dilatazione delle vescichette seminali che riflette un quadro di possibile ostruzione dei condotti eiaculatori, che determina azoospermia o oligozoospermia grave. L'efficacia della resezione transuretrale dei dotti eiaculatori (TURED) nei pazienti con PDK con oligozoospermia o azoospermia risulta comunque controversa (Hendry et al., 1998; Orhan et al., 2000). Esistono altri possibili meccanismi patogenetici alla base di tale associazione. L'astenoospermia rappresenta l'alterazione spermatica principale dovuta sia a difetti strutturali che ad anomalie della policistina (Torra et al., 2008). La coda dello spermatozoo infatti normalmente è costituita da due microtubuli centrali circondati da 9 colonne segmentate (9+2). Nei pazienti con PDK, i due microtubuli centrali sono assenti (9+0). Okada e colleghi hanno dimostrato che la presenza dei due microtubuli centrali è associata al successo della fecondazione (Okada et al., 1999). La policistina è una proteina espressa nelle ciglia e nei flagelli, pertanto anomalie a carico di quest'ultima determinano infertilità (lo spermatozoo affetto ha una motilità limitata) senza alterazione della spermatogenesi.

Inoltre l'insorgenza di uremia nei pazienti con PDK può compromettere gravemente la loro fertilità. In uno studio di Xu e colleghi, la fertilità di 40 pazienti con uremia è stata paragonata a quella di 40 soggetti dopo trapianto renale e 40 controlli normali. Gli autori riportano che l'indice di fertilità (indice ottenuto dalla moltiplicazione tra densità, motilità e morfologia nemaspermica, che rappresenta il numero di spermatozoi con motilità progressiva e normale morfologia in ogni ml di campione seminale) nei pazienti con uremia (0.23) era significativamente più basso rispetto ai controlli (13.2). L'indice di fertilità dei soggetti con trapianto renale era più vicina ai controlli normali due anni dopo il trapianto (9.23) (Xu et al., 2009).

Infine, non è presente in letteratura una consistente associazione tra infertilità e carcinoma a cellule renali. Nel 2010 è stato pubblicato un case-report a tale riguardo, tuttavia l'infertilità non è considerata una manifestazione riconosciuta di tale condizione (McKelvey et al., 2010). Un altro case-report ha mostrato una possibile associazione tra azoospermia ed insufficienza renale acuta, con reversibilità della funzione spermatica quattro mesi dopo la normalizzazione della funzione renale (Eldar et al., 2008).

Patologie autoimmuni

Le patologie autoimmunitarie sono, in generale, più frequenti nel sesso femminile. Le nuove terapie permettono una migliore prognosi e una migliore qualità della vita per i pazienti affetti, rendendo il tema dell'infertilità di attuale interesse. Anche se i dati non sono molti e sono spesso contrastanti, i pazienti di sesso maschile affetti da patologie autoimmunitarie presentano una ridotta capacità riproduttiva, le cui cause sono solitamente multifattoriali.

I meccanismi alla base della ridotta fertilità in questi pazienti comprenderebbero: tossicità da farmaci; presenza di anticorpi anti-spermatozoo, spesso riscontrabili in questi pazienti [nel siero, nel liquido seminale o sulla superficie degli spermatozoi (Arap et al., 2007)]; lesioni immunopatologiche del testicolo, che potrebbero derivare da meccanismi cellulari T-mediati (Tung&Teuscher, 1995; Rival et al., 2005); aneuploidie (Fu et al., 2012); danno testicolare secondario a vasculiti in patologie autoimmuni quali la poliartrite nodosa, il morbo di Behçet, la porpora e l'artrite reumatoide; ridotto desiderio sessuale e limitazioni fisiche/meccaniche (Gallinaro et al., 2012; Sariyildiz et al., 2013); fattori psicosociali ed età.

Relativamente alle patologie reumatiche, una revisione sistematica della letteratura riassume le principali evidenze sulla correlazione con l'infertilità maschile. In questi pazienti, il trattamento farmacologico è probabilmente il principale fattore determinante la disfunzione gonadica (Freire et al., 2006). Nel lupus eritematoso sistemico (LES) sono stati riscontrati ridotte concentrazioni sieriche di inibina B, correlati con ridotta concentrazione e motilità totale degli spermatozoi e con elevati livelli di LH ed FSH (Suehiro et al., 2008). Inoltre, alterazioni della funzione sessuale, in particolare deficit della funzione erettile, sono state riportate nel 20% dei casi, unitamente a ridotto volume testicolare nel 38% e anomalie dei parametri del liquido seminale nel 48% in associazione con il trattamento con ciclofosfamide (Silva et al., 2009). Anticorpi anti-spermatozoo IgG nel siero sono stati riscontrati nel 15% dei pazienti affetti da LES e anticorpi anti DNA nel 42% (D'Cruz et al., 1994). Uno studio di Dillon e colleghi, dopo analisi del cariotipo di 316 pazienti con LES, ha evidenziato aneuploidie nel 2.5% dei casi, con nessun caso nel gruppo di controllo (Dillon et al., 2012).

Moraes e colleghi hanno valutato 5 pazienti con dermatomiosite e 10 controlli sani, con riscontro di teratozoospermia in tutti i pazienti malati e presenza di anticorpi anti-spermatozoo in uno (Moraes et al., 2008). Uno studio laterale ha valutato la fertilità in 10 pazienti affetti da dermatomiosite confrontati a 10 controlli sani; i pazienti con patologia autoimmunitaria presentavano una riduzione della concentrazione, della motilità e delle forme normali (Moraes et al., 2010).

Gli studi realizzati su pazienti con artrite reumatoide sono pochi, ma suggeriscono una correlazione con ridotte concentrazioni sieriche di testosterone ed elevati livelli di LH ed FSH; alterazioni della sfera sessuale, in particolare deficit della funzione erettile e/o riduzione della libido (Gordon et al., 1986); contrastanti appaiono i risultati riguardo la possibile correlazione con anticorpi-antispermatozoo (Shiraishi et al., 2009).

Nei pazienti con spondilite anchilosante è stata evidenziata una relazione significativa con lo sviluppo di varicocele (Nukumizu et al., 2012). Studi successivi hanno mostrato nessun coinvolgimento della funzione sertoliana e nessun impatto delle terapie anti-TNF (Paschou et al., 2009; Almeida et al., 2013).

Uno studio ha valutato 162 soggetti affetti da morbo di Behçet e 48 controlli sani non rilevando significative relazioni con ridotta fertilità maschile (Uzunaslán et al., 2014).

Esistono pochi dati riguardo il possibile ruolo degli anticorpi nelle condizioni di tiroidite autoimmune sulla fertilità maschile, con evidenze spesso contraddittorie. Uno studio di Trummer e colleghi che ha valutato 305 uomini infertili, ha evidenziato una relazione tra positività per AbTPO e alterazioni dei parametri del liquido seminale (Trummer et al., 2001), tuttavia questo studio non chiarisce un possibile effetto diretto da parte degli anticorpi sui parametri spermatici o il possibile ruolo di altri fattori, ad esempio la presenza di Ab-antispermatozoo, ipotesi peraltro supportata dallo studio di Paschke e coll. (Paschke et al., 1994). Nessuna relazione invece è stata evidenziata nello studio di Poppe e coll. condotto su 299 uomini suddivisi in due gruppi in relazione alla qualità spermatica, mediante determinazione delle concentrazioni sieriche di ormoni tiroidei e autoAb (Poppe et al., 2006).

L'infertilità rappresenta una possibile manifestazione della sindrome polighiandolare autoimmune (SPA) di tipo I. Uno studio di Landegren e coll., ha dimostrato che TGM4 (autoantigene espresso in modo specifico nell'epitelio prostatico di uomini, a partire dalla fase puberale) potrebbe avere un significato rilevante nel determinismo della subfertilità di questi pazienti (Landegren et al., 2015). In particolare, studi su topi deficienti per il gene AIRE hanno dimostrato mancata tolleranza per l'antigene TGM4, supportando l'eziologia autoimmune della subfertilità nei topi AIRE-negativi (Landegren et al., 2015).

L'associazione tra morbo celiaco e infertilità maschile è controversa in letteratura; sebbene vi siano studi che non dimostrano alcuna relazione, altri, come quello condotto da Khoshbaten e colleghi valutando 100 coppie con infertilità inspiegata tramite ricerca di anticorpi anti-transglutaminasi, mostrano una maggiore siero-prevalenza di morbo celiaco in pazienti infertili (Khoshbaten et al., 2011).

Anticorpi anti-FSH potrebbero essere responsabili di anomalie dei parametri spermatici in uomini con infertilità idiopatica (Jian Wang et al., 2008), mentre anticorpi diretti contro le cellule ipofisarie gonadotropino-secrenti potrebbero essere responsabili per lo più di un ipogonadismo ipogonadotropo (De Bellis et al., 2007).

Come già evidenziato, il ruolo probabilmente più importante nel determinismo dell'infertilità maschile in corso di patologie autoimmuni è di tipo indiretto, ovvero legato all'impiego di particolari farmaci (Freire et al., 2006). Le evidenze principali riguardano gli agenti alchilanti (ciclofosfamide e clorambucile), che in molti casi risultano associati a condizioni di infertilità irreversibile con oligozoospermia o azoospermia (Tabbara, 1983; Dooley & Nair, 2008). La monoterapia con metotrexato non induce, di regola, infertilità nell'uomo (Ostensen et al., 2006); anomalie spermatiche possono tuttavia presentarsi in alcuni casi, che spesso si risolvono dopo sospensione della terapia (Howell et al., 1999). La sulfasalazina può indurre quadri di oligozoospermia, astenozoospermia, teratozoospermia (Ostensen, 2004), con possibile ruolo causale della sulfapiridina, metabolita del farmaco (Meirow et al., 2005), e dello stress ossidativo (Alonso et

al., 2009). Wetzels (2004) ha evidenziato una chiara relazione tra durata del trattamento con ciclofosfamide o la dose cumulativa e il rischio di azoospermia; tale rischio è evidente alle dosi cumulative superiori a 300 mg/kg, anche se spesso sono tollerate dosi superiori. Questi dati derivano da cinque studi condotti su pazienti sottoposti a terapia con ciclofosfamide per sindrome nefrosica idiopatica, dopo molti anni dalla fine del trattamento, e valutando la conta spermatica (Hsu et al., 1979; Bogdanovic et al., 1990). Tuttavia la maggioranza dei pazienti coinvolti in questi studi sono stati trattati in fase prepubere e, considerato che questo potrebbe ridurre il rischio di azoospermia (Rivkees & Crawford, 1988), tali dati potrebbero non essere applicabili a pazienti adulti. Il danno testicolare attribuibile all'impiego di agenti alchilanti è stato descritto, già dagli anni settanta, a carico dei parametri spermatici convenzionali e delle cellule del Sertoli (Etteldorf et al., 1976; Qureshi et al., 1972).

I dati riguardanti gli effetti sui parametri spermatici di pazienti in trattamento con farmaci biologici non sono numerosi, tuttavia non sembrano esserci effetti rilevanti sulla fertilità di questi soggetti.

La crioconservazione del seme rappresenta l'unica opzione valida, al momento, per adulti e adolescenti in fase post-puberale prima dell'avvio a terapia con agenti citotossici (Ostensen et al., 2004; Revel et al., 2008; Ranganathan et al., 2002; Bashore, 2007).

Patologie oncologiche

L'innovazione delle strategie terapeutiche in ambito oncologico ha determinato un aumento del tasso di sopravvivenza a 5 anni degli onco-pazienti giovani. In particolare, il registro EURO CARE-5 ha mostrato un tasso di sopravvivenza a 5 anni dell'88.6%, del 59.4% e dell'80.8% rispettivamente nei pazienti affetti da tumore testicolare, linfoma non-Hodgkin (NHL) e linfoma di Hodgkin (HL), diagnosticati tra il 2000 ed il 2007. Per il carcinoma della prostata e della vescica sono stati riportati tassi di sopravvivenza rispettivamente dell'88.6% e del 60.0%, mentre per il carcinoma gastrointestinale esso varia dal 48 al 59% (Caponecchia et al., 2016).

L'aumento del tasso di sopravvivenza si associa al bisogno di migliorare la qualità di vita di questi pazienti: per gli uomini in età riproduttiva uno degli aspetti chiave in tal senso riguarda il desiderio di paternità. Gli studi hanno dimostrato che più del 50% di questi giovani maschi desidera una paternità dopo il trattamento e, considerati solo coloro che al tempo della diagnosi non hanno avuto figli, questa percentuale sale al 75% (Vakalopoulos et al., 2015).

Le patologie neoplastiche possono ripercuotersi negativamente sulla capacità riproduttiva del soggetto di sesso maschile mediante un meccanismo diretto, ossia dovuto alla presenza stessa della neoplasia, anche se gli studi in tal senso mostrano risultati contrastanti. Più evidenti sono gli effetti gonadotossici del trattamento radio- e/o chemio-terapico somministrato al paziente (meccanismo iatrogeno o indiretto). Tali effetti dipendono dal tipo di farmaco e dalla dose utilizzati (Trost & Brannigan, 2012). Inoltre, anche alcune strategie chirurgiche possono condizionare negativamente la fertilità maschile.

La Società Americana di Medicina della Riproduzione (ASRM) e la Società Americana di Oncologia Clinica (ASCO) raccomandano formalmente non solo di informare i pazienti riguardo gli effetti delle terapie oncologiche sulla fertilità, ma anche di consigliare soluzioni per preservarla (Loren et al., 2013; Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, 2013).

Di seguito verranno esaminati meccanismi ed evidenza di alterazione dei parametri spermatici nei pazienti oncologici, prima e dopo il trattamento specifico, e saranno brevemente prese in esame le strategie preventive consigliate dalla ASRM e dalla ASCO. I tumori testicolari sono esclusi dalla trattazione in quanto discussi altrove.

Meccanismi diretti

Le patologie neoplastiche sono potenzialmente in grado di alterare la fertilità maschile attraverso un gran numero di meccanismi, tra cui (i) l'alterazione dello stato nutrizionale ed endocrino, (ii) l'induzione di uno stato ipermetabolico promosso dalle stesse cellule neoplastiche, dovuto alla loro rapida proliferazione ed apoptosi, e (iii) la produzione di metaboliti spermatotossici. In particolare, le patologie neoplastiche che comportano una deficienza di vitamine, minerali ed elementi in tracce aventi un ruolo cruciale nel mantenimento della spermatogenesi, possono contribuire all'infertilità maschile alterando aspetti che vanno dallo sviluppo testicolare alla qualità della spermatogenesi. Inoltre, i tumori possono promuovere una risposta autoimmunitaria inducendo la produzione di anticorpi anti-spermatozoo, alterando la motilità o rilasciando citochine che danneggiano le cellule germinali o del Leydig. Anche la febbre (solitamente associata al HL) può influire negativamente sui parametri spermatici, in maniera proporzionale alla gravità dell'iperpiressia (Vakalopoulos et al., 2015).

Tali conoscenze teoriche non trovano sempre un riscontro pratico. I dati pubblicati in letteratura sono molto eterogenei, e soltanto una parte degli studi riguardanti i parametri spermatici nei pazienti oncologici prima di sottoporsi a terapia riporta l'evidenza di alterazioni seminali. Non esistono studi di meta-analisi a riguardo. Tra i trial clinici condotti su pazienti affetti da HL, quello di Paoli e colleghi presentano la casistica più ampia sin ora esaminata in letteratura (n= 519). Lo studio riporta una percentuale di pazienti oligozoospermici del 25% ed azoospermici del 2.9% sull'intera coorte esaminata, dato deponente per la presenza di un basso grado di ripercussione della malattia sui parametri spermatici. Inoltre, i pazienti con malattia in stadio iniziale (I-II) presentavano un più basso volume e numero totale rispetto ai pazienti con malattia in stadio avanzato (III-IV), pur rimanendo tali valori nel range di normalità. Nella coorte di pazienti in stadio I-II, coloro che manifestavano febbre, sudorazione e perdita di peso, presentavano concentrazione, numero totale, motilità e percentuale di forme normali più basse rispetto a quelli senza sintomi (Paoli et al., 2016). Pertanto, i parametri spermatici nei pazienti affetti da HL sembrerebbero essere influenzati dalla presenza di sintomi e dallo stadio (parametri peggiori nei pazienti con stadio precoce). Gli studi precedenti mostrano dati contrastanti: alcuni riportano la presenza di normozoospermia nel 50% dei pazienti con HL esaminati, altri invece descrivono un alto grado di alterazione dei parametri spermatici. Tali studi comunque sono stati condotti su casistiche più piccole.

Infine, lo studio di Caponecchia e colleghi, condotto su 236 pazienti neoplastici, di cui 128 con tumore testicolare, 68 con neoplasie ematologiche, 40 con tumori in altre sedi (polmone, laringe, prostata, apparato gastroenterico, encefalo, tiroide, milza, tessuto osseo) e 102 controlli fertili, non ha osservato una differenza significativa della conta spermatica tra i pazienti con carcinoma testicolare e quelli con neoplasia ematologica, ma entrambi i gruppi presentavano una concentrazione spermatica ed una percentuale di forme normali significativamente più basse rispetto ai pazienti con neoplasie in altre sedi. I pazienti con tumore testicolare avevano inoltre una motilità progressiva ridotta rispetto al gruppo di pazienti con neoplasie in altre sedi. Infine, i pazienti con neoplasia ematologica presentavano una conta spermatica di globuli bianchi significativamente più alta rispetto agli altri gruppi. I dati di questo studio inoltre non hanno rilevato un peggioramento dei parametri spermatici in funzione dello stadio (Caponecchia et al., 2016).

In conclusione, sebbene i meccanismi teorici responsabili di alterazione dei parametri spermatici nei pazienti con patologia neoplastica sono molteplici, i dati presenti in letteratura sono contrastanti. Non sicure alterazioni dei parametri spermatici sono riscontrabili in questi pazienti. Le neoplasie testicolari ed ematologiche potrebbero avere un grado di ripercussione negativa maggiore rispetto alle altre neoplasie sui parametri spermatici.

Meccanismi indiretti

I meccanismi indiretti comprendono la chirurgia, la radioterapia, la chemioterapia e la terapia ormonale.

Chirurgia

Tra le tecniche chirurgiche aventi una ripercussione negativa sulla fertilità maschile si annovera la prostatectomia radicale, eseguita per carcinoma della prostata e determinante invariabilmente aneiaculazione e conseguente azoospermia ostruttiva. La prostatectomia inoltre può esitare in disfunzione erettile di grado variabile, influenzando la capacità dell'individuo di avere un rapporto sessuale.

Il carcinoma vescicale può essere trattato chirurgicamente con la cistoprostatectomia, determinando le stesse conseguenze della prostatectomia radicale.

Il carcinoma penieno è trattato chirurgicamente con l'escissione che può consistere nella penectomia totale o parziale, con conseguente impossibilità ad avere dei rapporti sessuali (Polland & Berookhim, 2016).

Radioterapia

La radioterapia può danneggiare la fertilità maschile. Il danno può essere dovuto alla radiazione diretta del tessuto testicolare o, più frequentemente, i testicoli possono risentire degli effetti della radioterapia somministrata per il trattamento di tumori vicini (es. carcinoma prostatico, carcinoma vescicale). In questi casi, possono essere adottati sistemi di protezione meccanica (conchiglia) che riducono la radiazione testicolare.

L'effetto gonadotossico della radioterapia dipende dalla dose e dal suo frazionamento. Infatti, il frazionamento della dose è più dannoso rispetto ad un trattamento con dose equivalente somministrato con singola dose. Effetti avversi sulla spermatogenesi cominciano ad insorgere alla dose di 0.1-1.2 Gy, con danno irreversibile alla dose di 4 Gy. Le cellule di Leydig sono maggiormente resistenti al danno da

radiazioni, riportando un danno per dosi di 14-20 Gy. Sebbene il recupero della spermatogenesi cominci circa 9 mesi dopo il trattamento, una dose più accuratamente frazionata, tecniche di somministrazione più avanzate e strategie volte a proteggere le gonadi permettono un completo recupero della spermatogenesi in 9-12 mesi dopo dosi di 1 Gy, 30 mesi dopo dosi di 2-3 Gy e 5 anni per dosi sino a 4 Gy (Vakalopoulos et al., 2015). Altri studi di revisione della letteratura riportano un completo recupero in 10-18 mesi per dosi di 35-50 cGy (Trottman et al., 2007).

Non è chiaro quale sia il limite massimo oltre il quale si verifichi una azoospermia persistente; dosi superiori ad 1.2 Gy si associano ad un incremento del tempo di recupero della spermatogenesi. Il trattamento combinato radio-chemioterapico induce un effetto gonadotossico più rilevante rispetto ad un trattamento singolo. La radioterapia, oltre ad influire sulla concentrazione spermatica, incrementa il tasso di frammentazione del DNA (che può rimanere elevato per oltre due anni dal trattamento). Questo determina una alterazione dei tassi di gravidanza dopo il recupero degli spermatozoi (Vakalopoulos et al., 2015).

La brachiterapia è un trattamento alternativo alla radioterapia esterna per il carcinoma della prostata e permette una radiazione testicolare inferiore a 20 cGy, valore ritenuto troppo basso per avere significative ripercussioni sul tessuto testicolare (Tran et al., 2015).

Anche la terapia radiometabolica somministrata per il trattamento del carcinoma differenziato della tiroide può avere ripercussioni negative sulla fertilità maschile, specie quando il trattamento viene somministrato in età pediatrica. Le linee guida della Associazione Americana Tiroidea (ATA) del 2015 sul carcinoma tiroideo in età pediatrica raccomandano di evitare tentativi di concepimento per almeno 4 mesi dalla terapia radiometabolica. Nei maschi in età postpuberale è stato osservato un rialzo dell'FSH che può persistere anche per oltre 18 mesi dalla esposizione alla terapia; l'attività cumulativa dello I^{131} può portare a ridotta spermatogenesi, senza interferire sulla produzione di testosterone. I testicoli postpuberali sembrano essere più vulnerabili rispetto a quelli del prepubere agli effetti tossici della terapia. Pertanto, i maschi di età postpuberale dovrebbero essere avvisati e dovrebbe essere suggerito il crioconservamento del seme per coloro esposti ad una dose cumulativa ≥ 400 mCi (14.8 GBq) (Francis et al., 2015).

Chemioterapia

Gli effetti gonadotossici dei chemioterapici sono dovuti all'azione che questi farmaci hanno sulle cellule rapidamente proliferanti. Gli effetti dei chemioterapici sui parametri spermatici dipendono dal tipo di farmaco, dal dosaggio, dalla qualità di partenza del liquido seminale, dalla sede della tossicità specifica sul ciclo spermatogenetico. Le mutazioni che si verificano negli spermatogoni in stadio di maturazione precoce causano un danno permanente della spermatogenesi in confronto alle mutazioni insorgenti negli spermatogoni in fase di maturazione tardiva, che determinano invece un danno spermatogenetico transitorio.

Molti chemioterapici attraversano la barriera emato-testicolare e danneggiano le cellule germinali direttamente o causando fibrosi e ialinizzazione del tessuto interstiziale del testicolo. Gli studi di revisione della letteratura suddividono i chemioterapici in funzione del danno che essi hanno sulla spermatogenesi. Si distinguono quelli in grado di dare azoospermia prolungata o permanente, tra cui il clorambucil (1.4 g/m^2), il cisplatino, il carboplatino, la ciclofosfamide (19 g/m^2), la procarbazina (4 g/m^2) ed il melfalan (140 g/m^2). La

carmustina e la lomustina possono dare azoospermia in età adulta, specie quando sono somministrati prima della pubertà. Il busulfano (600 mg/m^2), l'actinomicina-D, l'ifosfamida (42 g/m^2) e le mostarde azotate danno azoospermia, specie quando somministrati in combinazione ad altri chemioterapici. La doxorubicina (770 mg/m^2), il tiotepa (400 mg/m^2), la citarabina (1 g/m^2), la vinblastina (50 g/m^2) e la vincristina (8 g/m^2), quando usati da soli, possono causare una riduzione temporanea della conta spermatica; insieme ad altri agenti sopracitati, invece, possono determinare azoospermia. Gli antimetaboliti (bleomicina, fluorouracile, 6-mercaptopurina, tioguanina, metotrexate) e l'etoposide, quando usati nei regimi convenzionali, causano solo una temporanea diminuzione della conta spermatica. In combinazione ad altri agenti sopracitati, possono causare azoospermia. Il prednisone (utilizzato in combinazione ai chemioterapici) difficilmente ha un affetto sulla spermatogenesi. L'interferone infine non ha alcun effetto (Vakalopoulos et al., 2015; Zavras et al., 2016).

I chemioterapici quindi possono danneggiare in maniera più o meno grave le cellule del Sertoli, con ripercussioni negative sulla fertilità maschile. Possono inoltre danneggiare il DNA spermatico, con rischio di aborto e malformazioni fetali. Lo stadio di maturazione della cellula germinale, oltre che il tipo di chemioterapico, influiscono sulla natura della mutazione genetica. Alcuni autori suggeriscono pertanto di posporre una gravidanza da 3 mesi ad 1 anno dal trattamento chemioterapico per ridurre il rischio di malformazioni (Tran et al., 2015).

Terapia ormonale

Anche la terapia ormonale può avere delle ripercussioni sulla fertilità. La deprivazione androgenica, utilizzata più comunemente per il trattamento del carcinoma della prostata, elimina il testosterone intratesticolare causando azoospermia o, meno comunemente, oligozoospermia dopo il trattamento. Mentre uno studio condotto sul modello animale dimostra il ripristino della fertilità al termine della terapia con antagonista del GnRH, i pochi studi condotti sull'uomo suggeriscono che il blocco androgenico prolungato causa una alterazione potenzialmente irreversibile sulla funzione delle cellule di Leydig (Tran et al., 2015).

Prevenzione

Sia la ASCO (Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, 2013) che la ASRM (Loren et al., 2013) hanno promulgato delle linee guida nelle quali vengono discusse e raccomandate le strategie di prevenzione della fertilità da attuare prima dell'inizio del trattamento oncologico.

La criopreservazione del liquido seminale rappresenta il metodo più utilizzato. Essa è efficace nei pazienti in età puberale ed adulta, mentre non può essere applicata in età prepuberale. Nei pazienti incapaci ad eiaculare, possono essere considerate alcune opzioni terapeutiche per criopreservare il seme, tra cui (i) l'utilizzo di inibitori della fosfodiesterasi-5 (comunemente utilizzati per il trattamento della disfunzione erettile), (ii) la stimolazione vibratoria, (iii) l'elettroeiaculazione (eseguita in anestesia mediante applicazione di una sonda transrettale), (iv) α -agonisti in coloro affetti da eiaculazione retrograda, (v) criopreservazione del seme estratto chirurgicamente, mediante aspirazione percutanea epididimaria (PESA), testicolare (TESA), estrazione testicolare (TESE) o aspirazione microchirurgica epididimaria (MESA) (Loren et al., 2013).

I bambini e gli adolescenti rappresentano una categoria a parte. Per i pazienti andati incontro a pubertà con inizio della produzione degli spermatozoi, la terapia oncologica può danneggiare la fertilità. Molti fattori non consentono l'attuazione di strategie di prevenzione della fertilità in questi pazienti per l'assenza di programmi terapeutici adeguati nelle cliniche pediatriche, mancanza di conoscenza circa la vulnerabilità di questi pazienti alle terapie oncologiche, disagio nel discutere della salute riproduttiva del paziente con i genitori (Loren et al., 2013).

Per i pazienti in età prepuberale le linee guida della ASCO del 2013 (Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, 2013) raccomandano la criopreservazione del tessuto gonadico, metodo tuttavia considerato ancora sperimentale.

Malattie endocrine

L'incidenza delle endocrinopatie primarie nei maschi infertili è inferiore al 3% ed è rara nei maschi con concentrazione nemaspermica superiore a 5 milioni/ml. Comunque, quando viene diagnosticata una endocrinopatia, il trattamento ormonale specifico dà spesso risultati soddisfacenti (Dale McClure, 1987).

Cause endocrine di infertilità

Le principali cause endocrine di infertilità sono riportate nella Tabella 2.

Tabella 2. Cause di ipogonadismo

- Ipogonadismo primario (sindromi ipergonadotrope)
 - o Anomalie cromosomiche
 - o Distrofia miotonica
 - o Anorchia bilaterale (sindrome del testicolo scomparso)
 - o Sindrome a sole cellule di Sertoli
 - o Sostanze gonadotossiche (farmaci, radiazioni)
 - o Orchite
 - o Malattie sistemiche (epatiche, renali, anemia a cellule falciformi)
 - o Deficitaria sintesi o azione degli androgeni
- Ipogonadismo centrale (sindromi ipogonadotrope)
 - o Eunuoidismo ipogonadotropo
 - o Deficit isolato di LH
 - o Deficit isolato di FSH
 - o Malattia ipofisaria
 - o Androgeni, estrogeni, glucocorticoidi (eccesso endogeno/esogeno)
 - o Iperprolattinemia
 - o Emocromatosi

Ipogonadismo primario

I livelli di FSH ed LH sono aumentati, mentre i livelli di T sono ai limiti bassi della norma o ridotti. In molti casi l'eziologia è genetica (es. sindrome di Klinefelter). Non esiste un trattamento per la

conseguente infertilità, ad eccezione di alcune forme acquisite (insufficienza renale, anemia falciforme), nelle quali la somministrazione di zinco può migliorare la conta spermatica (Mahajan et al., 1982).

Ipogonadismo centrale

I livelli di FSH, LH e T sono ridotti. L'eunucoidismo si riscontra quando l'ipogonadismo insorge prima della pubertà. La sindrome di Kallmann è dovuta ad una perdita congenita della secrezione di GnRH. Quando l'ipogonadismo si verifica dopo la pubertà, bisogna escludere la presenza di una tumore ipofisario o ipotalamico mediante indagine radiologica (TC della ipofisi) e attraverso la valutazione dei livelli sierici di prolattina.

I maschi infertili affetti da ipogonadismo ipogonadotropo possono essere trattati con hCG (3 x 2000 UI/settimana), seguita da hCG + hMG (2 x 150 UI/settimana). Una precedente terapia con androgeni non altera la risposta al trattamento. Nei casi con criptorchidismo è più difficile raggiungere la fertilità (Finkel et al., 1985). Uno studio non randomizzato ha confrontato gli effetti della terapia combinata con GnRH pulsatile (4-8 µg sotto cute ogni 2 ore), somministrato usando una pompa portatile, ed hCG (3 x 2500 UI/settimana), somministrato per via intra muscolare, con quelli del trattamento combinato hCG-hMG. L'incremento del volume testicolare e della conta spermatica è stato raggiunto più rapidamente nel gruppo trattato con GnRH rispetto a quello trattato con hMG (Schopohl et al., 1991). Secondo uno studio non controllato, in caso di perdita di risposta all'hMG, la sensibilità delle gonadi all'hMG potrebbe migliorare dopo somministrazione dell'ormone della crescita (3 x 4 UI/settimana) (Shoham et al., 1992). In un paziente azoospermico ipofisectomizzato abbiamo osservato un incremento dell'IGF-1 nel liquido seminale dopo trattamento con hCG-hMG. La terapia adiuvante con ormone della crescita aumenta l'IGF-1 nel sangue ma non nel liquido seminale.

Eccesso di glucocorticoidi

Una ridotta spermatogenesi può verificarsi in presenza di sindrome di Cushing o in caso di ipercortisolismo iatrogeno. Nella malattia di Cushing, gli elevati livelli plasmatici di cortisolo possono deprimere la secrezione di LH causando disfunzione testicolare secondaria (Luton et al., 1977). La somministrazione acuta o cronica di glucocorticoidi induce una riduzione del T senza un incremento compensatorio dei livelli di LH (McAdams et al., 1986). Un miglioramento della fertilità (senza effetto sullo sperma) è stato comunque osservato dopo somministrazione di prednisone ad una dose compresa da 40 ad 80 mg per 10 giorni/mese per 9 mesi, prescritta in presenza di anticorpi anti-spermatozoo (Hendry et al., 1990).

Iperprolattinemia

Il calo della libido, associato a cefalea, disturbi del visus e galattorrea (dal 14% al 33% dei casi) suggeriscono una iperprolattinemia. Quest'ultima rappresenta un'insolita causa di infertilità e la prolattina

non dovrebbe essere routinariamente richiesta nell'iter diagnostico dell'infertilità a meno che non sia presente anche impotenza o galattorrea e/o bassi livelli di T con livelli di LH normale-basso. Il recupero della fertilità, così come quello della funzione erettile, può avvenire dopo trattamento chirurgico o medico (es. bromocriptina) (Segal et al., 1976; Cunnah et al., 1991).

Iperplasia surrenalica congenita

Nelle forme lievi di deficit di 21-idrossilasi, l'eccessiva produzione di ACTH conseguente alla sintesi deficitaria di cortisolo stimola la corteccia surrenalica alla produzione di androgeni, determinando pubertà precoce ed anomalo accrescimento penieno (Urban, 1978). Le gonadotropine risultano essere sopresse a causa dell'aumento degli steroidi; ciò comporta, in alcuni casi, oligozoospermia o arresto della spermatogenesi. Il 17-idrossiprogesterone e l'androstenedione sono incrementati. La fertilità può essere ripristinata mediante il trattamento con glucocorticoidi (Bonaccorsi et al., 1987).

Bibliografia

- Almeida BP, Saad CG, Souza FH, Moraes JC, Nukumizu LA, Viana VS, Bonfá E, Silva CA. Testicular Sertoli cell function in ankylosing spondylitis. *ClinRheumatol* 2013;32:1075-9.
- Alonso V, Linares V, Belles M, Albina ML, Sirvent JJ, Domingo JL, Sánchez DJ. Sulfasalazine induced oxidative stress: a possible mechanism of male infertility. *Reprod Toxicol* 2009;27: 35–40.
- Arap MA, Vicentini FC, Cocuzza M, Hallak J, Athayde K, Lucon AM, Arap S, Srougi M. Late hormonal levels, semen parameters, and presence of antisperm antibodies in patients treated for testicular torsion. *J Androl* 2007;28:528-32.
- Avni M, White D, Kanwal F, Garcia JM. Relevance of low testosterone to non-alcoholic fatty liver disease. *Cardiovasc Endocrinol* 2015;4:83-9.
- Bashore L. Semen preservation in male adolescents and young adults with cancer: one institution's experience. *Clin J OncolNurs* 2007;11: 381–6.
- Belet U, Danaci M, Sarikaya S, Odabas F, Utas C, Tokgoz B, Sezer T, Turgut T, Erdoğan N, Akpolat T. Prevalence of epididymal, seminal vesicle, prostate, and testicular cysts in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Urology* 2002;60:138–41.
- Bogdanovic R, Banicevic M, Cvoric A. Testicular function following cyclophosphamide treatment for childhood nephrotic syndrome: longterm follow-up study. *PediatrNephrol* 1990;4:451-4.
- Bonaccorsi AC, Adler I, Figueiredo JG. Male infertility due to congenital adrenal hyperplasia: testicular biopsy findings, hormonal evaluation, and therapeutic results in three patients. *Fertil Steril* 1987;47:664-70.
- Burra P. Liver abnormalities and endocrine diseases. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 2013;553–63.
- Caponecchia L, Cimino G, Sacchetto R, Fiori C, Sebastianelli A, Salacone P, Marcucci I, Tomassini S, Rago R. Do malignant diseases affect semen quality? Sperm parameters of men with cancers. *Andrologia* 2016;48:333-40.
- Chen JW, Cui Y, Zhang XX. Investigate the impact of hepatitis B virus infection on sperm DNA integrity. *Chinese Journal of Experimental and Clinical Virology* 2011;25:345–7.
- Cunnah D, Besser M. Management of prolactinomas. *Clin Endocrinol* 1991;34:231-5.
- D'Cruz OJ, Haas GG Jr, Reichlin M. Autoantibodies to decondensed sperm nuclear deoxyribonucleic acid in patients with antisperm antibodies and systemic lupus erythematosus detected by immunofluorescence flow cytometry. *FertilSteril* 1994; 62:834-44.
- Dale McClure R. Endocrine investigation and therapy. *Urol Clin North Am* 1987;14:471-87.
- De Bellis A, Sinisi AA, Conte M, Coronella C, Bellastella G, Esposito D, Pasquali D, Ruocco G, Bizzarro A, Bellastella A. Antipituitary antibodies against gonadotropin-secreting cells in adult male

- patients with apparently idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2007;92:604–7.
- Deng TQ, Huang YH, Zhen JY, Lu JT, Li YC, Tan XY, Liu XC, Ruan JB, Zhang HB. Sperm DNA integrity of infertile males with hepatitis B virus infection. *National Journal of Andrology* 2013;19:72–6.
 - Dillon SP, Kurien BT, Li S, Bruner GR, Kaufman KM, Harley JB, Gaffney PM, Wallace DJ, Weisman MH, Scofield RH. Sex chromosome aneuploidies among men with systemic lupus erythematosus. *J Autoimmun* 2012; 38:129-34.
 - Dooley MA, Nair R. Therapy Insight: preserving fertility in cyclophosphamide-treated patients with rheumatic disease. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2008;4:250-7.
 - Eckersten D, Giwercman A, Christensson A. Male patients with terminal renal failure exhibit low serum levels of antimüllerian hormone. *Asian J Androl* 2015;17:149-53.
 - Eckersten D, Giwercman A, Bruun L, Christensson A. Anti-Müllerian hormone, a Sertoli cell-derived marker, is decreased in plasma of male patients in all stages of chronic kidney disease. *Andrology* 2015;3:1160-4.
 - Eisenberg ML, Li S, Behr B, Pera RR, Cullen MR. Relationship between semen production and medical comorbidity. *Fertil Steril* 2015;103:66-71.
 - El-Atrebi KA, Kamal A. El-Atrebi Mohamed A. Sexual dysfunction in males with hepatitis C virus: relevance to histopathologic changes and peginterferon treatment. *Saudi J Gastroenterol* 2011;17:406–10.
 - Eldar I, Godin M, Bdolah Y, Hurwitz A, Haimov-Kochman R. Acute renal failure may lead to reversible azoospermia. *Fertil Steril*. 2008;90:2007.e11-2.
 - El-Serafi AT, Osama S, El-Zalat H, EL-Deen IM. Dysregulation of male sex hormones in chronic hepatitis C patients. *Andrologia* 2016;48, 82–8.
 - Etteldorf JN, West CD, Pitcock JA, Williams DL. Gonadal function, testicular histology, and meiosis following cyclophosphamide therapy in patients with nephrotic syndrome. *J Pediatr* 1976;88:206-12.
 - Fang S, Baker HW. Male infertility and adult polycystic kidney disease are associated with necrospemia. *Fertil Steril* 2003;79:643-4.
 - Finkel DM, Phillips JL, Snyder PJ. Stimulation of spermatogenesis by gonadotropins in men with hypogonadotropic hypogonadism. *N Engl J Med* 1985;313:651-5.
 - Francis GL, Waguespack SG, Bauer AJ, Angelos P, Benvenga S, Cerutti JM, Dinanuer CA, Hamilton J, Hay ID, Luster M, Parisi MT, Rachmiel M, Thompson GB, Yamashita S; American Thyroid Association Guidelines Task Force. Management Guidelines for Children with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid* 2015;25:716-59.
 - Freire EA, Nepomuceno JD, Maia ID, Ciconelli RM. Doencas reumáticas e infertilidade masculina. *Revista Brasileira de Reumatologia* 2006;46:12-20.
 - Fu L, Xiong DK, Ding XP, Li C, Zhang LY, Ding M, Nie SS, Quan Q. Genetic screening for chromosomal abnormalities and Y chromosome microdeletions in Chinese infertile men. *J Assist Reprod Genet* 2012; 29:521-7.
 - Fu-Hsiung, Chang SN, Sung FC, Su CT, Shieh YH, Lin CC, Yeh CC. Hepatitis B virus infection and the risk of male infertility: a population-based analysis. *Fertility and Sterility* 2014;102:1677-84.
 - Gallinaro AL, Akagawa LL, Otuzi MH, Sampaio-Barros PD, Goncalves CR. Sexual activity in ankylosing spondylitis. *Rev Bras Reumatol* 2012; 52:887-91.
 - Garolla A, Pizzol D, Bertoldo A, Menegazzo M, Barzon L, Foresta C. Sperm viral infection and male infertility: focus on HBV, HCV, HIV, HPV, HSV, HCMV, and AAV. *Journal of Reproductive Immunology* 2013;100:20– 9.
 - Gordon D, Beastall GH, Thomson JA, Sturrock RD. Androgenic status and sexual function in males with rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis. *Q J Med* 1986;60:671-9.
 - Handelsman DJ, Dong Q. Hypothalamo-pituitary-gonadal axis in chronic renal failure. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1993;22:145–161.
 - Harald H, Donnerer J, Sator K, Staufer K, Scherzer TM, Dejaco C, Sator M, Kessler H, Ferenci P. Seminal fluid ribavirin level and functional semen parameters in patients with chronic hepatitis C on antiviral combination therapy. *Journal of Hepatology* 2010;52: 812–6.

- Hendry WF, Hughes L, Scammell G, Pryor JP, Hargreave TB. Comparison of prednisolone and placebo in subfertile men with antibodies to spermatozoa. *Lancet* 1990;335:85-8.
- Hendry WF, Rickards D, Pryor JP, Baker LR. Seminal megavesicles with adult polycystic kidney disease. *Hum Reprod* 1998;13:1567-9.
- Hofny ER, Ali ME, Taha EA, Nafeh HM, Sayed DS, Abdel-Azeem HG, Abdou EF, Kamal GM, Mostafa T. Semen and hormonal parameters in men with chronic hepatitis C infection. *Fertil Steril* 2011;95:2557-9.
- Howell SJ, Radford JA, Ryder WD, Shalet SM. Testicular function after cytotoxic chemotherapy: evidence of Leydig cell insufficiency. *J Clin Oncol* 1999;17:1493-8.
- Hsu AC, Folami AO, Bain J, Rance CP. Gonadal function in males treated with cyclophosphamide for nephrotic syndrome. *Fertil Steril* 1979;31:173-7.
- Huang JM, Jian-Min Huang, Tian-Hua Huang, Huan-Ying Qiu, Xiao-Wu Fang, Tian-Gang Zhuang, Hong-Xi Liu, Yong-Hua Wang, Li-Zhi Deng, and Jie-Wen Qiu. Studies on the integration of hepatitis B virus DNA sequence in human sperm chromosomes. *Asian J Androl* 2002;4:209-12.
- Hussein T. M, Abou-ElKhie, A. A. Eid, D. Elneily. Assessment of antisperm antibodies in a sample of Egyptian patients with hepatitis C virus infection. *Andrologia* 2016;[Epub ahead of print]
- Jian Wang, B.Y., Liang, W., Cui, Y.X., Ge, Y.F., Follicle-stimulating hormone autoantibody is involved in idiopathic spermatogenic dysfunction. *Asian Journal of Andrology* 2008;10:915-921.
- Jones TH, Kennedy RL. Cytokines and hypothalamic-pituitary function. *Cytokine* 1993;5:531-8.
- Kang XJ, XiangJin Kang, QingDong Xie, XiaoLing Zhou, FangZheng Li, JiHua Huang, DongLing Liu, TianHua Huang. Effects of Hepatitis B Virus S Protein Exposure on Sperm Membrane Integrity and Functions. *Plos one* 2012;7:e33471.
- Khoshbaten M, Mohammad Rostami Nejad, Laya Farzady, Nasrin Sharifi, Sayyed Hassan Hashemi and Kamran Rostami. Fertility disorder associated with celiac disease in males and females: fact or fiction? *J Obstet Gynaecol Res* 2011;37:1308-12.
- Kuczera P, Adamczak M, Wiecek A. Endocrine Abnormalities in Patients with Chronic Kidney Disease. *Pril (Makedon Akad Nauk Umet Odd Med Nauki)* 2015;36:109-18.
- La Vignera S, Condorelli R. A, Vicari E, D'Agata R, Calogero A.E. . Sperm DNA damage in patients with chronic viral C hepatitis. *European Journal of Internal Medicine* 2012;1:19-24
- Landegren N, Sharon D, Shum AK, Khan IS, Fasano KJ, Hallgren Å, Kampf C, Freyhult E, Ardesjö-Lundgren B, Alimohammadi M, Rathsmann S, Ludvigsson JF, Lundh D, Motrich R, Rivero V, Fong L, Giwercman A, Gustafsson J, Perheentupa J, Husebye ES, Anderson MS, Snyder M, Kämpe O. Transglutaminase 4 as a prostate autoantigen in male subfertility. *Sci Transl Med* 2015 17;7:292ra101.
- Lee VC, Ng EH, Yeung WS, Ho PC. Impact of positive hepatitis B surface antigen on the outcome of IVF treatment. *Reprod Biomed Online* 2010;21:712-7.
- Levy R, Bourlet T, Maertens A, Salle B, Lornage J, Laurent JL, Pozzetto B, Guerin JF. Pregnancy after safe IVF with hepatitis C virus RNA- positive sperm. *Human Reproduction* 2002;17:2650-3
- Li Qian, Qiong Li, Haibo Li. Effect of hepatitis B virus infection on sperm quality and oxidative stress state of the semen of infertile males. *Am J Reprod Immunol* 2016;76:183-5.
- Lin Shi, Shan Liu, Wanqiu Zhao, Juanzi Shi. Hepatitis B Virus Infection Reduces Fertilization Ability During In Vitro Fertilization and Embryo Transfer. *Journal of Medical Virology* 2014; 86:1099-104.
- Lin Yang, Ronghua Zhao, Yingjie Zheng, and Xueru Song . Effect of hepatitis C virus infection on the outcomes of in vitro fertilization. *Int J ClinExp Med* 2015;8:6230-5.
- Loren AW, Mangu PB, Beck LN, Brennan L, Magdalinski AJ, Partridge AH, Quinn G, Wallace WH, Oktay K, American Society of Clinical Oncology. Fertility preservation for patients with cancer: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline update. *J Clin Oncol* 2013;31:2500-10.
- Lorusso F, Palmisano M, Chironna M, Vacca M, Masciandaro P, Bassi E, Selvaggi Luigi L, Depalo R. Impact of chronic viral diseases on semen parameters. *Andrologia* 2010;42:121-6
- Luton JP, Thieblot P, Valcke JC, Mahoudeau JA, Bricaire H. Reversible gonadotropin deficiency in male Cushing's disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1977;45:488-5.

- Mahajan SK, Abbasi AA, Prasad AS, Rabbani P, Briggs WA, McDonald FD. Effect of oral zinc therapy on gonadal function in hemodialysis patients. A double-blind study. *Ann Intern Med* 1982;97:357-61.
- Mauboussin JM, Mahamat A, Peyrière H, Rouanet I, Fabbro-Peray P, Daures JP, Vincent D. Low plasma levels of dehydroepiandrosterone sulphate in HIV-positive patients coinfecting with hepatitis C virus. *HIV Med* 2004;5:151-7.
- McAdams MR, White RH, Chipps BE. Reduction of serum testosterone levels during chronic glucocorticoid therapy. *Ann. Intern. Med* 1986;104:648-51.
- McDonald JA, Handelsman DJ, Dilworth P, Conway AJ, McCaughan GW. Hypothalamic-pituitary-adrenal function in end-stage non-alcoholic liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 1993;8:247-53.
- McKelvey KD Jr, Siraj S, Kelsay J, Batres F. *Fertil Steril* 2010;93:2075.e1-2.
- Meeker John D, Godfrey-Bailey Linda, and Hauser Russ. Relationships between serum hormone levels and semen quality among men from an infertility clinic. *J Androl* 2007;28:397-406.
- Meirow D, Levron J, Eldar-Geva T, Hardan I, Fridman E, Zalel Y, Schiff E, Dor J. Pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a patient with ovarian failure after chemotherapy. *N Engl J Med* 2005;353:318-21.
- Moraes AJ, Pereira RM, Cocuzza M, Casemiro R, Saito O, Silva CA. Minor sperm abnormalities in young male post-pubertal patients with juvenile dermatomyositis. *Braz J Med Biol Res* 2008;41:1142-7.
- Moraes AJ, Bonfa E, Cocuzza M, Borges CT, Saito O, Silva CA. Gonad evaluation in male dermatomyositis. A pilot study. *ClinExp Rheumatol* 2010;28:441-2.
- Mowat NA, Edwards CR, Fisher R, McNeilly AS, Green JR, Dawson AM. Hypothalamic-pituitary-gonadal function in man with cirrhosis of the liver. *Gut* 1976;17:345-50.
- Nukumizu LA, GoncalvesSaad C, Ostensen M, Almeida BP, Cocuzza M, Goncalves C, Saito O, Bonfá E, Silva CA. Gonadal function in male patients with ankylosing spondylitis. *Scand J Rheumatol* 2012;41:476-81.
- Oger P, Yazbeck C, Gervais A, Dorphin B, Gout C, Jacquesson L, Ayel JP, Kahn V, Rougier N. Adverse effects of hepatitis B virus on sperm motility and fertilization ability during IVF. *Reprod Biomed Online* 2011;23:207-12.
- Okada H, Fujioka H, Tatsumi N. Assisted reproduction for infertile patients with 9+0 immotile spermatozoa associated with autosomal dominant polycystic kidney disease. *Hum Reprod* 1999;14:1166.
- Orhan I, Onur R, Ergin E, Köksal IT, Kadioğlu A. Infertility treatment in autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD)-a case report. *Andrologia* 2000;32:91-3.
- Ostensen M. New insights into sexual functioning and fertility in rheumatic diseases. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2004;18:219-32.
- Ostensen M, Khamashta M, Lockshin M, Parke A, Brucato A, Carp H, Doria A, Rai R, Meroni P, Cetin I, Derksen R, Branch W, Motta M, Gordon C, Ruiz-Irastorza G, Spinillo A, Friedman D, Cimaz R, Czeizel A, Piette JC, Cervera R, Levy RA, Clementi M, De Carolis S, Petri M, Shoenfeld Y, Faden D, Valesini G, Tincani A. Anti-inflammatory and immunosuppressive drugs and reproduction. *Arthritis Res Ther* 2006;8:209.
- Palmer BF. Sexual dysfunction in men and women with chronic kidney disease and end-stage kidney disease. *Adv Ren Replace Ther* 2003;10:48-60.
- Paoli D, Rizzo F, Fiore G, Pallotti F, Pulsoni A, Annechini G, Lombardo F, Lenzi A, Gandini L. Spermatogenesis in Hodgkin's lymphoma patients: a retrospective study of semen quality before and after different chemotherapy regimens. *Hum Reprod* 2016;31:263-72.
- Paschke R, Bertelsbeck DS, Tsalimalma K, Nieschlag E. Association of sperm antibodies with other autoantibodies in infertile men. *Am J Reprod Immunol* 1994;32:88-94.
- Paschou S, Voulgari PV, Vrabie IG, Saougou IG, Drosos AA. Fertility and reproduction in male patients with ankylosing spondylitis treated with infliximab. *J Rheumatol* 2009;36:351-4.
- Peces R, Venegas JL. Seminal vesicle cysts and infertility in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Nefrologia* 2005;25:78-80.

- Pecou S, Moinard N, Walschaert M, Pasquier C, Daudin M and Bujan L. Ribavirin and pegylated interferon treatment for hepatitis C was associated not only with semen alterations but also with sperm deoxyribonucleic acid fragmentation in humans. *Fertility and Sterility* 2009;91:3.
- Polland A, Berookhim BM. Fertility concerns in men with genitourinary malignancies: treatment dilemmas, fertility options, and medicolegal considerations. *Urol Oncol* 2016;34:399-406.
- Poppe K, Glinier D, Tournaye H, Maniewski U, Haentjens P, Velkeniers B. Is systematic screening for thyroid disorders indicated in subfertile men? *Eur J Endocrinol* 2006;154:363–66.
- Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine. Fertility preservation in patients undergoing gonadotoxic therapy or gonadectomy: a committee opinion. *Fertil Steril* 2013;100:1214-23.
- Qureshi MS, Pennington JH, Goldsmith HJ, Cox PE. Cyclophosphamide therapy and sterility. *Lancet* 1972;2:1290-1.
- Ranganathan P, Mahran AM, Hallak J, Agarwal A. Sperm cryopreservation for men with nonmalignant, systemic diseases: a descriptive study. *J Androl* 2002;23:71–5.
- Revel A, Revel-Vilk S. Pediatric fertility preservation: is it time to offer testicular tissue cryopreservation? *Mol Cell Endocrinol* 2008;282:143–9.
- Rival C, Guazzone VA, Theas MS, Lustig L. Pathomechanism of autoimmune orchitis. *Andrologia* 2005;37:226-7.
- Rivkees SA, Crawford JD. The relationship of gonadal activity and chemotherapy-induced gonadal damage. *JAMA* 1988;259:2123-5.
- Sariyildiz MA, Batmaz I, Dilek B, Inanir A, Bez Y, Tahtasiz M, Em S, Cevik R. Relationship of the sexual functions with the clinical parameters, radiological scores and the quality of life in male patients with ankylosing spondylitis. *Rheumatol Int* 2013;33:623-9.
- Schopohl J, Mehlretter G, von Zumbusch R, Eversmann T, von Werder K. Comparison of gonadotropin-releasing hormone and gonadotropin therapy in male patients with idiopathic hypothalamic hypogonadism. *Fertil Steril* 1991;56:1143-50.
- Segal S, Polishuk WZ, Ben-David M. Hyperprolactinemic male infertility. *Fertil. Steril.*, 1976;27:1425-1427.
- Shefi S, Levron J, Nadu A, Raviv G. Male infertility associated with adult dominant polycystic kidney disease: a case series. *Arch Gynecol Obstet* 2009;280:457–60.
- Shiraishi K, Shimabukuro T, Naito K. Effects of hemodialysis on testicular volume and oxidative stress in humans. *J Urol* 2008;180:644-50.
- Shiraishi Y, Shibahara H, Koriyama J, Hirano Y, Okazaki H, Minota S, Suzuki M. Incidence of antisperm antibodies in males with systemic autoimmune diseases. *Am J Reprod Immunol* 2009;61:183-9.
- Shoham Z, Conway GS, Ostergaard H, Lahlou N, Bouchard P, Jacobs HS. Cotreatment with growth hormone for induction of spermatogenesis in patients with hypogonadotropic hypogonadism. *Fertil. Steril* 1992;57:1044-1051.
- Shouval CD. The impact of ribavirin treatment on spermatogenesis in patients with chronic hepatitis. *Journal of Hepatology* 2010;52:781-2.
- Silva CA, Bonfa E, Borba EF, Braga AP, Soares PM, Moraes AJ, Saito O, Cocuzza M. Saúde reprodutiva em homens com lupus eritematoso sistêmico. *Revista Brasileira de Reumatologia*. 2009;49:207-22.
- Sinclair M, Grossmann M, Gow PJ, Angus PW. Testosterone in man with advanced liver disease: abnormalities and implications. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2015;244-51
- Smith SR, Chetri MK, Johanson J et al. The pituitary-gonadal axis in men with protein-calorie malnutrition. *J Clin Endocrinol Metab* 1975;41:60–69.
- Suehiro RM, Borba EF, Bonfa E, Okay TS, Cocuzza M, Soares PM, Silva CA. Testicular Sertoli cell function in male systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)* 2008;47:1692-7.
- Tabbara KF. Chlorambucil in Behcet's disease. A reappraisal. *Ophthalmology* 1983;90:906-8.
- Tarantino G, Savastano S, Colao A. Hepatic steatosis, low-grade chronic inflammation and hormone/growth factor/adipokine imbalance. *World J Gastroenterol* 2010;16:4773-783.

- Torra R, Sarquella J, Calabia J, Marti J, Ars E, Fernandez-Llama P, et al. Prevalence of cysts in seminal tract and abnormal semen parameters in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008;3:790–3.
- Tran S, Boissier R, Perrin J, Karsenty G, Lechevallier E. Review of the Different Treatments and Management for Prostate Cancer and Fertility. *Urology* 2015;86:936–41.
- Trost LW, Brannigan RE. Oncofertility and the male cancer patient. *Curr Treat Options Oncol* 2012;13:146–60.
- Trottmann M, Becker AJ, Stadler T, Straub J, Soljanik I, Schlenker B, Stief CG. Semen quality in men with malignant diseases before and after therapy and the role of cryopreservation. *Eur Urol* 2007;52:355–67.
- Trummer H, Ramschak-Schwarzer S, Haas J, Habermann H, Pummer K, Leb G. Thyroid hormones and thyroid antibodies in infertile males. *FertilSteril* 2001;76:254–7.
- Tung KS, Teuscher C. Mechanisms of autoimmune disease in the testis and ovary. *Hum Reprod Update*. 1995;1:35–50.
- Urban MD, Lee PA, Migeon CJ. Lee PA, Migeon CJ. Adult height and fertility in men with congenital virilizing adrenal hyperplasia. *N Engl J Med* 1978;299:1392–6.
- Uzunaslan D, Saygin C, Hatemi G, Tascilar K, Yazici H. No appreciable decrease in fertility in Behcet's syndrome. *Rheumatology* 2014;53:828–33.
- Vakalopoulos I, Dimou P, Anagnostou I, Zeginiadou T. Impact of cancer and cancer treatment on male fertility. *Hormones* 2015;14:579–89.
- Wetzels JF. Cyclophosphamide-induced gonadal toxicity: a treatment dilemma in patients with lupus nephritis? *Neth J Med* 2004;62:347–52.
- Xu LG, Xu HM, Zhu XF, Jin LM, Xu B, Wu Y, Lu NQ. Examination of the semen quality of patients with uraemia and renal transplant recipients in comparison with a control group. *Andrologia* 2009;41:235–40.
- Zachoval R, Jarabak J, Slatinska J, Burgelova M, Sobotka V, Vranova J, Krhut J. Dynamics of fertility in patients on waiting list for kidney transplantation. *Bratisl Lek Listy* 2013;114:711–5.
- Zavras N, Siristatidis C, Siatelis A, Koumarianou A. Fertility Risk Assessment and Preservation in Male and Female Prepubertal and Adolescent Cancer Patients. *Clin Med Insights Oncol* 2016;10:49–57.
- Zhou XL, Sun PN, Huang TH, Xie QD, Kang XJ, Liu LM. Effects of hepatitis B virus S protein on human sperm function. *Human Reproduction* 2009;24:1575–83.
- Zhou XP, Hu XL, Zhu YM, Qu F, Sun SJ, Qian YL. Comparison of semen quality and outcome of assisted reproductive techniques in Chinese men with and without hepatitis B. *Asian J Androl* 2011;13:465–9.
- Zietz B, Lock G, Plach B, Drobnik W, Grossman J, Scholmerich J, Straub RH. Dysfunction of the hypothalamic-pituitary-glandular axes and relation to Child-Pugh classification in male patients with alcoholic and virus-related cirrhosis. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol* 2003;15:495–501.
- Zini A, Phillips S, Lefebvre J, Baazeem A, Bissonnette F, Kadoch IJ, Gabriel MS. Anti-sperm antibodies are not associated with sperm DNA damage: a prospective study of infertile men. *J Reprod Immunol* 2010;85:205–8.

Fattori di rischio: steroidi anabolizzanti

Gli steroidi androgeni anabolizzanti (AAS, dall'inglese *Androgenic-Anabolic Steroids*) rappresentano una delle numerose categorie farmacologiche la cui azione si estrinseca a livello della fertilità maschile. Con il termine di AAS si intendono tutti i derivati sintetici del testosterone, sintetizzati in laboratorio per scopi diversi ma frequentemente “abusati” in ambito sportivo al fine di migliorare la performance atletica. Sebbene esistano diverse tipologie di attività sportiva, gli androgeni anabolizzanti rappresentano una delle sostanze più frequentemente abusate dagli atleti: facilitando un aumento della forza e della massa muscolare, e contribuendo al contempo a ridurre la massa grassa, gli AAS consentono di migliorare numerosi parametri metabolici, possibilmente esitando in un migliore risultato sportivo. Le evidenze scientifiche in letteratura non sempre sono rappresentative dei veri protocolli di doping: difatti, molto spesso gli atleti ricorrono a miscele di sostanze, nella speranza di aumentare gli effetti positivi delle sostanze assunte senza incorrere in spiacevoli effetti collaterali. Va tenuto presente che nell'ambito di tale protocolli dopanti si fa spesso uso di più AAS contemporaneamente e a dosaggi elevati, che possono arrivare a 10-15 volte i dosaggi terapeutici. Inoltre, gli AAS spesso sono alternati tra di loro e quando sono interrotti, spesso vengono sostituiti da altri prodotti dopanti la cui funzione dovrebbe essere quella di riattivare la produzione endogena di testosterone quali hCG e clomifene citrato. Non da sottovalutare il fatto che accanto agli AAS vengano spesso associati altri farmaci dopanti.

Il doping non è esclusivamente appannaggio del mondo dell'attività agonistica: numerosi atleti “amatoriali” ricorrono agli AAS o ad altri ormoni al fine di incrementare i risultati dell'allenamento, o nel tentativo di migliorare l'aspetto fisico [1]. Nella popolazione generale, si stima che circa il 3-4% degli uomini e l'1.6% delle donne abbia fatto ricorso ad AAS [2,3]; questa percentuale raggiunge proporzioni allarmanti fra gli atleti, con vette intorno al 15-25% in alcune nazioni [4]. In considerazione della vera e propria “epidemia di doping” e delle numerose evidenze scientifiche a sostegno del ruolo degli AAS nella patogenesi dell'infertilità di coppia, è fondamentale non tralasciare questo fattore di rischio durante la raccolta anamnestica.

Nell'uomo, l'assunzione di androgeni esogeni, ed in particolare di testosterone, induce un feedback negativo sull'asse ipotalamo-ipofisi-testicolo: questo feedback si manifesta come un ipogonadismo ipogonadotropo derivante dal mancato stimolo alla produzione delle gonadotropine ipofisarie LH ed FSH [5]. Valori normali di testosteronemia sono spesso riscontrati nella valutazione ematochimica come conseguenza dell'assunzione di testosterone esogeno; tuttavia, il riscontro di basse concentrazioni di LH ed FSH deve essere un campanello d'allarme, soprattutto qualora il dato ormonale sia accompagnato da un riferito problema di fertilità. In tal senso, va tenuto presente che

l'utilizzo di AAS si estende oltre il testosterone e che in caso di assunzione di altri tipi di AAS, il clinico può trovarsi di fronte a valori di LH, FSH e testosterone marcatamente bassi pur in assenza di segni e sintomi caratteristici. Il mancato stimolo da parte dell'FSH comporta una soppressione della spermatogenesi, clinicamente manifesta sottoforma di oligo- o azoospermia, il cui ripristino può richiedere tempi persino superiori ai due anni dalla sospensione degli AAS [6]: i meccanismi che giustificano tale ritardo nel ritorno ad una normale spermatogenesi sono sia la presenza di fenomeni di accumulo, sia l'interazione irreversibile con il recettore degli androgeni da parte degli AAS. È tuttavia possibile che la spermatogenesi non ritorni mai alla normalità [7]; possibili preesistenti condizioni favorevoli all'infertilità possono essere concausa di questo mancato ritorno alla norma [8]. Schemi terapeutici con clomifene citrato, tamoxifene o anastrozolo possono essere utilizzati al fine di facilitare il ripristino di un normale assetto ormonale [9]. All'esame obiettivo, l'inibizione prolungata dell'asse ipotalamo-ipofisi-testicolo comporta una diminuzione del volume testicolare, conseguente al mancato stimolo proliferativo nei confronti del compartimento sertoliano [10]. I pazienti che sviluppano ipogonadismo indotto da steroidi manifestano, oltre alle alterazioni della spermatogenesi, condizioni analoghe alle tradizionali forme di carenza androgenica: disturbi della sfera sessuale, con calo della libido e disfunzione erettile, sono frequentemente associati a riduzione della forza muscolare, aumento della massa grassa e minore sopportazione della fatica. Nelle donne l'utilizzo di AAS provoca risultati sicuramente più evidenti rispetto agli uomini in termini di guadagno e di forza muscolare in quanto fisiologicamente esposte a livelli di testosterone decisamente più bassi. Da altra parte, nelle donne gli AAS sono anche in grado di provocare effetti collaterali decisamente più significativi con amenorrea, irsutismo, atrofia del seno, ipertrofia clitoridea, abbassamento del tono della voce e virilizzazione. Non pochi sono i casi di atlete della DDR nelle quali l'assunzione per anni AAS a dosaggi elevati ha provocato tali cambiamenti fisici da spingere l'ex-atleta al cambio di sesso.

Bibliografia essenziale

1. Di Luigi, L., Romanelli, F., Lenzi, A.: Androgenic-anabolic steroids abuse in males. J Endocrinol Invest **28**(3 Suppl), 81-84 (2005).
2. Fronczak, C.M., Kim, E.D., Barqawi, A.B.: The insults of illicit drug use on male fertility. J Androl **33**(4), 515-528 (2012).
3. Sagoe, D., Molde, H., Andreassen, C.S., Torsheim, T., Pallesen, S.: The global epidemiology of anabolic-androgenic steroid use: a meta-analysis and meta-regression analysis. Ann Epidemiol **24**(5), 383-398 (2014).

4. El Osta, R., Almont, T., Diligent, C., Hubert, N., Eschwege, P., Hubert, J.: Anabolic steroids abuse and male infertility. *Basic Clin Androl* **26**, 2 (2016).
5. Di Luigi, L., Romanelli, F., Sgro, P., Lenzi, A.: Andrological aspects of physical exercise and sport medicine. *Endocrine* **42**(2), 278-284 (2012).
6. Nieschlag, E., Vorona, E.: Mechanisms In Endocrinology: Medical consequences of doping with anabolic androgenic steroids: effects on reproductive functions. *Eur J Endocrinol* **173**(2), R47-58 (2015). doi:10.1530/EJE-15-0080
7. Rasmussen, J.J., Selmer, C., Ostergren, P.B., Pedersen, K.B., Schou, M., Gustafsson, F., Faber, J., Juul, A., Kistorp, C.: Former Abusers of Anabolic Androgenic Steroids Exhibit Decreased Testosterone Levels and Hypogonadal Symptoms Years after Cessation: A Case-Control Study. *PloS one* **11**(8), e0161208 (2016).
8. Turek, P.J., Williams, R.H., Gilbaugh, J.H., 3rd, Lipshultz, L.I.: The reversibility of anabolic steroid-induced azoospermia. *J Urol* **153**(5), 1628-1630 (1995).
9. Rahnema, C.D., Lipshultz, L.I., Crosnoe, L.E., Kovac, J.R., Kim, E.D.: Anabolic steroid-induced hypogonadism: diagnosis and treatment. *Fertil Steril* **101**(5), 1271-1279 (2014).
10. de Souza GL, Hallak J. Anabolic steroids and male infertility: a comprehensive review. *BJU Int.* **108**(11):1860-5 (2011).

FATTORI OCCUPAZIONALI E AMBIENTALI

Negli ultimi anni in letteratura è stato messo in evidenza come l'esposizione all'inquinamento fisico-chimico possa avere effetti deleteri sulla spermatogenesi. Molti principi attivi e solventi contenuti, ad esempio, nei preparati antiparassitari di uso comune sono, in base ad evidenze sperimentali, ritenuti probabili agenti nocivi per il sistema riproduttivo umano. Le informazioni sperimentali raccolte sull'animale sono tuttavia difficili da applicare all'uomo, per le note differenze tra specie, nell'assorbimento e nel metabolismo delle sostanze tossiche. L'uomo ha una spermatogenesi meno efficiente rispetto agli altri mammiferi utilizzati come modelli sperimentali, con una produzione spermatica giornaliera pari al 20-40% per grammo di testicolo, rispetto a quello delle altre specie studiate e quindi può risultare particolarmente sensibile ad alcuni di questi agenti ipospermatogenetici. Per alcune di queste sostanze esiste una chiara e ben documentata evidenza di effetti negativi sul sistema riproduttivo maschile. Tra gli esempi di infertilità indotta da esposizioni lavorative possiamo citare il di-bromocloropropano (DBCP) e il clordecone. L'esposizione prolungata dei lavoratori durante la produzione o l'applicazione del prodotto è stata associata a danno severo della spermatogenesi, e il recupero al cessare dell'esposizione non è stato osservato in tutti i casi (Whorton 1988). Altro esempio è l'esposizione occupazionale agli "eteri del glicole", come l'"etilene glicol mono metil etere". Questi sono composti altamente volatili utilizzati come solventi in diversi processi industriali. Numerose evidenze ottenute in laboratorio su animali da esperimento dimostrano effetti negativi sulla spermatogenesi.

Sulla scia dell'esperienza con il DPCB, la ricerca si è concentrata nell'identificare il rischio occupazionale associato all'esposizione ad altri pesticidi e su come questi potrebbero interferire sulla spermatogenesi o sulla fertilità del lavoratore esposto. Tuttavia, nella maggior parte di questi studi i soggetti erano esposti a più sostanze, piuttosto che a singoli pesticidi, rendendo l'interpretazione dei dati meno attendibile.

Uno dei più noti insetticidi, il DDT, è una delle sostanze la cui influenza è ben nota. Esso agirebbe mimando l'azione degli estrogeni e quindi inducendo una "femminilizzazione" nello sviluppo del feto di sesso maschile. Inoltre, il DDE, che rappresenta il principale prodotto di degradazione del DDT esplica una potente inibizione degli androgeni legandosi ai loro recettori a livello delle cellule bersaglio. Anche se l'impiego del DDT è stato bloccato in Europa e negli USA da circa vent'anni, e non rappresenta più un rischio occupazionale, esso rimane un inquinante di notevole rilevanza perchè persiste per decenni nell'ambiente e si accumula nella catena alimentare. A causa dell'accumulo del DDT, e più probabilmente del DDE, milioni di persone, ancora oggi, in tutto il mondo presentano quantità sostanziali di tali prodotti nel tessuto adiposo. Inoltre, il DDT è tuttora impiegato in vari Paesi, quali il Messico ed il Brasile, tanto da indurre l'OMS a considerare il suo impiego come una grave minaccia alla salute ed a sconsigliarne la produzione, l'esportazione e ovviamente l'uso.

I policlorobifenili, noti spesso con la sigla PCB, sono una classe di composti organici considerati inquinanti persistenti, a causa della stabilità della loro molecola. Le miscele di PCB sono state usate in un'ampia gamma di applicazioni: oli (askarel) utilizzati nella produzione di circuiti e condensatori, lubrificanti, oli da taglio, additivi in vernici, pesticidi, carte copiative, adesivi, sigillanti, ritardanti di fiamma e fissanti per microscopia. Il loro ampio uso commerciale nasceva principalmente dalla loro elevata stabilità chimica. La loro stabilità è tuttavia anche responsabile della loro persistenza nell'ambiente. I PCB ed i loro metaboliti causano un incremento dei radicali liberi dell'ossigeno. I ricercatori ipotizzano che basse dosi di PCB causino alterazione della spermatogenesi attraverso l'espressione del gene p53 che porta all'arresto del ciclo cellulare, mentre l'esposizione ad elevate dosi di PCB comporta l'apoptosi delle cellule germinali attraverso l'attivazione della cascata delle caspasi.

La temperatura è considerata, specie in campo di medicina del lavoro, come un potenziale tossico ambientale in grado di indurre patologie di vari organi ed apparati (S.N.C., organi di senso, cute,

apparato respiratorio). In campo riproduttivo esistono alcune chiare dimostrazioni di causa-effetto nell'animale da esperimento in cui è stato dimostrato un danno spermatogenetico e nemaspermico termicamente indotto (Thonneau 1998).

Nell'uomo vi è un ampio dibattito riguardante l'effetto delle variazioni termiche sulla spermatogenesi con particolare riferimento al deterioramento della qualità dei parametri seminali.

In uno studio epidemiologico è stata analizzata una popolazione di operai dell'industria della ceramica. Tali soggetti per la loro attività sono sottoposti a temperature di base di poco inferiori a 40°C con punte di 80°C durante le fasi di immissione ed estrazione della ceramica dai forni. I soggetti ed un gruppo di controllo sono stati studiati per la variabile epidemiologica "tempo per la gravidanza" e per le caratteristiche seminali.

Il parametro "tempo per la gravidanza" si è dimostrato una variabile fortemente correlata, in senso negativo, con l'esposizione alla temperatura. Fra i parametri seminali, la velocità nemaspermica sembra essere quella più correlata, in senso negativo, con l'esposizione termica. Questi dati sembrano confermare che un'esposizione cronica a temperature elevate è in grado di incidere negativamente sulla fertilità.

I residenti in aree urbane e particolarmente, i guidatori di taxi e di autobus, si sono dimostrati delle categorie con un forte rischio di dispermia. Le noxe causali potrebbero essere il calore sviluppato dalla postura e dagli indumenti, le vibrazioni trasmesse dall'automezzo, le sostanze tossiche ispirate nel traffico, ed infine, i fattori psico-neuro-endocrini legati allo stress.

Negli ultimi anni sono stati segnalati effetti tossici derivanti dall'influenza dell'esposizione a campi elettromagnetici a seguito dell'ampia diffusione di computer e terminali video. È opinione comune, a questo proposito, che più che le radiazioni ionizzanti o elettromagnetiche gli effetti negativi sull'apparato riproduttivo siano imputabili a fattori ergonomici e di stress associati all'impiego di tali sistemi. Tuttavia recenti osservazioni hanno dimostrato che i campi elettromagnetici deboli sono in grado di interagire con vari sistemi biologici, riaprendo così il dibattito sull'argomento.

Un altro fattore di rischio sulla fertilità è rappresentato dalle radiazioni. Le radiazioni ionizzanti possono danneggiare le molecole del DNA, alterare o distruggere i geni ed alterare la forma ed il numero dei cromosomi, con conseguente sterilità, infertilità, aumento dell'abortività e delle malformazioni fetali. La quantità di radiazioni in grado di produrre tali danni è, come tutti gli effetti tossici, dose-dipendente anche se, ad oggi non vi sono dati sicuri su quale sia la soglia in grado di produrre effetti tossici.

Negli anni seguenti l'incidente al reattore nucleare di Chernobyl, si è approfondito il ruolo dei radionuclidi artificiali nell'inquinamento ambientale. Alcune delle sostanze a lunga vita che si accumulano nella catena alimentare, raggiungono il corpo umano mediante il cibo e si depositano in vari organi a seconda delle loro proprietà. L'esposizione alle radiazioni di cellule ed organi, dovuta a tali nucleotidi incorporati è probabilmente bassa e se comparata alla radioattività naturale, forse inconsistente. Nonostante tali incertezze sarebbe buona norma evitare l'esposizione prolungata a radionuclidi artificiali. In uno studio pubblicato subito dopo Chernobyl, è stata dimostrata la presenza di Cesio134 (emivita 2-5 anni) e di Cesio137 (emivita 28 anni) nel fluido follicolare e nel plasma seminale di coppie sottoposte alla fecondazione assistita anche se non sono state trovate correlazioni tra i successi alla FIVET e le concentrazioni dei radionuclidi. Va comunque notato che in uno studio eseguito negli Stati Uniti è stata dimostrata la presenza di Cesio, in alcuni casi a concentrazioni maggiori di quelle trovate in Europa, in un gruppo di pazienti americani. Tale reperto non si può spiegare con l'incidente di Chernobyl e potrebbe essere indicativo di un'esposizione cronica ai radionuclidi, probabile conseguenza di esperimenti nucleari.

Bibliografia

- Grier J.W.: Ban of DDT and subsequent recovery of reproduction in bald eagles. *Science* 1982, 218:1232-1234
- Delgado J.M., Leal J., Montegusi J.L., Gracia M.G.: Embriological changes induced by weak, extremely low frequency electromagnetic fields. *J. Anat.* 1982, 134:531-533.
- MacKay C.J.: The alleged reproductive hazards of VDUs. *Work Stress* 1987, 1:5-13.
- Krenn C.G., Herczeg K., Albrecht A., Koppensteiner E., Mikoleit B., Rahmani A., Stranzinger J., Weixelberger A., Wieser S., Unfried E., Feichtinger W.: Radioaktives Cesium 137 und Cesium 134 in der Follikel und Samenflüssigkeit. *Geburstshilfe Frauenheilkd* 1990, 50:394-396.
- Barad D., Feinman M., Cohen B., Bartfai G., Unfried E., Feichtinger W.: Radioactive cesium in follicular fluid and reproductive performance. 37th Annual Meeting of the Society for Gynecological Investigation, St Louis, Missouri, Abstr. 220, 1990.
- Figà-Talamanca I., Dell'Orco V., Pupi A., Dondero F., Gandini L., Lenzi A., Lombardo F., Scavalli P., Mancini G. Fertility and semen quality of workers exposed to high temperatures in the ceramics industry. *Reprod. Toxicol.* 1992; 6, 517-523.

AGING MASCHILE: QUALE RUOLO NELLA SPERMATOGENESI E NELLE TECNICHE DI PROCREAZIONE MEDICAMENTE ASSISTITA

Aging e spermatogenesi

Negli ultimi anni, fattori demografici e socio-economici hanno modificato il comportamento riproduttivo della coppia determinando una ricerca più tardiva della prima gravidanza che non viene più considerata come obiettivo prioritario bensì secondario al raggiungimento di altri traguardi socio-economici, portando a inevitabili conseguenze negative sulla fertilità e sulla natalità nei paesi occidentali. Il progresso biomedico, in associazione ad un miglioramento della qualità della vita, ha prolungato il tempo medio di vita, con il conseguente aumento della popolazione anziana e delle relative problematiche fisiopatologiche connesse alla terza età e alle varie fasi dell'invecchiamento. In questo quadro di globale invecchiamento della popolazione ci troviamo a fronteggiare la richiesta di prole da parte di una popolazione maschile sempre più anziana. Nell'uomo si osserva un graduale declino della capacità fecondante a partire da un'età tra i 55 e i 65 anni, sebbene non si possa parlare di una situazione del tutto analoga a quella della donna, nella quale la menopausa rappresenta una linea di demarcazione temporale tra il periodo della fertilità e quello di una maturità sessuale priva di finalità riproduttive. La gametogenesi maschile a differenza di quella femminile è un fenomeno continuo fino alla tarda età e consente, in teoria, di ottenere una gravidanza anche in età molto avanzata anche se, a partire dalla 6° decade di vita, si possano verificare importanti modificazioni delle caratteristiche seminali, dell'assetto ormonale e della struttura isto-citologica testicolare. La funzione gonadica nel maschio è inserita in un complesso meccanismo di controllo neuro-endocrino-metabolico. Iniziando dal livello neuro-psichico e scendendo fino alle gonadi, i principali neurotrasmettitori chiamati in causa nei meccanismi di collegamento interneuronale sono la noradrenalina (attivatore), la dopamina e serotonina (inibitori). Inoltre a livello delle cellule ipotalamiche viene secreto il decapeptide GnRH che regola sia la sintesi che il rilascio pulsatile delle gonadotropine ipofisarie LH e FSH. A queste glicoproteine compete il controllo trofico e funzionale delle gonadi, sia per quanto riguarda la parte germinativa (spermatozoi) sia per quella endocrina (testosterone e in parte anche nel maschio, estrogeni). La componente endocrina testicolare è influenzata anche dal metabolismo periferico. Il trasporto del testosterone è affidato ad una proteina di sintesi epatica, la sex hormone binding globulin (SHBG). L'interazione con il recettore nucleare e la sequenza degli eventi post-recettoriali sono simili a quelli di altri steroidi. A livello periferico, infine, l'effetto biologico di tale ormone è condizionato anche dall'attività enzimatica, che porta da un lato alla trasformazione del testosterone in deidrotestosterone (DHT) e dall'altro alla sua aromatizzazione ad estrogeno [\(Snyder,2010\)](#). L'invecchiamento coinvolge ciascuno degli eventi sopra riportati, per cui l'involutione, a cui la gonade maschile va incontro col passare degli anni, è certamente un fenomeno multifattoriale. Nei

soggetti anziani viene alterato il sofisticato equilibrio neuroendocrino che regola l'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi. Per quanto riguarda l'unità ipotalamoipofisaria, a partire dalla sesta decade di vita, si assiste ad un progressivo aumento dei livelli plasmatici di FSH e LH. Vi è, peraltro, un certo numero di pazienti anziani che non mostra tale aumento, soprattutto per quanto riguarda LH, ciò potrebbe suggerire una sensibilità variabile dell'unità ipotalamo-ipofisaria ai diminuiti livelli circolanti di testosterone biodisponibile dell'anziano (Gooren, 2010). Inoltre, l'ipofisi evidenzia una diminuita capacità secretiva gonadotropinica in risposta allo stimolo con GnRH con picco nettamente ritardato a cui si aggiungono alterazione di frequenza, ampiezza e durata dei "pulse" secretivi in condizioni basali (Castro-Magana et al. 1993, Davidson, 1990). A livello gonadico, numerosi studi hanno dimostrato una diminuzione dei livelli di testosterone plasmatico circolante già a partire dalla fine del 50° anno di vita. In particolare in gruppi di soggetti anziani (età media 70 anni) sottoposti a prelievi seriali per 24 ore, si è appunto evidenziata una riduzione dei livelli di testosterone non legato alla SHBG ed una perdita del ritmo circadiano, mentre la quantità totale di ormone può essere normale (Vermeulen e Kaufman, 1995). Inoltre è stata dimostrata una riduzione della perfusione testicolare all'aumentare dell'età (Suoranta, 1971) con lesioni arteriosclerotiche delle arteriose testicolari simili a quelle osservate nei grossi vasi (Sasano e Ichijo, 1969). Schematizzando i dati sopra riportati, sotto il profilo funzionale, le prove più evidenti del danno gonadico sono la riduzione della secrezione di testosterone, la riduzione dei livelli ematici basali del DHT, la diminuita risposta allo stimolo con HCG mentre, contemporaneamente, i livelli di LH e soprattutto di FSH appaiono in progressivo incremento età ed individuo-correlato e, inoltre, un significativo aumento, anch'esso età-correlato, della proteina di trasporto SHBG, con inevitabile interferenza negativa sulla quota di testosterone libero. Infine va aggiunto che il trasferimento del testosterone, con la mediazione della Androgen Binding Protein (ABP), dalla cellula di Leydig al vicino settore germinativo, risulta diminuito sia per la ridotta secrezione testosteronica sia per una diminuita sintesi della proteina di trasporto ABP, a livello della cellula del Sertoli. I primi lavori relativi all'effetto dell'invecchiamento sulla fertilità maschile risalgono agli anni 80 ed hanno dimostrato nel plasma dei soggetti anziani una diminuzione dei livelli di testosterone sia totale che libero ed un aumento dei livelli di SHBG e di FSH ed LH, rispetto al plasma di soggetti più giovani. Alterazioni della spermatogenesi si associano spesso ad alterazioni della funzione delle cellule di Leydig come dimostrato da Andersson et al. (2004) che hanno riscontrato nel 15% di uomini con diminuita spermatogenesi anche bassi valori di testosteronemia o più alti livelli di LH. Altri Autori hanno evidenziato un ridotto numero di cellule germinali in corso di differenziazione ed una riduzione numerica delle cellule di Leydig e delle cellule del Sertoli in campioni bioptici testicolari di uomini di età superiore ai 70 anni. Tale dato è stato confermato dall'analisi dei parametri seminali dei soggetti in grado di effettuare lo spermioγραμμα, da cui risultava una concentrazione nemaspermica fortemente variabile, una riduzione della motilità e del volume dell'eiaculato rispetto a quanto evidenziato in soggetti più giovani. Sempre negli anni '80 è stata valutata la linea spermatogenetica per grammo di tessuto, su testicoli asportati post-mortem di soggetti anziani deceduti improvvisamente senza patologie endocrine. Dai dati è emersa una progressiva riduzione numerica di tutte le cellule germinative, in parallelo con la riduzione numerica delle cellule di Leydig e con l'aumento del FSH plasmatico. Tale dato è stato ulteriormente confermato da studi successivi che hanno evidenziato una marcata degenerazione cellulare a livello della seconda divisione meiotica, in relazione alla diminuzione della produzione gametica, in soggetti di età avanzata. Le principali modificazioni che si verificano a livello testicolare, in funzione dell'età, sono rappresentate dall'ispessimento della tunica albuginea e dall'aumento della percentuale del peso delle tuniche rispetto al peso totale testicolare, con conseguente riduzione del peso parenchimale testicolare. A livello del compartimento spermatogenetico si riscontra una diminuzione del volume dei tubuli e dell'epitelio seminifero, del numero delle cellule del Sertoli e degli spermatici, associato all'ispessimento della membrana basale, con presenza di fibrosi peritubulare. Vi è inoltre una riduzione della massa testicolare totale per il ridotto volume dei tubuli seminiferi. La riduzione degli spermatici si traduce in una riduzione della produzione giornaliera di spermatozoi che, in media, si può calcolare di circa il 50% rispetto

ai soggetti giovani di controllo. D'altra parte il declino della spermatogenesi è un fenomeno graduale e progressivo e funzione dello stato di salute generale del soggetto, che presenta una notevole variabilità individuale, per cui alcuni soggetti anziani possono avere una produzione testicolare di spermatozoi uguale a quella di soggetti giovani. Peraltro è importante sottolineare come l'elevata concentrazione degli spermatozoi riscontrata, in alcuni studi, negli anziani può essere in parte dovuta al prolungato periodo di astinenza precedente alla raccolta del liquido seminale che risulta essere maggiore di 10 giorni nella maggior parte dei soggetti anziani. È difficile valutare se i parametri nemaspermici si modificano all'aumentare dell'età in quanto i dati in letteratura sono contraddittori e vi è un'alta variabilità intra-individuale nello spermioγραμμα. In uno studio pubblicato dal gruppo di Levitas (2005) su 9489 liquidi seminali, la durata dell'astinenza si è dimostrata correlata positivamente al volume seminale. Peraltro, in uno studio successivo, sempre lo stesso gruppo (Levitas et al. 2007), ha mostrato una progressiva riduzione del volume nonostante l'aumento del periodo di astinenza sessuale. Per tale motivo gli autori concludono che la riduzione del volume può essere attribuita principalmente all'invecchiamento, come anche dimostrato da altri studi basati su analisi di regressione multipla, aggiustate per la durata dell'astinenza sessuale (AndoIz et al., 1999; Jung et al., 2002). Inoltre, l'aumento della durata del periodo di astinenza è responsabile del progressivo aumento con l'età della concentrazione nemaspermica.

Per quanto riguarda la capacità fecondante Dondero et al. nel 1985 hanno studiato in maniera estesa i parametri seminali di soggetti appartenenti a varie fasce di età. I risultati dello studio hanno evidenziato una progressiva riduzione della concentrazione nemaspermica dopo i 40 anni, più significativa dopo i 60 anni e un decremento graduale e costante della motilità degli spermatozoi anch'esso più drastico ed evidente dopo i 60 anni con un parallelo deterioramento della morfologia nemaspermica. In uno studio comparativo della qualità seminale in uomini anziani (con età ≥ 50 anni) e più giovani (età compresa fra 21 e 25 anni) Jung et al. nel 2002 hanno dimostrato che la motilità rettilinea, la percentuale di forme normali ed il volume seminale sono significativamente più bassi nel gruppo degli anziani rispetto ai soggetti più giovani. La concentrazione nemaspermica risulta non alterata dal progredire dell'età. Infine, un dato molto interessante riguarda il livello di testosterone sierico che risulta significativamente più basso nel gruppo dei soggetti più anziani, confermando che l'ipogonadismo di questi soggetti è il responsabile delle alterazioni seminali. Tali dati sono stati confermati da Eskenazi et al. nel 2003 in un lavoro che include un numero di soggetti anziani relativamente più alto rispetto alla maggior parte degli studi precedenti. Sono stati ipotizzati vari meccanismi per spiegare le alterazioni seminali con l'età. Per quanto riguarda la diminuzione del volume dell'eiaculato si ritiene che sia dovuta ad una progressiva atrofia delle vescicole seminali che contribuiscono a formare la maggior parte del volume seminale stesso. Questo dato insieme alla progressiva riduzione dei valori del fruttosio può essere interpretato come un'alterazione della funzione delle ghiandole accessorie da alterata secrezione di testosterone. La astenozoospermia, cioè la riduzione della motilità nemaspermica, potrebbe dipendere dalla progressiva atrofia della muscolatura liscia delle vescicole seminali con riduzione della componente proteica e acquosa e conseguente alterazione della motilità. Sempre a proposito della motilità sono state ipotizzate alterazioni strutturali dell'epididimo con modificazione del meccanismo di maturazione nemaspermica (Hamilton e Naftolin, 1981). Infatti l'integrità della struttura epididimaria è indispensabile perché durante il transito nell'epididimo gli spermatozoi completano la loro maturazione acquisendo motilità e capacità fecondante. La morfologia nemaspermica è un buon indicatore dello status dell'epitelio germinale. Le modificazioni degenerative dell'epitelio germinale nel paziente anziano potrebbero determinare alterazioni dell'assetto morfologico dello spermatozoo. È controverso, invece, se l'invecchiamento si associ ad una diminuzione della concentrazione nemaspermica anche se è plausibile che tale fenomeno possa accadere. Con l'avanzare dell'età, infatti, vi è un restringimento ed una sclerosi del lume dei tubuli, una riduzione dell'attività spermatogenetica, una degenerazione delle cellule germinali ed una diminuzione quantitativa e qualitativa delle cellule di Leydig. Oltre al fisiologico processo di invecchiamento è necessario considerare che il paziente anziano è più soggetto a patologie croniche di tipo

internistico e di conseguenza a terapie di lunga durata che possono ulteriormente alterare la qualità del seme in genere interferendo con la produzione o l'attività biologica degli androgeni e sui meccanismi di replicazione cellulare. Per citare solo alcuni esempi, l'intolleranza glucidica è presente nel 25% degli ottantenni, il diabete mellito nel 6-9% della popolazione tra i 65 e gli 84 anni, l'ipertensione arteriosa è presente nel 40% dei soggetti tra i 55 e i 65 anni e in età avanzata aumentano significativamente le patologie coronariche, polmonari e renali; tutte queste patologie nonché le terapie ad esse correlate sono in grado di deteriorare la qualità seminale. Un altro fattore da non trascurare è il periodo di astinenza di 3-5 giorni da rispettare per la corretta esecuzione dell'analisi del liquido seminale. Nel soggetto anziano tale periodo è difficilmente rispettato e può risultare più lungo, alterando la valutazione di alcuni parametri dipendenti da questa variabile, quali la concentrazione e la motilità degli spermatozoi. Infine bisogna considerare le oggettive difficoltà di raccolta del campione per masturbazione legate alla maggiore incidenza di deficit erettile e disturbi eiaculatori dell'anziano. Possiamo pertanto concludere che con il trascorrere degli anni, in misura più rilevante dopo i 70 anni di età, nell'uomo si determinano chiare modificazioni della capacità riproduttiva e la sua fertilità, pur conservata, diminuisce. Da un punto di vista ormonale questo porta, come detto, ad un aumento progressivo dei livelli plasmatici della gonadotropina FSH, interpretabile come fenomeno compensatorio ipofisario indotto dalla riduzione dei livelli circolanti di inibina, dimostrata nell'anziano, ed ovviamente correlata alla ridotta attività tubulare (Sekhavat e Moein, 2010; Winkle et al., 2009). Pertanto, si assiste ad una progressiva minore efficienza del testicolo nelle sue due principali funzioni, secrezione del testosterone e produzione di spermatozoi, con possibile aumento nell'eiaculato di forme immobili o alterate nella loro morfologia ed incapaci, quindi, di fecondare.

Per quanto riguarda il comparto nucleare del gamete maschile, non è ancora ben definito l'effetto dell'invecchiamento sull'integrità del DNA nemaspermico. Infatti, in letteratura sono presenti numerosi lavori che riportano dati contrastanti, svolti su casistiche estremamente variabili. Nel 1997 Sun et al., misurando la frammentazione del DNA nemaspermico mediante metodologia Tunel in un campione di 291 pazienti che afferivano ad un programma di fecondazione in vitro, non hanno riscontrato una relazione tra il danno al DNA e l'invecchiamento.

Nel 1998 Spanò et al., utilizzando l'SCSA, metodica che misura la resistenza del DNA spermatico alla denaturazione acida, hanno studiato una popolazione di 277 uomini danesi sani (range di età 18-55), dimostrando che il COMP aT, che rappresenta la media delle cellule al di fuori della popolazione cellulare resistente, quasi si raddoppia passando dai 25 ai 55 anni.

Vagnini et al. (2007) hanno studiato una popolazione di 508 uomini di coppie in trattamento per infertilità, divisi in tre gruppi di età (≤ 35 aa; 36-39 aa; ≥ 40 aa) mediante metodologia Tunel. I loro risultati dimostrano che il danno del DNA aumenta significativamente con l'età dei soggetti anche se la percentuale del DFI (DNA Fragmentation Index) si incrementa solo dal 15,7% al 18,3%. In un lavoro condotto su 320 pazienti sottoposti a studio per la fertilità e a valutazione della frammentazione del DNA mediante PI, Winkle et al. (2009) non rilevano una correlazione significativa tra età del maschio e parametri seminali convenzionali e frammentazione del DNA. Peraltro, tale studio, pur prendendo in considerazione un'ampia casistica, considera come gruppo di anziani pazienti con una età media di 42.9 anni. Colin et al. (2010) hanno studiato la frammentazione del DNA, mediante Tunel ed Annessina V, in 25 uomini, fertili, divisi per decenni (da 20 a 70 anni) in 5 gruppi di 5 soggetti. I risultati del loro studio dimostrano che l'invecchiamento si associa ad una più elevata espressione dei markers apoptotici precoci, quali la traslocazione di membrana della fosfatidilserina, e a frammentazione, segno più tardivo del processo apoptotico. Anche in questo lavoro, peraltro ben condotto e ben strutturato, l'esiguità della casistica rende i risultati sia dal punto di vista statistico che biologico poco significativi.

La disamina della letteratura dimostra come sia complessa la realizzazione di uno studio che prenda in considerazione un numero significativo di soggetti realmente anziani, cioè in una fascia di età al di sopra dei 60 anni. Inoltre un ulteriore fattore confondente è rappresentato dalle scarse notizie relative a patologie internistiche ed andrologiche, che possono essere dei fattori causali di alterazione delle caratteristiche seminali oltre al fisiologico invecchiamento tissutale.

Questo coincide con l'esperienza andrologica clinica che dimostra come la fertilità maschile è tanto più recuperabile quanto prima (in termini di età del paziente) si interviene sulla patologia andrologica di base. Infatti, solo con la prevenzione si potrebbe ottenere il risultato di evitare che la noxa patogena trasformi con gli anni un danno di funzione gametica reversibile in un danno anatomico gonadico irreversibile.

Aging e Outcome Riproduttivo nella Procreazione Medicalmente Assistita

Nella società attuale lo sviluppo economico e il crescente desiderio di affermazione professionale da parte delle donne porta sempre più frequentemente a coronare il desiderio di maternità e paternità in età sempre più avanzata. E' oramai ben noto che le donne hanno un proprio corredo ovocitario che si depaupera con l'avanzare dell'età, per cui si assiste sempre più frequentemente a fronteggiare l'enorme richiesta di genitorialità da parte delle coppie che si sottopongono a tecniche di fecondazione assistita. Innumerevoli studi hanno evidenziato il declino ovocitario nelle donne con un'età > 35 anni associato ad una riduzione della loro fertilità (van Zonneveld et al. 2001, te Velde e Pearson 2002). Oltre a considerare l'orologio biologico per le donne è altrettanto noto, come in età avanzata, aumentino una serie di altre difficoltà, come aborti spontanei, complicazioni nella gravidanza, anomalie congenite e morte perinatale (de la Rochebrochard e Thonneau 2002). Mentre per le donne l'orologio biologico determina la fine della loro fertilità, orologi biologici degli uomini non sembrano giocare un ruolo di primo piano. La fertilità maschile può essere conservata fino a età superiore agli 80 anni anche se la paternità per uomini al di sopra di 70 anni è un fenomeno estremamente raro. Attualmente, non ci sono restrizioni legali o biologiche alla partecipazione di uomini anziani nei programmi di riproduzione assistita. L'attenzione sui fattori che influenzano il risultato delle tecniche di riproduzione assistita è principalmente legato all'influenza di fattori femminili. Infatti in letteratura esistono innumerevoli evidenze scientifiche che hanno confermato l'importanza dei fattori femminili nell'outcome riproduttivo e invece, pochi e contrastanti lavori che definiscono il ruolo effettivo giocato dal partner maschile nella sfera riproduttiva. La maggior parte degli studi sui fattori maschili hanno messo in relazione gli effetti dell'esposizione del partner maschile a sostanze tossiche (come ossido di etilene, prodotti chimici, solventi e ditiocarbammati) con il rischio di aborto spontaneo nella partner femminile (Lindbohm et al; 1991, Savitz et al; 1997). In un lavoro del 2002 de La Rochebrochard e Thonneau hanno studiato 3174 donne dimostrando un chiaro effetto negativo dell'età materna e paterna sul rischio di aborto definendo tre trends. Se la donna ha un'età compresa tra i 20-29 anni il rischio di aborto non è significativamente alto indipendentemente dall'età dell'uomo, se la donna ha tra i 30-34 anni il rischio di aborto è più alto se l'uomo ha un'età ≥ 40 anni. Se la donna ha un'età ≥ 35 anni il rischio di aborto aumenta a prescindere dall'età maschile. Gli autori concludono che il rischio di aborto aumenta all'aumentare dell'età di entrambi i partners.

Ulteriori studi hanno considerato gli effetti dell'età paterna sulla possibilità di indurre nascite pretermine anche se i risultati non sono stati ben confermati, (Aitken et al. 1995, Anton-Culver et al. 1996, Bondy et al 1994, Douglas et al. 1999). Tuttavia è stata ampiamente studiata l'associazione tra l'età paterna avanzata e i disturbi autosomici- dominanti e le mutazioni genetiche (Floderus et al. 1990). Infatti, diverse evidenze scientifiche indicano che i fattori genetici giocano un ruolo importante nel timing riproduttivo (Garber et al. 1997). Come è noto la placenta è in gran parte di derivazione paterna, pertanto se il timing riproduttivo è guidato da geni placentari o fetali e se le mutazioni in questi geni avvengono più comunemente nei gameti di uomini anziani allora l'età paterna avanzata potrebbe giocare un ruolo determinante. Infatti Zhu et al. (2005), per valutare se esistesse un'associazione tra l'età paterna e le malformazioni congenite nella prole, hanno condotto uno studio di coorte sulla popolazione danese, analizzando tra il 1980 e il 1996, 71.937 coppie ed ottenendo dal registro nazionale le diagnosi di eventuali malformazioni nei primogeniti delle coppie. Gli autori concludono che esiste un rischio 4,5 volte maggiore di avere un bambino con trisomia 21 negli uomini con età > 45 anni rispetto a uomini con età < 30 anni (Zhu et al., 2005).

Inoltre, gli autori suggeriscono che questi risultati potrebbero essere dovuti a fattori biologici e ambientali che causano mutazioni nei gameti maschili.

In letteratura è ancora esistente la controversia nello stabilire se esista un'associazione tra età paterna avanzata e outcome riproduttivo. La difficoltà degli autori è rappresentata dal fatto che, poiché il processo di fecondazione coinvolge entrambi i partners, è difficile eliminare o controllare l'influenza dell'età della donna sul potenziale riproduttivo. Per ridurre gli effetti negativi che l'età della donna ha sul potenziale riproduttivo, Fratterelli et al. (2008) e Luna et al. (2009) hanno condotto studi per valutare gli effetti dell'età paterna sullo sviluppo embrionale e sull'outcome riproduttivo utilizzando ovociti di donatrici. Gli studiosi concludono che l'avanzata età paterna influenza l'outcome della gravidanza e la percentuale di formazione delle blastocisti. Dai loro dati si evince un aumento significativo della percentuale di aborto, una diminuzione sia nella percentuale delle nascite che nella percentuale di formazione di blastocisti negli uomini con un'età > 50 anni. Di contro, gli autori non trovano una correlazione statisticamente significativa tra l'età paterna e la capacità dello spermatozoo di penetrare l'ovocita e la formazione dei primi embrioni. Pertanto secondo gli autori queste prime fasi del processo fecondativo non sembrano essere alterate dall'età dello spermatozoo (Fratterelli et al, nel 2008). Anche Luna et al, nel 2009 hanno riscontrato una diminuzione statisticamente significativa nella percentuale di impianto rilevata solo nelle coppie in cui il partner maschile aveva un'età > 60 anni.

In un altro lavoro di Ferreira et al. (2010) sono stati valutati gli effetti dell'età paterna sull'outcome riproduttivo in 1024 coppie che si sono sottoposte a cicli di fecondazione assistita (ICSI), analizzando sia pazienti con fenotipo seminale di normozoospermia che di oligozoospermia. Dai loro dati si evince che l'età paterna influenza negativamente la percentuale di impianto e di gravidanza nelle coppie in cui la concentrazione di spermatozoi/ML risulta < di 20×10^6 . Gli autori hanno dimostrato che, in pazienti oligozoospermici, la possibilità di ottenere una gravidanza diminuiva del 5% ad ogni aumento di un anno di età. In una review del 2011 che includeva 10 lavori non si è dimostrata la correlazione tra avanzata età paterna e percentuale di fecondazione, di impianto, di gravidanza, di aborto e di nascite. Inoltre non è stato trovato nessun effetto negativo tra età paterna e qualità embrionaria e stadi di clivaggio (giorni 2-3). Tuttavia è emersa una diminuzione statisticamente significativa nella formazione di blastocisti all'aumentare dell'età paterna. Sharma et al. (2015) in una recente review hanno dimostrato che l'età paterna non influenza significativamente la percentuale di aborto e la qualità embrionale. Tuttavia, nel gruppo di donne con un'età compresa tra i 30 e i 34 anni la percentuale di impianto diminuiva all'aumentare dell'età paterna e la percentuale di gravidanze era significativamente più alta nel gruppo di uomini con un'età < di 30 anni e nel gruppo di uomini con un'età compresa tra i 30 e i 32 anni se paragonati al gruppo di uomini con un'età compresa tra i 36 e i 38 e tra i 39 e i 41 anni. In un lavoro recente, Marieke et al. (2016) hanno condotto uno studio retrospettivo su 7051 cicli IVF/ICSI da Gennaio 2001 a Giugno 2013. Lo scopo degli autori era quello di valutare l'eventuale influenza dell'età paterna, sulla qualità embrionale in modo da effettuare il transfer in terza giornata, sul tasso di gravidanza biochimica, sul tasso di aborto e sul tasso di gravidanza in corso a 8 settimane. Dai loro dati non si evince una differenza statisticamente significativa tra età paterna e la probabilità di ottenere una gravidanza in corso sia nel gruppo di uomini con età compresa fra 35 e 44 anni sia nel gruppo di uomini con età ≥ 45 anni, rispetto al gruppo di controllo costituito da uomini con età < 35 anni. Gli autori inoltre non hanno riscontrato differenze statisticamente significative tra età paterna e qualità embrionale, gravidanza biochimica e aborto spontaneo. Gli autori concludono che l'età paterna non influenza i tassi di gravidanza nei primi cicli IVF / ICSI. Alla luce dei risultati presenti in letteratura, appare chiaro ed evidente che l'influenza dell'età paterna sull'outcome riproduttivo non ha prodotto risultati univoci. Pertanto sarebbe necessario effettuare altri studi per comprendere appieno se l'avanzare dell'età paterna possa giocare un ruolo determinante nella probabilità di ottenere gravidanze così come già evidenziato per l'età femminile.

BIBLIOGRAFIA

- Aitken J, Bain C, Ward M, Siskind V, MacLennan R. How accurate is self-reported family history of colorectal cancer? *Am J Epidemiol.* 1995 May 1;141(9):863-71
- Andersson AM, Jorgensen N, Frydelund-Larsen L, Rajpert-De Meyts E, Skakkebaek NE. Impaired Leydig cell function in infertile men: a study of 357 idiopathic infertile men and 318 proven fertile controls. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89: 3161-7.
- Andolz P¹, Bielsa MA, Vila J. Evolution of semen quality in North-eastern Spain: a study in 22,759 infertile men over a 36 year period. *Hum Reprod.* 1999 Mar;14(3):731-5.
- Anton-Culver H¹, Kurosaki T, Taylor TH, Gildea M, Brunner D, Bringman D. Validation of family history of breast cancer and identification of the BRCA1 and other syndromes using a population-based cancer registry. *Genet Epidemiol.* 1996;13(2):193-205.
- Castro-Magana M, Angulo M, Uy J. Male hypogonadism with gynecomastia caused by late-onset deficiency of testicular 17-ketosteroid reductase. *N Engl J Med.* 1993 May 6;328(18):1297-301.
- Colin A, Barroso G, Gómez-López N, Duran EH, Oehninger S. The effect of age on the expression of apoptosis biomarkers in human spermatozoa. *Fertil Steril.* 2010 Dec;94(7):2609-14. doi: 10.1016/j.fertnstert.2010.04.043. Epub 2010 Jun 12
- Dain L¹, Auslander R, Dirnfeld M. The effect of paternal age on assisted reproduction outcome. *Fertil Steril.* 2011 Jan;95(1):1-8. doi: 10.1016/j.fertnstert.2010.08.029. Epub 2010 Oct 8.
- Davidson JM. Sexuality and aging. In *Principles of Geriatric Medicine and Gerontology* 1990, pag.108
- de la Rochebrochard E¹, Thonneau P. Paternal age and maternal age are risk factors for miscarriage; results of a multicentre European study. *Hum Reprod.* 2002 Jun;17(6):1649-56.
- Dondero F, Mazzilli F, Giovenco P, Lenzi A, Cesararo M. Fertility in elderly men. *J. Endocrinol. Invest.* 1985; 8 (suppl.2): 87.
- Douglas FS¹, O'Dair LC, Robinson M, Evans DG, Lynch SA. The accuracy of diagnoses as reported in families with cancer: a retrospective study. *J Med Genet.* 1999 Apr;36(4):309-12.
- Eskenazi B, Wyrobek AJ, Slotter E, et al. The association of age and semen quality in healthy men. *Hum Reprod.* 2003; 18: 447-54.
- Ferreira RC¹, Braga DP, Bonetti TC, Pasqualotto FF, Iaconelli A Jr, Borges E Jr. Negative influence of paternal age on clinical intracytoplasmic sperm injection cycle outcomes in oligozoospermic patients. *Fertil Steril.* 2010 Apr;93(6):1870-4. doi: 10.1016/j.fertnstert.2008.12.043. Epub 2009 May 5.
- Floderus B¹, Barlow L, Mack TM. Recall bias in subjective reports of familial cancer. *Epidemiology.* 1990 Jul;1(4):318-21.
- Frattarelli JL¹, Miller KA, Miller BT, Elkind-Hirsch K, Scott RT Jr. Male age negatively impacts embryo development and reproductive outcome in donor oocyte assisted reproductive technology cycles. *Fertil Steril.* 2008 Jul;90(1):97-103. Epub 2007 Sep 4.
- Garber JE Validation of family history of breast cancer and identification of the BRCA1 and other syndromes using a population-based cancer registry. *J Womens Health.* 1997 Jun;6(3):349-51
- Gooren LJ. Androgens and male aging: Current evidence of safety and efficacy. *Asian J Androl.* 2010 Mar;12(2):136-51. doi: 10.1038/aja.2010.4. Epub 2010 Feb 15. Review
- Hamilton, D, Naftolin, F. *Basic Reproductive* Cambridge, UK Medicine. MIT Press.

- Jung A¹, Schuppe HC, Schill WB. Comparison of semen quality in older and younger men attending an andrology clinic. *Andrologia*. 2002 Apr;34(2):116-22.
- Levitas E¹, Lunenfeld E, Weiss N, Friger M, Har-Vardi I, Koifman A, Potashnik G. Relationship between the duration of sexual abstinence and semen quality: analysis of 9,489 semen samples. *Fertil Steril*. 2005 Jun;83(6):1680-6.
- Levitas E¹, Lunenfeld E, Weisz N, Friger M, Potashnik G. Relationship between age and semen parameters in men with normal sperm concentration: analysis of 6022 semen samples. *Andrologia*. 2007 Apr;39(2):45-50.
- Lindbohm ML¹, Hemminki K, Bonhomme MG, Anttila A, Rantala K, Heikkilä P, Rosenberg MJ. Effects of paternal occupational exposure on spontaneous abortions. *Am J Public Health*. 1991 Aug;81(8):1029-33.
- Luna M¹, Finkler E, Barritt J, Bar-Chama N, Sandler B, Copperman AB, Grunfeld L. Paternal age and assisted reproductive technology outcome in ovum recipients. *Fertil Steril*. 2009 Nov;92(5):1772-5. doi: 10.1016/j.fertnstert.2009.05.036. Epub 2009 Jun 21.
- Meijerink AM¹, Ramos L², Fleischer K², Veltman JA³, Hendriks JC⁴, Braat DD². Influence of paternal age on ongoing pregnancy rate at eight weeks' gestation in assisted reproduction. *Reprod Biomed Online*. 2016 Jan;32(1):96-103. doi: 10.1016/j.rbmo.2015.09.017. Epub 2015 Oct 22.
- Sasano N, Ichijo S. Vascular patterns of the human testis with special reference to its senile changes. *Tohoku J Exp Med*. 1969 Nov;99(3):269-80.
- Savitz DA¹, Arbuckle T, Kaczor D, Curtis KM. Male pesticide exposure and pregnancy outcome. *Am J Epidemiol*. 1997 Dec 15;146(12):1025-36.
- Sekhavat L, Moein MR. The effect of male body mass index on sperm parameters. *Aging Male* 2010 Jan 11.
- Sharma R¹, Agarwal A², Rohra VK³, Assidi M^{4,5}, Abu-Elmagd M^{6,7}, Turki RF^{8,9}. Effects of increased paternal age on sperm quality, reproductive outcome and associated epigenetic risks to offspring. *Reprod Biol Endocrinol*. 2015 Apr 19;13:35. doi: 10.1186/s12958-015-0028-x.
- Snyder PJ. Low testosterone must explain diminished physical performance in the elderly--right? *J Clin Endocrinol Metab*. 2010 Jun;95(6):2634-5. doi: 10.1210/jc.2010-0957.
- Spanò M¹, Kolstad AH, Larsen SB, Cordelli E, Leter G, Giwercman A, Bonde JP. The applicability of the flow cytometric sperm chromatin structure assay in epidemiological studies. *Asclepios. Hum Reprod*. 1998 Sep;13(9):2495-505.
- Sun JG, Jurisicova A, Casper RF. Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. *Biol Reprod*. 1997 Mar;56(3):602-7.
- Suoranta H. Changes in the small blood vessels of the adult human testis in relation to age and to some pathological conditions. *Virchows Arch A Pathol Pathol Anat*. 1971;352(2):165-81. No abstract available.
- te Velde ER¹, Pearson PL. The variability of female reproductive ageing. *Hum Reprod Update*. 2002 Mar-Apr;8(2):141-54.
- Vagnini L, Baruffi RL, Mauri AL, Petersen CG, Massaro FC, Pontes A, Oliveira JB, Franco JG Jr. The effects of male age on sperm DNA damage in an infertile population. *Reprod Biomed Online*. 2007 Nov;15(5):514-9.
- Van Zonneveld P, Scheffer GJ, Broekmans FJ, te Velde ER. Hormones and reproductive aging. *Maturitas*. 2001 Feb 28;38(1):83-91; discussion 92-4. Review.
- Vermeulen A¹, Kaufman JM. Ageing of the hypothalamo-pituitary-testicular axis in men. *Horm Res*. 1995;43(1-3):25-8.
- Zhu JL, Madsen KM, Vestergaard M, Olesen AV, Basso O, Olsen J. Paternal age and congenital malformations. *Hum Reprod*. 2005 Nov;20(11):3173-7. Epub 2005 Jul 8.
- Winkle T¹, Rosenbusch B, Gagsteiger F, Paiss T, Zoller N. The correlation between male age, sperm quality and sperm DNA fragmentation in 320 men attending a fertility center. *J*

Assist Reprod Genet. 2009 Jan;26(1):41-6. doi: 10.1007/s10815-008-9277-3. Epub 2008 Nov 22.

- Winkle T¹, Rosenbusch B, Gagsteiger F, Paiss T, Zoller N. The correlation between male age, sperm quality and sperm DNA fragmentation in 320 men attending a fertility center. J Assist Reprod Genet. 2009 Jan;26(1):41-6. doi: 10.1007/s10815-008-9277-3. Epub 2008 Nov 22.

FUMO DI TABACCO E INFERTILITA'

Epidemiologia

Il fumo di tabacco rappresenta uno dei principali problemi di sanità pubblica. Nel mondo i fumatori sono circa un miliardo. Il 40% dei bambini, il 33% dei non fumatori e il 35% delle non fumatrici è esposto al fumo passivo. Il fumo di tabacco uccide circa 6 milioni di persone ogni anno, compresi 600.000 non fumatori esposti al fumo passivo. In Italia i fumatori sono 10,9 milioni, il 20,8% della popolazione: 6,3 milioni di uomini (il 25,1%) e 4,6 milioni di donne (16,9%). Gli ex fumatori sono 6,3 milioni (il 12,1%) 4,0 milioni di uomini e 2,3 milioni di donne.

L'analisi della prevalenza del fumo di sigarette tra gli uomini e le donne di varie età mostra che la percentuale di fumatori è ancora superiore a quella delle fumatrici in tutte le fasce di età. Nella fascia di età compresa tra i 25 e 44 anni si registra la prevalenza maggiore di fumatori di entrambi i sessi (22,4% delle donne e 30,7% degli uomini).

Composizione del fumo di tabacco

Il fumo prodotto dalla combustione della sigaretta è un aerosol complesso costituito da una fase vapore e una fase particolata i cui costituenti principali sono: nicotina, idrocarburi policiclici aromatici (IPA) e le nitrosammine tabacco specifiche (NTS) che si ritrovano principalmente nella fase particolata; idrocarburi a basso peso molecolare come il benzene, il butadiene e il toluene che sono presenti principalmente nella fase vapore; acido cianidrico e l'ammoniaca che sono stati trovati in entrambe le fasi.

Meccanismi del danno

Gli studi relativi all'effetto del fumo di sigaretta sull'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi hanno prodotto risultati contrastanti. Secondo Ochedalski e collaboratori, esiste una correlazione inversamente proporzionale tra numero di sigarette consumate e livelli plasmatici di LH e FSH; in altri studi, con stratificazione dei fumatori in tre gruppi sulla base del numero di sigarette consumate, non sono state riscontrate variazioni statisticamente significative delle concentrazioni plasmatiche di gonadotropine e testosterone (Pasqualotto et al).

Il fumo di sigaretta contiene due differenti gruppi di radicali liberi: radicali a lunga emivita nella fase particolata e radicali a emivita breve, nella fase vapore.

Il principale radicale della fase particolata è costituito dal complesso chinone-idrochinone, un sistema redox molto attivo e in grado di ridurre l'ossigeno molecolare a radicale superossido e quindi a perossido di idrogeno e a radicale idrossilico. La fase vapore del fumo di sigaretta contiene invece piccoli radicali alchilici e alcossilici dotati di una reattività di gran lunga superiore ai radicali della fase particolata. Il plasma seminale sostiene e protegge gli spermatozoi dai livelli patologici dei ROS (reactive oxygen species) attraverso sostanze quali alfa-tocoferolo, enzimi come superossido dismutasi, catalasi e glutazione perossidasi e contiene fino a 10 mg/dL di acido ascorbico, concentrazione che supera per più di nove volte quella ematica. I forti fumatori di sesso maschile presentano una riduzione dal 20% al 40% dei livelli di acido ascorbico nel siero, tale riduzione della concentrazione è espressione del maggior consumo dell'acido ascorbico con lo scopo di difendere gli spermatozoi dall'azione lesiva dei ROS. Quando le sostanze anti-ossidanti non bilanciano i ROS, è possibile avere alterazioni della membrana plasmatica come conseguenza della perossidazione lipidica, ma il danno cellulare può manifestarsi anche per ossidazione delle proteine, alterazioni della funzione mitocondriale e frammentazione del DNA spermatico, determinando alterazioni quantitative e qualitative a carico degli spermatozoi.

Il processo della spermatogenesi ha un elevato fabbisogno metabolico e il testicolo è fisiologicamente vulnerabile all'ipossia. L'insufficiente apporto di ossigeno, che può essere causato

dal fumo, può influenzare negativamente la funzione testicolare, così come a livello macroangiopatico il fumo può rientrare nel determinismo della disfunzione erettile. Il fumo può anche indurre cambiamenti epigenetici, ovvero alterazioni dell'espressione genica senza modificare la sequenza di DNA, le quali possono essere trasmesse attraverso le divisioni cellulari mitotiche e meiotiche. Numerosi sono i meccanismi chiamati in causa, tra cui la metilazione del DNA, modificazioni degli istoni e rimodellamento della cromatina.

Fumo e caratteristiche seminali

I dati presenti in letteratura relativamente al ruolo dell'abitudine al fumo di tabacco nell'indurre una compromissione della fertilità maschile sono contrastanti. In parte tale discordanza è riconducibile alla preferenza di fattori confondenti, ad esempio l'alcool. È più probabile, infatti, che forti fumatori presentino in associazione uno stile di vita più lesivo per la salute andrologica in generale.

La nicotina è il principio attivo responsabile della dipendenza dal tabacco. La maggior parte della nicotina, nell'uomo, è metabolizzata a cotinina, e la cotinina è ulteriormente metabolizzata a trans-3'-idrossicotinina (3HC). La motilità totale degli spermatozoi correla negativamente con la concentrazione seminale di 3HC, mentre la motilità rettilinea degli spermatozoi è correlata negativamente con la concentrazione seminale di cotinina. L'alterazione della motilità degli spermatozoi nei fumatori è associata a diversi meccanismi fisiopatologici. L'assonema, un organo strutturale di base delle ciglia mobili e dei flagelli, è composto da microtubuli. Nei fumatori sono state descritte alterazioni sia a carico del numero sia a carico del posizionamento dei microtubuli. Queste alterazioni fumo-indotte possono modificare il movimento flagellare e, quindi, causare anomalie della motilità degli spermatozoi. La motilità può essere alterata, nel fumatore, anche per compromissione dell'attività dell'enzima creatinchinasi, che interviene nel catalizzare la reazione che porta alla produzione di fosfocreatina dalla creatina attraverso il consumo di ATP. Tale reazione consente la liberazione di energia che è essenziale per la capacità di movimento dello spermatozoo.

Cessazione dell'abitudine al tabagismo

La cessazione dell'abitudine al tabagismo sicuramente è in grado di ridurre il rischio di sviluppare disfunzione erettile, mentre per quanto riguarda gli effetti sulle caratteristiche seminali e l'integrità dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi i dati sono contrastanti.

Bibliografia

- Cigarette smoking is related to a decrease in semen volume in a population of fertile men. Pasqualotto FF, Sobreiro BP, Hallak J, Pasqualotto EB, Lucon AMBJU Int. 2006 Feb; 97(2):324-6.
- Saleh RA, Agarwal A, Sharma RK, Nelson DR, Thomas AJ, Jr Effect of cigarette smoking on levels of seminal oxidative stress in infertile men: a prospective study. Fertil Steril. 2002;78:491-499.
- Trummer H, Habermann H, Haas J, Pummer K. The impact of cigarette smoking on human semen parameters and hormones. Hum Reprod. 2002;17:1554-1559.
- Colagar AH, Jorsaraee GA, Marzony ET. Cigarette smoking and the risk of male infertility. Pak J Biol Sci. 2007;10:3870-3874.
- Richthoff J, Elzanaty S, Rylander L, Hagmar L, Giwercman A. Association between tobacco exposure and reproductive parameters in adolescent males. Int J Androl. 2008;31:31-39.

- Zhu AZ, Zhou Q, Cox LS, Ahluwalia JS, Benowitz NL, Tyndale RF. Variation in trans-3'-hydroxycotinine glucuronidation does not alter the nicotine metabolite ratio or nicotine intake. *PLoS One*. 2013;8:e70938.
- Pacifici R, Altieri I, Gandini L, Lenzi A, Pichini S, Rosa M, et al. Nicotine, cotinine, and trans-3-hydroxycotinine levels in seminal plasma of smokers: effects on sperm parameters. *Ther Drug Monit*. 1993;15:358–363.
- Chia SE, Xu B, Ong CN, Tsakok FM, Lee ST. Effect of cadmium and cigarette smoking on human semen quality. *Int J Fertil Menopausal Stud*. 1994;39:292–298.
- Zavos PM, Correa JR, Karagounis CS, Ahparaki A, Phoroglou C, Hicks CL, et al. An electron microscope study of the axonemal ultrastructure in human spermatozoa from male smokers and nonsmokers. *Fertil Steril*. 1998;69:430–434.
- Yeung CH, Tüttelmann F, Bergmann M, Nordhoff V, Vorona E, Cooper TG. Coiled sperm from infertile patients: characteristics, associated factors and biological implication. *Hum Reprod*. 2009;24:1288–1295.
- Miyaji K, Kaneko S, Ishikawa H, Aoyagi T, Hayakawa K, Hata M, et al. Creatine kinase isoforms in the seminal plasma and the purified human sperm. *Arch Androl*. 2001;46:127–134.
- Gerhard I, Fröhlich E, Eggert-Kruse W, Klinga K, Runnebaum B. Relationship of sperm acrosin activity to semen and clinical parameters in infertile patients. *Andrologia*. 1989;21:146–154.
- Alvarez JG, Storey BT. Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation. *Gamete Res*. 1989;23:77–90.
- Dawson EB, Harris WA, Teter MC, Powell LC. Effect of ascorbic acid supplementation on the sperm quality of smokers. *Fertil Steril*. 1992;58:1034–1039.
- Dacheux JL, Dacheux F. New insights into epididymal function in relation to sperm maturation. *Reproduction*. 2013;147:R27–R42.
- Bornman MS, Kok EL, du Plessis DJ, Otto BS. Clinical features of patients with detached ciliary tufts in semen. *Andrologia*. 1989;21:18–22.
- Klaiber EL, Broverman DM, Pokoly TB, Albert AJ, Howard PJ, Jr, Sherer JF., Jr. Interrelationships of cigarette smoking, testicular varicoceles, and seminal fluid indexes. *Fertil Steril*. 1987;47:481–486.
- Hiremagalur B, Sabban EL. Nicotine elicits changes in expression of adrenal catecholamine biosynthetic enzymes, neuropeptide Y and immediate early genes by injection but not continuous administration. *Brain Res Mol Brain Res*. 1995;32:109–115.
- Jensen JA, Goodson WH, Hopf HW, Hunt TK. Cigarette smoking decreases tissue oxygen. *Arch Surg*. 1991;126:1131–1134.
- Boissonnas CC, Jouannet P, Jammes H. Epigenetic disorders and male subfertility. *Fertil Steril*. 2013;99:624–631.

ALCOOL E SOSTANZE D'ABUSO

Alcool

L'abuso di alcool negli uomini causa una riduzione della produzione di testosterone e atrofia testicolare, i quali possono portare a impotenza, infertilità e compromissione dei caratteri sessuali secondari maschili. Tuttavia, non sono ancora ben stabiliti effetti dose-dipendenti dell'alcool sulla spermatogenesi umana. Il background genetico e le carenze nutrizionali possono modulare l'impatto dell'alcol sulla spermatogenesi. Anche se l'epatopatia alcolica in generale è considerata come l'espressione più comune di patologia d'organo da alcool, ed è correlata alla quantità totale di alcool ingerito nel tempo, bisogna considerare che solo il 30% dei forti bevitori sviluppa epatite alcolica e solo il 10% cirrosi epatica. Ciò indica la difficoltà di prevedere con certezza lo sviluppo di patologia epatica alcool correlata, in relazione ad una differente suscettibilità individuale. Lo stesso principio è valido per l'insorgenza di alterazioni del liquido seminale e per l'insorgenza di infertilità nei consumatori di alcool. Nell'uomo si tende a considerare, come associato ad un basso rischio di sviluppare patologie alcool-relate, un consumo giornaliero di 2-3 unità alcoliche, in presenza di condizioni ottimali di salute, dove una unità alcolica corrisponde a 12 grammi di etanolo puro, che a loro volta corrispondono ad un bicchiere di vino (125 ml), una lattina di birra (330 ml), un bicchierino di superalcolico (30 ml).

L'alcool ha un effetto deleterio a tutti i livelli del sistema riproduttivo maschile: interferisce con i meccanismi di feedback dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi (HPG) con conseguente compromissione della produzione e secrezione di ormone luteinizzante (LH) e follicolo-stimolante (FSH), causando un deterioramento delle cellule del Sertoli. L'alcool colpisce le cellule di Leydig e riduce i livelli ematici di testosterone, riducendo la sua produzione e aumentando la sua clearance metabolica. Agisce anche sulle funzioni delle cellule del Sertoli, probabilmente producendo danni ad alcune delle proteine necessarie per la produzione di spermatozoi. Pertanto, la riduzione alcool-indotta dei livelli di testosterone, LH e FSH non solo ostacola il normale sviluppo morfologico e la maturazione degli spermatozoi (causando una significativa teratozoospermia), ma rallenta anche la produzione di spermatozoi da parte delle cellule germinali (oligozoospermia), in particolare nei forti bevitori.

Il consumo di alcol altera i parametri seminali, la più frequente anomalia è l'incremento della percentuale di spermatozoi morfologicamente atipici. Tendono anche a presentarsi una diminuzione del volume liquido seminale ed un aumento della concentrazione seminale di leucociti. Quest'ultimo aspetto sembra possa essere ricondotto alla maggiore frequenza, negli alcolisti, di uretrite e prostatite.

Cannabis

Il sistema endocannabinoide (ECS) è profondamente coinvolto nella complessa regolazione della riproduzione maschile attraverso il rilascio endogeno di endocannabinoidi e il legame ai loro specifici recettori. Disturbare il delicato equilibrio dell'ECS, a causa di uso di marijuana, può avere un impatto negativo sul potenziale riproduttivo. All'interno delle resine di colore dorato, essudate dalla infiorescenze delle piante del genere Cannabis, si riscontrano arie sostanze psicotrope, la principale delle quali è il tetraidroccannabinolo (THC). Vari studi in vivo e in vitro hanno riportato che la cannabis riveste un ruolo determinante nell'interrompere l'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi, nell'alterare la spermatogenesi e le capacità funzionali degli spermatozoi, come la motilità e la reazione acrosomiale. I recettori dei cannabinoidi sono strettamente collegati ai neuroni nell'ipotalamo e il rilascio di GnRH è inibito nei maschi dall'oppiode endogeno anandamide (AEA), ma anche dal tetraidrocannabinolo (THC) attraverso l'interazione con GABA e altri sistemi.

Dopo un'esposizione regolare alla cannabis si osserva una diminuzione della concentrazione di spermatozoi. Risulta inoltre che il numero degli spermatozoi è inversamente proporzionale alla

quantità di cannabis assunta. Ci sono evidenze più limitate per quanto riguarda l'associazione tra l'uso di cannabis e le anomalie morfologiche negli spermatozoi umani.

Cocaina

La cocaina è un alcaloide derivante dalle foglie dell'*Erythroxylum Coca*. L'effetto farmacologico principale è quello di aumentare la disponibilità sinaptica di catecolamine e serotonina, in particolare agisce a livello delle terminazioni cortico-mesolimbiche e nigro-striatali aumentando la disponibilità di dopamina per blocco della sua ricaptazione. A livello periferico, gli effetti farmacologici sono quelli tipici dell'attivazione simpatica. L'assunzione di cocaina porta, come effetto a breve termine, ad un incremento della libido. Il consumatore cronico di cocaina, invece, va incontro ad un calo della libido e a disfunzione erettile, inoltre la cocaina può causare iperprolattinemia.

Bibliografia

- Emanuele MA and Emanuele NV. Alcohol's effects on male reproduction. *Alcohol Health Res World* 1998;22:195-218
- Gordon GG, Altman K, Southren AL, Rubin E, Lieber CS. The effect of alcohol administration on sex hormone metabolism in normal men. *N Engl J Med* 1976;295:793-7.
- Zhu Q, Van Thiel DH, Gavalier JS. Effect of ethanol on rat Sertoli Cell function: Studies in vitro and in vivo. *Alcohol Clin Exp Res* 1997;21:1409-17.
- Galambos J. *Alcoholic Hepatitis*. Intercontinental Medical Book Co: New York; 1974
- Farkas I, Kallo I, Deli L, Vida B, Hrabovszky E, Fekete C, et al. Retrograde endocannabinoid signaling reduces GABAergic synaptic transmission to gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology*. 2010;151(12):5818–5829. doi: 10.1210/en.2010-0638.
- Murphy LL, Munoz RM, Adrian BA, Villanua MA. Function of cannabinoid receptors in the neuroendocrine regulation of hormone secretion. *Neurobiol Dis.* 1998;5(6 Pt B):432–446. doi: 10.1006/nbdi.1998.0224.
- Pagotto U, Marsicano G, Cota D, Lutz B, Pasquali R. The emerging role of the endocannabinoid system in endocrine regulation and energy balance. *Endocr Rev.* 2006;27(1):73–100. doi: 10.1210/er.2005-0009.
- Wang H, Dey SK, Maccarrone M. Jekyll and hyde: two faces of cannabinoid signaling in male and female fertility. *Endocr Rev.* 2006;27(5):427–448. doi: 10.1210/er.2006-0006
- Kolodny RC, Masters WH, Kolodner RM, Toro G. Depression of plasma testosterone levels after chronic intensive marijuana use. *N Engl J Med.* 1974;290(16):872–874. doi: 10.1056/NEJM197404182901602.
- Hembree WC, Zeidenberg P, Nahas GG. Marijuana's effects on human gonadal function. In: Nahas GG, editor. *Marijuana, chemistry, biochemistry and cellular effects*. New York: Springer; 1976. pp. 521–532.
- Volkow ND, Li TK. Drugs and alcohol: treating and preventing abuse, addiction and their medical consequences. *Pharmacol Ther* 2005;108:3-17.

L'OBESITA'

Oltre la metà della popolazione maschile e femminile in età riproduttiva presenta una condizione di sovrappeso o di obesità (1). L'incidenza di questa condizione sta aumentando progressivamente nel corso degli anni e la prevalenza dell'obesità nei giovani maschi, è addirittura triplicata negli ultimi 40 anni. L'obesità è una condizione in cui l'eccesso di tessuto adiposo si associa a varie condizioni patologiche come il diabete, l'ipertensione, le patologie cardiovascolari ed alcuni tipi di cancro. Sebbene sia noto da tempo che l'obesità riduce significativamente la fertilità femminile, il potenziale ruolo di questa patologia sulla fertilità maschile è stato molto meno studiato. Tuttavia vi sono numerose dimostrazioni a supporto degli effetti negativi dell'obesità sulla conta spermatica, sulla struttura molecolare degli spermatozoi e sullo sviluppo embrionario e fetale (2). In figura 2 è riportato il risultato di una meta-analisi che mette in luce le alterazioni seminali di soggetti infertili affetti da obesità riscontrate nei differenti studi. Inoltre, una recente meta-analisi ha chiaramente evidenziato che l'obesità paterna altera profondamente il potenziale riproduttivo rispetto alla popolazione generale con conseguente riduzione della fertilità spontanea, del numero di nati vivi e della percentuale di gravidanze ottenute attraverso procreazione medicalmente assistita (3).

Negli ultimi anni, malattie come il diabete, l'ipertensione, l'ipercolesterolemia e l'infertilità maschile sono stati associati ad un elevato BMI soprattutto nelle popolazioni con maggiore sviluppo socio-economico (4, 5, 6). Inoltre è stato riportato che gli uomini ipofertili hanno in media un BMI superiore rispetto a quello riscontrato nella popolazione generale e che alti livelli di BMI si associano ad un volume testicolare ridotto e ad una peggiore qualità del liquido seminale (7, 8). Inoltre, l'aumento di peso si associa a bassi livelli di testosterone circolante, a ridotta qualità seminale, a ridotta fertilità rispetto ai soggetti normopeso ed è stato calcolato che il rischio di infertilità aumenta del 10% ogni 9 kg nei soggetti sovrappeso. Ancora, è stato riportato che l'obesità paterna aumenta il rischio di obesità e diabete nei figli, suggerendo un possibile meccanismo di amplificazione di queste malattie croniche nella prole (4).

Figura 2. Sintesi degli studi che hanno riportato la presenza di alterazioni seminali in soggetti obesi alla ricerca di prole (2).

	Concentration	Motility	Morphology
Strain et al. ¹⁴⁶	Decreased	No change	n/a
Jensen et al. ⁵⁸	Decreased	No change	Decreased
Magnusdottir et al. ¹⁴⁷	Decreased	Decreased	n/a
Fejes et al. ¹⁴⁸	Decreased	No change	No change
Koloszar et al. ¹⁴⁹	Decreased	n/a	n/a
Kort et al. ⁴⁵	Decreased *	Decreased *	Decreased *
Qin et al. ¹⁵⁰	No change	No change	No change
Hammoud et al. ¹⁵¹	Decreased	Decreased	Decreased
Pauli et al. ⁵⁶	No change	No change	No change
Aggerholm et al. ⁵²	No change	No change	No change
Nicopoulou et al. ¹⁵²	Decreased	n/a	n/a
Hofny et al. ¹⁵³	Decreased	Decreased	Decreased
Stewart et al. ¹⁵⁴	Decreased	n/a	n/a
Chavarro et al. ¹⁵⁵	No change	No change	No change
Shayeb et al. ¹⁵⁶	No change	No change	Decreased
Koloszar et al. ¹⁴⁹	Decreased	n/a	n/a
Sekhavat et al. ¹⁵⁷	Decreased	Decreased	n/a
Paasch et al. ⁵⁴	Decreased	No change	Decreased
Tunc et al. ⁴⁹	Decreased	No change	No change
Rybar et al. ¹⁵⁸	No change	No change	No change

Negli anni sono stati suggeriti diversi meccanismi patogenetici in grado di alterare la fertilità nei soggetti obesi come le alterazioni endocrine, l'insulino-resistenza, l'infiammazione, il calore e lo stress ossidativo. Molti studi hanno documentato che elevati livelli di BMI si associano a ridotte concentrazioni di SHBG e testosterone con un concomitante incremento degli estrogeni circolanti. Si stima che circa il 60% dei soggetti obesi presenti un certo grado di ipogonadismo. Bassi livelli di testosterone ed elevate concentrazioni di estrogeni sono da sempre correlati ad uno stato di alterata fertilità con ridotta conta di spermatozoi e disregolazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi. Infatti, gli estrogeni hanno un effetto negativo sull'ipotalamo alterando la produzione del GnRH con conseguente soppressione della produzione di gonadotropine. Inoltre, gli elevati livelli di leptina presenti in questi soggetti contribuirebbero ulteriormente ad inibire il funzionamento dell'asse. Pertanto, anche gli altri ormoni coinvolti nella regolazione della funzione sertoliana e nella spermatogenesi come FSH, LH e inibina B sono stati osservati essere ridotti in maschi con elevato BMI (4). E' stato suggerito inoltre che nelle obesità gravi vi sarebbe una alterata secrezione di oppioidi con conseguente quadro di ipogonadismo ipogonadotropo. Il diabete tipo 2 e l'insulino-resistenza, che sono frequentemente associati all'obesità, avrebbero un effetto peggiorativo sulla funzione endocrina dell'asse ipotalamo-ipofisario che sembrerebbe mediato dal rilascio di citochine pro-infiammatorie (9). Inoltre, è stato dimostrato che l'insulino-resistenza avrebbe un effetto diretto e indipendente dai livelli di SHBG sulla produzione di testosterone. Tale condizione infatti, sarebbe in grado di indurre l'espressione del gene DAXA a livello delle cellule di Leydig con conseguente effetto inibitorio sulla steroidogenesi. Come detto nel paragrafo precedente, l'obesità riveste un ruolo determinante nell'aumento della temperatura scrotale a causa della incrementata adiposità addomino-scrotale. E' stato dimostrato che tale condizione può contribuire a ridurre la capacità funzionale degli spermatozoi portando ad infertilità. Al contrario, la rimozione chirurgica del grasso scrotale da un lato sarebbe in grado di ridurre la temperatura testicolare e dall'altro porterebbe ad un miglioramento dei parametri seminali (4). Lo stress ossidativo generato dalla massiva produzione di radicali liberi (ROS), è stato proposto per molte condizioni patologiche e anche per l'obesità (6). Inoltre il fenomeno delle apnee notturne, frequentemente presente in questi soggetti, è in grado di incrementare notevolmente i fenomeni di stress ossidativo. Gli spermatozoi umani, sono particolarmente suscettibili alla perossidazione lipidica a causa del loro elevatissimo contenuto di acidi grassi insaturi. I ROS vengono prodotti normalmente nel metabolismo cellulare ed a basse concentrazioni risultano fondamentali alla normale funzionalità spermatica. Tuttavia, un eccesso di ROS può danneggiare il nucleo e il DNA mitocondriale, portando a frammentazione, alterata ricombinazione e a difettosa compattazione del DNA spermatico. Si è visto che elevate concentrazioni di ROS nel siero e nel plasma seminale di soggetti infertili sono in grado di alterare la respirazione mitocondriale disaccoppiando il trasporto di elettroni e la sintesi di ATP (10). Questo fenomeno induce un carente metabolismo di substrati energetici in grado di portare importanti effetti negativi sulla qualità seminale. Alti livelli di ROS sono stati associati infatti a ridotta motilità spermatica, a elevati tassi di frammentazione del DNA

spermatico e ad infertilità. Pertanto, oggi è chiaro che lo stress ossidativo indotto da un eccesso di ROS a livello testicolare è in grado di indurre delle modificazioni così profonde nella spermatogenesi da ridurre sia la produzione che la qualità degli spermatozoi.

Recentemente, gli studi sull'obesità maschile hanno messo in luce che oltre all'alterazione della fertilità e degli ormoni testicolari, i soggetti obesi possono presentare disturbi della sessualità. Su questa base, alcuni studiosi hanno verificato l'efficacia della chirurgia bariatrica sulle anomalie della funzione riproduttiva in maschi con obesità severa documentando che mentre i disturbi sessuali si attenuavano già nel primo periodo dopo la chirurgia, non si verificava un miglioramento parallelo dei parametri seminali (11). Saranno necessari follow-up più prolungati ed ulteriori studi per una comprensione più ampia di questo fenomeno.

In conclusione, sebbene il meccanismo patogenetico che causa infertilità nei soggetti obesi non sia stato ancora del tutto chiarito e verosimilmente si tratta di un problema multifattoriale, le numerose evidenze scientifiche oggi ci consentono di considerare a pieno titolo l'obesità tra i fattori di rischio di infertilità maschile.

Bibliografia

1. Klenov VE, Jungheim ES. Obesity and reproductive function: a review of the evidence. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2014 26:455-460.
2. Palmer NO, Bakos HW, Fullston T, Lane M. Impact of obesity on male fertility, sperm function and molecular composition. *Spermatogenesis*. 2012 Oct1;2(4):253-263.
3. Campbell JM, Lane M, Owens JA, Bakos HW. Paternal obesity negatively affects male fertility and assisted reproduction outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Reprod Biomed Online*. 2015 Nov;31(5):593-604.
4. Katib A. Mechanisms linking obesity to male infertility. *Cent European J Urol*. 2015;68(1):79-85.
5. McPherson NO, Lane M. Male obesity and subfertility, is it really about increased adiposity? *Asian J Androl*. 2015 May-Jun;17(3):450-8.
6. Shukla KK, Chambial S, Dwivedi S, Misra S, Sharma P. Recent scenario of obesity and male fertility. *Andrology*. 2014 Nov;2(6):809-18.
7. Jo J, Kim H. The relationship between body mass index and scrotal temperature among male partners of subfertile couples. *J Therm Biol*. 2016 Feb;56:55-8.
8. Alshahrani S, Ahmed AF, Gabr AH, Abalhassan M, Ahmad G. The impact of body mass index on semen parameters in infertile men. *Andrologia*. 2016 Feb 5. doi:10.1111/and.12549.
9. Morrison CD, Brannigan RE. Metabolic syndrome and infertility in men. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2015 May;29(4):507-15.
10. Ferramosca A, Conte A, Moscatelli N, Zara V. A high-fat diet negatively affects rat sperm mitochondrial respiration. *Andrology*. 2016 May;4(3):520-5.
11. Rosenblatt A, Faintuch J, Cecconello I. Abnormalities of Reproductive Function in Male Obesity Before and After Bariatric Surgery-A Comprehensive Review. *Obes Surg*. 2015 Jul;25(7):1281-92.

DIABETE, FARMACI ANTIDIABETICI E FERTILITA' MASCHILE

Il diabete è ormai una patologia che riveste un impatto notevole sull'intera popolazione mondiale; recenti report, infatti, indicano che circa 415 milioni sono i soggetti affetti da diabete e le proiezioni al 2040 ipotizzano una crescita a circa 642 milioni (1). Come noto, al diabete sono associate anche numerose complicanze che coinvolgono diversi organi quali occhio, rene, sistema nervoso, apparato cardiovascolare, con le associate affezioni micro e macrovascolari tra cui la disfunzione erettile (2) e, inoltre, sull'apparato riproduttivo maschile (3). Vari studi, infatti, hanno dimostrato gli effetti negativi indotti dal diabete, sia tipo 1 che tipo 2 (4), sui parametri seminali, sulla frammentazione del DNA nucleare e sulla qualità della cromatina (5-8), dovuti ad alterazioni ormonali, ad effetti indotti dalla neuropatia diabetica o a stress ossidativo (4). È noto che gli spermatozoi, per acquisire e preservare la loro motilità e nella fase di capacitazione, necessitano di energia (3). A dimostrare il grande ruolo che i glucidi hanno sullo spermatozoo sono i numerosi trasportatori di glucosio (GLUT 1-9) che passivamente consentono il passaggio dei monosaccaridi attraverso la membrana fosfolipidica (9-10). Proprio i GLUT svolgono un ruolo di adattamento alle variazioni ambientali e/o metaboliche utili a proteggere la loro funzione ma, nel caso del diabete, possono essere associati ad una disfunzione del trasporto dei nutrienti e quindi ad una ridotta fertilità (11-12). Di seguito i principali possibili effetti indotti dal diabete sul liquido seminale (Tab.1):

Tabella 1: principali possibili effetti del diabete sul liquido seminale (3,8)

Alterazione della spermatogenesi
Ridotto volume dell'eiaculato
Ridotto numero di spermatozoi
Alterazioni della morfologia
Ridotta motilità
Ridotta capacità di fecondazione
Alterazione del DNA spermatico
Alterazione epigenetica durante la spermatogenesi

Gli effetti del diabete, però, non sono solo espressi direttamente sull'organismo umano ma possono anche incidere in maniera indiretta, ad esempio attraverso l'utilizzo di farmaci per il trattamento ipoglicemizzante. Nel caso dell'impatto di tali farmaci sulla fertilità, infatti, solo alcuni sono stati studiati in maniera completa anche per i loro potenziali effetti sulla fertilità (Tab.2)

Tabella 2. Farmaci per il trattamento del diabete e possibile effetto sulla fertilità

Farmaco antidiabetico	Possibili effetti sulla fertilità (Si/No/Non Valutato - nv)
Inibitori dell'alfa glucosidasi	nv
Biguanidi	Si
Inibitori del DPP-IV	Si
Glinidi	Si
Agonisti del GLP-1	Si
Insuline	Si
Inibitori del SGLT-2	Si/nv
Sulfaniluree	Si
Tiazolidinedioni	Si

Biguanidi

La metformina è uno degli storici farmaci utilizzati nel trattamento del diabete e, grazie alla sua attività insulino-sensibilizzante, blocca la gluconeogenesi epatica, incrementa l'uptake muscolare del glucosio riducendone l'assorbimento a livello intestinale. Sebbene siano in atto alcuni lavori utili a chiarire il ruolo della metformina sul metabolismo delle cellule del Sertoli e sulla fertilità maschile, è stato riportato in letteratura un potenziale effetto protettivo mediante l'aumento dell'attività dei GLUT nelle cellule del Sertoli, la stimolazione della produzione di alanina con i suoi effetti antiossidanti, l'aumento dei lattati con i loro effetti antiapoptotici sulla linea germinale (13).

Inibitori del DPP IV

Questa classe di antidiabetici orali, mediante l'inibizione del DPP-IV e quindi aumentando i livelli delle incretine GLP-1 e GIP, consentono l'inibizione della secrezione del glucagone, quindi un abbassamento della glicemia, diminuzione dello svuotamento gastrico con relativo beneficio sui valori glicemici postprandiali. Tra le storiche molecole appartenenti a tale classe si ricorda il sitagliptin. Studi su animali hanno evidenziato una safety sulla fertilità maschile ma, un case report del 2011 ha ipotizzato una possibile compromissione della spermatogenesi in un paziente di 39 anni che aveva assunto 50 mg di sitagliptin quotidianamente (14).

Glinidi

Tale classe di farmaci agisce come secretagoga non sulfanilureica. La repaglinide è una delle molecole di questa famiglia di antidiabetici orali. I dati non-clinici non hanno messo in evidenza particolari rischi per l'uomo sulla base degli studi convenzionali sulla sicurezza farmacologica, tossicità a dosi ripetute, genotossicità e potenzialità carcinogenetica (15). Gli effetti osservati in tutti gli studi su ratti si sono verificati solo a concentrazioni plasmatiche superiori a quelle che normalmente vengono adottate nel classico iter terapeutico (16).

Agonisti del GLP-1

Questa classe di farmaci porta ad inibire la secrezione di glucagone, a ridurre la motilità gastrointestinale consentendo, così, la riduzione di appetito e di assunzione di cibo, con successivo calo ponderale. Tra i vari potenziali effetti collaterali associati a tale classe non sono ancora ben noti gli effetti sulla fertilità maschile. Jeibmann et al. hanno evidenziato una riduzione della pulsatilità del testosterone in concomitanza con l'utilizzo di GLP-1 (17). La liraglutide è una delle numerose molecole appartenenti a questa famiglia e, in letteratura, sono riportati 3 casi su oltre 20 mila soggetti con reazioni avverse che hanno mostrato una ridotta, apparentemente reversibile, conta spermatica durante il suo utilizzo (18). Inoltre, come riportato dalla FDA, recenti trials sulla lixisenatide (clinical Study TDR11215) non hanno mostrato effetti significativi sulla spermatogenesi nell'uomo (19), almeno al dosaggio attualmente indicato nel trattamento per il diabete.

Insuline

Tale categoria è sicuramente la più famosa e la più fisiologica tra le terapie a disposizione tra i farmaci antidiabetici. Tanti sono i tipi di insulina ad oggi utilizzabili ed altrettanti sono in fase di studio. Ricerche su animali ad oggi non hanno mostrato particolari rischi per la fertilità (20).

Inibitori del SGLT-2

Questa classe di farmaci, per quanto sia nota da molti anni, è di recente introduzione nel “parco” farmaci per il trattamento del diabete. Sono molecole che agiscono inibendo il cotrasportatore sodio-glucosio SGLT-2, sito a livello del tubulo contorto prossimale nonché responsabile di circa il 90% del riassorbimento del glucosio: riducono la soglia plasmatica renale per il glucosio e inducono glicosuria con conseguente riduzione del glucosio plasmatico. È ipotizzabile che, data la frequenza delle infezioni delle vie urinarie nei pazienti che assumono tali molecole (21), la fertilità possa essere in qualche misura essere coinvolta ma, ad oggi, non sono noti studi sulla fertilità nell'uomo anche se studi su animali, ai dosaggi terapeutici attualmente consentiti, non hanno mostrato effetti in tal senso.

Sulfaniluree

Questa classe di farmaci antidiabetici agisce come secretagoga a livello delle insulae pancreatiche, stimolate ad incrementare la produzione insulinica. La farmacocinetica di tale molecola si esplica mediante l'azione sui canali di K ATP-dipendente con relativa depolarizzazione ed apertura dei canali del Ca^{2+} . Un interessante lavoro su campioni di liquido seminale umano ha evidenziato come questa azione dose e tempo dipendente associata ad un aumento del $[Ca^{2+}]$ porta ad una progressiva riduzione della vitalità degli spermatozoi, manifestando quindi un'attività spermicida (22). Ad oggi studi su ratti di sesso maschile non hanno comunque riportato effetti sulla capacità riproduttiva.

Tiazolidinedioni

Il pioglitazone, principio attivo appartenente alla classe dei Tiazolidinedioni, agisce mediante l'attivazione dei recettori PPAR- γ coinvolti nella regolazione della trascrizione di geni utili a favorire una risposta ipoglicemizzante mediante un'azione insulino-sensibilizzante (23). Un recente lavoro di Meneses et.al. sugli effetti del pioglitazone sulle cellule del Sertoli, ha evidenziato un aumento dei flussi glicolitici e della produzione di lattato deidrogenasi di queste cellule, passaggi essenziali per sostenere e consolidare i vari step della spermatogenesi (23).

Allo stato attuale alcune molecole utilizzate per il trattamento del diabete non sono state studiate per i loro potenziali effetti sulla fertilità nell'uomo pertanto sono sicuramente necessari ulteriori studi clinici utili a colmare tale "lack of knowledge" e consentire una terapia, non solo diabetologica, impostata su misura per determinate tipologie di pazienti.

Bibliografia

- 1) IDF Diabetes Atlas ed. 2015
- 2) Defeudis G, Gianfrilli D, Di Emidio C, Pofi R, Tuccinardi D, Palermo A, Lenzi A, Pozzilli P. Erectile dysfunction and its management in patients with diabetes mellitus. *Rev Endocr Metab Disord*. 2015 Oct 26
- 3) Ding GL, Liu Y, Liu ME, Pan JX, Guo MX, Sheng JZ, Huang HF. The effects of diabetes on male fertility and epigenetic regulation during spermatogenesis. *Asian Journal of Andrology* (2015) 17, 948–953
- 4) La Vignera S, Condorelli R, Vicari E, D'Agata R, Calogero AE. Diabetes mellitus and sperm parameters. *J Androl*. 2012 Mar-Apr;33(2):145-53.
- 5) Agbaje IM, Rogers DA, McVicar CM, McClure N, Atkinson AB, Mallidis C, Lewis SE. Insulin dependant diabetes mellitus: implications for male reproductive function. *Hum Reprod* 2007; 22: 1871–7.
- 6) Kilarkaje N, Al- Hussaini H, Al- Bader MM. Diabetes- induced DNA damage and apoptosis are associated with poly (ADP ribose) polymerase 1 inhibition in the rat testis. *Eur J Pharmacol* 2014; 737: 29–40.
- 7) Cavallini G. Male idiopathic oligoasthenoteratozoospermia. *Asian J Androl* 2006; 8: 143–57.
- 8) Bhattacharya SM, Ghosh M, Nandi N. Diabetes mellitus and abnormalities in semen analysis. *J Obstet Gynaecol Res*. 2014 Jan;40(1):167-71.
- 9) Joost HG, Thorens B. The extended GLUT- family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members (review). *Mol Membr Biol* 2001; 18: 247–56.
- 10) Scheepers A, Joost HG, Schürmann A. The glucose transporter families SGLT and GLUT: molecular basis of normal and aberrant function. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2004; 28: 364–71.
- 11) Yang J, Cummings EA, O'connell C, Jangaard K. Fetal and neonatal outcomes of diabetic pregnancies. *Obstet Gynecol* 2006; 108: 644–50.

- 12) Purcell SH, Moley KH. Glucose transporters in gametes and preimplantation embryos. *Trends Endocrinol Metab* 2009; 20: 483–9.
- 13) Alves MG, Martins AD, Vaz CV, Correia S, Moreira PI, Oliveira PF, Socorro S. Metformin and male reproduction: effects on Sertoli cell metabolism. *Br J Pharmacol*. 2014 Feb;171(4):1033–42.
- 14) Hibi H, Ohori T, Yamada Y. DPP-IV inhibitor may affect spermatogenesis. *Diabetes Res Clin Pract*. 2011 Aug;93(2):e74–5.
- 15) http://www.ema.europa.eu/docs/it_IT/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000187/WC500029905.pdf access on 11.12.16.
- 16) Viertel B1, Güttner J. Effects of the oral antidiabetic repaglinide on the reproduction of rats. *Arzneimittelforschung*. 2000 May;50(5):425–40.
- 17) Jeibmann, A., Zahedi, S., Simoni, M., Nieschlag, E., Byrne, M.M., 2005. Glucagon-like peptide-1 reduces the pulsatile component of testosterone secretion in healthy males. *Eur. J. Clin. Invest.* 35, 565–572.
- 18) Fontoura P, Cardoso MC, Erthal-Martins MC, Werneck C, Sartorio C, Ramos CF. The effects of liraglutide on male fertility: a case report. *Reprod Biomed Online*. 2014 Nov;29(5):644–6.
- 19) http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2016/208471Orig1s000PharmR.pdf Access on 11.12.16
- 20) http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_Product_Information/human/000528/WC500036662.pdf. Access on 11.12.16
- 21) Li D, Wang T, Shen S, Fang Z, Dong Y, Tang H. Urinary tract and genital infections in patients with type 2 diabetes treated with sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Diabetes Obes Metab*. 2016 Nov 12.
- 22) Kumar N, Jain S, Gupta A, Tiwary AK. Spermicidal activity of sulfonylureas and meglitinide analogues: role of intrasperm Ca²⁺ elevation. *J Pharm Pharmacol*. 2008 Mar;60(3):323–30.
- 23) Meneses MJ, Bernardino RL, Sá R, Silva J, Barros A, Sousa M, Silva BM, Oliveira PF, Alves MG. Pioglitazone increases the glycolytic efficiency of human Sertoli cells with possible implications for spermatogenesis. *Int J Biochem Cell Biol*. 2016 Oct;79:52–60

STILI DI VITA E INFERTILITA' MASCHILE

Negli ultimi anni numerosi studi hanno tentato di analizzare i possibili effetti di fattori ambientali e stili di vita sulla produzione spermatica e sulla fertilità maschile. Tuttavia, a causa dell'enorme variabilità intra ed inter-individuale nella conta spermatica e a causa della difficoltà di eseguire questi studi in modo rigoroso, solo per pochi di essi è stata trovata una solida evidenza scientifica di una qualche relazione causale (1). Per molti altri fattori di rischio ipotetici, rimangono ad oggi evidenze limitate di una chiara associazione con l'infertilità. In Tabella 1 sono riportati gli stili di vita per i quali vi sono evidenze scientifiche a dimostrazione del loro ruolo nell'infertilità maschile.

Tabella 1. Stili di vita che comportano un rischio di infertilità

-
- | | |
|---|--|
| ▪ | TEMPERATURA SCROTALE |
| ▪ | OBESITA' |
| ▪ | FUMO |
| ▪ | ALCOOL |
| ▪ | ONDE ELETTROMAGNETICHE |
| ▪ | SOSTANZE DA ABUSO E ANABOLIZZANTI |
| ▪ | ESPOSIZIONE FATTORI TOSSICI AMBIENTALI e/o OCCUPAZIONALI |
-

IL CALORE

I testicoli nell'uomo e nella maggior parte degli animali sono collocati nello scroto al di fuori dell'addome dove si trovano ad una temperatura di 2-8°C inferiore rispetto a quella corporea (2). Inoltre, i testicoli sono dotati di un sistema di vasi posto tra il plesso pampiniforme e l'arteria testicolare che permette di eliminare il calore eccessivo. Queste caratteristiche assicurano ai testicoli una temperatura controllata che garantisce il normale completamento della spermatogenesi (2).

Sia nell'uomo che nell'animale è stato dimostrato che un aumento della temperatura scrotale si associa ad un danno della spermatogenesi (3, 4). Sia un'esposizione ad alte temperature per un breve periodo, sia un'esposizione a modesti aumenti di temperatura per periodi più prolungati, sono in grado di danneggiare quantitativamente e qualitativamente la spermatogenesi. Risalgono addirittura al 1923 i primi studi sull'animale che dimostrano come in molte specie animali in cui veniva indotto chirurgicamente il criptorchidismo, sviluppavano un arresto della spermatogenesi. Curiosamente, l'applicazione di un sistema di raffreddamento del testicolo reso criptorchide era in grado di prevenire l'alterazione della spermatogenesi (5). Nel 1987, alcuni autori avevano riportato l'impatto di elevate temperature scrotali nel ratto e nel topo dimostrando un ridotto volume testicolare ed una alterazione dei parametri seminali. Inoltre nel topo, effetti diretti del riscaldamento testicolare portavano ad alterazione nello sviluppo delle cellule germinali con alterata sintesi di DNA, RNA e proteine ma anche denaturazione proteica e difetti nel meccanismo di compattazione della cromatina spermatica (2). In questi animali, l'esposizione dei testicoli ad un range di temperatura tra i 38 ed i 42°C per un tempo variabile tra 20 minuti ed un'ora causava effetti citotossici nelle cellule germinali con un maggiore impatto a carico degli spermatogoni differenziati e degli spermatoцитi. Effetti negativi erano riportati anche a livello degli epididimi nella porzione della coda, con perdita della loro capacità di accumulare e mantenere vitali gli spermatozoi e conseguente graduale e progressivo aumento del numero di spermatozoi morti, immobili e con alterazioni morfologiche a carico della testa e della coda. Gli epididimi e le ghiandole accessorie secernono inoltre molti fattori importanti per la maturazione e la fisiologia spermatica. La presenza nel liquido seminale di sostanze come fruttosio, zinco e alfa glucosidasi sono fondamentali per l'attività funzionale degli spermatozoi e l'esposizione al calore di epididimi, vescicole seminali e prostata è stata chiaramente associata ad un'alterata secrezione di questi

fattori (6). Inoltre, modelli sperimentali hanno dimostrato che una lieve e transitoria ipertermia testicolare è in grado di indurre uno stress ossidativo in grado di alterare il delicato equilibrio tra capacità ossidativa e anti-ossidante. Tale alterazione, sarebbe in grado di portare ad un incremento dei radicali liberi e delle specie reattive dell'ossigeno, che rappresentano fattori di insulto ai quali gli spermatozoi sono particolarmente sensibili.

Anche nell'uomo, l'aumento della temperatura scrotale è stato messo in relazione ad un peggioramento della qualità spermatica e ad una riduzione della fertilità (2). L'esposizione dei testicoli al calore nell'uomo può essere secondaria a vari fattori come l'esposizione occupazionale, il criptorchidismo, gli stili di vita, l'abbigliamento, l'attività fisica, il varicocele e l'obesità. E' stato riportato che i soggetti con lavori sedentari, come ad esempio i camionisti ed i tassisti, hanno una temperatura scrotale mediamente più elevata e questa è inversamente correlata con la conta spermatica che risulta ridotta fino al 40% del normale. E' stato dimostrato inoltre che uomini con una pregressa storia di criptorchidismo, hanno una temperatura scrotale superiore alla media e sono spesso subfertili o infertili. L'abitudine a frequentare le saune è spesso stata messa in relazione ad un elevato stress termico da parte di tutto il corpo compresi i testicoli. Un recente lavoro ha valutato la spermatogenesi, gli ormoni, il DNA spermatico ed i geni coinvolti nella risposta allo stress termico in soggetti normozoospermici che per la prima volta si esponevano a due sedute di sauna la settimana per 3 mesi (7). In questi soggetti si verificava una significativa alterazione di tutti i parametri seminali, della funzione mitocondriale e della compattazione del DNA spermatico. Negli spermatozoi di questi soggetti era possibile riscontrare una significativa attivazione di tutti i geni coinvolti nello shock termico e nei meccanismi di risposta all'ipossia. Tutte le modificazioni osservate nei soggetti esposti, scomparivano solo dopo sei mesi dalla sospensione delle saune. Anche l'abbigliamento e gli indumenti intimi hanno un ruolo importante nella regolazione del calore a livello testicolare. Vari autori hanno messo in luce che indumenti intimi stretti, come ad esempio quelli indossati dai ciclisti o dai maratoneti durante l'attività sportiva hanno una scarsa capacità di disperdere il calore durante lo sforzo fisico. Basandosi su queste osservazioni, un recente lavoro ha dimostrato una significativa differenza tra i parametri seminali registrati in soggetti che indossavano abitualmente slip o boxer (8). Recentemente è stato messo a punto uno strumento (Thermochip) in grado di eseguire un holter della temperatura scrotale durante le 24 ore (9). Attraverso questo strumento, il monitoraggio dinamico delle variazioni termiche dei testicoli ha evidenziato come vi siano importanti variazioni diurne e notturne in base alle attività quotidiane svolte. Ad esempio, sono state osservate differenze significative tra le fasi di riposo e di attività fisica, tra l'attività fisica da seduti o in piedi e anche tra le ore del giorno e della notte. In particolare, lo strumento è stato utilizzato per confrontare la temperatura scrotale media di soggetti normopeso, obesi e di soggetti affetti da varicocele. Lo studio ha dimostrato che in caso di obesità o varicocele, i soggetti presentano una temperatura scrotale media di due gradi superiore la norma come evidenziato in Figura 1. I risultati di questo studio hanno inoltre dimostrato che la temperatura scrotale di ciascun soggetto riflette esattamente sia lo stato funzionale dei testicoli che quello perfusionale. In questi soggetti infatti, l'incremento di temperatura medio era direttamente proporzionale all'alterazione dei parametri seminali e ormonali riscontrati. Un'altra possibilità infine, è che la riduzione e addirittura l'assenza di periodi climatici freschi, osservata negli ultimi anni, sia responsabile del declino progressivo della conta spermatica nella specie umana e del conseguente aumento dei tassi infertilità che si riscontra a livello mondiale (5).

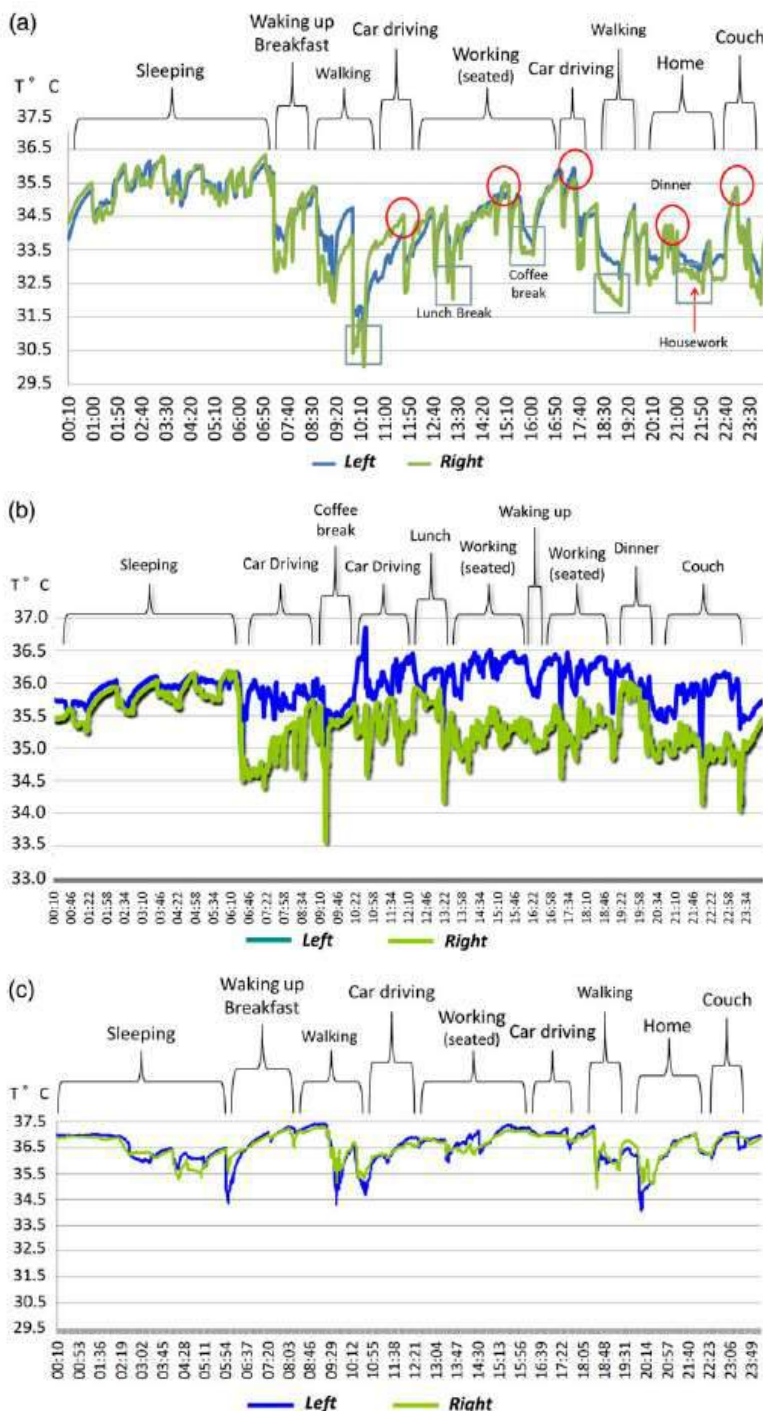
Inoltre, nei soggetti con elevata temperatura scrotale la riduzione della conta spermatica sembra associarsi ad alterazioni a carico del nucleo degli spermatozoi. Vi sono numerosi studi infatti che dimostrano come lo stress indotto dall'aumento della temperatura testicolare induce nei soggetti esposti fenomeni di alterata condensazione cromatinica, aumento degli enzimi preposti ai processi

di apoptosi spermatica, riduzione dell'integrità cromatinica e frammentazione a carico del DNA (2, 10, 11). Infine nel topo, è stato dimostrato che addirittura un singolo, lieve e transitorio episodio di riscaldamento scrotale è in grado di indurre un significativo danno del DNA tale da indurre ridotta fertilità e alterare il processo di formazione della blastocisti (11).

Di conseguenza, fattori ambientali, stili di vita e patologie in grado di alterare la temperatura scrotale, sembrano rappresentare importanti fattori di rischio per una ridotta produzione spermatica e di conseguenza per una ridotta fertilità.

Figura 1.

Esempio di monitoraggio della temperatura scrotale eseguito mediante Thermochip in un soggetto normopeso a), in un soggetto con varicocele sinistro b), ed in un soggetto obeso c)



Bibliografia

1. Sharpe RM. Environment, lifestyle and male infertility. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2000 Sep;14(3):489-503.
2. Banks S, King SA, Irvine DS, Saunders PT. Impact of a mild scrotal heat stress on DNA integrity in murine spermatozoa. *Reproduction.* 2005 Apr;129(4):505-14.
3. Mieuisset R and Bujan L. Testicular heating and its possible contributions to male infertility: a review. *Int J Androl* 1995; 18: 169-184.
4. Setchell BP. Heat and the testis. *J Reprod Fertil* 1995; 114:179-184.
5. Jung A and Schuppe B. Influence of genital heat stress on semen quality in humans. *Andrologia* 2007; 39(6): 203-215.
6. Meng R, Xiao-Ling Z, Jing Y, Shi-Fu H., Hui L, Wei X, Chang-Hong Z. Effect of transient scrotal hyperthermia on sperm parameters, seminal plasma biochemical markers, and oxidative stress in men. *Asian J Androl.* 2015; 17:668-675
7. Garolla A, Torino M, Sartini B, Cosci I, Patassini C, Carraro U, Foresta C. Seminal and molecular evidence that sauna exposure affects human spermatogenesis. *Hum Reprod.* 2013 Apr;28(4):877-85.
8. Jurewicz J, Radwan M, Sobala W, Ligocka D, Radwan P, Bochenek M, Hanke W. Lifestyle and semen quality: role of modifiable risk factors. *Syst Biol Reprod Med.* 2014 Feb;60(1):43-51.
9. Garolla A, Torino M, Miola P, Caretta N, Pizzol D, Menegazzo M, Bertoldo A, Foresta C. Twenty-four-hour monitoring of scrotal temperature in obese men and men with a varicocele as a mirror of spermatogenic function. *Hum Reprod.* 2015 May;30(5):1006-13.
10. Zhang MH, Shi ZD, Yu JC, Zhang YP, Wang LG, Qiu Y. Scrotal heat stress causes sperm chromatin damage and cysteinyl aspartate-specific proteinases 3 changes in fertile men. *J Assist Reprod Genet.* 2015 May;32(5):747-55.
11. Paul C, Murray AA, Spears N, Saunders PT. A single, mild, transient scrotal heat stress causes DNA damage, subfertility and impairs formation of blastocysts in mice. *Reproduction.* 2008 Jul;136(1):73-84.

FATTORI DI RISCHIO DELL'INFERTILITA' MASCHILE

Sandro La Vignera¹, Rocco Rago², Mariagrazia Gallo², Aldo E. Calogero¹

¹Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Scuola "Facoltà di Medicina", Università degli Studi di Catania.

²Dipartimento Materno Infantile, Unità di Fisiopatologia della Riproduzione e Andrologia, Ospedale Sandro Pertini, Roma.

Definizione ed epidemiologia dell'infertilità

L'infertilità è intesa come l'incapacità degli esseri viventi di riprodursi. Storicamente, l'infertilità ha rappresentato da sempre un problema sentito in tutte le società. I primi scritti che parlano di questo argomento risalgono ad alcuni papiri egiziani del 2200 a.C. e, inoltre, sono numerosi i riferimenti biblici sull'importanza della procreazione ("... siate fecondi e moltiplicatevi; riempite la Terra ..." – Genesi 1:28). A Ippocrate (460-370 a.C.) si deve il primo trattato "sul seme", mentre sarà la medicina romana a riconoscere come cause del declino della fertilità, già allora evidenziato, l'avvelenamento da piombo, la promiscuità dei rapporti sessuali e il ricorso a bagni caldi.

Il forte rallentamento del tasso di natalità nelle società occidentali, a partire dagli anni sessanta, potrebbe essere collegato ad una perdita generale di fecondità, ma anche al desiderio delle coppie di avere un minor numero di figli e di rimandare la maternità/paternità, proprio quando la capacità riproduttiva si riduce per cause biologiche.

Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) e l'American Fertility Society, una coppia è da considerarsi infertile quando non è in grado di concepire dopo 1-2 anni di rapporti sessuali regolari e non protetti. Viceversa, è da considerarsi sterile quella coppia nella quale uno o entrambi i coniugi siano affetti da una condizione fisica permanente che non renda possibile ottenere gravidanza. Si definisce infertilità secondaria, la condizione della coppia che non riesce a raggiungere una seconda gravidanza.

Secondo l'OMS, circa il 15% delle coppie in età fertile nei Paesi occidentali è affetto da infertilità. Le limitazioni alle considerazioni di carattere epidemiologico a questa condizione sono legate al fatto che non si tratta di analizzare le caratteristiche e la diffusione di un agente eziologico ben preciso. L'infertilità e la sterilità sono infatti causati da agenti eziologici diversi, talvolta sintomatici, ma molto spesso asintomatici da un punto di vista clinico. Una ridotta o totale incapacità riproduttiva è inoltre espressione dell'interazione di due differenti condizioni fisiche, quella maschile e quella femminile. Una stima dell'infertilità e della sterilità di una popolazione deve quindi necessariamente utilizzare dei metodi approssimativi di tipo diretto o indiretto.

Pur con queste premesse, studi epidemiologici sulla popolazione generale riportano una percentuale di concepimento dell'80-85% entro 12 mesi di rapporti liberi. Le restanti coppie che non hanno gravidanza entro 2 anni possono avere destini diversi: la metà delle coppie senza anomalie andrologiche e ginecologiche otterrà una gravidanza entro i successivi 6 anni, mentre in presenza di oligo (riduzione del numero degli spermatozoi eiaculati)-, asteno (riduzione della motilità nemaspermica)-, e/o terato (riduzione della percentuale di forme normali)-zoospermia (OAT) moderata-grave solo il 22-35% delle coppie otterrà una gravidanza spontanea entro 12 anni.

I dati forniti dall'Istituto Superiore di Sanità indicano che in circa il 35% delle coppie infertili si riconosce un fattore maschile, nel 35% dei casi un fattore femminile, nel 15% dei casi entrambi i fattori; infine, nel rimanente 15% delle coppie l'eziologia rimane sconosciuta (Fig. 1).

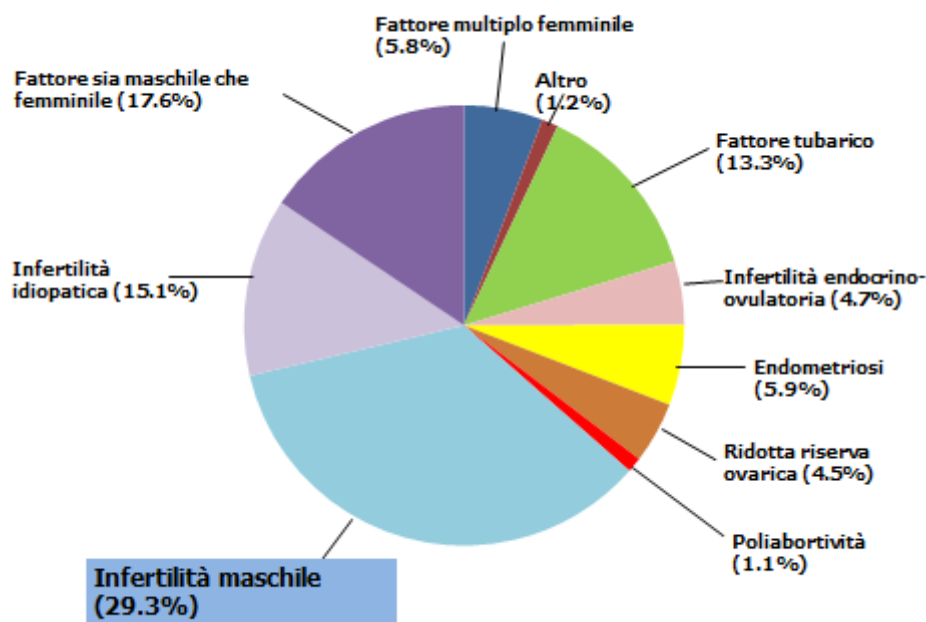


Figura 1. Frequenza delle cause di infertilità nelle coppie che si sottopongono a tecniche di procreazione medicalmente assistita (PMA) (Registro Nazionale PMA, Istituto Superiore di Sanità)

E' noto che la fertilità di una coppia correla in maniera diretta con la frequenza dei rapporti sessuali e inversamente con l'età della donna, mentre non è stata dimostrata una chiara relazione con l'età dell'uomo (Strickler, 1997). Tra i fattori di rischio che influenzano la fertilità sono sicuramente annoverati:

- il fumo di sigaretta (Howe et al., 1985)
- le variazioni del peso corporeo (Rebar, 1983; Sermondade et al., 2013)
- i fattori psico-emozionali (Paulson et al., 1988)
- patologie sistemiche varie,
- farmaci,
- agenti chimici e fisici,
- malattie sessualmente trasmesse.

Classificazione ed eziopatogenesi dell'infertilità maschile

La fertilità dell'uomo è garantita dalla normale produzione di liquido seminale, dalla presenza di un numero adeguato di spermatozoi maturi e funzionali e da una normale eiaculazione grazie alla quale gli spermatozoi possono raggiungere le vie genitali femminili.

Uno studio recente ha suggerito l'introduzione di nuovi valori di riferimento per definire lo stato di fertilità maschile valutando i campioni di liquido seminale di 4500 uomini in 14 paesi di vari continenti (Cooper et al., 2010). Il valore dei vari parametri del liquido seminale, corrispondente al quinto percentile, è stato adottato dall'Organizzazione Mondiale della Sanità nell'ultimo manuale per l'esecuzione dello spermioγραμμα pubblicato nel 2010 (Tab. 1).

Tabella 1. Valori di riferimento dei principali parametri del liquido seminale: confronto tra i valori forniti dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) nel 1999 e nel 2010.

Parametri del liquido seminale	OMS 1999	OMS 2010
Volume (ml)	≥ 2	$\geq 1,5$
Concentrazione (milioni/ml)	20	15
Numero totale di spermatozoi (milioni/eiaculato)	40	39
Motilità totale (%)	Non presa in considerazione	$\geq 40\%$
Motilità progressiva (%)	Motilità tipo a $\geq 25\%$ Motilità tipo a+b $\geq 50\%$	$\geq 32\%$
Morfologia: forme normali (%)	$\geq 15\%$	$\geq 4\%$

I valori di riferimento non indicano la fertilità di un soggetto, ma la possibilità o probabilità di determinare un concepimento. Non vanno quindi considerati come parametro assoluto della fertilità maschile, ma devono essere rapportati alla situazione clinica generale del maschio e soprattutto della coppia nel suo complesso.

L'infertilità si instaura tutte le volte in cui si verifica un'alterazione della normale produzione, maturazione, vitalità e liberazione degli spermatozoi. Il maschio infertile, infatti, non riesce a produrre e/o a liberare nell'eiaculato un'adeguata quantità di spermatozoi perfettamente maturi e funzionali (Sharif, 2000).

Le cause di infertilità maschile sono molteplici e possono essere classificate in forme pre-testicolari, testicolari e post-testicolari.

Cause pre-testicolari

Le cause pre-testicolari di infertilità maschile comprendono patologie congenite o acquisite che determinano una produzione deficitaria di gonadotropine (LH, FSH) con conseguente mancata stimolazione della spermatogenesi. Le patologie responsabili di alterata funzione dell'asse ipotalamo-ipofisi-testicolo hanno un'incidenza di circa l'8-10% (Vicari et al., 2006). Le principali cause pre-testicolari sono riassunte nella Tab. 2.

Tabella 2. Principali cause di infertilità maschile a patogenesi pre-testicolare.

Patologie ipotalamiche congenite	• Sindrome di Kallmann • Sindrome di Prader-Willy • Sindrome di Laurence-Moon-Biedl • Altre sindromi
Patologie ipotalamiche acquisite	• Tumori • Radiazioni • Traumi • Sarcoidosi • Emocromatosi • Altro
Patologie ipofisarie	• Adenomi • Craniofaringiomi • Sarcoidosi • Emocromatosi • Traumi

	• Infarti • Altro
Altre malattie endocrine	• Iperprolattinemie • Sindrome di Cushing • Iperplasia surrenalica congenita • Tumori estrogeni o androgeni secernenti • Ipotiroidismo e ipertiroidismo • Altro
Malattie sistemiche	• Epatopatie • Insufficienza renale cronica • Malnutrizione • Obesità • Emocromatosi • Sindrome di Wilson • Altro

Obesità

Anche l'obesità può contribuire all'ipogonadotropinemia e alla infertilità maschile (Sermondade et al., 2012; Reis & Dias, 2012; Hofstra et al., 2008). Sebbene evidenze indicino che l'obesità potrebbe inibire direttamente o attraverso l'insulino-resistenza la normale funzione testicolare, la maggior parte dei dati suggerisce che il principale meccanismo causale dell'ipogonadismo nell'obesità sia la soppressione di LH e FSH.

L'ipogonadismo obesità-indotto potrebbe essere causato da un'aumentata aromatizzazione del T in 17 β -estradiolo (E₂) nel tessuto adiposo periferico, in quanto l'E₂ è un potente inibitore della secrezione di LH. Anche la resistenza alla leptina potrebbe contribuire all'ipogonadismo obesità-indotto. C'è una forte evidenza da studi animali e qualche conferma da un piccolo numero di studi condotti su uomini leptina-deficienti che la leptina sia essenziale per la riproduzione maschile normale (Teerds et al., 2011). In particolare, la leptina sembrerebbe agire attraverso la via della kisspeptina, capace di stimolare il rilascio ipotalamico di GnRH, che a sua volta stimola la secrezione di gonadotropine ipofisarie. Poiché l'obesità è comunemente associata con la resistenza alla leptina, è probabile che il deficit funzionale di leptina contribuisca all'ipogonadismo obesità-indotto.

Cause testicolari

Le cause testicolari sono di gran lunga le cause più frequenti di infertilità maschile (50-70%) (Vicari et al., 2006). Comprendono un gruppo eterogeneo di patologie a carico del testicolo che alterano la normale produzione degli spermatozoi. Le principali cause testicolari sono riassunte nella Tab. 3.

Tabella 3. Principali cause di infertilità maschile a patogenesi testicolare.

Varicocele	• Ha una prevalenza compresa tra l'8 e il 16% nella popolazione generale maschile e una frequenza del 30-40% tra i maschi infertili. Rappresenta una delle cause più frequenti di infertilità maschile.
Patologie genetiche	• Sindrome di Klinefelter • Microdelezioni del braccio lungo del cromosoma Y • Sindrome di Down

	• Distrofia miotonica (sindrome di Steinert)
Criptorchidismo	
Anorchia congenita bilaterale	
Torsioni del funicolo spermatico	
Orchiti	• Virali • Batteriche • Autoimmunitaria
Traumi	
Uso o esposizione a sostanze gonadotossiche	• Fumo di sigaretta • Pesticidi • Farmaci • Solventi • Metalli pesanti • Radiazioni ionizzanti • Altro
Tumori	

Varicocele

Il varicocele è una patologia del testicolo caratterizzata da una dilatazione e da un'incontinenza delle vene testicolari (o spermatiche). Quando queste vene sono dilatate si verifica un reflusso di sangue dall'alto verso il testicolo, che provoca un aumento della temperatura e una condizione ambientale sfavorevole per una normale produzione di spermatozoi (spermatogenesi).

Interessa circa il 10-20% della popolazione generale maschile. Può insorgere già in età preadolescenziale (riscontro nel 2-2,5% dei ragazzi tra i 7 e i 10 anni), ma l'epoca in cui normalmente si manifesta è quella della maturazione sessuale, tra gli 11 e i 16 anni. È interessato soprattutto il testicolo sinistro (95%) e raramente il testicolo destro (5%) per motivi anatomici. Nel 70% dei portatori di varicocele si riscontrano alterazioni più o meno evidenti del liquido seminale. Il varicocele può infatti causare alterazioni della spermatogenesi, quali riduzione del numero degli spermatozoi, alterazioni della motilità e della morfologia, per ipertermia intrascrotale (aumento della temperatura di 1-1,5°C), per reflusso di cataboliti dalla vena surrenalica e/o secondari a fenomeni ischemici.

Una diagnosi precoce è fondamentale per seguire l'evolversi della patologia a carico della funzione riproduttiva. Generalmente la diagnosi di varicocele viene posta in primo luogo con la visita. Una ispezione accurata dello scroto e esame palpatorio adeguato permettono al medico di determinare la presenza di varicosità a livello testicolare e di stadiare clinicamente il varicocele (Tab. 4).

Tabella 4. Stadiazione clinica del varicocele.

Grado	Caratteristiche
Primo	Varici non evidenziabili alla ispezione scrotale, non palpabili in condizione di base, ma evocabili palpatoriamente durante manovra di Valsalva
Secondo	Varici palpabili in condizioni di base in corrispondenza della regione scrotale
Terzo	Varici visibili all'ispezione dello scroto dove assumono sembianze di rilievi serpiginosi superficiali

Dal momento che il varicocele può portare a una compromissione della qualità del liquido seminale, sono indispensabili uno spermioγραμμα e un esame ecografico della regione scrotale combinato ad ecocolor Doppler del plesso pampiniforme che consentirà di ottenere informazioni riguardo i seguenti parametri:

- aumento di calibro delle ectasie venose >3 mm in clinostatismo,
- ulteriore aumento di calibro delle stesse passando dalla condizione di clinostatismo a quella di ortostatismo,
- presenza di segnale colore in basale e/o in corrispondenza degli atti respiratori,
- durata del reflusso venoso espresso in secondi (tra 0,5 e 1 secondo = primo grado; tra 1 e 1,5 secondi = secondo grado; >1,5 secondi = terzo grado).

Microdelezioni del cromosoma Y

Le microdelezioni del cromosoma Y rappresentano una delle cause genetiche-molecolari più frequente dell'infertilità maschile (Krausz et al. 2003). Grazie all'identificazione di sequenze specifiche del cromosoma Y, che ha permesso lo studio su larga scala del suo braccio lungo, sono state distinte tre regioni critiche per la spermatogenesi, chiamate azoospermia factor (AZFa, AZFb e AZFc) (Tiepoli e Zuffardi 1976; Vogt et al. 1996). Tali regioni contengono geni ed unità trascrizionali, la maggioranza dei quali presenta un'espressione testicolare specifica. Ciascun tipo di microdelezione insorge con frequenza diversa nella popolazione ed è associata a quadri clinici distinti di anomalie della spermatogenesi. La microdelezione più frequente è quella della regione AZFc (60%); seguono poi le delezioni della regione AZFb, AZFb+c e AZFa+b+c (35%).

Le delezioni della regione AZFa sono più rare (5%) e sono associate ad azoospermia con un quadro istologico di sindrome a sole cellule di Sertoli (SCOS) di tipo I, ovvero dall'assenza completa di cellule germinali nei tubuli seminiferi. La delezione della regione AZFb determina azoospermia con un quadro istologico di arresto della spermatogenesi. La delezione della regione AZFc (delezione "b2/b4") è quella più frequente ed è associata a quadri istologici variabili dalla SCOS di tipo I e di tipo II (presenza di alcuni tubuli con normale spermatogenesi) e alla ipospermatogenesi.

Cause post-testicolari

Le cause post-testicolari sono responsabili di circa il 20-40% delle infertilità maschili (Vicari et al., 2006). Rientrano in questa categoria tutte quelle condizioni nelle quali si verifica un ostacolo al transito dello sperma lungo le vie escrettrici seminali fino all'orifizio uretrale esterno e/o un'alterazione funzionale delle principali ghiandole sessuali accessorie. Le principali cause post-testicolari sono riassunte nella Tab. 5.

Tabella 5. Principali cause di infertilità maschile a patogenesi post-testicolare.

Sindrome di Kartagener	
Agenesia congenita dei dotti deferenti	• Per mutazione del gene CFTR
Sindrome di Young	
Vasectomia e traumi iatrogeni delle vie escrettrici	• Interventi urologici • Emioplastica
Infezioni a carico delle ghiandole sessuali accessorie maschili (MAGI)	• Responsabili del 1,5-16% delle infertilità maschili (Diemer et al., 2003). Queste possono determinare sia anomalie secretive, in quanto responsabili di importanti modificazioni a carico del plasma seminale, sia anomalie ostruttive, in quanto possono determinare sub-ostruzione monolaterale o bilaterale delle vie

	escretrici (La Vignera et al., 2006)
Anomalie dell'eiaculazione	• Eiaculazione retrograda • Aneiaculazione • Disfunzioni legate a neuropatia diabetica • Malattie del SNC • Lesioni midollari
Disfunzione erettile	
Alterazioni congenite dell'uretra	• Ipospadia • Epispadia

Agenesia bilaterale congenita dei dotti deferenti

Tra le cause post-testicolari di infertilità maschile, ricordiamo le mutazioni a carico del gene CFTR che, nei casi di mutazioni con perdita di funzione più grave, causano la comparsa della fibrosi cistica. Alcune mutazioni nel gene della fibrosi cistica provocano l'assenza congenita bilaterale del vaso deferente (CBAVD), l'assenza congenita unilaterale del vaso deferente (CUAVD) senza manifestazioni a livello dei polmoni o del pancreas, o l'ostruzione del vaso deferente.

L'agenesia bilaterale congenita dei vasi deferenti, trasmessa come carattere autosomico recessivo, costituisce circa il 15% delle cause di infertilità maschile che nel 80% dei casi è riconducibile a mutazioni del gene CFTR. È responsabile del 6-8% dei casi di azoospermia ostruttiva. Il vaso deferente trasporta lo sperma dall'epididimo alle vescicole seminali, perciò una sua anomalia provoca oligozoospermia o azoospermia, a loro volta risultanti in infertilità negli uomini portatori della mutazione associata.

Importanza del ridotto volume testicolare

Il volume testicolare di un soggetto adulto in epoca fertile è compreso tra 15 e 25 ml (Prader, 1966), la normale volumetria testicolare riflette due importanti aspetti funzionali. Da una parte il normale completamento dello sviluppo puberale che si articola didatticamente in cinque stadi e che nella sua fase conclusiva prevede appunto il raggiungimento di un volume target che rientri nel range sopra indicato (Tinggaard et al., 2012; Marshall and Tanner, 1970). Esiste inoltre una certa relazione tra funzione endocrino-spermatogenetica e volume testicolare nel soggetto adulto normale (Condorelli et al., 2013). Classicamente il rialzo delle concentrazioni sieriche di gonadotropine riflette un danno testicolare, relativo alla componente leydigiana (rialzo concentrazioni sieriche LH) e/o della componente tubulare (rialzo concentrazioni sieriche FSH). Opportuno inoltre segnalare che l'interpretazione dell'andamento delle concentrazioni sieriche di altri due ormoni testicolari : Inibina B e Ormone Anti Mulleriano (AMH) in fase prepuberale può rappresentare un importante ausilio per la identificazione dei quadri di danno tubulare pre/per puberale. Fisiologicamente infatti le concentrazioni sieriche di AMH si riducono significativamente procedendo oltre il terzo stadio di sviluppo puberale, abbassandosi ulteriormente nell'ultima fase. La presenza durante la maturazione puberale di un quadro endocrino caratterizzato da : riduzione delle concentrazioni sieriche di Inibina B e/o concentrazioni sieriche elevate o inappropriatamente normali di AMH per età, identificano prematuramente la presenza di una disfunzione del compartimento tubulare ((Tinggaard et al., 2012; Valeri et al., 2013).. E' stato riportato recentemente che nella popolazione maschile italiana in epoca fertile circa il 23% dei soggetti esaminati presenti un volume testicolare < 12 ml (Foresta et al., 2013). Bisogna infine ricordare che la corretta stima del volume testicolare viene effettuata mediante esame ecografico, poiché la determinazione dello stesso mediante orchidometro di Prader (valutazione in corso di esame obiettivo) tende a sovrastimare di circa 2 ml (Sakamoto et al., 2007).

Infertilità idiopatica

Allo stato attuale, la causa dell'infertilità maschile non è identificabile in circa il 20% dei casi e quindi queste forme vengono definite idiopatiche (Menchini-Fabris e Turchi, 1996). All'infertilità idiopatica possono certamente contribuire alcuni stili di vita che costituiscono un rischio per la salute riproduttiva del maschio.

Fertilità maschile e stile di vita

La fertilità maschile nella popolazione occidentale sembra stia diminuendo negli ultimi anni. L'idea di un peggioramento della qualità del liquido seminale è già presente da alcuni decenni. Però solo nel 1992, uno studio condotto da un gruppo di ricercatori danesi ha dimostrato che la concentrazione di spermatozoi si è ridotta negli ultimi 50 anni del 50%, passando da una concentrazione media di 113 milioni/ml nel 1940 a 66 milioni/ml nel 1960 (Carlsen et al., 1992).

Molti epidemiologi si sono interrogati sulle possibili cause di questo fenomeno e sulla sua reale entità. Alle cause più note di infertilità, come le disfunzioni ormonali, il varicocele e il criptorchidismo, oggi si aggiunge l'influenza dell'alimentazione e dell'inquinamento. E' proprio nei paesi industrializzati e più sviluppati che è stata riscontrata una riduzione più significativa dei parametri del liquido seminale, compresa la motilità degli spermatozoi. L'aumentata esposizione ad una serie di sostanze nocive quali polveri sottili, piombo ed ossido di carbonio, presenti nell'aria e in molti cibi può portare ad una aumentata concentrazione delle stesse a livello testicolare, con conseguente riduzione della concentrazione e della qualità degli spermatozoi, del rischio di cancro alla ghiandola mammaria maschile, di criptorchidismo e di ipospadia (Balabanic et al., 2011).

L'alimentazione influenza la fertilità attraverso vari meccanismi. Per esempio, l'assorbimento di alcune sostanze che si accumulano durante il metabolismo può influenzare il sistema ormonale, interferire con la maturazione degli spermatozoi ed infine favorire l'infertilità maschile. Molta attenzione va rivolta anche all'aumento del peso corporeo, soprattutto nei giovani e nei bambini. L'obesità determina un anormale livello di ormoni riproduttivi, un aumento del rilascio di ormoni dal tessuto adiposo ed altri problemi fisici tra cui anche un aumento della temperatura scrotale (Cabler et al., 2010), tutti elementi in grado di danneggiare la produzione degli spermatozoi sia dal punto di vista quantitativo che qualitativo (La Vignera et al., 2011).

La maggiore frequenza di malattie a trasmissione sessuale è uno dei fattori che hanno determinato un aumento della prevalenza di infertilità nel corso degli anni. Questo fenomeno è dovuto all'aumentata frequenza di rapporti sessuali con partner diversi e senza opportuna precauzione. Molti sono i microrganismi che possono causare infezioni delle vie genitourinarie che spesso decorrono in maniera paucisintomatica o del tutto asintomatica e per tale motivo non vengono adeguatamente riconosciute. Ne risulta quindi una cronicizzazione dell'aspetto infettivo-infiammatorio con coinvolgimento progressivo delle varie ghiandole sessuali accessorie maschili.

Da tempo si discute se esista un nesso tra l'uso del telefono cellulare e la scarsa qualità del liquido seminale. Alcune ricerche hanno mostrato un'influenza negativa delle onde elettromagnetiche sugli spermatozoi, in quanto determinano una diminuzione della motilità e della vitalità nemaspermica all'aumentare della durata dell'esposizione. E' emerso in particolare che gli spermatozoi esposti a queste onde aumentano la produzione di radicali liberi dell'ossigeno (ROS). Si stabilisce così una iperproduzione di ROS con conseguente aumento dello stress ossidativo, vera causa del danno (Agarwal et al., 2009; La Vignera et al., 2012).

Il consumo eccessivo di alcool tende a ridurre la sintesi di testosterone e ad accelerare il suo metabolismo; ciò può determinare disfunzione erettile, riduzione del grado di androgenizzazione e infertilità, alla cui insorgenza contribuisce il danno sulle cellule di Sertoli causato dall'assunzione di alcool (La Vignera et al., 2013; Condorelli et al., 2015).

La tabella 6 riporta complessivamente i principali fattori di rischio per infertilità maschile che rappresentano i principali elementi anamnestici da indagare nella stratificazione del rischio individuale.

Tabella 6. Fattori di rischio per infertilità maschile. In rosso : grado severo, in giallo : grado moderato, in verde : grado limitato, in grigio : condizioni da contestualizzare.

Riduzione volume testicolare < 12 ml (mono e bilaterale)
Criptorchidismo (in particolare se trattato > 2 anni di età)
Chemio radio terapia
Tumore testicolare
Torsione funicolo spermatico
Doping
Infezioni tratto genitale
Varicocele
Trauma testicolare
Sostanze d'abuso : fumo, droghe, alcool
Malattie sessualmente trasmesse
Obesità (anche sovrappeso)
Età > 40 anni
Malattie endocrine (iperprolattinemia, testosterone totale < 346 ng/dl)
Alterazioni del metabolismo glico-lipidico
Pregresso trauma cranico
Attività fisica di tipo agonistico
Lavoro con turni notturni o numero di ore eccessive
Uso di telefonia mobile
Storia attiva di LUTS (sintomi basso tratto urinario in età medio-avanzata)
Esposizione a fattori ambientali e occupazionali

Bibliografia essenziale

- Agarwal A, Desai NR, Makker K, Varghese A, Mouradi R, Sabanegh E, Sharma R. Effects of radiofrequency electromagnetic waves (RF-EMW) from cellular phones on human ejaculated semen: an in vitro pilot study. *Fertil Steril*. 2009;92:1318-25.
- Balabanič D, Rupnik M, Klemenčič AK. Negative impact of endocrine-disrupting compounds on human reproductive health. *Reprod Fertil Dev*. 2011;23:403-16.
- Cabler S, Agarwal A, Flint M, du Plessis SS. Obesity: modern man's fertility nemesis. *Asian J Androl*. 2010;12:480-9.
- Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek NE. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ*. 1992; 305:609-13.
- Condorelli R, Calogero AE, La Vignera S. Relationship between Testicular Volume and Conventional or Nonconventional Sperm Parameters. *Int J Endocrinol*. 2013;2013:145792.
- Condorelli RA, Calogero AE, Vicari E, La Vignera S. Chronic consumption of alcohol and sperm parameters: our experience and the main evidences. *Andrologia*. 2015;47:368-79.
- Cooper TG, Noonan E, von Eckardstein S, Auger J, Baker HW, Behre HM, Haugen TB, Kruger T, Wang C, Mbizvo MT, Vogelsong KM. World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Hum Reprod Update*. 2010;16:231-45.
- Foresta C, Garolla A, Frigo AC, Carraro U, Isidori AM, Lenzi A, Ferlin A. Anthropometric, penile and testis measures in post-pubertal Italian males. *J Endocrinol Invest*. 2013;36:287-92.
- Hofstra J, Loves S, van Wageningen B, Ruinemans-Koerts J, Jansen I, de Boer H. High prevalence of hypogonadotropic hypogonadism in men referred for obesity treatment. *Neth J Med*. 2008;66:103–9.
- Howe G, Westoff C, Vessey M, Yeate D. Effects of age, cigarette smoking and other factors on fertility: findings in a large prospective study.” *Br Med J*. 1985;290:1697-700.
- Krausz C., Forti G., McElreavey K. The Y chromosome and male fertility and infertility. *Int J Androl*. 2003;26:70-75.
- La Vignera S, Condorelli R, Vicari E, Calogero AE. Negative impact of increased body weight on sperm conventional and non-conventional flow cytometric sperm parameters. *J Androl*. 2012;33:53-8.
- La Vignera S, Condorelli RA, Balercia G, Vicari E, Calogero AE. Does alcohol have any effect on male reproductive function? A review of literature. *Asian J Androl*. 2013;15:221-5.
- La Vignera S, Condorelli RA, Vicari E, D’Agata R, Calogero AE. Effects of the exposure to mobile phones on male reproduction: a review of the literature. *J Androl*. 2012;33:350-6.
- Marshall WA, Tanner JM. Variations in the pattern of pubertal changes in boys. *Arch Dis Child*. 1970;45:13-23.
- Menchini-Fabris F, Rossi P, Palego P, Simi S, Turchi P. Declining sperm counts in Italy during the past 20 years. *Andrologia*. 1996;28:304.
- Paulason JD, Haarmann BS, Salerno RL, Asmar P. An investigation of the relationship between emotional maladjustment and infertility. *Fertil Steril*. 1988;49:258-62.
- Prader A. Testicular size: assessment and clinical importance. *Triangle*. 1966;7:240-3.
- Rebar RW. Exercise and reproduction. *Semin Reprod Endocrin*. 1983;3:1-88.

- Reis LO, Dias FG. Male fertility, obesity, and bariatric surgery. *Reprod Sci.* 2012;19:778–85.
- Sakamoto H, Saito K, Ogawa Y, Yoshida H. Testicular volume measurements using Prader orchidometer versus ultrasonography in patients with infertility. *Urology.* 2007;69:158-62.
- Schinfeld JS. Effects of athletics on male reproduction and sexuality. *Med Aspects Hum Sex.* 1989;23:67-74.
- Schoysman R. Valutazione del fattore maschile: che cosa è determinante? *Giornale SIFES.* 1994;1:9-16.
- Sermondade N, Faure C, Fezeu L, Lévy R, Czernichow S. Obesity and increased risk for oligozoospermia and azoospermia. *Arch Intern Med.* 2012;172:440–2.
- Sermondade N1, Faure C, Fezeu L, Shayeb AG, Bonde JP, Jensen TK, Van Wely M, Cao J, Martini AC, Eskandar M, Chavarro JE, Koloszar S, Twigt JM, Ramlau-Hansen CH, Borges E Jr, Lotti F, Steegers-Theunissen RP, Zorn B, Polotsky AJ, La Vignera S, Eskenazi B, Tremellen K, Magnusdottir EV, Fejes I, Hercberg S, Lévy R, Czernichow S. BMI in relation to sperm count: an updated systematic review and collaborative meta-analysis. *Hum Reprod Update.* 2013;19(3):221-31.
- Sharif K. Reclassification of azoospermia: the time has come? *Hum Reprod.* 2000;15:237-8.
- Stickler RC. Fattori che influenzano la fertilità. In *Infertilità – Valutazione e trattamento*, Keye WR, Chang RJ, Rebar RW, Soules MR eds. Edizione Italiana Verducci, Roma 1997; 8 – 19.
- Teerds KJ, de Rooij DG, Keijzer J. Functional relationship between obesity and male reproduction: from humans to animal models. *Hum Reprod Update.* 2011;17:667–83.
- Tiepolo L, Zuffardi O. Localization of factors controlling spermatogenesis in the non fluorescent portion of the human Y chromosome long arm. *Hum Genet.* 1976;34:119-24.
- Tinggaard J, Mieritz MG, Sørensen K, Mouritsen A, Hagen CP, Aksglaede L, Wohlfahrt-Veje C, Juul A. The physiology and timing of male puberty. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2012;19:197-203.
- Valeri C, Schteingart HF, Rey RA. The prepubertal testis: biomarkers and functions. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2013;20:224-33.
- Vicari E, La Vignera S, Garrone F, Aiello B, Calogero AE. Terapia ormonale e non ormonale nell'infertilità maschile: indicazioni e nuove prospettive. *Contraccezione Fertilità Sessualità.* 2006;33:236-42.
- Vogt PH, Edelmann A, Kirsch S, Henegariu O, Hirschmann P, Kiesewetter F, Kohn FM, Schill WB, Farah S, Ramos C, Hartmann M, Hartschuh W, Meschede D, Behre HM, Castel A, Nieschlag E, Weidner W, Grone HJ, Jung A, Engel W, Haidl G. Human chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. *Hum Mol Genet.* 1996;5:933-43.
- WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen, fifth edition, 2010.
- Dain L¹, Auslander R, Dirnfeld M. The effect of paternal age on assisted reproduction outcome. *Fertil Steril.* 2011 Jan;95(1):1-8. doi: 10.1016/j.fertnstert.2010.08.029. Epub 2010 Oct 8.
- Dondero F, Mazzilli F, Giovenco P, Lenzi A, Cesararo M. Fertility in elderly men. *J. Endocrinol. Invest.* 1985; 8 (suppl.2): 87.
-

- Meijerink AM¹, Ramos L², Fleischer K², Veltman JA³, Hendriks JC⁴, Braat DD². Influence of paternal age on ongoing pregnancy rate at eight weeks' gestation in assisted reproduction. *Reprod Biomed Online*. 2016 Jan;32(1):96-103. doi: 10.1016/j.rbmo.2015.09.017. Epub 2015 Oct 22.

Poliabortività – fattori maschili

Introduzione

L'aborto spontaneo è la più frequente complicanza della gravidanza. Due o tre consecutivi aborti costituiscono invece una condizione più rara (1-5%), di abortività ripetuta che può riconoscere cause distinte. L'aborto ripetuto infatti riconosce diverse eziologie, spesso anche non identificabili, riconducibili a fattori embrionari, materni o paterni, quali anomalie cromosomiche, disordini trombofilici materni, disfunzioni immunitarie ed endocrinopatie. L'etiologia dell'aborto ripetuto è determinata solamente nel 30% dei casi: nella maggior parte delle condizioni, l'iter diagnostico è focalizzato sulla donna mentre per il maschio il percorso diagnostico è spesso limitato ad un semplice spermioγραμμα.

Negli ultimi anni si è affermata l'idea che l'aborto ripetuto sia il risultato di un background genetico sfavorevole sul quale intervengono fattori immunitari, ambientali legati anche allo spermatozoo. Per quanto riguarda i possibili fattori maschili responsabili, o in gioco come con-causa, di aborto ripetuto sicuramente l'integrità del DNA dello spermatozoo rappresenta un determinante maggiore. Non è sufficiente indagare il cariotipo maschile, poiché alcune anomalie cromosomiche, genetiche e in generale del DNA dello spermatozoo possono essere presenti anche in soggetti con corredo cromosomico normale e che quindi possono derivare da alterazioni intrinseche della spermatogenesi. In questo capitolo tratteremo pertanto di fattori maschili in senso di alterazioni genetiche classiche, aneuploidie spermatiche e frammentazione del DNA. Inoltre, recenti evidenze suggeriscono che anche l'infezione da HPV e l'adesione di HPV allo spermatozoo possano contribuire all'abortività.

Cause genetiche

Le conoscenze attuali relative all'eziologia dell'aborto ripetuto includono un piccolo numero di fattori eziologici noti come certamente causativi e altri fattori implicati solo come possibili agenti causali. Al primo gruppo appartengono le cause genetiche, rappresentate in maniera preponderante dalle anomalie cromosomiche parentali (anomalie cromosomiche che possono essere presenti indistintamente in ambo i membri della coppia) (1). I riarrangiamenti cromosomici bilanciati (sia citogeneticamente che molecularmente bilanciati) non determinano in genere effetti fenotipici in termini malformativi o di compromissione dello sviluppo fisico e mentale del soggetto che ne è portatore, poiché il corredo cromosomico è presente in maniera completa, sebbene sia organizzato in modo diverso (fatto salvo per i casi in cui il punto di rottura cromosomica interrompa, inattivandolo, uno specifico gene responsabile di malattia genetica). I riarrangiamenti cromosomici bilanciati sono però rilevanti nei confronti del rischio riproduttivo del soggetto portatore, in quanto possono causare la formazione di gameti con corredo genetico sbilanciato, e quindi abortività ricorrente e/o prole con sindrome cromosomica. A seconda dello specifico riarrangiamento tale rischio può variare ampiamente.

Si stima che il 2- 4% degli aborti ripetuti sia associato alla presenza di un riarrangiamento cromosomico strutturale bilanciato parentale, e tale anomalia sembra essere meno frequente negli uomini rispetto alle donne. Le anomalie di più frequente riscontro sono rappresentate dalle traslocazioni reciproche bilanciate, che rappresentano la dislocazione di materiale cromosomico tra due cromosomi non omologhi, con una frequenza del 4-6%, più di 50 volte superiore rispetto alla popolazione generale. Seguono le traslocazioni robertsoniane, traslocazioni che si stabiliscono tra due cromosomi acrocentrici, omologhi o non omologhi, comportando la perdita delle braccia corte dei due cromosomi coinvolti per fusione centrica delle braccia lunghe (soprattutto la t(13q;14q) con frequenza 4 volte superiore rispetto alla popolazione generale). Di più raro riscontro sono le fusioni peri o paracentriche, le inversioni cromosomiche, le inserzioni, le anomalie dei cromosomi sessuali, i piccoli cromosomi sovrannumerari e i microriarrangiamenti (2). I cromosomi 4, 7 e 10 sono i più comunemente coinvolti nei partner maschili di donne che hanno avuto esperienza di aborti ripetuti (3).

Anche le condizioni di mosaicismo somatico/gonadico (situazione in cui l'anomalia genetica non è omogeneamente presente nell'individuo ma coinvolge solo talune linee cellulari) per riarrangiamenti cromosomici strutturali degli autosomi, per quanto rare, possono determinare interruzioni spontanee ripetute di gravidanza nei soggetti portatori. L'identificazione del mosaicismo gonadico è molto problematica, essendo asintomatico e criptico per il portatore. Ad

oggi non sono stati pubblicati dati circa il profilo citogenetico dei riarrangiamenti cromosomici strutturali in mosaico e poco è noto in merito al timing, al meccanismo di formazione e di mantenimento degli stessi, né è stata stabilita la prevalenza dei pazienti che ne sono portatori. In letteratura sono stati identificati finora 103 casi di mosaicismo per riarrangiamenti non centromerici in cui sia stato specificato il sesso del portatore. Si osserva una leggera predominanza maschile tra i portatori di mosaicismo per riarrangiamenti bilanciati, mentre emerge una forte predominanza femminile tra i portatori di mosaicismo per riarrangiamenti sbilanciati, suggerendo una selezione specifica per l'uomo contro le cellule anomale piuttosto che la compromissione della gametogenesi maschile, e quindi una prognosi migliore per feti di sesso maschile. I portatori di mosaicismo per riarrangiamenti sbilanciati possono mostrare deficit riproduttivo, infertilità e storia di aborti ricorrenti con la partner.

Nelle coppie che sperimentano aborti ripetuti c'è una notevole predominanza femminile tra i portatori di traslocazioni reciproche, a differenza di una lieve predominanza maschile tra le coppie infertili. Sia nei maschi che nelle femmine la quota di traslocazioni reciproche negli individui infertili è più bassa rispetto alla quota di traslocazioni reciproche presenti nei pazienti con aborti ripetuti. Questi dati sono coerenti con la più bassa frequenza complessiva di portatori di anomalie cromosomiche omogenee tra i pazienti infertili rispetto ai pazienti con storia di aborti (5).

Pertanto, le anomalie cromosomiche strutturali, oltre ad essere un'importante causa di infertilità maschile poiché le rotture dei riarrangiamenti cromosomici possono localizzarsi in corrispondenza di geni per la spermatogenesi o possono determinare un "effetto posizione" su geni funzionalmente importanti per la spermatogenesi (6-8) aumentano il rischio di esiti avversi della gravidanza, rappresentando la più comune causa genetica di aborti spontanei ripetuti e aumentando il rischio di nati morti e di trasmissione di anomalie cromosomiche alla prole, a causa della produzione di un numero più alto di spermatozoi con corredo genetico sbilanciato (9).

Una valutazione completa della coppia che sperimenta l'aborto ripetuto dovrebbe pertanto includere lo studio del cariotipo parentale, ancor più se l'anamnesi genealogica estesa alla famiglia riveli la presenza di altre coppie con poliabortività o altri problemi riproduttivi (sterilità, nascita di bambini con difetti congeniti), in quanto avvalora il sospetto di una traslocazione cromosomica che segrega in vari membri della famiglia. A fronte di accertamenti cromosomici apparentemente negativi, è eventualmente indicata anche l'analisi FISH di tutti i telomeri, tesa ad escludere una traslocazione subtelomerica criptica in un genitore, non rilevabile dalla capacità di risoluzione dell'esame cromosomico standard né dal cariotipo molecolare.

Il counselling genetico trova indicazione in tutti i casi di aborto ripetuto associato ad anomalie cromosomiche nei membri della coppia, e, sulla base della specifica diagnosi formulata, il percorso della coppia potrà prevedere la diagnosi genetica preimpianto o potranno essere fornite le informazioni circa il possibile ricorso a donatori di gameti nei casi in cui l'anomalia genetica parentale individuata provochi sempre aneuploidia dell'embrione, come nel caso delle traslocazioni robertsoniane tra cromosomi omologhi (1).

Le anomalie cromosomiche non sono le uniche responsabili degli aborti ripetuti. Nei casi di aborto ripetuto le anomalie cromosomiche nel prodotto del concepimento sono meno frequenti rispetto ai casi di aborto sporadico, con un'analoga distribuzione dei differenti tipi di anomalie (10). Mutazioni su singolo gene, come quelle associate alla fibrosi cistica o all'anemia falciforme, si associano solo raramente ad aborti ripetuti (1). È raro che sul DNA del materiale abortivo vengano eseguiti approfondimenti molecolari diversi rispetto al cariotipo standard. Esami genetici mirati, come la ricerca di CNV (copy number variation) e la ricerca di mutazioni puntiformi su singolo gene, vengono svolti solo in alcuni centri e su specifico sospetto clinico postulato in base alle notizie anamnestiche familiari e relative alla gravidanza e ad eventuali segni clinici embrio-fetali, inclusi quelli raccolti mediante lo studio dismorfologico del prodotto del concepimento svolto al momento dell'espulsione. Non sono pertanto disponibili dati relativi all'impatto che le malattie monogeniche e i disturbi genomici da microdelezione/microduplicazione cromosomica possano avere negli aborti ripetuti, né se esista una predominanza degli stessi nei gameti maschili o femminili. Tuttavia, per completezza e a livello più strettamente didattico, è possibile annoverare tra i fattori genetici maschili (ma non esclusivamente maschili) causativi di aborti ripetuti l'eventuale presenza di condizioni di mosaicismo germinale (ovvero mutazione genetica confinata unicamente al DNA degli spermatozoi) per specifiche malattie autosomiche dominanti e X-linked a fenotipo tanto grave da compromettere lo sviluppo embrio-fetale, condizionando l'interruzione spontanea e ripetuta della gravidanza. Nel caso invece di patologie genetiche a trasmissione autosomica recessiva, all'eventuale fattore maschile dato dallo stato di portatore sano eterozigote di mutazione recessiva (sia in forma omogenea che in forma di mosaico coinvolgente le cellule germinali) dovrà combinarsi un evento mutazionale sulla copia allelica materna, o come evento "de novo" generatosi al momento della generazione dell'embrione o come condizione ereditata dal genoma materno (partner femminile portatrice sana).

Aneuploidie spermatiche

Spermatozoi aneuploidi possono essere riscontrati sia in soggetti con alterazione cromosomica costitutiva, sia in soggetti con cariotipo normale. In caso di aborto ripetuto è pertanto pertinente studiare la costituzione cromosomica dello spermatozoo, espressione del contributo paterno allo sviluppo del futuro embrione (11-13).

I primi studi che analizzavano indirettamente la costituzione cromosomica dello spermatozoo risalgono agli anni '70 del secolo scorso ed utilizzavano la tecnica dell'iniezione spermatica negli ovociti di hamster. Ad oggi la metodica maggiormente utilizzata è l'applicazione della FISH (fluorescence in-situ hybridization) sui nuclei spermatici (12). In contrasto con il test di hamster in cui una serie di esperimenti sono spesso necessari per ottenere un numero di metafasi di studio relativamente basso (circa 100 se la penetrazione degli spermatozoi negli ovociti di criceto è buono), l'uso della FISH mediante sonde specifiche per i singoli cromosomi consente lo studio di migliaia di spermatozoi (in interfase) in un tempo relativamente breve anche nei pazienti con criptozoospermia/grave oligozoospermia.

Gli studi di letteratura che hanno analizzato il ruolo delle alterazioni cromosomiche spermatiche negli aborti ripetuti sono scarsi ed estremamente variabili fra loro in relazione al disegno ed al tipo di cromosomi studiati. Rubio *et al.* (1999) in un lavoro prospettico su 12 coppie con due o più aborti spontanei nel primo trimestre, studiando le aneuploidie spermatiche per i cromosomi 13, 18, 21, X e Y, hanno documentato un incremento significativo delle alterazioni per i cromosomi sessuali in questi maschi rispetto ad un gruppo di controllo interno (0.84% vs 0.37%), dato confermato dagli stessi autori in un successivo studio su 40 coppie con le stesse caratteristiche (14, 15). Carrell *et al.*, studiando gli stessi cromosomi spermatici in 24 partner di donne con abortività ripetuta idiopatica, hanno anch'essi riscontrato un significativo incremento delle aneuploidie spermatiche ($2.77\% \pm 0.22\%$) rispetto alla popolazione generale con le stesse caratteristiche ($1.48 \pm 0.12\%$) e ad un gruppo di controllo fertile ($1.19 \pm 0.11\%$) (16). In un altro studio, privo però di gruppi di controllo, su un totale di 14 coppie con normale mappa cromosomica ed assenza di cause anatomiche, immunologiche ed endocrine di aborto ripetuto, è stata riscontrata una percentuale aumentata di aneuploidie spermatiche (16.5%) rispetto al dato pre-concezionale (4.6%) (17). Ancora, in un elegante studio di Bernardini *et al.* (18) su 20 maschi di coppie con aborto ripetuto nel primo trimestre, sono stati valutati separatamente i cromosomi 1-17, 8-18 ed i cromosomi sessuali; inoltre in un sottogruppo è stata eseguita FISH aggiuntiva per i cromosomi 4, 7, 12, 13,

15,18, 21 e 22 sulla base dei dati disponibili inerenti il cariotipo del prodotto del concepimento abortivo. Ebbene un tasso marcatamente aumentato di disomie spermatiche (14.5-15.5%) è stato riscontrato in due casi; per altri tre pazienti il tasso cumulativo di disomie per i cromosomi 1, 17, 8, 18, X e Y risultava aumentato ma in maniera meno marcata (7.8-9.5%); infine per i rimanenti 15 casi la frequenza delle aneuploidie spermatiche risultava moderatamente aumentata o normale. Gli autori evidenziavano che maschi di coppie con abortività ripetuta ed alterazioni numeriche e/o qualitative seminali presentavano un tasso di aneuploidie ed in particolare diploidie maggiore dei maschi con normali parametri seminali (con o senza aborto ripetuto). Questa evidenza è stata confermata da un più recente studio retrospettivo su una vasta popolazione di maschi di coppie con aborto ripetuto (140 uomini) su gravidanza spontanea e/o dopo cicli di procreazione medicalmente assistita (PMA). Il 40% di tali soggetti con normale concentrazione/motilità spermatica presentava alterazione dei cromosomi spermatici (13, 18, 21, X e Y) rispetto a soggetti di controllo; inoltre all'interno del gruppo di coppie con aborto ripetuto, maschi con oligoastenoteratozoospermia manifestavano una più alta percentuale di aneuploidie spermatiche rispetto ai soggetti normozoospermici (19). Infine, uno studio caso-controllo evidenzia come in 11 partner di coppie con abortività ricorrente più del 60% dei soggetti presenta errori meiotici coinvolgenti il cromosoma 16 suggerendo che le disomie paterne di tale cromosoma possano avere un peso paritario alle disomie materne sul corredo cromosomico fetale (20).

I dati di letteratura, sebbene scarsi, sembrano concordi pertanto nell'evidenziare che maschi di coppie con abortività ricorrente presentino un aumento delle alterazioni dei cromosomi spermatici studiate mediante FISH che possono tradursi in un aumentato rischio di aneuploidie nel prodotto del concepimento. È pertanto ipotizzabile che tali coppie possano beneficiare della diagnostica genetica pre-impianto (PGD) anche se i dati finora disponibili sembrano documentare che la FISH prima della PGD non migliori l'outcome in coppie con prognosi riproduttiva sfavorevole in particolare con abortività ripetuta (21).

Come sottolineato da una recente review sull'argomento (22), ancor oggi le indicazioni per eseguire l'analisi delle aneuploidie spermatiche mediante FISH nella pratica clinica ed il beneficio che tale indagine può avere in coppie con outcome riproduttivo sfavorevole (in particolare con aborti ricorrenti) rimangono dibattute e controverse.

Frammentazione del DNA spermatico

Negli ultimi anni un sempre maggior numero di studi ha riportato che la valutazione della frammentazione del DNA spermatico può rappresentare un parametro diagnostico per l'infertilità maschile in associazione all'esame del liquido seminale. Sebbene uno spermatozoo con DNA frammentato possa comunque fertilizzare l'ovocita (23), eventuali frammentazioni nel DNA paterno che non vengono riparate dalla cellula uovo (soprattutto quelle a doppia elica di DNA) avranno conseguenze sullo sviluppo embrionale e fetale e quindi sul successo della gravidanza. Non è infrequente che coppie senza un evidente fattore di infertilità femminile o maschile non riescano a concepire: è probabile che in queste coppie sia presente un fattore genetico maschile di infertilità, che comprende danni al DNA, alterazioni meiotiche o aneuploidie spermatiche.

Come accennato in precedenza, in seguito a fertilizzazione da spermatozoo con DNA frammentato, l'ovocita possiede i necessari meccanismi di riparazione del DNA, i quali però sono altamente influenzati dalla qualità genomica e citoplasmatica della cellula uovo, a loro volta fortemente età-dipendente. Anche la qualità del DNA spermatico dipende dall'età paterna (24), andando ulteriormente ad aggravare le probabilità di gravidanza in coppie di età avanzata (25).

Sulla base di queste evidenze, diventa quindi fondamentale comprendere la patogenesi della frammentazione del DNA spermatico. Si possono classificare cinque meccanismi di danno al DNA nella cellula spermatica: 1) alterata apoptosi durante la spermatogenesi; 2) rotture del filamento di DNA durante il rimodellamento cromatinico nella spermiogenesi; 3) frammentazione post-testicolare del DNA indotta da radicali liberi dell'ossigeno (ROS) durante la fase di trasporto degli spermatozoi lungo i tubuli seminiferi e l'epididimo; 4) frammentazione indotta da caspasi e endonucleasi endogene; 5) danno al DNA indotto da fattori esogeni quali: radioterapia, chemioterapia, inquinanti ambientali. Tra questi cinque meccanismi, quello che gioca un ruolo preponderante è la frammentazione post-testicolare durante il viaggio dello spermatozoo lungo l'epididimo: le cellule spermatiche nell'eiaculato o nella cauda epididimale mostrano infatti livelli di frammentazione del DNA maggiori rispetto a spermatozoi testicolari (26). Studi recenti hanno dimostrato come spermatozoi immaturi, attraverso l'elevata produzione di ROS, possano indurre danni al DNA in spermatozoi maturi in seguito alla spermiiazione, durante la quale si verifica una co-migrazione di cellule spermatiche mature e immature dai tubuli seminiferi alla cauda dell'epididimo (27). Inoltre, anche le cellule epiteliali dell'epididimo possono avere un ruolo nella frammentazione del DNA spermatico indotta da ROS in maniera diretta, oppure indirettamente

attraverso l'attivazione di caspasi e endonucleasi, in seguito a fattori esogeni come elevate temperature o fattori ambientali. Se il danno è causato in maniera diretta da ROS, l'uso di antiossidanti è in grado di limitare il danno al DNA (26). In particolare, il danno diretto da ROS induce principalmente rotture a singolo filamento della doppia elica di DNA, mentre danni di tipo indiretto (attivazione caspasi e endonucleasi, fattori esogeni) generano principalmente rotture a doppio filamento. Mentre il primo tipo di danno può essere riparato dall'ovocita o dall'embrione, il secondo è nella maggior parte dei casi impossibile da riparare ed è quindi incompatibile con un corretto sviluppo embrionale e fetale.

Diventa quindi di fondamentale importanza saper individuare e riconoscere le frammentazioni del DNA spermatico. A questo scopo, diversi tests sono stati introdotti nel corso degli ultimi anni e includono: TUNEL, comet test, SCSA, SCD e γ -H2AX. Diversi studi hanno mostrato come la frammentazione del DNA spermatico possa influenzare significativamente il successo di gravidanza, tuttavia la maggior parte dei tests utilizzati non è in grado di distinguere danni a singolo filamento da quelli a doppio filamento, né esistono valori di riferimento universalmente riconosciuti per questi test. Molto recentemente è stato dimostrato che la fosforilazione dell'istone H2AX è un valido indicatore del danno a doppio filamento del DNA spermatico e questo test si è dimostrato infatti più sensibile rispetto al test TUNEL nel predire il successo di gravidanza dopo ICSI in coppie infertili (28).

Indipendentemente dalla metodica utilizzata, numerosi studi hanno evidenziato un'associazione tra frammentazione del DNA ed outcome riproduttivo, sulla base dei quali una recente meta-analisi ha infatti confermato come un'elevata percentuale di frammentazione del DNA spermatico si associ a elevata frequenza di aborto e ridotta probabilità di gravidanza (29).

Già Carrel et al (56), in uno studio condotto su partners maschi di donne con abortività spontanea, avevano osservato che la percentuale di frammentazione del DNA (DFI) era statisticamente aumentata rispetto al gruppo di controllo, in assenza di evidenti differenze significative dei parametri seminali. Al contrario Brahem (57) aveva notato un'associazione tra conta nemaspermica e indice di frammentazione.

Carlini et al (58), in uno studio condotto su 112 maschi di coppie che riportavano nella storia riproduttiva due o più aborti ricorrenti dopo concepimento naturale, hanno evidenziato che il DFI era statisticamente più alto rispetto al gruppo di controllo ma sovrapponibile al gruppo di uomini con infertilità idiopatica. Allo stesso tempo il DFI correlava positivamente con il fattore età, in accordo con quanto già descritto da Cohen-Bacrie et al (59). Gli Aa non hanno osservato nessuna differenza per quanto riguarda i parametri seminali.

L'effetto del DFI differisce a seconda della tecnica di PMA utilizzata: l'associazione tra frammentazione del DNA e ridotto tasso di gravidanza risulta significativa solo dopo IVF e non ICSI (30). Questa discordanza può essere giustificata dalla selezione spermatica durante ICSI, che permette di rimuovere gli spermatozoi con morfologia anormale, che è il principale parametro seminale correlato all'aumentata frammentazione del DNA (31). Tuttavia attraverso ICSI si va ad annullare l'effetto delle barriere di selezione naturale durante il processo di fertilizzazione, e infatti nella stessa meta-analisi si evidenzia come il tasso di aborto in presenza di elevata frammentazione del DNA sia significativamente aumentato solo dopo ICSI ma non IVF (30). Tuttavia, l'elevato tasso di aborto spontaneo riportato in diversi lavori dopo ICSI/IVF (29) in uomini con elevata frequenza di frammentazione del DNA spermatico suggerisce che gli effetti deleteri del danno al DNA persistano ugualmente a prescindere dalla tecnica utilizzata, lasciando aperto quindi il dibattito sul miglior approccio clinico per la PMA in presenza di elevata frammentazione del DNA spermatico.

Dai dati di letteratura si deduce che un aumento del DFI si associa ad una diminuita capacità riproduttiva sia in termini di fertilizzazione che di outcome della gravidanza. Sebbene l'indice di frammentazione del DNA si presenta aumentato nei maschi di coppie affette da abortività ricorrente e pertanto proporsi come marker di fattore maschile, non può però essere considerato come predittivo per il rischio di abortività ricorrente.

Se la frammentazione del DNA spermatico risulta come uno dei fattori limitanti in una coppia infertile, allora una strategia volta a ridurre i livelli di frammentazione del DNA dovrebbe portare a un aumento di probabilità di successo della gravidanza in coppie senza causa apparente di infertilità, suggerendo quindi la necessità di diagnosi del danno al DNA con le metodologie più opportune. Soprattutto l'identificazione e selezione di una popolazione, o di un singolo spermatozoo con DNA integro diventa un punto cruciale nel contesto della PMA.

Ruolo dell'HPV

Il Papillomavirus umano o HPV (acronimo di Human Papilloma Virus) è un adenovirus, che appartiene ad una famiglia di più di 150 genotipi (32). Gli HPV sono virus nudi (senza pericapside), possiedono un capside icosaedrico con un diametro attorno a 50 nm, formato da 72 capsomeri che possono essere pentameri o esameri. Ciascun capsomero dà origine a una protuberanza che ha una forma simile a una stella a cinque punte con un canale al centro. Il capside contiene un genoma costituito da DNA circolare a doppio filamento lungo 8 Kb che codifica per otto geni precoci (early, da E1 a E8) e due geni tardivi (late, L1 e L2) (33).

HPV è un virus ubiquitario che colpisce sia uomini che donne, sessualmente trasmissibile (34). Dei genotipi completamente sequenziati, 12 (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59) sono stati definiti come ad alto rischio a causa della loro forte associazione con diverse neoplasie (35); mentre la maggior parte sono molto raramente associati a neoplasie e sono quindi classificati come a basso rischio, potendo per lo più causare infezioni subcliniche o papillomi benigni, e che possono persistere per mesi o anni, fino a quando non sono debellati dal sistema immunitario dell'ospite (34).

Le proteine precoci del virus hanno lo scopo di favorire la crescita e la divisione della cellula; l'HPV può infatti replicare solo nelle cellule in replicazione, in quanto non codifica per una DNA polimerasi propria, ma ha bisogno della polimerasi della cellula ospite, che viene sintetizzata nelle cellule in attiva divisione. Le cellule bersaglio del virus sono la cute e le mucose, due tessuti che si rigenerano in continuazione. Il virus induce la crescita degli strati basale e spinoso dell'epidermide (acantosi) o dello strato superficiale della mucosa (36).

Considerando l'infezione da HPV nel sesso maschile sono disponibili pochi dati, anche se negli ultimi anni l'interesse scientifico è cresciuto e ha dato luogo a diversi recenti lavori. Generalmente la sintomatologia HPV-correlata nel maschio può manifestarsi con lesioni delle mucose rilevate all'esame clinico oppure con patologie più complesse causate da genotipi ad elevato indice oncogeno. Nella maggior parte dei casi, l'infezione da HPV è asintomatica, mentre le manifestazioni sintomatiche più frequenti sono i condilomi acuminati, i papillomi laringei e le forme neoplastiche della regione anogenitale e localizzate all'ano ed al pene. (37).

Recentemente ha suscitato grande interesse il rilevamento di HPV DNA nell'uretra, nei dotti deferenti, nell'epididimo e nel testicolo: dati recenti di letteratura hanno documentato la presenza del virus nel liquido seminale richiamando perciò maggiore attenzione al problema. Ancora infezione da HPV è stata dimostrata non solo in maschi con fattori di rischio per il virus ma anche in soggetti sessualmente attivi asintomatici ed in soggetti con storia di infertilità. In presenza di infezione da HPV è stata anche riscontrata una alterazione dei parametri seminiologici, in particolare modo la motilità. La presenza di glicosaminoglicani o altri fattori solubili sulla superficie dello spermatozoo si ritiene possano mediare l'interazione e il legame tra HPV e spermatozoo (38), ipotesi confermata dalla presenza della proteina del capsido L1 e del glicosaminoglicano syndecan - 1 nella regione equatoriale del testa dello spermatozoo (39). Un recente lavoro di Laprise ha stimato la prevalenza di HPV nel liquido seminale in circa il 10% (95% CI: 7-14%) degli uomini nella popolazione generale e addirittura nel 16% (95% CI: 10-23%) degli uomini affetti da inspiegabile infertilità (40). Infatti, evidenze recenti dimostrano una possibile correlazione tra infezione da HPV nel liquido seminale e casi di astenozoospermia idiopatica (39, 41, 42). Il gruppo di Lee fu uno dei primi a dimostrare che spermatozoi incubati per 24 ore con frammenti di DNA di HPV tipo 6,11,16,18 o 31, mostravano una diminuzione della motilità progressiva e una ridotta capacità di spostamento laterale della testa (43). Questi risultati sono stati successivamente confermati in differenti studi in vivo (39, 44) nei quali gli autori, utilizzando il Mar-Test, segnalavano una percentuale significativamente più alta di ASA nei soggetti HPV positivi rispetto ai soggetti non infetti, sottolineando come in quei soggetti con spermatozoi in cui HPV-DNA era adeso alla superficie e con Mar-Test positivo, la motilità degli spermatozoi era ulteriormente compromessa e che la prevalenza di HPV era in accordo con la presenza di ASA (45).

La più alta prevalenza di ASA nel liquido seminale di uomini HPV positivi portano a ipotizzare che la motilità degli spermatozoi possa essere compromessa attraverso un meccanismo immunitario che non è ancora ben compreso. In particolare, non è del tutto chiaro se ASA reagiscono direttamente con la superficie dello spermatozoo o, in caso contrario, se si legano ad HPV ancorato alla cellula spermatica (38). Ad oggi, sulla base delle prove in vitro, il meccanismo molecolare putativo che possa giustificare le alterazioni dei parametri seminali relative all' HPV è l'aumento del tasso di frammentazione del DNA degli spermatozoi e di apoptosi (46, 47).

Alcuni lavori hanno dimostrato come lo spermatozoo possa trasportare il DNA di HPV esogeno e potenzialmente agire come un vettore che trasmette HPV al partner sessuale, nonché ad un feto attraverso l'ovocita fecondato (48). In modelli murini, spermatozoi infettati da HPV riuscivano a fecondare ovociti con successo, cui seguiva successiva espressione genica nella massa cellulare interna e nel trofoectoderma della blastocisti primordiale (49).

Utilizzando il test di penetrazione degli spermatozoi nella cellula uovo di criceto, Foresta e collaboratori hanno dimostrato in modo simile che lo spermatozoo umano può trasferire i geni E6 / E7 ed L1 all'ovocita, con conseguente espressione genica nella blastocisti in via di sviluppo (50). L'espressione dei geni E6 / E7 è stata correlata all'aumento della frammentazione del DNA e alla morte del trofoblasto nella blastocisti (51). Oltre al suo impatto sulla crescita del trofoblasto, HPV sembra ridurre l'impianto endometriale delle cellule trofoblastiche, aumentando così la teoria di rischio di aborto spontaneo HPV correlato (52).

Queste osservazioni suggeriscono il possibile effetto negativo di HPV sulle prime fasi di sviluppo embrionale, confermate da diversi lavori. In uno studio condotto su 108 i pazienti con aborti spontanei, il DNA di HPV 16 e 18, era rilevato nel 7,4% di tutti i feti testati (53). In un altro studio confrontando 25 aborti spontanei con 15 interruzioni volontarie di gravidanza, le sequenze di HPV E6 / E7 erano rilevate nel 60 % e nel 20 % rispettivamente (54). Lo studio di Garolla e collaboratori (55) ha valutato l'esito riproduttivo di 226 coppie infertili sottoposte a tecniche di riproduzione assistita (ART) con o senza papillomavirus umano nello sperma. In cinquantaquattro partner di sesso maschile (23,9%) era stata riscontrata l'infezione da HPV confinata alla superficie dello spermatozoo, sulle cellule di esfoliazione o in entrambe. Durante il periodo di diagnosi, le coppie con partner maschile non infetto avevano ottenuto gravidanze spontanee. ART erano state eseguite in 158 coppie HPV negative e 54 coppie HPV positive, con il 38,4% e il 14,2% di tassi di gravidanza cumulativo, rispettivamente. Il follow-up delle gravidanze mostrava un tasso di aborto spontaneo più elevato nelle coppie infette (62,5% vs 16,7%), e le gravidanze in corso di quest'ultimo gruppo erano caratterizzate dalla presenza di HPV confinata solo sulle cellule di esfoliazione.

Conclusioni

Nonostante la cause di abortività ripetuta rimangano spesso inspiegate, negli ultimi anni si sono chiariti alcuni meccanismi, o fattori di rischio, legati al contributo paterno e in particolar modo allo spermatozoo. La coppia con abortività ripetuta deve perciò intraprendere un percorso andrologico sottoponendo il maschio ad approfondimenti diagnostici. In ottica PMA tale percorso potrebbe essere di ausilio laddove vengano sperimentati insuccessi terapeutici. In questo senso, le indagini genetiche, le analisi sul DNA dello spermatozoo e la ricerca di HPV nel liquido seminale dovrebbero essere eseguite in tutte le coppie che affrontano un percorso di PMA, dal momento che tali indagini hanno anche un ruolo prognostico e quindi non andrebbero riservate solo alle coppie che sperimentano aborti ripetuti.

Bibliografia

1. Ford HB, Schust DJ. Recurrent pregnancy loss: etiology, diagnosis, and therapy. *Rev Obstet Gynecol*. 2009 Spring;2(2):76-83.
2. Lejeune V. Early recurrent spontaneous abortion: How to take care in 2006?. *Gynecol Obstet Fertil*. 2006 Oct;34(10):927-37.
3. Zhang M, Fan HT, Zhang QS, Wang XY, Yang X, Tian WJ, Li RW. Genetic screening and evaluation for chromosomal abnormalities of infertile males in Jilin Province, China. *Genet Mol Res*. 2015 Dec 8;14(4):16178-84.
4. Kochhar PK, Ghosh P. Reproductive outcome of couples with recurrent miscarriage and balanced chromosomal abnormalities. *J Obstet Gynaecol Res*. 2013 Jan;39(1):113-20.
5. Kovaleva NV, Cotter PD. Somatic/gonadal mosaicism for structural autosomal rearrangements: female predominance among carriers of gonadal mosaicism for unbalanced rearrangements. *Mol Cytogenet*. 2016 Jan 28;9:8.
6. Harton GL, Tempest HG. Chromosomal disorders and male infertility. *Asian J Androl*. 2012 Jan;14(1):32-9.
7. Ching CB, Ko E, Hecht B, Smith M, Sabanegh E. Presentation and treatment of subfertile men with balanced translocations: the cleveland clinic experience. *Curr Urol*. 2012 May;6(1):37-42.
8. Olesen C, Hansen C, Bendtsen E, Byskov AG, Schwinger E, Lopez-Pajares I, Jensen PK, Kristoffersson U, Schubert R, Van Assche E, Wahlstroem J, Lespinasse J, Tommerup N. Identification of human candidate genes for male infertility by digital differential display. *Mol Hum Reprod*. 2001 Jan;7(1):11-20.
9. Godo A, Blanco J, Vidal F, Anton E. Accumulation of numerical and structural chromosome imbalances in spermatozoa from reciprocal translocation carriers. *Hum Reprod*. 2013 Mar;28(3):840-9.
10. Stephenson MD, Awartani KA, Robinson WP. Cytogenetic analysis of miscarriages from couples with recurrent miscarriage: a case-control study. *Hum Reprod*. 2002 Feb;17(2):446-51.
11. Nicolaidis P and Petersen MB. Origin and mechanisms of non-.disjunction in human autosomal trisomies. *Hum Reprod* 1998; 13: 313-319.
12. Egozcue J, Blanco J, Vidal F. Chromosome studies in human sperm nuclei using fluorescence in-situ hybridization (FISH). *Hum Reprod Update* 1997; 3: 441-452.
13. Egozcue S, Blanco J, Vendrell J, Garcia F, Veiga A, Aran B, Barri PN, Vidal F, Egozcue J. Human male infertility: chromosome anomalies meiotic disorders, abnormal spermatozoa and recurrent abortion. *Hum Reprod Update* 2000; 6: 93-105.

14. Rubio C, Simon C, Blanco J, Vidal F, Minguez Y, Egozcue J, Crespo J, Remohí J, Pellicer A. Implications of sperm chromosome abnormalities in recurrent miscarriage. *J Ass Reprod Genet* 1999; 16(5): 253-258.
15. Rubio C, Gil-Salom M, Simon C, Vidal F, Rodrigo L, Minguez Y, Remohí J, Pellicer A. Incidence of sperm chromosomal abnormalities in a risk population: relationship with sperm quality and ICSI outcome. *Hum Reprod* 2001; 16(10): 2084-2092.
16. Carrell DT, Wilcox AL, Lowy L, Peterson CM, Jones KP, Erickson L, Campbell B, Branch DW, Hatasaka HH. Elevated sperm chromosome aneuploidy and apoptosis in patients with unexplained recurrent pregnancy loss. *Obstet Gynecol* 2003; 101(6): 1229-1235.
17. Al-Hassan S, Hellani A, Al-Shahrani A, Al-Deery M, Jaroudi K, Coskun S. Sperm chromosomal abnormalities in patients with unexplained recurrent abortions. *Arch Androl* 2005; 51(1): 69-76.
18. Bernardini LM, Costa M, Bottazzi C, Gianaroli L, Magli MC, Venturini PL, Francioso R, Conte N, Ragni N. Sperm aneuploidy and recurrent pregnancy loss. *Reprod Biomed Online* 2004; 9(3): 312-320.
19. Ramasamy R, Scovell JM, Kovac JR, Cook PJ, Lamb DJ, Lipshultz LI. Fluorescence in situ hybridization detects increased sperm aneuploidy in men with recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril* 2015; 103(4): 906-909.
20. Neusser M, Rogenhofer N, Durl S, Ochsenkuhn R, Trottmann M, Jurinovic V, Steinlein O, von Schonfeldt V, Muller S, Thaler CJ. Increased chromosome 16 disomy rates in human spermatozoa and recurrent spontaneous abortions. *Fertil Steril* 2015; 104(5): 1130-1137.
21. Kahraman S, Findikli N, Biricik A, Oncu N, Ogur C, Sertyel S, Karlikaya G, Karagozoglu H, Saglam Y. Preliminary FISH studies on spermatozoa and embryos in patients with variable degrees of teratozoospermia and a history of poor prognosis. *Reprod Biomed Online* 2006; 12(6): 752-761.
22. Caseiro AL, Regalo A, Pereira E, Esteves T, Fernandes F, Carvalho J. Implication of sperm chromosomal abnormalities in recurrent abortion and multiple implantation failure. *Reprod Biomed Online* 2015; 31: 481-485.
23. Gandini L, Lombardo F, Paoli D, Caruso F, Eleuteri P, Leter G, et al. Full-term pregnancies achieved with ICSI despite high levels of sperm chromatin damage. *Hum Reprod* 2004;19:1409–17.
24. Wyrobek AJ, Eskenazi B, Young S, Arnheim N, Tiemann-Boege I, Jabs EW, et al. Advancing age has differential effects on DNA damage, chromatin integrity, gene mutations, and aneuploidies in sperm. *PNAS* 2006;103:9601–6.

25. Belloc S, Cohen-Bacrie P, Benkhalifa M, CohenBacrie M, De MJ, Hazout A, et al. Effect of maternal and paternal age on pregnancy and miscarriage rates after intrauterine insemination. *Reprod Biomed Online* 2008;17:392–7.
26. Greco E, Scarselli F, Iacobelli M, Rienzi L, Ubaldi F, Ferrero S, et al. Efficient treatment of infertility due to sperm DNA damage by ICSI with testicular spermatozoa. *Hum Reprod* 2005;20: 226–30.
27. Ollero M, Gil-Guzman E, Lopez MC, Sharma RK, Agarwal A, Larson K, et al. Characterization of subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: implications in the diagnosis and treatment of male infertility. *Hum Reprod* 2001;16: 1912–21.
28. Garolla A, Cosci I, Bertoldo A, Sartini B, Boudjema E, Foresta C. DNA double strand breaks in human spermatozoa can be predictive for assisted reproductive outcome. *Reprod Biomed Online*. 2015;31(1):100-7. doi: 10.1016/j.rbmo.2015.03.009.
29. Osman A, Alsomait H, Seshadri S, El-Toukhy T, Khalaf Y. The effect of sperm DNA fragmentation on live birth rate after IVF or ICSI: a systematic review and meta-analysis. *Reprod Biomed Online*. 2015;30(2):120-7.
30. Zhao J, Zhang Q, Wang Y, Li Y. Whether sperm deoxyribonucleic acid fragmentation has an effect on pregnancy and miscarriage after in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*. 2014;102(4):998-1005.e8.
31. Sun JG, Jurisicova A, Casper RF. Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. *Biol Reprod* 1997;56:602–7.
32. Doorbar J et al. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine* 2012;30:F55–F70.
33. Stanley M. Pathology and epidemiology of HPV infection in females. *Gynecol Oncol* 2010; 117 (suppl 2):S5–S10.
34. Bosch FX et al. Comprehensive control of human papillomavirus infections and related diseases. *Vaccine* 2013;30:H1–H31.
35. Cid Arregui A, Gariglio P, Kanda T & Doorbar J. Oncogenic human papillomaviruses: high-risk human papillomaviruses: towards a better understanding of the mechanisms of viral transformation, latency and immune-escape. *Open Virol J* 2012;6:160–162.
36. Castellsagué X. Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. *Gynecol Oncol* 2008;110 (suppl 2):S4–S7.
37. Lenzi A. et al. Rome Consensus Conference – statement; human papilloma virus diseases in males. *BMC Public Health* 2013;13:117.

38. Foresta C, Garolla A, Zuccarello D et al. Human papillomavirus found in sperm head of young adult males affects the progressive motility. *Fertil Steril* 2010;93:802–806.
39. Garolla A. et al. Association, prevalence, and clearance of human papillomavirus and antisperm antibodies in infected semen samples from infertile patients. *Fertil Steril* 2013;99:125–131.
40. Laprise C, Trottier H, Monnier P, Coutlee F & Mayrand MH. Prevalence of human papillomaviruses in semen: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod* 2014;29:640–651.
41. Schillaci R. et al. Detection of oncogenic human papillomavirus genotypes on spermatozoa from male partners of infertile couples. *Fertil Steril* 2013;100:1236–1240.
42. Gizzo S. et al. Male and couple fertility impairment due to HPV DNA sperm infection: update on molecular mechanism and clinical impact—systematic review. *Biomed Res Int*, Article ID 230263, doi:10.1155/2014/783598. (2014)
43. Lee CA, Huang CT, King A & Chan PJ. Differential effects of human papillomavirus DNA types on p53 tumor-suppressor gene apoptosis in sperm. *Gynecol Oncol* 2002;85:511–516.
44. Foresta C et al. Clinical and prognostic significance of human papillomavirus DNA in the sperm or exfoliated cells of infertile patients and subjects with risk factors. *Fertil Steril* 2010;94:1723–1727.
45. Garolla A et al. Testicular cancer and HPV semen infection. *Front Endocrinol* 2012;3:172.
46. Brossfield JE, Chan PJ, Patton WC & King A. Tenacity of exogenous human papillomavirus DNA in sperm washing. *J Assist Reprod Genet* 1999;16:325–328.
47. Connelly et al. Human sperm deoxyribonucleic acid fragmentation by specific types of papillomavirus. *Am J Obstet Gynecol* 2001;184:1068–1070.
48. Rombaldi RL, Serafini EP, Mandelli J, Zimmermann E, Losquiavo KP. Transplacental transmission of human papillomavirus. *Virol J* 2008;5:106.
49. Cabrera M, Chan PJ, Kalugdan TH, King A. Transfection of the inner cell mass and lack of a unique DNA sequence affecting the uptake of exogenous DNA by sperm as shown by dideoxy sequencing analogues. *J Assist Reprod Genet* 1997;14:120–124.
50. Foresta C, Patassini C, Bertoldo A et al. Mechanism of human papillomavirus binding to human spermatozoa and fertilizing ability of infected spermatozoa. *PLoS ONE* 2011;6:15036.
51. Henneberg AA, Patton WC, Jacobson JD, Chan PJ. Human papilloma virus DNA exposure and embryo survival is stage-specific. *J Assist Reprod Genet* 2006;23:255–259.
52. Noventa M, Andrisani A, Gizzo S, Nardelli GB, Ambrosini G. Is it time to shift the attention on early stages embryo development to avoid inconclusive evidence on HPV related infertility: debate and proposal. *Reprod Biol Endocrinol* 2014;(12):48.

53. Hong LJ, Oshiro BT, Chan PJ. HPV-16 exposed mouse embryos: a potential model for pregnancy wastage. *Arch Gynecol Obstet* 2013;287:1093–1097.
54. Hermonat PL, Han L, Wendel PJ et al. Human papillomavirus is more prevalent in first trimester spontaneously aborted products of conception compared to elective specimens. *Vir Gen* 1997;14:13–17.
55. Garolla A, Engl B, Pizzol D, Ghezzi M, Bertoldo A, Bottacin A, Noventa M, Foresta C. Spontaneous fertility and in vitro fertilization outcome: new evidence of human papillomavirus sperm infection. *Fertil Steril*. 2016 Jan;105(1):65-72. 16
56. Carrel DT, Liu L, Peterson CM, Jones KP, Hatasaka HH, Erickson L, Campbell B. Sperm DNA fragmentation is increased in couples with unexplained recurrent pregnancy loss. *Arch.Androl* 2003;49, 49-55
57. Brahem S, Mehdi M, Landolsi H, Mougou S, Elghezal H, Saad A. semen parameters and sperm DNA fragmentation as causes of recurrent pregnancy loss. *Urology* 2011;78:792-796
58. Carlini T, Paoli D, Pelloni M, Faja F, Dal Lago A, Lombardo F, Lenzi A, Gandini L. Sperm DNA fragmentation in Italian couples with recurrent pregnancy loss. *Reprod Biomed Online* 2016, in press
59. Cohen-Bacrie P, Belloc S, Ménézo YL, Clement P, Hamidi J, Benkhalifa M. Correlation between DNA damage and sperm parameters: a prospective study of 1,633 patients. *Fertil Steril* 2009; 91, 1801-1805.

ESAME DEL LIQUIDO SEMINALE

L'esame standard del liquido seminale o spermiogramma, è un esame di primo livello che rappresenta il punto di partenza per l'impostazione diagnostica e per valutare la risposta alle terapie andrologiche. Per una corretta esecuzione laboratoristica dell'esame seminale è fondamentale standardizzare le procedure analitiche e pre-analitiche che comprendono precise norme di raccolta e consegna nonché di valutazione del campione seminale. Da alcuni anni viene considerato come punto di riferimento per l'analisi il manuale del WHO (Tabelle 1 e 2) che nell'ultima edizione (WHO 2010) ha stabilito i valori di riferimento basandosi su una coorte di uomini sani con un time-to-pregnancy inferiore ai 12 mesi.

Tabella 1. Esame del liquido seminale con indicazione del valore minimo (5° percentile) e medio (50° percentile) dei soggetti fertili (WHO 2010).

PARAMETRI SEMINALI	VALORI DI RIFERIMENTO	
	5° percentile	50° percentile
Volume seminale (ml)	≥ 1.5	≥ 3.7
pH	≥ 7.2	≥ 7.2
Concentrazione spermatozoi (milioni/ml)	≥ 15x 10 ⁶	≥ 73x 10 ⁶
Numero totale spermatozoi/eiaculato (milioni)	≥ 39x 10 ⁶	≥ 255x 10 ⁶
Motilità (%)	≥ 32% motilità progressiva (PR)	≥ 55% motilità progressiva (PR)
	≥ 40% motilità totale (PR+NP)	≥ 61% motilità totale (PR+NP)
Morfologia (%)	≥ 4%	≥ 15%
Vitalità (%)	≥ 58%	≥ 79%
Leucociti	< 1x 10 ⁶ /ml	
Immunobead test o MAR test	< 50% spermatozoi mobili con bead adese	
	< 50% spermatozoi con particelle adese	

Tabella 2. Terminologia utilizzata per la classificazione delle caratteristiche del liquido seminale.

Normozoospermia	Normalità dei parametri seminali
Oligozoospermia	Concentrazione spermatica < 15x 10 ⁶ /ml o numero totale di spermatozoi nell'eiaculato < 39x 10 ⁶
Astenozoospermia	< 32% di spermatozoi con motilità progressiva (PR) < 40% di spermatozoi con motilità totale (PR+NP)
Teratozoospermia	< 4% di spermatozoi con morfologia normale
Oligo-asteno-teratozoospermia	Alterazione del numero, della motilità e della morfologia degli spermatozoi
Oligo-teratozoospermia	Alterazione del numero e della morfologia degli spermatozoi
Oligo-astenozoospermia	Alterazione del numero e della motilità degli spermatozoi
Asteno-teratozoospermia	Alterazione della motilità e della morfologia degli spermatozoi
Criptozoospermia	Presenza di spermatozoi solo dopo centrifugazione
Necrozoospermia	< 58% di vitalità spermatica
Azoospermia	Assenza di spermatozoi nell'eiaculato anche dopo centrifugazione
Aspermia	Assenza di eiaculato

L'esame del liquido seminale comprende la valutazione di parametri macroscopici e microscopici dell'eiaculato. Per quanto riguarda i parametri macroscopici vanno considerate le caratteristiche reologiche del liquido seminale (aspetto, viscosità, fluidificazione) e vengono valutate il volume di eiaculato ed il pH seminale. Per quanto concerne l'esame microscopico, è necessario valutare sia la componente gametica che la non-gametica. Per quanto riguarda la prima, vanno distinti gli spermatozoi dalla presenza di cellule immature della spermatogenesi. In relazione agli spermatozoi vanno valutati la concentrazione (espressa come milioni per ml di liquido seminale), il numero totale di spermatozoi per eiaculato, la percentuale di motilità differenziata per tipo (progressivo o non progressivo) e infine la morfologia. Si passa quindi alla valutazione della componente cellulare non gametica, costituita da leucociti, cellule epiteliali, emazie, zone di spermioagglutinazione, corpuscoli prostatici.

Per una corretta interpretazione dell'esame seminale è necessario ricordare che non sempre alterazioni dei parametri seminali riflettono condizioni patologiche, ma possono esprimere una fisiologica variabilità intraindividuale, errori nella modalità di raccolta del campione, nel trasporto o nella valutazione del campione seminale. In particolare un periodo di astinenza troppo breve (<2 giorni) o eiaculazioni molto frequenti nel periodo precedente la raccolta seminale possono causare una riduzione del volume dell'eiaculato e del numero di spermatozoi e allo stesso tempo indurre la presenza di leucociti e/o di emazie. Al contrario, un periodo di astinenza eccessivo (>7 giorni) può alterare la morfologia e la motilità degli spermatozoi. Analoghe alterazioni seminali possono riscontrarsi anche in campioni raccolti in una sede diversa da quella dell'analisi, a causa di possibili contaminazioni batteriche, dell'esposizione allo shock termico e dell'allungamento dei tempi per la consegna del campione. Va inoltre sempre indagata la presenza nei tre mesi precedenti l'esame seminale di condizioni che possono influire negativamente sulla spermatogenesi come febbre elevata, terapie antibiotiche, eventi particolarmente stressanti, o di altre situazioni in grado di alterare transitoriamente i parametri seminali. Infine è necessario affidarsi ad operatori capaci e rigorosi, poiché l'esame seminale è un'indagine che non essendo automatizzata è strettamente operatore-dipendente.

Una corretta esecuzione dell'esame del liquido seminale prevede un'opportuna successione di passaggi che sono state suddivisi in varie fasi e che di seguito analizzeremo nel dettaglio.

Fase 1: Accettazione e preparazione del campione seminale

La fase di accettazione consiste nel controllo dei dati anagrafici del paziente, che deve fornire all'operatore un documento di riconoscimento, permettendo così la corretta compilazione del modulo di lavoro. Al paziente vengono richiesti oltre al nome e cognome, la data di nascita ed i giorni di astinenza dall'ultimo rapporto sessuale o dall'ultima eiaculazione. Quest'ultimo dato va segnato con precisione e dovrebbe, quanto più possibile, rientrare in un intervallo compreso tra 2 e 7 giorni.

Su un contenitore dall'apertura larga e rigorosamente sterile che verrà utilizzato per la raccolta viene attaccata una etichetta sulla quale sono riportati i dati del paziente. La raccolta dovrebbe avvenire mediante masturbazione in una stanza riservata vicino al laboratorio. Il campione deve essere consegnato entro 30 minuti dall'eiaculazione e conservato a temperatura costante tra 20°C e 37° C per evitare escursioni termiche che potrebbero deteriorare la motilità e la morfologia degli spermatozoi. È necessario accertarsi che il paziente non abbia perso parte dell'eiaculato, che per le sue caratteristiche intrinseche risulta suddivisibile in più frazioni, caratterizzate dalla presenza di differenti quantità di secrezioni prostatiche o vescicolari. Inoltre, poiché la maggior quantità di spermatozoi è presente nella prima porzione dell'eiaculato, è fondamentale segnalare l'eventuale perdita di tale frazione.

Fase 2: Analisi

La fase analitica viene suddivisa in 2 momenti distinti: valutazione macroscopica e microscopica. Tutte queste valutazioni devono essere eseguite preferibilmente dopo 30 minuti dall'eiaculazione ma non oltre 1 ora. L'analisi macroscopica prevede la valutazione e la registrazione di parametri macroscopici, quali volume, aspetto, viscosità, liquefazione/fluidificazione e pH.

L'analisi del **volume** offre importanti informazioni sullo status fisiologico dell'apparato urogenitale, dal momento che permette una valutazione dell'attività funzionale delle ghiandole accessorie (prostata e vescicole seminali). Il valore di riferimento inferiore del volume seminale è di 1.5 ml, al di sotto del quale si parla di ipospia. La valutazione del volume viene effettuata tramite pesatura del contenitore prima e dopo la raccolta del campione. La differenza tra il peso del contenitore prima e dopo la raccolta del liquido seminale rappresenta il volume di eiaculato prodotto dal paziente (densità del liquido seminale assunta come pari a 1g/ml). La valutazione più comune rimane comunque quella di utilizzare una pasteur graduata sterile e una provetta conica graduata nella quale verrà trasferito il campione seminale. La quantificazione del volume offre anche un'idea della funzionalità delle ghiandole accessorie e della pervietà delle vie genitali. Le alterazioni del volume del liquido seminale possono essere caratterizzate dalla completa assenza di liquido seminale nell'eiaculato o dall'aumento o dalla riduzione della sua quantità:

- **ASPERMIA:** con tale termine si indica genericamente l'assenza di eiaculato. Tale fenomeno può essere conseguente ad anorgasmia (aneiaculazione anorgasmica), ad eiaculazione retrograda o a mancata fase di emissione del liquido seminale in uretra (aspermia vera). Nella prima forma la causa può essere psicogena o più raramente neurogena (da lesione neurologica centrale o da neuropatia sensitiva periferica); in tali casi l'eiaculazione può essere indotta mediante vibrostimolazione del pene con un apposito strumento (Ferticare) o mediante elettrostimolazione. L'eiaculazione retrograda è dovuta invece ad inefficace chiusura del collo vescicale e riconosce molteplici cause: anatomiche, congenite o più frequentemente acquisite come gli interventi chirurgici sulla prostata, sul collo vescicale o sull'uretra posteriore; cause farmacologiche (terapie con alfa-bloccanti, antidepressivi, antipsicotici); infine cause neurologiche, come nelle lesioni midollari toraco-lombari, nelle resezioni rettali o sigmoidee allargate e nel diabete mellito.
- **IPOPOSIA:** con il termine di ipospia si intende un volume di eiaculato inferiore a 1.5 ml. Tale alterazione può essere dovuta ad una ridotta astinenza da rapporti sessuali o eiaculazioni, ad una raccolta seminale incompleta (pertanto deve essere sempre indagata un'eventuale perdita di eiaculato al momento della raccolta), a flogosi prostatiche-vescicolari (associate a pH alto) che possono determinare una alterata funzionalità secretoria ghiandolare, ad un quadro di ipogonadismo, ad assenza o ostruzione delle vie escrettrici (associata a pH basso) o a forme cosiddette idiopatiche quando non è possibile riscontrare cause ben documentabili.

L'**aspetto** viene valutato avvicinando la provetta con il liquido seminale ad una fonte luminosa. È possibile definire una scala categoriale, da trasparente a lattescente, scegliendo come valore di normalità il colore grigio-opalescente. Un liquido seminale trasparente può indicare una riduzione della componente nemaspermica, mentre liquidi giallastri o ematici indicano, rispettivamente, un'elevata concentrazione di leucociti o emazie segno di flogosi o infezione delle vie seminali. Infine, un liquido seminale lattescente indica la presenza di una forte componente prostatica (Fig. 1).

Valutazione dell'aspetto				
GRIGIO OPALESCENTE	TRASPARENTE	EMATICO	LATTESCENTE	GIALLASTRO
Colore Opaco	Colore Acquoso	Colore Rosato Rosso	Colore Biancastro	Colore Giallo
Proprio	Mancata presenza componente cellulare	Presenza Ermazie	Costituito solo da secreto Prostatico	Ittero, Assunzione di vitamine
				

La **viscosità** può essere normale, aumentata o diminuita. Una viscosità aumentata può a sua volta avere diversa gradazione, riportata nel referto con una gradazione qualitativa (----diminuita; ++++ aumentata), e può essere associata ad uno stato di flogosi. La misurazione avviene facendo gocciolare il liquido da una pipetta e la normale viscosità è rappresentata da gocce che si staccano in maniera ritmica una dopo l'altra. La formazione di filamenti è un segnale di aumentata viscosità.

Anche la **liquefazione/fluidificazione** va valutata attentamente, dal momento che, nei primi minuti successivi all'eiaculazione, il liquido, per effetto dell'azione di enzimi prodotti dalle vescichette seminali, forma un coagulo che arriva a sciogliersi dopo circa 15 minuti dalla consegna ad opera delle proteinasi del secreto prostatico, permettendo la scomparsa di strie di muco che potrebbero interferire con la motilità degli spermatozoi. In questa fase possono essere presenti nel liquido granuli che, vanno prontamente sottratti e quantificati. L'assenza del coagulo in condizioni basali indica una possibile agenesia delle vescichette seminali o un'agenesia dei dotti eiaculatori. Se dopo 60 minuti la liquefazione non è completa, si parla di liquefazione ritardata. La misurazione viene effettuata tramite percolamento del liquido lungo le pareti della provetta ed osservazione della qualità del liquido contro una sorgente luminosa.

Il **pH** del liquido seminale, misurato con apposite cartine indicatrici dopo 30 minuti dall'eiaculazione, deve essere ≥ 7.2 per poter essere definito normale; alterazioni del pH riflettono possibili alterazioni a livello prostatico o vescicolare. Livelli di pH acidi (< 7.2), in associazione ad una ipoposia, indicano la prevalenza della componente prostatica per compromissione delle vescichette seminali, pertanto possono essere segno di ostruzione o agenesia dei dotti eiaculatori.

La seconda parte dell'analisi consiste nella valutazione dei **parametri microscopici**.

In primo luogo l'operatore verifica la **concentrazione spermatica** attraverso una valutazione a fresco su vetrino con copri oggetto 22x22. In base al numero di spermatozoi che si rilevano (Fig. 1) si scelgono le due diluizioni più opportune per eseguire la valutazione con la camera di conta di Neubauer (Fig. 2). Il valore ottenuto con l'apposita formula (es: Diluizione 1+4 (1:5) $C = (N/n) \times 0.25$; C = concentrazione sp.zoi mil/ml, N = numero totale di spermatozoi contati, n = numero di righe contate) viene poi moltiplicato per il volume totale, così da ottenere il numero totale di spermatozoi nell'eiaculato indicando il grado di attività della spermatogenesi. La camera di conta più comunemente utilizzata rimane la camera di conta di Makler (Fig. 3). Nel vetrino copri oggetto di tale camera è presente una griglia 10x10 che consente di determinare la concentrazione

spermatica (milioni di spermatozoi/ml) attraverso il conteggio e la lettura del numero di spermatozoi nelle singole righe, o per una più corretta valutazione la somma di tutti gli spermatozoi presenti all'interno della griglia della camera da dividere per 10. Tale valore viene poi moltiplicato per il volume totale di eiaculato, così da ottenere il **numero totale di spermatozoi** presenti nell'eiaculato. In caso di assenza di spermatozoi il campione deve essere centrifugato per poter distinguere tra **azoospermia** (assenza di spermatozoi anche dopo centrifugazione) e **criptozoospermia** (presenza di spermatozoi dopo centrifugazione). Concentrazioni inferiori a 15 milioni/ml e/o 39 milioni/eiaculato definiscono la **oligozoospermia**. Valori superiori a 15 milioni/ml e 39 milioni/eiaculato stabiliscono la **normozoospermia**.

Anche nel caso in cui la valutazione a fresco indichi una presenza molto bassa di spermatozoi si ricorre alla centrifugazione del campione.

Figura 1. Diluizioni per camera di Neubauer.

Table 2.3 Semen dilutions required, how to make them, chambers to use and potential areas to assess

Spermatozoa per $\times 400$ field	Spermatozoa per $\times 200$ field	Dilution required	μ l of semen	μ l of fixative	Chamber	Area to be assessed
>101	>404	1:20 (1+19)	50	950	Improved Neubauer	grids 5, 4, 6
16-100	64-400	1:5 (1+4)	50	200	Improved Neubauer	grids 5, 4, 6
2-15	8-60	1:2 (1+1)	50	50	Improved Neubauer	grids 5, 4, 6
<2	<8	1:2 (1+1)	50	50	Improved Neubauer or large volume	all 9 grids entire slide

Figura 2. Camera di Neubauer.

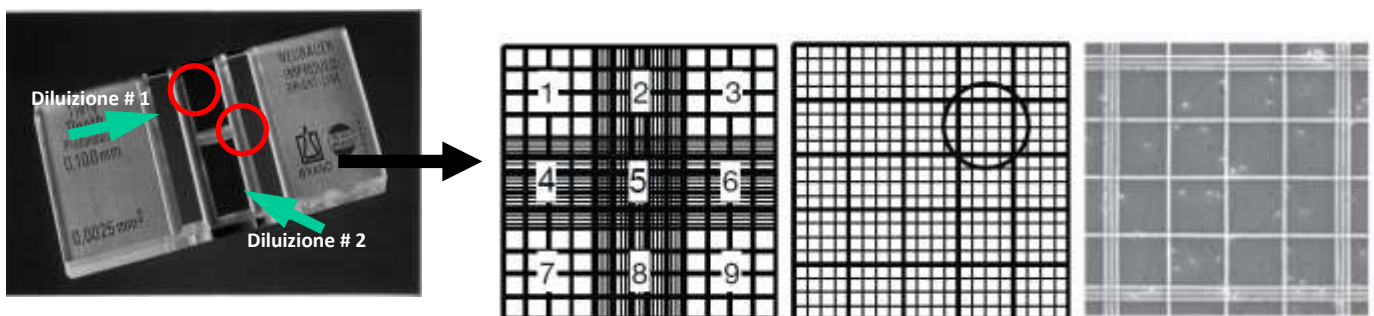
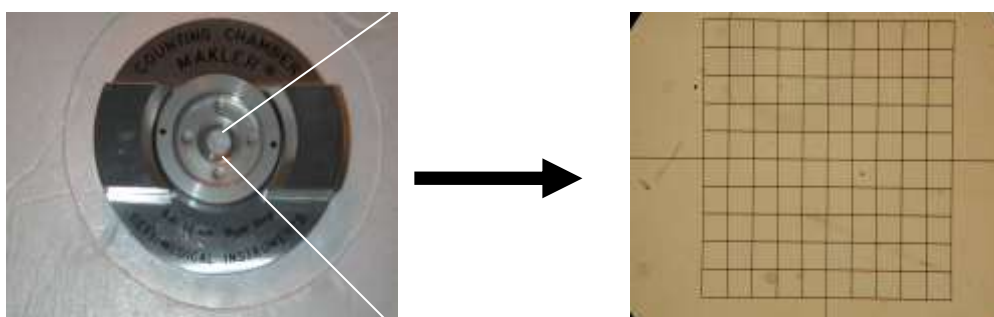


Figura 3. Camera di Makler.



L'osservazione in camera di Neubauer è utilizzata inoltre per valutare la componente non gametica, rappresentata da cellule di sfaldamento, round cells, emazie, leucociti (v.n. < 1.0 milioni/ml) e spermatozoi.

La **motilità** spermatica viene valutata preferibilmente dopo mezzora dalla raccolta o al massimo entro 1 ora dall'eiaculazione. Si valuta generalmente a fresco su un vetrino con coprioggetto 22x22. Il preparato così ottenuto viene esaminato con ottica in contrasto di fase a 200x o 400x ingrandimenti e si contano 200 spermatozoi intatti (non contare code mobili senza la testa)

Le classi di motilità sono:

- **PROGRESSIVA (PR)**: spermatozoi che si muovono rapidamente sia con moto rettilineo che in grossi cerchi senza considerare la velocità, ma valutando la loro progressione.
- **NON PROGRESSIVA (NP)**: spermatozoi che si muovono senza progressione, movimento in situ.
- **ASSENTE (IM)**: spermatozoi immobili.

Una motilità normale è definita da una percentuale di spermatozoi con motilità progressiva (PR) superiore al 32% e/o da una percentuale di spermatozoi mobili totali (PR+NP) superiore al 40%. Per valori inferiori si parla di astenozoospermia.

In caso di astenozoospermia è importante valutare la modalità della raccolta del liquido seminale, la sua conservazione/trasporto al laboratorio analisi, il pH, la viscosità seminale e la eventuale presenza di spermioagglutinazioni ed anticorpi antispermatozoo. Il dosaggio di alcuni indicatori biochimici di funzionalità prostatica, vescicolare, epididimaria quali la fosfatasi acida, zinco, fruttosio, alfa-glucosidasi, anche se poco indicativi e poco utilizzati, possono in taluni casi indirizzare verso un'alterazione delle ghiandole accessorie quale possibile causa dell'astenozoospermia. È necessario pertanto eseguire accertamenti di approfondimento con una spermicoltura e/o urinocoltura del primo mitto, per escludere la presenza di infezioni del tratto riproduttivo e delle vie urogenitali, responsabili di un danno sugli spermatozoi diretto o indiretto tramite la produzione di citochine o altri prodotti da parte delle cellule della risposta infiammatoria. In caso di infezione batterica la terapia antibiotica mirata dovrà essere seguita da una spermicoltura di controllo almeno 2-3 settimane dopo la fine del trattamento e da nuova analisi del liquido seminale da eseguire almeno tre mesi dopo l'eradicazione dell'infezione.

Un altro importante valutazione è rappresentata dal test della **vitalità**, che valuta l'integrità cellulare dello spermatozoo, ovvero la sua capacità di non accettare sostanze dall'esterno. La valutazione va eseguita preferibilmente entro 30 minuti. La sostanza usata per questo test è l'eosina Y 5% che va mescolata con un uguale volume di campione seminale. Sarà necessario distinguere le forme vive da quelle morte (200 spermatozoi contati), osservando, in un campo, quanti spermatozoi risultano colorati di rosso (spermatozoi morti) e quanti di bianco (spermatozoi vivi). Si parla di necrozoospermia quando la percentuale di forme vitali è inferiore al 58% (Fig. 4). Associato al test dell'eosina si esegue il test di rigonfiamento osmotico (Swelling test), un ulteriore test di vitalità nemaspermica, che stabilisce la capacità osmoregolatrice degli spermatozoi in funzione dell'integrità funzionale di membrana. Si esegue mescolando 0.1 ml di liquido seminale con 1 ml di soluzione di swelling ed incubando il tutto per almeno 30 minuti a 37° C (non più di 45 minuti). La lettura si effettua contando 200 spermatozoi, individuando la percentuale di spermatozoi rigonfi (vivi) sugli spermatozoi non rigonfi (morti) (Fig. 5).

Figura 4. Eosina test.

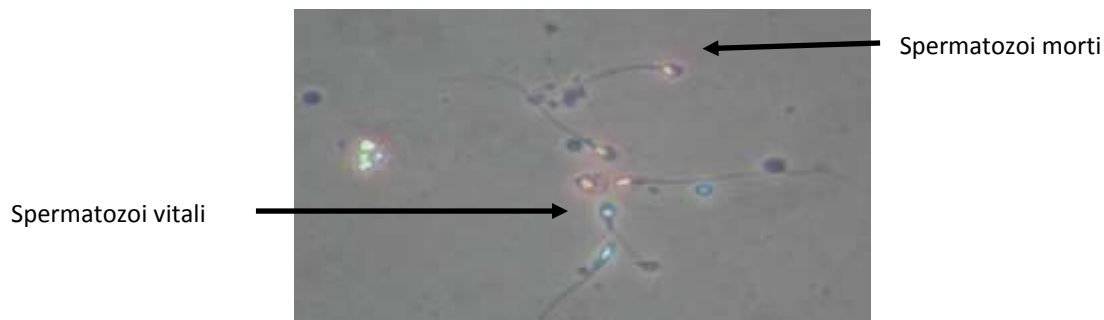
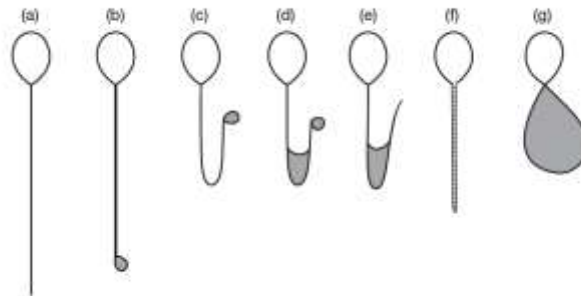


Figura 5. Swelling test.

(a) no change, (b)–(g) various types of tail changes. Swelling in tail is indicated by the grey area.



Reproduced from Jeyendran RS, Van der Van HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zanawald LJ. (1984) Journal of Reproduction and Fertility, 70: 219–228. © Society for Reproduction and Fertility (1984). Reproduced by permission.

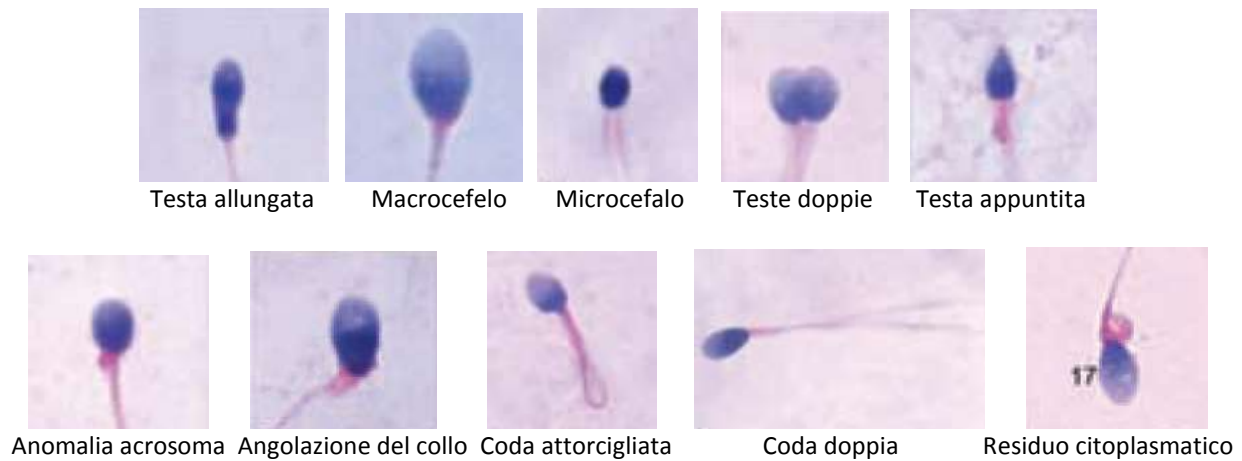
La **valutazione morfologica** si basa sulla distinzione tra forme tipiche (Fig. 6) (v.n. $\geq 4\%$) e forme atipiche (Fig. 6). La colorazione utilizzata è quella di papanicolau e la valutazione viene eseguita contando 200 spermatozoi dopo aver strisciato e colorato il preparato su vetrino.

Figura 6. Spermatozoi con normale morfologia.



Le atipie possono interessare la testa, il collo e la coda (Fig. 7) e generalmente comprendono: macrocefali, microcefali, anomalie dell'acrosoma, teste allungate, teste appuntite, teste doppie, angolazioni del collo, immaturi, code attorcigliate, code doppie, altre forme.

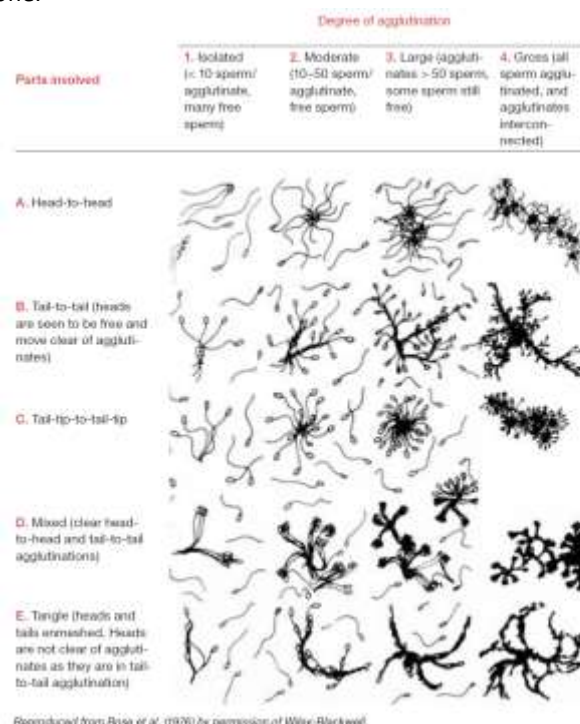
Figura 7.



Nel caso in cui la percentuale di forme atipiche superi il 96 %, si parla di teratozoospermia. Lo studio della morfologia può essere di aiuto talvolta anche per indirizzare la diagnosi: in caso di alterazioni testicolari può essere presente un aumento delle forme allungate e anomalie della testa; in caso di alterazioni a livello epididimario, dove avviene la maturazione finale dello spermatozoo, ci sarà una prevalenza delle forme immature caratterizzate dalla presenza di residui citoplasmatici; nelle flogosi genitali possono essere incrementate le anomalie del collo (presenza di spermatozoi angolati o con deconnessione testa-flagello).

Nell'esame del liquido seminale va tenuta in considerazione anche la presenza di eventuali **agglutinazioni**, che possono coinvolgere testa, tratto intermedio e coda. Nel referto viene utilizzata una gradazione semiquantitativa che va da ---- (assenza) a ++++ (agglutinazioni massive) (Fig. 8).

Figura 8. Gradi di agglutinazione.



Inoltre, è importante valutare l'eventuale presenza di **anticorpi IgG** sulla superficie della membrana plasmatica. Il test utilizzato è il MAR test o Immunobead che risulta patologico quando più del 50% degli spermatozoi presenta le particelle adese alla testa, al collo o alla coda degli stessi.

Bibliografia

World Health Organization (2010) WHO Laboratory Manual for the Examination and processing of human semen. Fifth edition. WHO Press, World, Health Organization, Geneva, Switzerland.

Diapositive e dispense del Master in Medicina della Riproduzione, Università di Padova, anno accademico 2009-2010

Disposizioni della Società Italiana di Andrologia e Medicina della Sessualità (SIAMS) gennaio 2010

ANALISI MORFO-FUNZIONALE DEGLI SPERMATOZOI

L'infertilità maschile è comunemente definita in relazione all'analisi standard del liquido seminale, che fornisce informazioni sul numero e sulla qualità in termini di motilità e morfologia degli spermatozoi presenti nell'eiaculato. Tuttavia è noto che la relazione tra questi parametri convenzionali e la fertilità non è diretta e in molti casi l'analisi del seme non è in grado di spiegare la causa dell'infertilità. Per tale motivo negli ultimi anni sono stati sviluppati nuovi test che valutano anche la competenza funzionale e forniscono informazioni sul potenziale di fertilizzazione dello spermatozoo umano. Le metodiche attualmente più utilizzate prevedono lo studio dell'integrità e della maturità della cromatina dello spermatozoo (sostituzione istoni-protamine) l'analisi dei fenomeni di apoptosi (modificazione strutturale della membrana cellulare, perdita della funzionalità mitocondriale, integrità cromatinica e frammentazione del DNA nucleare), e la valutazione delle aneuploidie spermatiche (Tabella 1). Una riduzione della condensazione nucleare espressione di immaturità spermatica, è stata riportata più frequentemente in campioni seminali di pazienti infertili e viene considerata un fattore prognostico negativo per la fertilità naturale (1, 2). Inoltre, la valutazione del danno del DNA spermatico (come ad esempio lo studio della frammentazione e dell'integrità cromatinica) è considerata particolarmente importante in quei casi in cui si ricorra all'utilizzo di tecniche avanzate di fecondazione assistita (3-5). Infine, lo studio delle aneuploidie spermatiche rappresenta una valutazione estremamente importante nei pazienti affetti da severa testicolopatia.

Tabella 1. Alcuni dei test più usati per lo studio funzionale degli spermatozoi.

Test	Oggetto di valutazione	Significato clinico
Annessina V	Esternalizzazione fosfatidilserina	Apoptosi fasi iniziali
JC-1	Potenziale di membrana mitocondriale	Apoptosi fasi iniziali
Arancio di acridina	Integrità cromatinica	Stress ossidativo e alterazione dei meccanismi di riparazione del DNA
TUNEL	Frammentazione del DNA nucleare	Necrosi e apoptosi in fase avanzata
Anilina	Protaminazione del DNA nucleare	Alterazione dei processi di maturazione nucleare
Decondensazione nucleare	Condensazione nucleare	Alterazione dei processi di condensazione nucleare
FISH	Aneuploidie spermatiche	Alterazione del numero dei cromosomi spermatici

È noto che i soggetti infertili, soprattutto quelli con severa oligozoospermia da testicolopatia primaria, presentano frequentemente un elevato numero di alterazioni strutturali e numeriche a carico dei cromosomi spermatici rispetto ai soggetti fertili (1, 2, 4, 5). Inoltre è stato riportato che il ricorso a tecniche di procreazione medicalmente assistita (PMA) da parte di questi soggetti, esita frequentemente in basse percentuali di fertilizzazione, in una riduzione dei nati vivi e in una aumentata probabilità di anomalie fenotipiche e aberrazioni cromosomiche nei nati (6-10). La maggior parte dei problemi nell'utilizzo degli spermatozoi di questi soggetti per tecniche di

fecondazione assistita mediante microiniezione intracitoplasmatica (ICSI), è legata al fatto che la selezione viene eseguita basandosi quasi esclusivamente sulla morfologia e sulla mobilità cellulari. È stato ipotizzato che questi criteri di selezione possano comportare un maggior rischio di utilizzare spermatozoi con alterazioni cromosomiche. Questa ipotesi giustificherebbe i peggiori risultati ottenuti con tecniche di PMA quando si utilizzano spermatozoi di soggetti con gradi estremi di oligoastenoteratozoospermia (OAT) da severo danno testicolare (6). Inoltre tali considerazioni sollevano importanti riflessioni circa la possibilità di trasmettere alterazioni genetiche alla prole (11-14).

Ad oggi, tutti i test per la valutazione cromosomica e funzionale degli spermatozoi allo scopo di predire l'esito e per migliorare i risultati delle tecniche di PMA si sono rivelati altamente citotossici, e non consentono pertanto il successivo utilizzo dei gameti a scopo riproduttivo. Per questo motivo, recentemente sono state proposte varie tecniche non invasive per la valutazione e la selezione degli spermatozoi allo scopo di migliorare la percentuale di successo delle tecniche di fecondazione assistita nei soggetti con importanti alterazioni seminali (15-18).

Acido ialuronico

Alcuni autori hanno ipotizzato che la selezione degli spermatozoi con maggiore potenziale di fertilità potrebbe essere eseguita sfruttando la loro capacità chemiotattica di migrare verso l'Acido ialuronico (AI) e di legarsi allo stesso (19). Il razionale di questa metodica presuppone che gli spermatozoi normali dal punto di vista genetico e funzionale siano quelli che esprimono elevati livelli della proteina HSPA2 (20, 21), la chaperonina che prende parte al complesso sinaptonemale che dirige e controlla i processi meiotici (22, 23). Sarebbero questi gli spermatozoi che hanno completato correttamente il processo spermiogenetico (transizione da spermatide rotondo, a spermatide allungato, a spermatozoo maturo), che prevede vari processi maturativi: rimodellamento della membrana plasmatica, estrusione del citoplasma e sostituzione delle proteine nucleari degli istoni con le protammine. Solo questi gameti possiederebbero i recettori per l'AI. Questa sostanza, che è normalmente presente nel tratto riproduttivo femminile e ad alte concentrazioni nella matrice extracellulare del cumulo ooforo che avvolge l'ovocita, parteciperebbe del processo di fertilizzazione. In accordo con tale ipotesi, l'analisi degli spermatozoi che si legano all'AI hanno mostrato un minor grado di frammentazione nucleare (25, 25) e una minor percentuale di aneuploidie rispetto ai campioni seminali pre-trattamento (19, 26). Nonostante questo metodo riduca ma non sia in grado di escludere la possibilità di selezionare spermatozoi con alterazioni cromosomiche, è stato ipotizzato che la sua associazione alla ICSI potesse migliorare i risultati di questa tecnica. Sfortunatamente ad oggi esiste solo uno studio di confronto tra ICSI standard e ICSI con selezione mediante AI (27). Inoltre, sebbene questo lavoro riporti una percentuale di fertilizzazione significativamente migliore nei campioni selezionati con AI, nessuna differenza significativa è stata osservata in termini di sviluppo embrionale e di percentuale di gravidanze ottenute.

MACS

Un'altra possibile tecnica di selezione è rappresentata dal sorting degli spermatozoi che utilizza la citoflussimetria con attivazione magnetica (*MACS: magnetic activated cell sorting*). Numerosi autori hanno dimostrato uno stretto legame tra la presenza di markers apoptotici negli spermatozoi umani e il fallimento delle tecniche di fertilizzazione sia in vivo che in vitro (28, 29). Uno dei quadri più precoci di apoptosi prevede l'esternalizzazione dei residui della fosfatidilserina (FS), un fosfolipide normalmente presente nella porzione interna della membrana citoplasmatica

degli spermatozoi. L'Annessina V (AV) è una proteina in grado di legare i fosfolipidi, con alta affinità per la FS, che non possiede la capacità di attraversare le membrane citoplasmatiche intatte. Pertanto negli spermatozoi vitali, il legame tra AV e FS può avvenire solamente sulla superficie esterna della membrana citoplasmatica e indica una compromissione dell'integrità di membrana, espressione iniziale di apoptosi. Mediante un sorting magnetico che preveda l'utilizzo di microbiglie supermagnetiche coniugate all'AV, è possibile isolare i gameti in necrosi e quelli in fase di apoptosi. Infatti, le cellule AV positive ovvero quelle che legano le biglie, vengono deviate nel loro percorso e trattenute da un campo magnetico, mentre le cellule non legate continuano il loro percorso. Secondo alcuni autori, gli spermatozoi AV negativi selezionati con questa metodica, mostrerebbero migliori qualità in termini di parametri seminali e una ridotta attivazione degli altri markers di apoptosi (30). Inoltre tali cellule, sopravviverebbero meglio alle metodiche di crioconservazione e in condizioni sperimentali mostrerebbero una migliore capacità di penetrare l'ovocita di hamster. Su questa base è stata proposta la selezione spermatica che prevede l'individuazione e l'isolamento di cellule non apoptotiche da poter utilizzare per tecniche di PMA. Un recente lavoro che ha utilizzato questa metodica di selezione abbinata alla ICSI in coppie con fattore maschile di infertilità, ha confrontato i risultati ottenuti con spermatozoi AV negativi rispetto a quelli ottenuti con spermatozoi selezionati attraverso metodi classici (31). Gli autori riportano migliori tassi di gravidanze nelle coppie in cui è stato utilizzato il sorting magnetico. Tuttavia, guardando attentamente i risultati è possibile osservare che si tratta solo di una tendenza al miglioramento delle gravidanze, poiché se da questi si sottraggono le gravidanze biochimiche, la percentuale di gravidanze cliniche non è statisticamente diversa dal gruppo di controllo. Inoltre, se da un lato vi sono esperienze ancora molto limitate che richiedono ulteriori studi comparativi randomizzati, dall'altro si pongono dubbi di natura applicativa sul metodo. Infatti, alterazioni del doppio strato fosfolipidico della membrana citoplasmatica degli spermatozoi sono state riportate anche in situazioni fisiologiche. Ad esempio durante il fenomeno di capacitazione, vengono espresse protein-kinasi che mediano il segnale di attivazione per l'esternalizzazione della PS (32, 33).

Birifrangenza

Una recente proposta si basa sulle caratteristiche di birifrangenza della testa dello spermatozoo osservato con un particolare microscopio invertito con luce polarizzata. Questa tecnica è fondata sull'idea di valutare l'organizzazione strutturale dello spermatozoo con particolare attenzione alle porzioni della testa e dell'acrosoma (34). Lo spermatozoo osservato con microscopio a luce polarizzata presenta delle caratteristiche di birifrangenza legate alle proprietà anisotropiche della sua tessitura protoplasmatica. Il nucleo dello spermatozoo maturo possiederebbe una forte birifrangenza intrinseca dovuta all'orientamento dei filamenti nucleoproteici disposti su assi longitudinali. Inoltre i filamenti proteici della porzione subacrosomiale, anch'essi disposti longitudinalmente sarebbero responsabili di una analoga birifrangenza a carico della regione acrosomiale. La presenza o meno della birifrangenza sarebbe espressione della rifrazione della luce che attraversa le diverse strutture cellulari con diverse velocità. Quando la luce attraversa una struttura anisotropica, essa viene rifratta in due raggi polarizzati con differente velocità. Questo fenomeno è noto come ritardanza e appare al microscopio polarizzato come una luce molto scintillante (birifrangente). È stato riportato che nei campioni seminali di soggetti normozoospermici la porzione di spermatozoi birifrangenti è significativamente maggiore rispetto a quella che si osserva in pazienti affetti da severa alterazione dei parametri seminali (35). L'ipotesi su cui si fonda questo metodo è che gli spermatozoi immaturi o con alterazioni nucleari posseggano filamenti nucleoproteici disorganizzati e quindi una struttura isotropica. Il fascio di

luce attraversando questo tipo di struttura non verrebbe rifratto, e quindi l'immagine della testa dello spermatozoo esposto alla luce polarizzata non appare birifrangente. Per lo stesso motivo, sarebbe possibile distinguere anche gli spermatozoi intatti da quelli che hanno subito il processo di reazione acrosomiale (36). L'applicazione di questo metodo di selezione alla ICSI ha evidenziato un incremento significativo dei tassi di impianto e di gravidanze cliniche nonostante siano riportate percentuali non diverse di fertilizzazione e qualità embrionaria. Inoltre è stata riportata una migliore percentuale di impianto e di gravidanze quando venivano utilizzati spermatozoi che avevano subito la reazione acrosomiale rispetto ai non reattati (35). Tuttavia, le esperienze legate a questa metodica non possono essere considerate conclusive, poiché tutti i dati riportati in letteratura circa la messa a punto del metodo di selezione e la sua applicazione clinica fanno capo ad un solo gruppo.

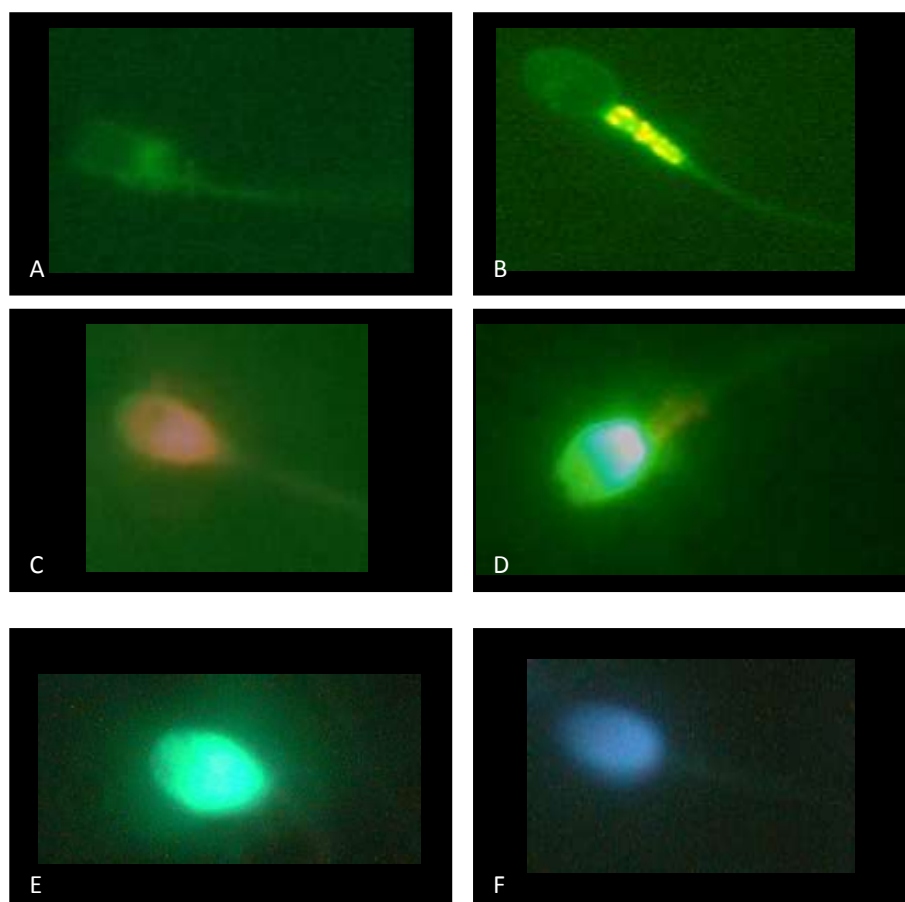
IMSI

Come già detto, i soggetti infertili presentano frequentemente alterazioni a carico dei parametri seminali. Tuttavia la letteratura non riporta alcuna correlazione tra successo delle tecniche ICSI e morfologia spermatica, anche confrontando campioni con morfologia normale rispetto a quelli con severa teratozoospermia (37-39). Tutti questi studi sono stati condotti utilizzando una selezione spermatica che si avvaleva di microscopi ottici e bassi ingrandimenti, in grado di svelare solo i difetti cellulari più marcati. Dal 2002 è stata proposta una selezione morfologica degli spermatozoi ad alto ingrandimento che si avvale di invertoscopi dotati di ottica Normarsky ad immersione, che associati a sistemi ottici digitali sono in grado di raggiungere 6300x di ingrandimento (40-42). Attraverso questa metodica chiamata MSOME (*motile sperm organelle morphology examination*) e mediante una attenta valutazione dei soli spermatozoi mobili, è possibile riconoscere anche anomalie morfologiche molto lievi a carico di ogni singola porzione cellulare. In particolare è stato riportato che la normalità della testa e l'assenza di vacuoli citoplasmatici sarebbe peculiare di gameti con miglior capacità fecondante e consentirebbe di garantire migliori probabilità di successo alle procedure di fecondazione assistita (43). L'associazione di questa tecnica alla ICSI prende il nome di IMSI (*intracytoplasmic morphologically-selected sperm injection*). Ad oggi sono disponibili alcuni dati circa i risultati di questa metodica. Il primo studio riporta che quando l'analisi degli spermatozoi ad alto ingrandimento mostra una morfologia normale inferiore al 20%, mediante ICSI non sarebbe possibile ottenere gravidanze (42). Studi successivi riferiscono un incremento nelle percentuali di fertilizzazione, nonostante vi siano ancora esperienze discordanti circa i risultati in termini di qualità embrionaria (42-44). Tuttavia sembra che tutti gli autori siano concordi nel riportare che nella popolazione di soggetti trattati con IMSI vi sono migliori tassi di impianto e di gravidanze cliniche e una riduzione della percentuale di aborti (42-46). Inoltre, gli studi più recenti indicano che nei soggetti che non presentano spermatozoi normali all'analisi ad alto ingrandimento i risultati della ICSI sarebbero molto scarsi (43, 44).

Nonostante tutte le metodiche citate sembrino portare ad un incremento della percentuale di bambini nati, la IMSI attualmente sembra essere la tecnica che ha riscosso più consensi e sulla quale sono state acquisite le maggiori esperienze applicative. Tuttavia questa metodica di selezione non prende in considerazione la possibilità che il campione seminale sia privo di spermatozoi mobili, evenienza non impossibile nei soggetti affetti da gradi molto severi di testicolopatia. Inoltre, essa non consente di valutare la funzionalità e la struttura di queste cellule dopo la selezione e prima del loro utilizzo. A questo scopo un nostro recente studio ha cercato di valutare dopo selezione ad altissimo ingrandimento, la funzionalità spermatica e la percentuale di aneuploidie in spermatozoi di soggetti con criptozoospermia e assenza di motilità per severa testicolopatia primaria (45). In questo studio, l'isolamento e la valutazione di singoli spermatozoi

caratterizzati in base alla morfologia ad altissimo ingrandimento (oltre 13000x) è stata ottenuta con un invertoscio (Nikon Eclipse TE2000-U) mediante obiettivo planare Apo X100/1.40 ad immersione, e una lente condensatore a 0.52 NA con l'ottica Normarski. Tale ingrandimento era determinato da 5 parametri: a) ingrandimento dell'obiettivo 100X; b) selettore d'ingrandimento 1.5X; c) passo C 2X; d) diagonale del chip CCD di 11mm; e) dimensione della diagonale del monitor di 482.6mm, pari ad un ingrandimento ottenuto a video (b/a) di 43.87. L'ingrandimento finale era pertanto di 13161X [ingrandimento del microscopio (150X)] x [passo C (2X)] x [ingrandimento video (43.87X)]. Dal campione seminale di 10 pazienti dopo valutazione ad altissimo ingrandimento, sono stati isolati mediante l'utilizzo di un micromanipolatore 100 spermatozoi con normale morfologia e presenza di almeno un vacuolo nucleare e 100 con normale morfologia e assenza di vacuoli, per un totale di 200 cellule. Su ogni singolo spermatozoo sono stati effettuati i test di apoptosi che valutano l'esternalizzazione della fosfatidilserina, la funzionalità mitocondriale, l'integrità cromatinica, la frammentazione del DNA nucleare e la valutazione delle aneuploidie spermatiche (Figura 1).

Figura 1 Determinazione dello stato funzionale degli spermatozoi, valutato su singola cellula dopo selezione a 13000x: alterato (A) e normale (B) potenziale di membrana mitocondriale (MitoSensor test); alterata (C) e normale (D) integrità cromatinica (test con Arancio di Acridina); alterata (E) e normale (F) integrità cromatinica (test di TUNEL).



I risultati ottenuti hanno confermato che la funzionalità mitocondriale, lo stato di frammentazione e l'integrità del DNA spermatico sono alterate nei pazienti con severo danno testicolare e che in questi soggetti è presente un'elevata percentuale di spermatozoi aneuploidi. L'analisi delle singole cellule ad altissimo ingrandimento ha messo in luce che gli spermatozoi con normale morfologia

hanno più frequentemente una normale funzione mitocondriale, una adeguata struttura cromatinica e basse percentuali di aneuploidie. Inoltre, è stato documentato che questi parametri migliorano ulteriormente considerando solo gli spermatozoi senza vacuoli nucleari. Infine, è di estrema importanza il dato che gli spermatozoi con normale morfologia e assenza di vacuoli non presentano aneuploidie.

In conclusione sembra che vi sia una stretta relazione tra i vari aspetti funzionali dello spermatozoo e le caratteristiche morfologiche valutate ad altissimo ingrandimento. Ciascuna delle tecniche descritte pur con indicazioni diverse (Tabella 2), sembra in grado di selezionare spermatozoi potenzialmente migliori, allo scopo di incrementare l'efficacia e la sicurezza del loro utilizzo con la ICSI. Pertanto ciascuna di esse da sola o in associazione con le altre, potrebbe trovare indicazione nelle seguenti condizioni cliniche: a) elevata percentuale di aneuploidie spermatiche; b) elevati tassi di frammentazione del DNA; c) ripetuti fallimenti di procedure ICSI; d) casi con alterazione molto marcata dei parametri seminali da severa testicolopatia. I dati della letteratura suggeriscono che la IMSI è attualmente la tecnica più utilizzata e sulla quale sono state acquisite le maggiori esperienze cliniche. Tuttavia, questa metodica richiede costi e tempi di esecuzione che ad oggi non possono essere sopportati da tutti i centri di medicina della riproduzione. Pertanto, la crioconservazione dei singoli spermatozoi selezionati ad altissimo ingrandimento in centri di elevata specializzazione, potrebbe permettere l'applicazione di questa tecnica a tutte le strutture che lo richiedano.

Tabella 2. Indicazione alle tecniche di selezione in base alle caratteristiche seminali.

TECNICA	Caratteristiche seminali
Acido ialuronico	Oligoastenoteratozoospermia con ≥ 2 milioni di spermatozoi mobili
MACS	Oligoastenoteratozoospermia con ≥ 5 milioni di spermatozoi mobili
Birifrangenza	Oligoastenoteratozoospermia grave Criptozoospermia Spermatozoi recuperati da testicolo o epididimo
IMSI	Oligoastenoteratozoospermia grave solo se presenti spermatozoi mobili

Bibliografia

1. Shen H and Ong C. Detection of oxidative DNA damage in human sperm and its association with sperm function and male infertility. *Free Radic Biol Med* 2000;28:529-536.
2. Spano M, Bonde JP, Hjollund HI, Kolstad HA, Cordelli E and Leter G. Sperm chromatin damage impairs human fertility. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *Fertil Steril* 2000;73:43-50.
3. Zini A, Libman J. Sperm DNA damage: clinical significance in the era of assisted reproduction. *CMAJ* 2006;175:495-500.
4. Irvine DS, Twigg JP, Gordon EL, Fulton N, Milne PA and Aitken RJ. DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *J Androl* 2000 ;21:33-44.
5. Zini A, Bielecki R, Phang D and Zenzes MT. Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men. *Fertil Steril* 2001;75:674-677.
6. Bonduelle M, Camus M, De Vos A, Staessen C, Tournaye H, Van Assche E, Verheyen G, Devroey P, Liebaers I, Van Steirteghem A. Seven years of intracytoplasmic sperm injection and follow-up of 1987 subsequent children. *Hum Reprod* 1999;1:243-64.
7. Silver RI, Rodriguez R, Chang TS and Gearhart JP. In vitro fertilization is associated with an increased risk of hypospadias. *J Urol* 1999;161:1954-1957.
8. Hansen M, Kurinczuk JJ, Bower C and Webb S. The risk of major birth defects after intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization. *N Engl J Med* 2002;346:725-730.
9. Loutradi KE, Tarlatzis BC, Goulis DG, Zepiridis L, Pagou T, Chatziioannou E, Grimbizis GF, Papadimas I and Bontis I. The effects of sperm quality on embryo development after intracytoplasmic sperm injection. *J Assist Reprod Genet* 2006;23:69-74.
10. Verpoest W and Tournaye H. ICSI: hype or hazard? *Hum Fertil* 2006;9:81-92.

11. In't Veld P, Branderburg H, Verhoeff A, Dhont M, Los F. Sex chromosomal anomalies and intracytoplasmic sperm injection. *Lancet* 1995;346:773.
12. Liebaers I, Bonduelle M, Van Assche E, Devroey P, Van Steirteghem A. Sex chromosome abnormalities after intracytoplasmic sperm injection. *Lancet* 1995;346:1095.
13. Loft A, Petersen K, Erb K, Mikkelsen AL, Grinsted J, Hald F, Hindkjaer J, Nielsen KM, Lundstrom P, Gabrielsen A, Lenz S, Hornnes P, Ziebe S, Ejdrup HB, Lindhard A, Zhou Y, Nyboe Andersen A. Danish cohort of 730 infants born after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) 1994–1997. *Hum Reprod* 1999;14:2143–2148.
14. Foresta C, Garolla A, Bartoloni L, Bettella A, Ferlin A. Genetic abnormalities among severely oligospermic men who are candidates for intracytoplasmic sperm injection. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90:152-6.
15. Berkovitz A, Eltes F, Ellenbogen A, Peer S, Feldberg D, Bartoov B. Does the presence of nuclear vacuoles in human sperm selected for ICSI affect pregnancy outcome? *Hum Reprod* 2006;21,1787-1790.
16. Guthauser B, Vialard F, Dakouane M, Izard V, Albert M and Selva J. Chromosomal analysis of spermatozoa with normal-sized heads in two infertile patients with macrocephalic sperm head syndrome. *Fertil Steril* 2006;85,750.e5-750.e7.
17. Hazout A, Dumont-Hassan M, Junca AM, Cohen Bacrie P, Tesarik J. High-magnification ICSI overcomes paternal effect resistant to conventional ICSI. *Reprod Biomed Online* 2006;12:19-25.
18. Ubaldi F, Rienzi L. Morphological selection of gametes. *Placenta.* 2008;29,115-120.
19. Jakab A, Sakkas D, Delpiano E, Cayli S, Kovanci E, Ward D, Revelli A, Huszar G. Intracytoplasmic sperm injection: a novel selection method for sperm with normal frequency of chromosomal aneuploidies. *Fertil Steril* 2005;84:1665-1673.
20. Huszar G, Stone K, Dix D, Vigue L. Putative creatine kinase M-isoform in human sperm is identified as the 70-kilodalton heat shock protein HspA2. *Biol Reprod* 2000;63:925-932.
21. Huszar G, Ozenci CC, Cayli S, Zavaczki Z, Hansch E, Vigue L. Hyaluronic acid binding by human sperm indicates cellular maturity, viability, and unreacted acrosomal status. *Fertil Steril* 2003;79:1616-1624.
22. Dix DJ, Allen JW, Collins BW, Mori C, Nakamura N, Poorman-Allen P, Goulding EH, Eddy EM. Targeted gene disruption of Hsp70-2 results in failed meiosis, germ cell apoptosis, and male infertility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:3264-3268.
23. Allen JW, Dix DJ, Collins BW, Merrick BA, He C, Selkirk JK, Poorman-Allen P, Dresser ME, Eddy EM. HSP70-2 is part of the synaptonemal complex in mouse and hamster spermatocytes. *Chromosoma* 1996;104:414-421.
24. Cayli S, Sakkas D, Vigue L, Demir R, Huszar G. Cellular maturity and apoptosis in human sperm: creatine kinase, caspase-3 and Bcl-XL levels in mature and diminished maturity sperm. *Mol Hum Reprod* 2004;10:365-372.
25. Huszar G, Ozkavukcu S, Jakab A, Celik-Ozenci C, Sati GL, Cayli S. Hyaluronic acid binding ability of human sperm reflects cellular maturity and fertilizing potential: selection of sperm for intracytoplasmic sperm injection. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2006;18:260-267.
26. Huszar G, Jakab A, Sakkas D, Ozenci CC, Cayli S, Delpiano E, Ozkavukcu S. Fertility testing and ICSI sperm selection by hyaluronic acid binding: clinical and genetic aspects. *Reprod Biomed Online* 2007;14:650-663.
27. Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Vahdati AA, Fathi F, Tavalaee M. Evaluation of sperm selection procedure based on hyaluronic acid binding ability on ICSI outcome. *J Assist Reprod Genet* 2008;25:197-203.
28. Tesarik J, Greco E, Mendoza C. Assisted reproduction with in-vitro-cultured testicular spermatozoa in cases of severe germ cell apoptosis: a pilot study. *Hum Reprod* 2001;16:2640-2645.
29. Barroso G, Taylor S, Morshedi M, Manzur F, Gaviño F, Oehninger S. Mitochondrial membrane potential integrity and plasma membrane translocation of phosphatidylserine as early apoptotic markers: a comparison of two different sperm subpopulations. *Fertil Steril* 2006;85:149-154.
30. Said TM, Agarwal A, Zborowski M, Grunewald S, Glander HJ, Paasch U. Utility of magnetic cell separation as a molecular sperm preparation technique. *J Androl* 2008;29:134-142.
31. Dirican EK, Ozgün OD, Akarsu S, Akin KO, Ercan O, Uğurlu M, Camsari C, Kanyilmaz O, Kaya A, Unsal A. Clinical outcome of magnetic activated cell sorting of non-apoptotic spermatozoa before density gradient centrifugation for assisted reproduction. *J Assist Reprod Genet.* 2008;25:375-381.
32. Gadella BM, Harrison RA. Capacitation induces cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent, but apoptosis-unrelated, exposure of aminophospholipids at the apical head plasma membrane of boar sperm cells. *Biol Reprod* 2002;67:340-350.
33. de Vries KJ, Wiedmer T, Sims PJ, Gadella BM. Caspase-independent exposure of aminophospholipids and tyrosine phosphorylation in bicarbonate responsive human sperm cells. *Biol Reprod* 2003;68:2122-2134.
34. Baccetti B. Microscopical advances in assisted reproduction. *J Submicrosc Cytol Pathol* 2004;36:333-339.
35. Gianaroli L, Magli MC, Collodel G, Moretti E, Ferraretti AP, Baccetti B. Sperm head's birefringence: a new criterion for sperm selection. *Fertil Steril* 2008;90:104-112.

36. Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Crippa A, Lappi M, Capitani S, Baccetti B. Birefringence characteristics in sperm heads allow for the selection of reacted spermatozoa for intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2008;Epub ahead of print.
37. Mansour RT, Aboulghar MA, Serour GI, Amin YM, Ramzi AM. The effect of sperm parameters on the outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1995;64:982-986.
38. Nagy ZP, Liu J, Joris H, Verheyen G, Tournaye H, Camus M, Derde MC, Devroey P, Van Steirteghem AC. The result of intracytoplasmic sperm injection is not related to any of the three basic sperm parameters. *Hum Reprod* 1995;10:1123-1129.
39. Küpker W, Schulze W, Diedrich K. Ultrastructure of gametes and intracytoplasmic sperm injection: the significance of sperm morphology. *Hum Reprod* 1998;13:99-106.
40. Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F, Kogosowski A, Menezo Y, Barak Y. Real-time fine morphology of motile human sperm cells is associated with IVF-ICSI outcome. *J Androl* 2002;23:1-8.
41. Berkovitz A, Eltes F, Yaari S, Katz N, Barr I, Fishman A, Bartoov B. The morphological normalcy of the sperm nucleus and pregnancy rate of intracytoplasmic injection with morphologically selected sperm. *Hum Reprod* 2005;20:185-190.
42. Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F, Kogosovsky A, Yagoda A, Lederman H, Artzi S, Gross M, Barak Y. Pregnancy rates are higher with intracytoplasmic morphologically selected sperm injection than with conventional intracytoplasmic injection. *Fertil Steril* 2003;80:1413-1419.
43. Berkovitz A, Eltes F, Lederman H, Peer S, Ellenbogen A, Feldberg B, Bartoov B. How to improve IVF-ICSI outcome by sperm selection. *Reprod Biomed Online* 2006;12:634-638.
44. Antinori M, Licata E, Dani G, Cerusico F, Versaci C, d'Angelo D, et al. Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection: a prospective randomized trial. *RBMOnline*. 2008;16:835-841.
45. Garolla A, Fortini D, Menegazzo M, De Toni L, Nicoletti V, Moretti A, Selice R, Engl B, Foresta C. High-power microscopy for selecting spermatozoa for ICSI by physiological status. *Reprod Biomed Online* 2008;17:610-616.

INDICAZIONI E METODI DI CONGELAMENTO DEGLI SPERMATOZOI

Introduzione

I primi tentativi di congelamento del seme, da parte di Spallanzani e Mantegazza, risalgono a circa 200 anni fa, anche se si può iniziare a parlare ufficialmente di crioconservazione solo a partire dal 1946 quando Polge scopre le proprietà crioprotettive del glicerolo mentre nel 1953 vengono ottenuti da Sherman i primi successi in termini di gravidanze (1). La crioconservazione del seme o del tessuto testicolare rappresenta una tecnica che permette di conservare i gameti maschili per un tempo indefinito a -196°C e rappresenta un formidabile strumento per i pazienti che si sottopongono a trattamenti medici o chirurgici potenzialmente in grado di indurre sterilità e per i pazienti affetti da azoospermia secretoria o escretoria che possono accedere alle tecniche di fecondazione assistita.

Aspetti metodologici

Il maggiore problema biologico della crioconservazione è rappresentato dal possibile danno sui meccanismi di controllo delle attività molecolari. Infatti, tutti i processi vitali si svolgono in seguito a modificazioni biochimiche che avvengono grazie a movimenti molecolari in ambiente acquoso; tali movimenti vengono bloccati quando l'acqua intra ed extra cellulare si trasforma in ghiaccio, creando uno stato di "animazione sospesa", che consente la conservazione delle cellule per periodi di tempo variabili. Perché ciò avvenga è necessario seguire specifiche procedure. Infatti, le cellule vitali esposte a basse temperature subiscono danni irreversibili che ne provocano la morte e per ovviare a tali danni si ricorre in criobiologia a specifiche metodologie che prevedono l'uso di crioprotettori e di procedure di congelamento e scongelamento idonee, al fine di proteggere il materiale biologico dallo shock termico.

In campo seminologico la possibilità di congelare la cellula nemaspermica è basata sull'impiego di terreni di crioconservazione, costituiti da specifiche sostanze che hanno lo scopo di preservare lo spermatozoo dalla disidratazione e dall'aumento della concentrazione di sali (glicerolo, glicina, saccarosio, ecc.), di proteggerlo dallo shock termico (tuorlo d'uovo, glicerolo, glicina), di salvaguardare l'integrità della membrana cellulare, soprattutto nella parte lipoproteica (tuorlo d'uovo, glicerolo) e di ottimizzare l'osmolarità nei fluidi extracellulari (zuccheri, sali, ecc) (2).

Metodiche di congelamento

Per quanto riguarda le metodiche di congelamento, le tecniche maggiormente utilizzate sono: 1) il metodo rapido, proposto per la prima volta da Sherman (1), in cui le paillettes vengono lasciate a contatto dei vapori di azoto per circa 8 min e, quindi, immerse in azoto liquido a -196°C ; 2) il metodo lento, proposto da Behrman e Sawada, in cui il campione seminale viene portato a 4°C in 20-30 min, quindi a -40°C in 5-10 min e, finalmente, immerso in azoto liquido a -196°C ; 3) il metodo lento automatizzato che impiega dei sistemi computerizzati nei quali il campione seminale viene gradualmente raffreddato ad una velocità di abbassamento della temperatura compresa fra 1°C e $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ sino ad arrivare all'immersione finale in azoto liquido a -196°C .

La tecnica di crioconservazione del seme più utilizzata è schematizzata nella Tabella 1.

Tabella 1. Tecnica di crioconservazione del seme (metodo di Sherman) (1).

-
- Diluire goccia a goccia, con terreno crioprotettivo, il campione di liquido seminale, al termine della fluidificazione alla diluizione 1:2 e miscelare delicatamente.
 - Lasciare la sospensione così ottenuta a T ambiente per 15 min.
 - Aspirare la sospensione nelle paillettes con la pompa a vuoto.
-

-
- Sigillare le paillettes con la sigillatrice e marcarle con specifico codice identificativo.
 - Inserire le paillettes nella rastrelliera.
 - Inserire il dispositivo di crioconservazione nel contenitore dell'azoto.
 - Far discendere lentamente le paillettes sino a raggiungere la superficie dell'azoto, quindi, sollevare lentamente la rastrelliera al di sopra del livello dell'azoto.
 - Lasciare nei vapori di azoto circa 8 min .
 - Immergere lentamente le paillettes nell'azoto liquido.
 - Estrarre lentamente le paillettes dall'azoto e trasferirle negli appositi cestelli.
-

Per quanto riguarda gli spermatozoi ottenuti mediante prelievo testicolare, il materiale bioptico, posto in una capsula di Petri contenente terreno di coltura, viene sminuzzato in piccoli frammenti con aghi o vetrini portaoggetti e poi osservato al microscopio invertito per evidenziare la presenza di spermatozoi. Tale terreno di coltura viene aspirato e trasferito in una provetta sterile e lasciato sedimentare, il surnatante viene lavato con lo stesso terreno di coltura e quindi diluito goccia a goccia con il terreno di crioconservazione alla diluizione 1:2. La sospensione viene miscelata delicatamente e poi aspirata nelle paillettes che vengono sigillate e poi congelate secondo il metodo rapido o lento. Il tessuto testicolare residuo viene ulteriormente sminuzzato mediante il passaggio ripetuto in speciali cateteri radiopachi e successivamente diluito e congelato secondo la metodologia descritta precedentemente.

La tecnica di scongelamento è un punto altrettanto importante perché deve consentire alle cellule di recuperare le normali attività biologiche limitando quanto più possibile rapide differenze di temperatura. Infatti, al fine di evitare bruschi sbalzi termici è necessario estrarre lentamente le paillettes dall'azoto liquido e consentire il raggiungimento dell'equilibrio termico tra materiale cellulare ed ambiente esterno. Attualmente vengono impiegate varie tecniche di scongelamento, tra cui ricordiamo: lo scongelamento a T ambiente per 10 min e il successivo passaggio in termostato a 37°C per altri 10 min; lo scongelamento in termostato a bagnomaria a 37°C per 10 min; lo scongelamento a T ambiente (22°C) per 15 min.

Il paziente che crioconserva il proprio seme deve essere sottoposto ad uno screening infettivologico (Tab. 2) al fine di evitare la potenziale dispersione di microorganismi nel contenitore di crioconservazione ed il potenziale inquinamento degli altri campioni seminali in esso contenuti (3).

La crioconservazione del liquido seminale può avvenire esclusivamente per spontanea volontà del soggetto depositante ed al solo scopo della futura utilizzazione personale, tramite il ricorso alla procreazione assistita, sulla propria partner consenziente. Al fine di evitare conseguenze giuridiche è indispensabile far sottoscrivere e firmare al paziente un consenso informato in cui sia precisato, fra l'altro, il periodo di scadenza al termine del quale il paziente, se lo desidera, può rinnovare il deposito, che il seme crioconservato è di proprietà esclusiva di colui che deposita e che può essere richiesto e ritirato solo dal legittimo proprietario.

Tabella 2. Analisi infettive da effettuare prima della crioconservazione del seme.

SCREENING EPATITE B

- HBsAg (Antigene Australia)
 - HBsAb (Anticorpi anti HBs)
 - HBeAg (Antigene Hbe)
 - HBeAb (Anticorpi anti Hbe)
 - HBcAg (Antigene HBc)
 - HBcAb (Anticorpi anti HBc)
 - HBc IgM (Anticorpi anti Core IgM)
-

SCREENING EPATITE C

- Anticorpi anti – HCV
- HCV-RNA Qualitativo (solo in caso di positività agli Ab)

SCREENING CITOMEGALOVIRUS

- Anticorpi anti IgG
- Anticorpi anti IgM

SCREENING HIV

- Anticorpi anti - HIV
-

Indicazione alla criconservazione del seme e del tessuto testicolare

La criconservazione nelle “banche del seme” può essere “omologa” se viene criconservato il seme del soggetto stesso che poi impiegherà gli spermatozoi o “eterologa” se un donatore deposita il seme che poi verrà utilizzato da una coppia estranea al donatore stesso. Peraltro quest’ultima forma di donazione non è più effettuabile nel nostro Paese, secondo quanto previsto dall’ art. 4, comma 3 della legge 40/2004 “Norme in Materia di Riproduzione Medicalmente Assistita”.

Le principali indicazioni alla criconservazione omologa del seme e del tessuto testicolare sono riportate nella tabella 3.

Tabella 3. Principali indicazioni alla criconservazione del seme.

-
1. Pazienti affetti da patologie neoplastiche o autoimmuni che si sottopongono a terapie in grado di causare sterilità transitoria o permanente
 2. Pazienti affetti da patologie urologiche che si devono sottoporre ad interventi chirurgici in grado di alterare i meccanismi dell’ejaculazione
 3. Pazienti con lesioni del midollo spinale
 4. Pazienti con OAT che presentano transitori miglioramenti della qualità del seme
 5. Pazienti che presentano una alterazione progressiva della qualità del seme
 6. Pazienti criptozoospermici
 7. Pazienti con patologie andrologiche rare (S. di Klinefelter, S. di Kennedy, ecc.)
 8. Pazienti che hanno difficoltà (psicologiche o logistiche) a raccogliere il liquido seminale il giorno della fecondazione assistita
 9. Soggetti che per motivi di lavoro sono esposti a sostanze genotossiche
 10. Soggetti che si sottopongono a vasectomia
-

Pazienti affetti da patologie neoplastiche

La criconservazione del seme è diventata una tappa fondamentale nella gestione dei pazienti neoplastici che si sottopongono a terapie potenzialmente in grado di indurre sterilità (4). I pazienti oncologici in età fertile, pur dovendo affrontare un problema molto grave, trovano nella criconservazione del seme non solo la speranza di una fertilità futura ma anche un sostegno psicologico per affrontare le varie fasi dei protocolli terapeutici. I progressi nella terapia anti-neoplastica e le sempre più sofisticate tecniche di Fecondazione Assistita hanno aperto nuove possibilità riproduttive per il maschio infertile e, quindi, la criconservazione del seme si impone anche nei casi di liquidi seminali gravemente alterati che non avrebbero avuto nessuna possibilità di fecondare in epoca pre-ICSI. È, pertanto, imperativo informare il paziente neoplastico di questa possibilità in caso di terapie che possono ledere in modo irreversibile la capacità fecondante ed è altrettanto imperativo eseguire la criconservazione prima dell’inizio di qualsiasi terapia.

In caso di patologie neoplastiche testicolari il “periodo finestra” utile per una corretta crioconservazione è quello fra l'intervento chirurgico di orchietomia e l'inizio della chemio o radioterapia. In caso di altre patologie tumorali, degenerative o autoimmuni il deposito del seme deve essere comunque eseguito prima di qualunque terapia che possa interferire con la spermatogenesi e con l'integrità del genoma (4).

Un problema che è stato sollevato ed a cui è difficile dare una risposta definitiva è quello legato alla possibilità che vi possa essere un rischio aumentato di alterazioni genetiche nella prole dei pazienti affetti da patologie neoplastiche. I dati provenienti dai centri di fecondazione assistita ad oggi disponibili indicano che non vi sarebbe un aumento del rischio e di malformazioni nei nati da ICSI con spermatozoi crioconservati. Tuttavia il numero dei casi valutati non è sufficiente per rispondere in maniera definitiva e tranquillizzante a tale questione (5).

Pazienti affetti da patologie urologiche che si devono sottoporre ad interventi chirurgici in grado di alterare i meccanismi dell'eiaculazione

La prostatectomia si associa spesso ad eiaculazione retrograda, cioè al passaggio dello sperma, al momento dell'eiaculazione, in vescica, piuttosto che all'esterno come di norma. Essa è dovuta alla perdita del meccanismo di chiusura del collo vescicale e comporta l'impossibilità di procreare mentre si mantiene normale l'erezione. Tale condizione si verifica nell'80-90% dei pazienti operati di adenomectomia transvescicale (6). Ovviamente, anche in questo caso, la crioconservazione preventiva del liquido seminale, può ovviare all'eventuale impotenza generandi a cui vanno incontro questi soggetti.

Pazienti che si sottopongono a vasectomia

La vasectomia rappresenta un metodo contraccettivo invasivo e spesso irreversibile ed, ad oggi, poco utilizzato. Anche se la coppia si trova nella necessità di fare una scelta definitiva sulla sua capacità procreativa, varie circostanze (morte di un figlio o della partner, separazione dalla partner e nuovo desiderio di paternità) possono portare ad un ripensamento con conseguente desiderio di ricanalizzazione mediante vaso-vasostomia o vaso-epididimostomia. La crioconservazione in questi casi può consentire la possibilità di fertilità nel caso l'intervento di ricanalizzazione non portasse ai risultati sperati (7).

Pazienti con lesioni del midollo spinale

Un gruppo di pazienti sicuramente meno rappresentato ed, a volte, trascurato è quello con lesioni del midollo spinale e conseguente perdita della capacità eiaculatoria. In questi casi è possibile raccogliere il seme mediante vibromassaggio applicando un intenso stimolo vibratorio a livello della superficie dorsale e ventrale del glande e sull'area peno scrotale oppure, in caso di fallimento, mediante elettrostimolazione per via rettale; quest'ultima tecnica richiede nel 25% dei casi un'anestesia generale in particolare nei pazienti con sensibilità conservata e/o lesioni incomplete. E' quindi una metodica complessa che richiede personale medico e paramedico adeguatamente addestrato e, non ultimo, risulta particolarmente costosa. Per tali motivi la crioconservazione del seme può offrire ai pazienti il grande vantaggio di non doversi sottoporre più volte a questi trattamenti e di potere usufruire di spermatozoi impiegabili in tecniche di fecondazione assistita (8).

Pazienti che si sottopongono a programmi di fecondazione assistita.

Da quando sono state introdotte le tecniche di fecondazione artificiale ed in particolare la ICSI (intra cytoplasmic sperm injection) (9) il trattamento della sterilità maschile si è andato modificando. Infatti in epoca pre-ICSI le forme di infertilità da grave fattore maschile (severa

oligoastenoteratozoospermia o azoospermia) avevano inevitabilmente una prognosi sfavorevole. Una autentica rivoluzione in questo campo è avvenuta quando è stato messo a punto il prelievo microchirurgico di spermatozoi epididimari con la conseguente possibilità di recuperare ed impiegare in una tecnica di fecondazione assistita spermatozoi provenienti da pazienti azoospermici. Oggi esistono varie tecniche che consentono il recupero degli spermatozoi sia dall'epididimo che direttamente dal testicolo (TESE, TESA, MESA, PESA). Tali tecniche di recupero degli spermatozoi sono applicate nei casi di azoospermia ostruttiva che non possono essere trattati con successo con la microchirurgia ricostruttiva o nei casi di severissima oligoastenoteratozoospermia o azoospermia ipergonodotropa da sindrome a sole cellule di Sertoli focale o da arresto incompleto della spermatogenesi; in questi ultimi casi la spermatogenesi è talmente compromessa da non consentire la presenza di spermatozoi nell'eiaculato ma, a volte, è possibile trovare piccoli focolai di spermatogenesi intratesticolare con possibile impiego nelle tecniche di fecondazione assistita (10). Ovviamente la crioconservazione degli spermatozoi non impiegati o dei frammenti di tessuto testicolare ottenuto da biopsie consente al paziente di evitare ulteriori trattamenti invasivi. In conclusione, la crioconservazione del tessuto testicolare può inserirsi in un programma di fecondazione assistita oppure nella biopsia testicolare, ultimo livello dell'iter diagnostico dell'azoospermia escretoria o secretoria. Infatti, nel primo caso consente di avere la certezza di poter utilizzare gli spermatozoi del partner al momento del prelievo ovocitario e, nel secondo caso, se affianca il prelievo bioptico eseguito a fini diagnostici, consente al paziente di non subire una seconda biopsia in sede di fecondazione assistita.

Conclusioni

In conclusione la crioconservazione del seme rappresenta uno dei più importanti presidi che abbiamo oggi a disposizione per garantire una possibile futura fertilità a pazienti che in passato sarebbero stati condannati alla sterilità. Come abbiamo visto questo è soprattutto vero nel caso dei pazienti affetti da patologie neoplastiche i quali si trovano ovviamente in un momento di grandissimo sconforto fisico e psicologico; poter garantire un futuro fertile a tali pazienti può rappresentare uno spiraglio di serenità e di incoraggiamento per affrontare le difficoltà del momento. A tal fine è assolutamente necessario sensibilizzare gli oncologi e gli ematologi che più spesso vengono a contatto con questa tipologia di pazienti affinché prospettino tale eventualità ed è indispensabile che ogni regione si fornisca di una efficiente banca del seme in modo da soddisfare nei tempi più brevi possibili e con il più alto grado di professionalità, le sempre maggiori richieste di crioconservazione. Proprio al fine di diffondere l'impiego della crioconservazione del seme e per aumentare più possibile gli standard di effettuazione di tale pratica è stata istituita la European Association of Tissue Bank (EATB) una associazione non profit che, come si legge nel suo statuto, si propone di promuovere la cooperazione, la ricerca e lo sviluppo delle "tissue banking" in Europa.

Bibliografia

1. Sherman JF. Cryopreservation of Human Semen. In Keel BA, Webster BW (Eds). Handbook of the Laboratory Diagnosis and Treatment of Infertility. CRC Press, Boca Raton, 1990, p. 229.
2. Shufaro Y, Schenker JG. Cryopreservation of human genetic material. Ann N Y Acad Sci. 2010 Sep;1205:220-4.
3. Bielanski A, Vajta G. Risk of contamination of germplasm during cryopreservation and cryobanking in IVF units. Hum Reprod. 2009 Oct;24(10):2457-67.
4. Gandini L, Lombardo F, Salacone P, Paoli D, Anselmo AP, Culasso F, Dondero F, Lenzi A. Testicular cancer and Hodgkin's disease: evaluation of semen quality. Hum Reprod 18(4):796, 2003.
5. Revel A, Haimov-Kochman R, Porat A, Lewin A, Simon A, Laufer N, Gino H, Meirow D. In vitro fertilization-intracytoplasmic sperm injection success rates with cryopreserved sperm from patients with malignant disease. Fertil Steril. 2005 Jul;84(1):118-22.

6. Johnson EK, Hedgepeth RC, He C, Wood DP. The Impact of Anterior Urethropexy During Robotic Prostatectomy on Urinary and Sexual Outcomes. *J Endourol*. 2010 Dec 2. [Epub ahead of print].
7. Pisipati S, Percy R. The role of urological surgery in male infertility. *Hum Fertil (Camb)*. 2010 Dec;13(4):233-41.
8. Restelli AE, Bertolla RP, Spaine DM, Miotto A Jr, Borrelli M Jr, Cedenho AP. Quality and functional aspects of sperm retrieved through assisted ejaculation in men with spinal cord injury. *Fertil Steril*. 2009 Mar;91(3):819-25
9. Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 340(8810):17, 1992.
10. Semião-Francisco L, Braga DP, Figueira Rde C, Madaschi C, Pasqualotto FF, Iaconelli A Jr, Borges E Jr. Assisted reproductive technology outcomes in azoospermic men: 10 years of experience with surgical sperm retrieval. *Aging Male*. 2010 Mar;13(1):44-50.

Diagnosi microbiologica del maschio infertile

Anomalie iniziali riscontrabili nella consulenza per infertilità

Anamnesi positiva per infezioni urogenitale e/o MST nel paziente e/o nella partner

Sintomatologia (disturbi disurici e/o eiaculatori, dolore pelvico cronico)

Anomalie all'esame obiettivo genitale (didimo, epididimo, prostata, vescicole seminali, glande e/o prepuzio)

Spermiogramma + Ricerca ASA (WHO, 2010)

Approfondimento anamnestico + somministrazione questionari (NIH-CPSI, MQSS o altri)

Valori normali (entro i limiti di riferimento)

Stop

Alterazione dei parametri spermatici e/o dei parametri reologici e/o segni/sintomi di MAGI

Leucocitospermia isolata

Spermiocoltura quantitativa*
Tampone uretrale†

Ricerca HPV DNA (mRNA)

Ricerca HPV DNA nella partner

Positiva o negativa

Se positivo, controlli specifici

Ricerca HPV positiva

Vaccino

Negativa

**Stop
Anti-infiammatori
Esami di 2° livello**

Positiva per germi o miceti

Trattamento specifico

Controllo microbiologico

Tampone cervico-vaginale*

Trattamento specifico

Controllo microbiologico

Esami di secondo livello

Ecografia didimo-epididimaria

Ecografia prostatico-vescicolare

Test di Mares and Stamey

Tipizzazione delle popolazioni linfocitarie

*Incluso ricerca *Neisseria gonorrhoeae*

†per ricerca *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, *Trichomonas vaginalis* e miceti

DIAGNOSTICA ORMONALE

Tutti gli steroidi gonadici possono essere dosati con metodi radioimmunologici. Sebbene anche delle singole determinazioni possano consentire una distinzione tra soggetti normali e quelli con ipogonadismo grave, alterazioni lievi della produzione di androgeni possono passare inosservate. Nei soggetti normali vi sono delle frequenti e rapide modificazioni di tipo pulsatile del testosterone sierico, così come un lieve aumento nelle prime ore del mattino. I metodi radioimmunologici per gli androgeni e gli estrogeni misurano la concentrazione sierica totale degli steroidi, vale a dire l'ormone libero biologicamente attivo e la componente legata alle proteine; sebbene nella maggior parte dei casi non sia necessario determinare la quantità reale di ormone libero, in alcuni casi si può rendere necessario, per esempio nei pazienti affetti da ipotiroidismo, obesità e acromegalia si può osservare una ridotta concentrazione di SHBG, per cui i livelli di testosterone totale potrebbero essere ridotti a fronte di una componente biologicamente attiva nella norma.

L'LH e, in minor misura, l'FSH vengono liberati nell'arco della giornata con variazioni pulsatili. Il fine principale di dosare le concentrazioni basali delle due gonadotropine è quello di distinguere tra l'ipogonadismo ipergonadotropo, nel quale una o entrambe le tropine sono elevate, e l'ipogonadismo ipogonadotropo nel quale le gonadotropine sono ridotte, in presenza, in entrambi i casi, di una ridotta produzione di androgeni. Gli aumenti della prolattina sierica possono inibire la normale liberazione delle gonadotropine ipofisarie (in particolare dell'LH), attraverso un'azione sull'ipotalamo, motivo per il quale in tutti i pazienti con ipogonadismo ipogonadotropo dovrebbe essere dosata la prolattina sierica.

L'insieme dei parametri seminali e dei dosaggi ormonali basali, consente di ottenere delle ipotesi diagnostiche:

- Oligo- o azoospermia con testosterone ridotto, LH ed FSH aumentati, indicano insufficienza gonadica primaria.
- Oligospermia con testosterone e LH normali, ma FSH aumentato, indica insufficienza dei tubuli seminiferi
- Oligo- o azoospermia con testosterone, LH ed FSH nella norma, può associarsi ad assenza congenita dei deferenti e delle vescicole seminali, così come ad ostruzione dei dotti.
- Oligo- o azoospermia con testosterone ridotto, FSH ed LH normali o ridotti, correla con patologia ipotalamo-ipofisaria.
- Oligo- o azoospermia con LH e testosterone aumentati, ma FSH normale, si presenta in caso di ipertiroidismo o di insensibilità parziale agli androgeni.

Le inibine A e B sono glicoproteine eterodimeriche. Nell'uomo è dosabile solo l'inibina B. Questo ormone è prodotto dalle cellule del Sertoli e dalle cellule della spermatogenesi. Durante l'infanzia l'inibina B è prodotta dalle sole cellule del Sertoli sotto il controllo delle gonadotropine; in questa fase il suo dosaggio è utile nella diagnosi differenziale tra anorchia e criptorchidismo bilaterale in pazienti con testicoli non palpabili. A partire dall'epoca puberale, la produzione avviene ad opera di cellule della spermatogenesi, in stadi specifici, ovvero dallo spermatocita allo stadio di pachitene fino allo spermatide rotondo. Pertanto, nell'uomo adulto, i livelli di inibina B sono strettamente correlati alla spermatogenesi, e risultano bassi o indosabili nella *Only Sertoly Cell Syndrome* e negli arresti maturativi precoci, mentre risultano nella norma negli arresti maturativi tardivi e nelle azoospermie ostruttive.

Il testicolo produce anche estradiolo: tuttavia nel maschio solo il 20% della quota circolante è di provenienza testicolare, mentre il restante 80% ha origine periferica da interconversione di androgeni testicolari e surrenalici ad opera della aromatasi. Trattandosi di un enzima caratteristico del tessuto adiposo, nei soggetti obesi è più comune osservare riduzione dei livelli di testosterone a vantaggio dell'estradiolo.

Valori di riferimento, in condizioni basali:

Ormone	Intervallo di normalità	Unità di misura
LH	1.70-8.60	mUI/mL
FSH	1.50-12.40	mUI/mL
TESTOSTERONE	10.4-38.20	nmol/L
PROLATTINA	4.00-15.20	ng/mL
ESTRADIOLO	25.00-107.00	pg/mL
INIBINA B	80.00-380.00	pg/mL

Oltre alle valutazioni ormonali basali, è possibile anche ricorrere a test dinamici.

Il test di stimolazione con gonadotropina corionica umana (hCG), si basa sulla un'iniezione di tale ormone glicoproteico che presenta azioni biologiche simili a quelle dell'LH. Dopo la somministrazione l'hCG si lega ai recettori dell'LH a livello delle cellule del Leydig e stimola la sintesi e la secrezione di steroidi testicolari. Pertanto le cellule del Leydig possono essere studiate direttamente con la somministrazione di 4000 UI/die di hCG per quattro giorni. Una risposta normale è rappresentata da un raddoppio dei livelli di testosterone dopo l'ultima iniezione. I pazienti con una patologia primitiva gonadica presentano una risposta ridotta dopo il test, mentre i pazienti con insufficienza delle cellule del Leydig, secondaria ad una patologia ipofisaria o ipotalamica, presentano una risposta qualitativamente normale.

L'ormone stimolante le gonadotropine (GnRH), stimola direttamente le cellule gonadotrope dell'ipofisi anteriore a produrre LH ed FSH. Sulla base di tale meccanismo d'azione il test di stimolo dovrebbe consentire di distinguere la patologia ipotalamica da quella ipofisaria. In realtà sono numerosi gli studi in cui si è osservato una assenza di risposta al test da stimolo con GnRH, sia in presenza di patologia ipofisaria si in caso di patologia ipotalamica. Inoltre la presenza di una normale risposta dell'LH e dell'FSH al GnRH, in un maschio ipogonadico, non elimina l'ipopituitarismo come possibile causa di insufficienza gonadica, dato che alcuni pazienti con ipogonadismo ipogonadotropo lieve possono mostrare una risposta normale. Il test si effettua somministrando 100 microgrammi di GnRH con bolo endovenoso rapido e dosaggio di LH e FSH ai tempi 0',15',30',45',60',90'. I maschi adulti sani presentano un aumento da 2 a 5 volte dell'LH rispetto ai valori basali, mentre il valore dell'FSH raddoppia. Tuttavia, alcuni maschi normali non mostrano alcun aumento dell'FSH dopo il test da stimolo. I pazienti con una patologia testicolare primitiva possono rispondere con un aumento esagerato di LH e FSH. Se è presente solamente un danno a carico dei tubuli seminiferi, si osserva un aumento anormale dell'FSH e una risposta normale dell'LH.

Esiste anche il test di stimolazione con clomifene citrato. Il clomifene citrato è un composto non steroideo dotato di debole attività estrogenica. Esso si lega ai recettori degli estrogeni in vari tessuti, compreso l'ipotalamo. Impedendo all'estradiolo il legame di questi recettori, il clomifene fa sì che l'ipotalamo percepisca una riduzione dei livelli di estradiolo. Il deficit apparente di estradiolo porta ad un aumento della liberazione di GnRH, la cui conseguenza principale è la stimolazione delle cellule gonadotrope ipofisarie a secernere quantità maggiori di LH ed FSH. Questo test consente, dunque, di valutare l'integrità sia dell'ipotalamo sia dell'ipofisi. Il test si effettua con la somministrazione di clomifene citrato, 100 mg per os, due volte al giorno per dieci giorni. I soggetti maschi normali presentano un aumento del 50-250% dell'LH, del 30-200% dell'FSH e del 30-220% del testosterone nel decimo giorno di somministrazione. Nei pazienti con malattie ipofisarie o ipotalamiche non si osserva tale aumento.

Bibliografia

- Sharlip ID et al: Best practice policies for male infertility. Fert Steril 2002.
- Kauschansky A, Dickerman Z, Phillip M, Weintrob N, Strich D. Use of GnRH agonist and human chorionic gonadotrophin tests for differentiating constitutional delayed puberty from gonadotrophin deficiency in boys. Clin Endocrinol (Oxf) 2002;
- Pan H, Shi YF, Deng JY, Wu XY, Lu S. Clinical value of LHRH exciting test in differential diagnosis of constitutional delayed puberty and male hypogonadotropic hypogonadism. Chin J Endocrinol Metab. 2003;
- Cheer K, Trainer PJ. Evaluation of pituitary function. Handb Clin Neurol 2014.

DIAGNOSTICA CITOLOGICA CON AGOASPIRATO TESTICOLARE

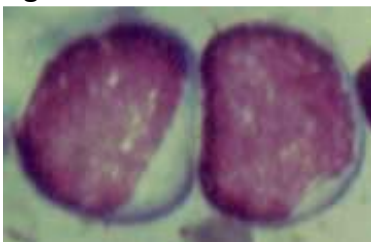
Negli uomini infertili affetti da azoospermia va sempre raccomandata l'esecuzione di un agoaspirato testicolare, perché tale procedura, minimamente invasiva, permette di valutare la struttura istologica del testicolo e lo stato della spermatogenesi, differenziando le condizioni di sindrome a sole cellule del Sertoli, le ipospermatogenesi, gli arresti spermatogoniali, quelli spermatidici ed i quadri di normale spermatogenesi.

L'agoaspirazione testicolare fu proposto per la prima volta nel 1992 ed attualmente è considerata una tecnica minimamente invasiva e facilmente riproducibile per lo studio dell'epitelio seminifero e del processo spermatogenetico in soggetti infertili (1,2,3). Tale metodica permette di distinguere azoospermie ed oligozoospermie di natura ostruttiva da quelle di natura secretiva e, nell'ambito di queste ultime, consente di individuare diversi gradi di ipospermatogenesi, associati o meno a turbe maturative. L'esatta categorizzazione del paziente consente di scegliere una terapia specifica, mirata per ciascun soggetto.

Sulla base delle caratteristiche citologiche all'esame microscopico dopo colorazione, è possibile individuare in maniera precisa le caratteristiche delle varie cellule della spermatogenesi qui di seguito riportate:

- **Spermatogoni.** Nell'uomo, come nel ratto, sono stati identificati tre diversi tipi di spermatogoni, denominati A dark (Ad), A pale (Ap) e B (4,5) (Fig.1).

Fig.1



Spermatogonio A dark



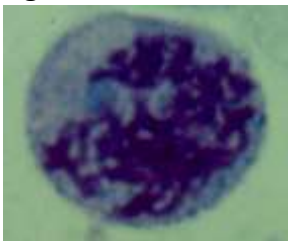
Spermatogonio A pale



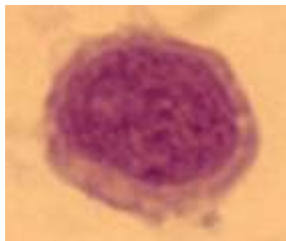
Spermatogonio B

- **Spermatocita primario e Spermatocita secondario** (Fig.2)

Fig.2



Spermatocita primario



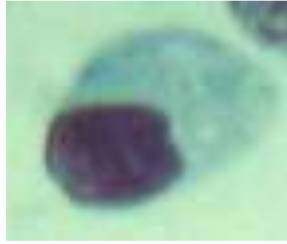
Spermatocita secondario

- **Spermatidi.** Classicamente si distinguono 2 tipi di spermatidi: early spermatidi (Sab) o spermatidi rotondi e late spermatidi (Scd) o spermatidi allungati. (Fig.3).

Fig. 3



Spermatide ab (rotondo)



Spermatide cd (allungato)

- **Spermatozoi.** Talora possono presentare piccoli residui citoplasmatici a livello del middle-piece od essere privi della coda come conseguenza dello striscio su vetrino, o essere immersi nel citoplasma di cellule del Sertoli prima del rilascio nel lume tubulare (Fig.4).

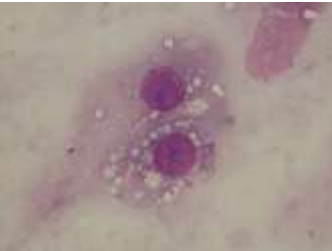
Fig. 4



Spermatozoo maturo

- **Cellula del Sertoli.** Essendo molto delicate vengono facilmente danneggiate durante lo striscio e possono apparire sprovviste di citoplasma. (Fig.5).

Fig.5

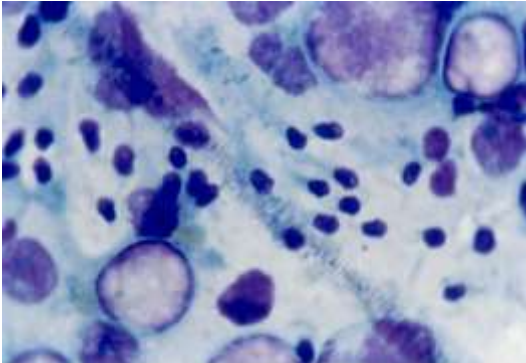


Cellula del Sertoli

I preparati citologici dei soggetti con normozoospermia sono caratterizzati dalla presenza di tutte le cellule spermatogenetiche, con prevalenza delle forme più mature rispetto a quelle immature e alle cellule del Sertoli. In particolare le forme più rappresentate sono gli spermatidi Sab e Scd, in accordo con la progressione geometrica cui vanno incontro le cellule a partire dallo stadio di spermatogonio fino a quello di spermatide. Una simile progressione numerica non è presente da spermatociti primari e secondari, che presentano percentuali simili tra loro, a causa della breve durata (circa 24 ore) dello stadio di spermatocita secondario. La percentuale di spermatozoi non risulta superiore a quella degli spermatidi in conseguenza della mancanza di un'ulteriore divisione cellulare e della rapida esfoliazione degli spermatozoi nel lume tubulare e nelle vie escrettrici.

Normalmente le cellule del Sertoli rappresentano circa un terzo di tutte le cellule testicolari visualizzabili nei vetrini allestiti da agoaspirato (Fig.6).

Fig. 6

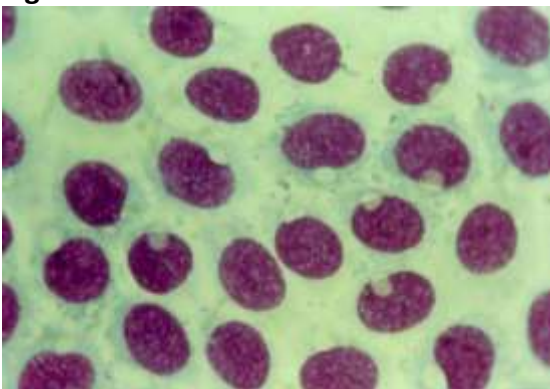


Quadro citologico normale/ostruttivo

L'esame citologico testicolare permette di distinguere in maniera certa le azoospermie di natura secretiva, da sindrome a sole cellule di Sertoli o da grave ipospermatogenesi o da arresti maturativi completi nella linea spermatogenetica, da quelle di natura escretoria, conseguenti ad ostruzione delle vie seminali. La lettura dei preparati citologici dei soggetti azoospermici può evidenziare pertanto i seguenti quadri:

- **Sindrome a sole cellule di Sertoli.** In questo quadro mancano completamente gli elementi della linea germinale (Fig.7).

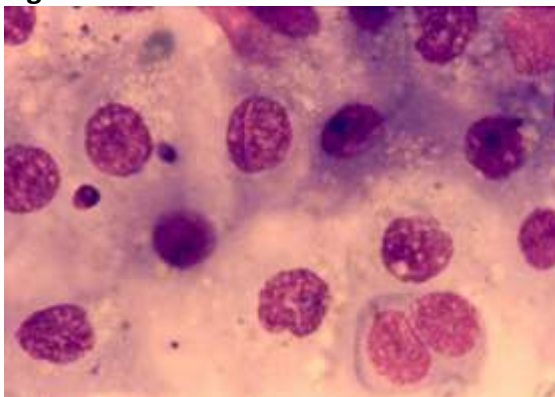
Fig. 7



Sindrome a sole cellule del Sertoli

- **Gravi ipospermatogenesi.** Le gravi ipospermatogenesi sono caratterizzate dalla marcata riduzione della componente germinativa, con incremento della percentuale di cellule del Sertoli rispetto a quella delle cellule della spermatogenesi (Fig.8).

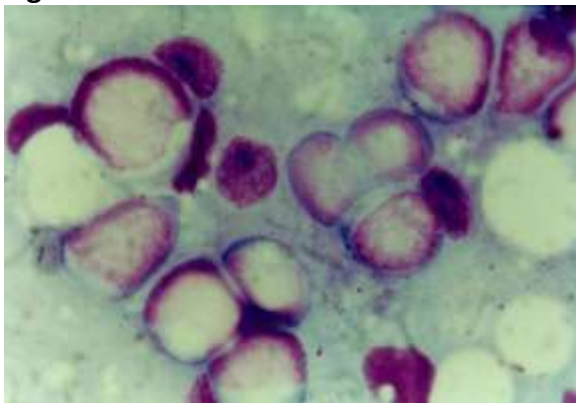
Fig. 8



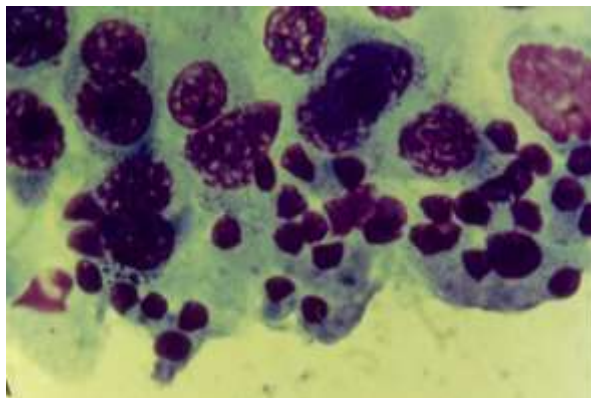
Grave ipospermatogenesi

- **Arresti maturativi.** Spesso sono presenti importanti anomalie nella progressione maturativa spermatica e fenomeni di rallentamento maturativo, responsabili dell'aumento percentuale di spermatogoni e/o spermatociti primari e dell'assenza di forme mature di spermatozoi. Negli arresti maturativi viene conservato il normale rapporto tra cellule di Sertoli e cellule spermatogenetiche, ma sono presenti importanti disturbi maturativi con aumento della percentuale di spermatogoni e spermatociti primari e corrispondente decremento delle forme più a valle fino alla completa assenza di elementi maturi. Poiché il feed-back negativo sulla secrezione di FSH coinvolge solo le cellule spermatogenetiche più mature, i quadri di blocco maturativo precoce (a livello spermatogoniale-spermatocitico primario) si associano ad incremento dell'FSH, mentre quelli tardivi (a livello spermatocitico secondario-spermatidico) si accompagnano a normali livelli di gonadotropina (Fig.9).

Fig. 9



Arresto spermatogoniale completo

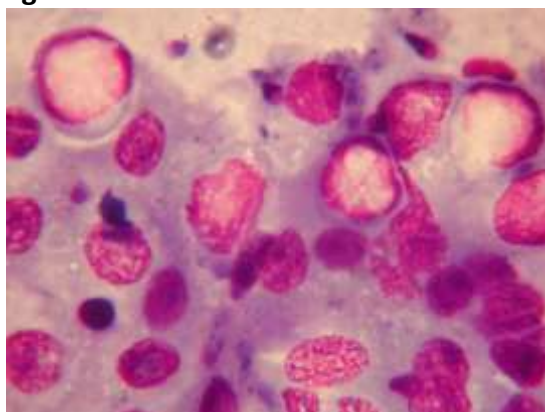


Arresto spermatidico completo

Infine, nelle azoospermie escretorie la citologia testicolare evidenzia un normale andamento maturativo germinale con presenza di tutte le cellule spermatogenetiche (Fig.6) e frequente incremento percentuale delle forme mature rispetto alle altre cellule della spermatogenesi e alle cellule del Sertoli (6).

Analogamente a quanto detto per le azoospermie, nelle oligozoospermie gravi è possibile individuare quadri citologici caratterizzati da ipospermatogenesi e/o da blocchi maturativi parziali e quadri parzialmente ostruttivi (Fig.10).

Fig. 10



Moderata ipospermatogenesi

Nelle ipospermatogenesi è presente una riduzione della percentuale di cellule della spermatogenesi rispetto alle cellule del Sertoli con presenza di rari spermatozoi maturi. In questi casi, l'entità dell'incremento della percentuale di cellule del Sertoli esprime il grado di alterazione e compromissione della componente spermatogenetica.

Nei blocchi maturativi è presente un incremento percentuale delle forme a monte del blocco, espressione di una difficoltosa progressione maturativa, con riduzione ma mai assenza, delle forme mature e frequente associazione con fenomeni cellulari di tipo degenerativo (elementi multinucleati o in fase di anomala divisione) (6). In tabella 2 sono riportati i vari quadri citologici riscontrabili nei diversi casi di azoospermia ed oligozoospermia con i rispettivi livelli di FSH.

Tab. 2 Principali quadri citologici correlati ad alterazioni quantitative dei parametri seminali.

QUADRO SEMINALE	DIAGNOSI CITOLOGICA	QUADRO CITOLOGICO	QUADRO ORMONALE
AZOOSPERMIA	-Quadro ostruttivo.	-Normale linea maturativa germinale	-FSH normale
	-Sindrome a sole cellule del Sertoli	-Assenza completa degli elementi germinali	-FSH elevato
	-Grave ipospermatogenesi	-Marcata riduzione della componente germinativa, con incremento della percentuale di cellule del Sertoli rispetto a quella delle cellule della spermatogenesi ed assenza di cellule spermatiche mature	-FSH elevato
	-Blocco maturativo completo a livello spermatogoniale/ spermatocitico o spermatidico	-Normale rapporto tra cellule del Sertoli e cellule della spermatogenesi, assenza completa di cellule mature ed incremento percentuale delle cellule spermatogeniche a monte del blocco (spermatogoni/spermatociti o spermatociti/spermatidi)	-FSH elevato nei blocchi precoci; normale negli arresti maturativi tardivi (normale feed-back sull'ipofisi)

OLIGOZOOSPERMIE	-Ipospermatogenesi lieve-moderata	-Incremento della percentuale di cellule del Sertoli per riduzione della componente germinativa ed aumento relativo delle cellule di Sertoli; riduzione delle cellule spermatiche mature	-FSH elevato
	-Blocchi maturativi parziali a livello spermatogoniale/ spermatocitico o spermatidico	- Normale rapporto tra cellule del Sertoli e cellule della spermatogenesi, riduzione del numero di cellule mature ed incremento percentuale delle cellule spermatogeniche a monte del blocco (spermatogoni/spermatociti o spermatociti/spermatidi)	- FSH elevato nei blocchi precoci; normale negli arresti maturativi tardivi (normale feed-back sull'ipofisi)

Bibliografia

1. Foresta C, Varotto A, Scandellari C. Assessment of testicular cytology by fine needle aspiration as a diagnostic parameter in the evaluation of the azoospermic subject. *Fertil Steril* 1992; 57: 858–865.
2. Foresta C, Ferlin A, Bettella A, Rossato M, Varotto A. Diagnostic and clinical features in azoospermia. *Clin Endocrinol* 1995; 43: 537–543.
3. Foresta C, Varotto A. Assessment of testicular cytology by fine needle aspiration as a diagnostic parameter in the evaluation of the oligospermic subject. *Fertil Steril* 1992; 58: 1028–1033.
4. Clermont Y. The cycle of the seminiferous epithelium in men. *Amer J Anat* 1963; 112: 35-51.
5. Clermont Y. Spermatogenesis in men. A study of the spermatogonial population. *Fertil Steril* 1966; 17: 705-721.
6. Shefi S, Kaplan K, Turek PJ. Analysis of spermatogenesis in non-obstructive azoospermic and virtually azoospermic men with known testicular pathology. *Reprod Biomed Online* 2009; 18(4): 460-464.

Istologia testicolare

Le indicazioni per l'effettuazione di una diagnostica invasiva in caso di infertilità maschile sono significativamente cambiate negli ultimi trent'anni per diversi motivi, non ultimo il ruolo delle tecniche di riproduzione assistita nel trattamento dell'infertilità di coppia. In particolare, nelle forme più gravi di infertilità maschile, quali le azoospermie, è stato abbandonato il vecchio protocollo diagnostico invasivo che prevedeva l'esecuzione di una esplorazione scrotale con biopsia testicolare a cielo aperto e vesciculodeferentografia (VDG).

In effetti, in molti dei casi di azoospermia la diagnosi differenziale definitiva tra azoospermia ostruttiva e secretoria è ancora oggi desumibile solo dai risultati dell'istologia testicolare. Infatti una azoospermia associata ad una normale istologia testicolare è prova certa, anche se indiretta, della presenza di una ostruzione delle vie seminali.

Il panorama è cambiato da quando, con l'avvento dell'ICSI (iniezione intracitoplasmatica di spermatozoi), nelle azoospermie la tendenza è di effettuare una biopsia testicolare per ottenere una diagnosi istologica associandola al recupero di spermatozoi per ICSI immediata o successiva, previo congelamento di essi.

E' importante anche ricordare che la ICSI non rappresenta l'unica terapia per l'azoospermia (vi sono anche le ricanalizzazioni microchirurgiche, le disostruzioni dei dotti eiaculatori, il trattamento farmacologico-ormonale dell'ipogonadismo ipogonadotropo e dell'ipospermatogenesi, etc.). Da qui la valenza di una precisa diagnosi eziologica sia ai fini della scelta della terapia appropriata, medica o chirurgica, sia, nel caso della ICSI, della predizione delle possibilità di successo e di ripetizione della stessa. E' perciò pratica diffusa effettuare una biopsia testicolare diagnostica inviando un campione per esame istologico ed uno o più campioni al laboratorio biologico (TESE o MICROTESE) per il congelamento degli spermatozoi in vista di una successiva ICSI. Il referto istologico sarà anche utile per confermare il risultato del laboratorio biologico nel recupero di spermatozoi, per meglio chiarire il quadro di danno spermatogenetico e per dare ulteriori indicazioni all'andrologo sulla possibilità di successo di una ulteriore futura procedura di recupero di spermatozoi. Infine, l'esame istologico sarà di fondamentale importanza per escludere la presenza di una neoplasia testicolare, in particolare nella condizione di neoplasia intratubulare, talvolta associata all'infertilità maschile.

Esistono situazioni particolari in cui l'esame istologico può essere omesso, quali per es. l'agenesia bilaterale dei deferenti. In questa condizione, infatti, in oltre il 95% dei casi la spermatogenesi è normale ed essendo la ICSI l'unica terapia efficace, è giustificato, in caso di deferenti non palpabili, omettere la biopsia ed effettuare direttamente il recupero degli spermatozoi per ICSI, anche con semplice agoaspirato. La biopsia può altresì essere omessa sia nelle azoospermie da ostruzione distale,

nelle quali un recupero transcutaneo o un wash out di spermatozoi del tratto deferente-ampullo-vescicolare possono chiarire la causa della azoospermia e rendono immediatamente possibile la terapia, sia in altre azoospermie di certa natura ostruttiva, come nei vasectomizzati.

Esistono ancora pochi lavori che abbiano comparato i risultati dell'agoaspirato testicolare con un esame istologico tradizionale. In linea di massima l'agoaspirato è sufficientemente attendibile in mani esperte, ma spesso, per una diagnosi esatta del tipo di danno spermatogenetico, è necessaria una biopsia testicolare con esame istologico.

Ai fini diagnostici è consigliabile una biopsia singola di circa 5 mm su ciascun testicolo. La biopsia multipla, anche se più accurata, è sicuramente troppo invasiva al solo scopo diagnostico. Riteniamo più adeguata la biopsia chirurgica tradizionale "open", possibilmente con tecnica "a finestra", senza esteriorizzazione del testicolo, rispetto alle tecniche percutanee con ago tru-cut o di altro tipo. Queste ultime infatti, spesso non permettono di avere un adeguato frammento per la istologia (tessuto testicolare scarsamente compatto) e in definitiva non sono meno invasive (puntura alla cieca, rischio di ematocele, di ematomi intratesticolari, di danno epididimario, necessità comunque di anestesia locale).

Inoltre è consigliabile:

- Manipolare il meno possibile il pezzo da asportare e da analizzare
- Utilizzare il fissativo adeguato (Bouin o Zenker)
- Esaminare almeno 80 sezioni di tubuli seminiferi
- Associare quando possibile una preparazione a fresco (wet prep) o, meglio ancora, un frammento per TESE diagnostica e/o eventualmente terapeutica tramite congelamento del pezzo o degli spermatozoi per successiva ICSI.

I quadri istologici sono essenzialmente cinque:

1. Spermatogenesi normale (ostruzione)
2. Ipospermatogenesi
3. Aplasia cellule germinali (SCOS):
 - 3a) completa
 - 3b) incompleta
4. Arresto maturativo:
 - 4a) completo
 - 4b) incompleto
5. Sclerosi tubulare

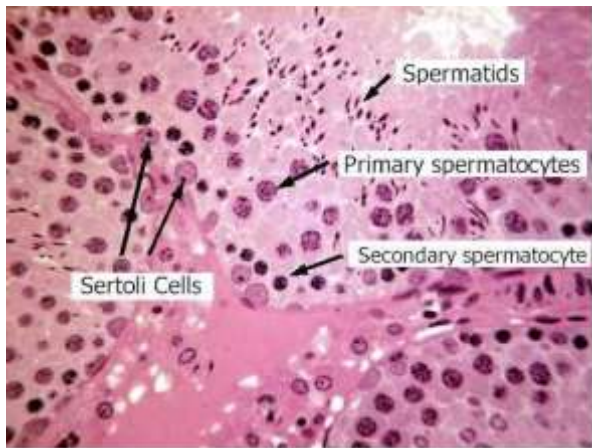


Fig 1 Spermatogenesi normale



Fig 2 Ipospermatogenesi

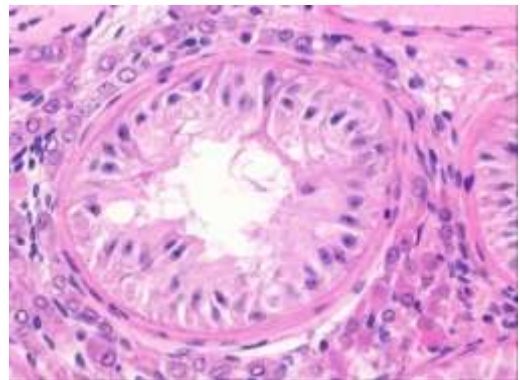


Fig 3 SCOS

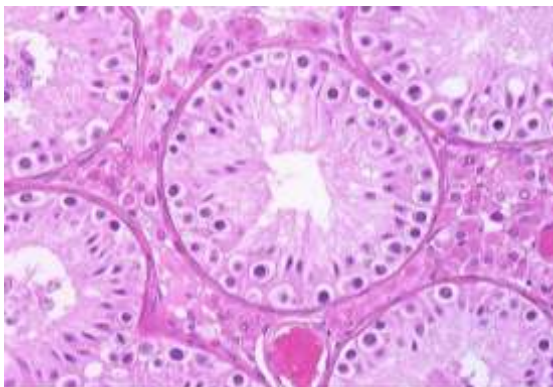


Fig 4 Arresto maturativo

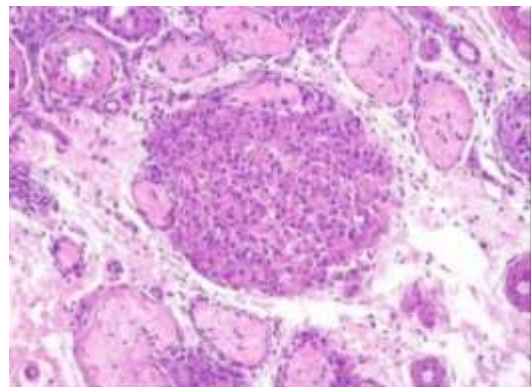


Fig 5 Sclerosi tubulare

Un lavoro di Tournaye ha analizzato il valore predittivo della biopsia testicolare ai fini di un successivo recupero di spermatozoi per ICSI nelle diverse situazioni istologiche. Complessivamente in caso di ritrovamento di spermatozoi nella biopsia,

il valore predittivo positivo è dell' 83%. In caso di assenza di spermatozoi il valore predittivo negativo è del 68,7%. In particolare, distinguendo i vari quadri istologici, la possibilità di recupero di spermatozoi è la seguente:

- Spermatogenesi normale (ostruzione) e ipospermatogenesi: 100%
- SCOS completa 19%
- SCOS incompleta 86%
- Arresto completo 48%
- Arresto incompleto 62%

Studi più recenti (Su, Franco, Caroppo) hanno sostanzialmente riportato analoghe percentuali.

Bibliografia

- **Assesment of testicular citology by fine needle aspiration as a diagnostic parameter in the evaluation of the azoospermic subject**
Foresta C, Varotto A, Scandellari C
Fertil Steril 1992;57: 858-65
- **Normal pregnancies resulting from testicular sperm extraction and ICSI for azoospermia due to maturation arrest**
Silber SJ, Van Steirteghem AC, Nagy PZ, Liu J, Tournaye H, Devroey P
Human reproduction 1996;66: 110-117
- **Correlation between testicular histology and outcome after intracytoplasmic sperm injection using testicular spermatozoa**
Tournaye H, Liu J, Nagy PZ, Camus M, Goossens A, Silber SJ, Van Steirteghem AC, Devroey P
Human reproduction 1996;11: 127-132
- **Testicular sperm extraction with intracytoplasmic sperm injection for nonobstructive azoospermia:testicular histology can predict success of sperm retrieval.**
Su LM, Palermo GD, Goldstein M, Veeck LL, Rosenwaks Z, Schlegel PN.
J Urol. 1999 Jan;161(1):112-6

- **A novel stepwise micro-TESE approach in non obstructive azoospermia.**
Franco G, Scarselli F, Casciani V, De Nunzio C, Dente D, Leonardo C, Greco PF, Greco A, Minasi MG, Greco E
BMC Urol. 2016 May 12;16(1):20
- **Testicular histology may predict the successful sperm retrieval in patients with non-obstructive azoospermia undergoing conventional TESE: a diagnostic accuracy study.**
Caroppo E, Colpi EM, Gazzano G, Vaccalluzzo L, Scroppo FI, D'Amato G, Colpi GM
J Assist Reprod Genet. 2016 Sep 21

VALUTAZIONE DELL'INTEGRITA' CROMATINICA : SCSA, TUNEL, COMET, SCD

VALUTAZIONE ISTONI E PROTAMINE: BU DI ANILINA , CMA3,

La cromatina nemaspermica è stata oggetto di numerosi studi che hanno evidenziato una diversità di organizzazione nucleare nelle varie specie animali; in particolare nei mammiferi il DNA nemaspermico, grazie a particolari proteine basiche, viene notevolmente condensato. Infatti, nonostante, lo spermatozoo sia privo di sistemici enzimatici di riparo del DNA, risulta essere una cellula molto resistente all'azione di agenti fisici, chimici e biologici grazie proprio alla profonda ristrutturazione nucleare. L'impacchettamento della cromatina è dovuto principalmente al DNA complessato con le protamine (PRM) piuttosto che con gli istoni, come invece avviene per le cellule somatiche e per le cellule germinali prima del loro differenziamento. Le PRM sono proteine basiche specie-specifiche, espresse solo nel maschio, a basso peso molecolare e con elevato contenuto di arginina e cisteina. Tutto ciò contribuisce a far sì che il DNA nemaspermico dei mammiferi sia il DNA eucariotico maggiormente condensato. Nell'uomo sono distinguibili 2 tipi di PRM: PRM1 e PRM2. PRM2 differisce da PRM1 nella sequenza aminoacidica e nel peso molecolare, è molto più ricca di istidina, e presenta il cluster di arginine distribuito più regolarmente lungo la molecola. Il processo di compattazione DNA-protamine inizia nel testicolo, continua nell'epididimo, si conclude nel fluido seminale. In particolare, durante la spermiogenesi, il nucleo degli spermatidi viene rimodellato e condensato mediante la sostituzione degli istoni con le protamine. La transizione istoni/protamine è molto complessa e si effettua con diversi meccanismi di fosforilazione, acetilazione, ubiquinazione istonica e con l'ausilio di proteine di transizione (TNP), capaci di mantenere una struttura intermedia nei siti di deposizione delle PRM e favorire l'eliminazione degli istoni (1) anche se il loro ruolo non è stato ben definito. Il filamento di DNA si avvolge intorno alle molecole di protamine formando loops altamente organizzati. Ogni molecola di protamina viene avvolta da una spira di DNA; in particolare, lungo il solco della doppia elica, si formano legami tra cariche positive dei residui di arginina delle protamine e residui carichi negativamente della struttura fosfodiesterica del DNA. Il DNA legato alle protamine si avvolge in cerchi concentrici, che collassano in una struttura toroidale contenente 50-60 Kb di DNA. Tale complesso è fortemente compattato e stabilizzato da ponti covalenti -S-S- intra ed inter-protaminici tra i residui cisteinici -SH. L'unità fondamentale dell'impacchettamento cromatinico è, quindi, un toroide di circa 60 kb di DNA, di circa 0.9 μm di diametro, spesso circa 0.2 μm e con un buco centrale di 0.15 μm . Ogni toroide contiene un loop di DNA ed è ancorato alla matrice nucleare, mediante regioni di attracco definite MAR (Matrix Associated Regions) (2), ad intervalli di 40 Kb; tali regioni sono costituite da

un segmento nucleasi sensibile di circa 1000 bp (3). La matrice nucleare sembra svolgere un ruolo molto importante in quanto è stato dimostrato che la corretta associazione DNA- matrice nucleare è necessaria per la replicazione del DNA del pronucleo maschile ed il controllo dell'integrità nucleare dopo la fecondazione. La cromatina dello spermatozoo, quindi, può essere suddivisa in importanti domini strutturali rappresentati da istoni, protamine e MAR. Tale complessa organizzazione strutturale è necessaria per la realizzazione di importanti funzioni quali ridurre la grandezza e la forma del nucleo dello spermatozoo conferendo alla cellula una struttura idrodinamica e proteggere il genoma maschile durante il transito nelle vie genitali femminili. Il DNA nemaspermico, infatti, può essere soggetto a frammentazione, ed in particolare, una piccola percentuale di rotture del DNA avviene fisiologicamente, durante la spermiogenesi, per agevolare la riorganizzazione della cromatina. Una volta che la cromatina viene condensata, le rotture dei filamenti di DNA vengono riparati. Errori che intervengono nel meccanismo di rottura e riparo dei filamenti di acido nucleico possono causare alterazione della condensazione e frammentazione del DNA. L'etiologia del danno al DNA nemaspermico è multifattoriale e le anomalie della struttura cromatinica possono essere, anche, il risultato di danni indotti da difetti di condensazione cromatinica e di protaminizzazione, processo apoptotico e stress ossidativo da radicali liberi.

Per la valutazione del danno al DNA nemaspermico sono stati messi a punto numerosi metodi e strategie al fine di definire il grado di condensazione della cromatina all'interno del nucleo. Lo sviluppo di questi test si è incrementato parallelamente al progresso della Procreazione Medicalmente Assistita (PMA) e all'importanza che l'integrità cromatinica ha assunto in questo contesto.

Per valutare il processo di sostituzione istoni - protamine sono stati utilizzati i seguenti metodi: Blu di Anilina e Cromomicina A3 (CMA3). In condizioni normali, la sostituzione deve essere completa affinché la condensazione della cromatina possa essere considerata ottimale. Per l'analisi degli istoni residui, viene utilizzato il Blu di Anilina, un colorante che si lega specificamente con la lisina, amminoacido molto presente negli istoni e poco rappresentato nelle protamine. Gli spermatozoi con nuclei ricchi di istoni appariranno blu mentre quelli protaminati non verranno colorati. Vari studi hanno confrontato le anomalie cromatiniche valutate mediante blu di anilina con l'outcome della PMA indicando che la percentuale di spermatozoi con anomalie cromatiniche sembra maggiore nei pazienti infertili. La maggior parte degli studi non ha rilevato una correlazione tra spermatozoi con anomalie della condensazione cromatinica e percentuale di fecondazione; l'associazione invece, è stata identificata, dopo IUI (Intra Uterine Insemination) e Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI), con la percentuale di aborto, sviluppo dello zigote (4,5) e con il corso della gravidanza (6), indicando il test Blu di Anilina come predittivo nella scelta

della tecniche di PMA. Le anomalie della cromatina possono essere anche valutate mediante l'analisi delle protamine. In questo caso si utilizza la Cromomicina A3, un antibiotico fluorescente con affinità per le regioni ricche di G-C. La CMA3 compete per il sito di legame delle protamine, quindi, spermatozoi subprotaminati appariranno fluorescenti mentre quelli che hanno completato la sostituzione istonica compariranno non fluorescenti alla lettura al microscopio a fluorescenza. In letteratura sono presenti numerosi lavori che utilizzano il test CMA3 al fine di predire l'outcome riproduttivo, ma i dati sono discordanti. Diversi studi (7,8,9,10,11) hanno rilevato una correlazione negativa tra percentuale di spermatozoi subprotaminati valutati e percentuale di fecondazione con ICSI; un minor numero di studi, invece, ha trovato una significatività tra percentuale di CMA3 e percentuale di fecondazione con IVF (12,13). Diversi lavori, inoltre, hanno comparato i due test CMA3 e Blu di Anilina dimostrando che CMA3 aveva una maggiore capacità predittiva rispetto al test Blu di Anilina (7,14); mentre un lavoro del 2015 (15) ha dimostrato che i due test non rilevano differenze nella condensazione cromatinica tra fertili e infertili rispetto ad altre metodologie prese in considerazione nello studio. E' da sottolineare, però, che le capacità predittive di CMA3 e Blu di Anilina possono variare sulla base del cutoff scelto (16) e che tali metodologie analizzano le anomalie di sostituzione istoni/ protamine ma non riescono a dare informazioni molto precise; in particolare, non sono in grado di discriminare il difetto di PRM1 o di PRM2, per il quale, invece, è necessario applicare metodologie più specifiche e attendibili, quali RTqPCR o Western blotting. Il processo di impacchettamento, derivante dalla sostituzione degli istoni con le protamine, infatti, è caratterizzato da un corretto rapporto di PRM1 e 2. Negli individui fertili tale rapporto è compreso tra 0,8 e 1,2 (17,18) e alterazioni nell'espressione genica e nel rapporto proteico di PRM1/PRM2 sono state osservate in associazione con l'infertilità (19,20) e con la riduzione della qualità embrionale (21,22,23). Livelli alterati delle protamine sono, anche, associati ad una riduzione dell'integrità cromatinica. In un lavoro del 2005 è stato dimostrato, infatti, una aumentata frammentazione del DNA in campioni con un basso rapporto PRM1/PRM2 rispetto a quelli con normale o elevato rapporto di protamine (24).

Per valutare l'integrità della cromatina nemaspermica vengono utilizzati i seguenti metodi: TUNEL, COMET, SCSA, SCD.

TUNEL - Il metodo TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase UTP-driven Nick End Labeling) visualizza la presenza di rotture endogene sul DNA degli spermatozoi mediante l'enzima, TdT (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase). Questa polimerasi incorpora nucleotidi marcati a livello delle rotture 3'-OH terminali del DNA. Tale metodica, quindi, quantifica l'incorporazione di desossiridinatrifosfato (dUTP) ai frammenti di DNA derivati da rotture a singola o doppia elica. Una volta che i nucleotidi marcati dUTP vengono incorporati ai frammenti di DNA possono essere

quantificati mediante microscopio a fluorescenza o analisi citofluorimetrica. I primi studi effettuati da Gorczyca et al. 1993(25) sulle cellule somatiche, hanno dimostrato la possibilità di distinguere DNA frammentato derivante da un processo apoptotico da quello delle cellule necrotiche, mediante la metodica TUNEL. Tale metodica ha consentito di identificare frammentazione del DNA correlato al processo apoptotico nelle cellule germinali maschili (26). E' stato ipotizzato, infatti, che fattori testicolari e extratesticolari contribuiscono alla formazione di DNA alterato negli spermatozoi e che il principale pathway che porta alla rottura dell'elica di DNA negli spermatozoi è un processo apoptotico (27,28).

COMET ASSAY- La Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE) o COMET assay, introdotta da Ostling and Johanson nel 1984 (29), è un metodo che consente di valutare l'integrità del DNA visualizzando le rotture dell'elica a livello di ogni singola cellula. Inizialmente fu utilizzata per la valutazione degli effetti genotossici sulle cellule somatiche e successivamente Singh NP *et al* (1989) (30) la applicarono allo studio delle cellule nemaspermiche. Il metodo prevede l'inclusione degli spermatozoi in un gel di agarosio su vetrino; le cellule vengono poi lisate e sottoposte ad elettroforesi in condizioni di elevata concentrazione salina. In tale test il DNA viene evidenziato con un colorante nucleare di tipo intercalante. La cellula danneggiata appare come una cometa, con una testa fluorescente ed una coda la cui lunghezza e fluorescenza è proporzionale al numero delle rotture presenti nell'elica di DNA. La cellula integra appare, invece, come un nucleo intatto fluorescente, la testa della cometa, senza coda. La metodica originaria prevedeva un elettroforesi in ambiente alcalino che si è dimostrata essere poco efficiente nello studio dell'integrità del DNA a causa della presenza di siti alcalino-labili che inducevano numerose rotture del DNA non presenti di base. Questo aveva reso, inizialmente, il metodo di difficile standardizzazione anche al fine di applicazioni immediatamente trasferibili in ambito clinico. Per tale motivo, è stata proposta una modifica della metodica che utilizza una elettroforesi neutra in grado di superare il problema dei siti alcalino- labili.

SCSA- è una tecnica citofluorimetrica caratterizzata dalla valutazione dei parametri rilevati su un numero statisticamente significativo di eventi, in quanto riesce ad analizzare circa 5000 spermatozoi per campione. Valuta la resistenza della cromatina nemaspermica all'azione di agenti denaturanti, attraverso il colorante arancio di acridina (AO). L'AO si lega agli acidi nucleici, in particolari condizioni stechiometriche, intercalando la doppia elica ed impacchettandosi nelle regioni a singola elica. Le molecole legate secondo queste due diverse modalità di interazione fluorescono in bande spettrali differenti; se la molecola è intercalata nella doppia elica emette una fluorescenza verde, mentre se legata a regioni a singola elica la fluorescenza è rossa. SCSA è l'unica tecnica per cui studi epidemiologici hanno suggerito un valore di soglia; è stato identificato, infatti, un parametro

che descrive la percentuale di spermatozoi con DNA suscettibile alla denaturazione, il DFI (DNA Fragmentation Index), ottenuto dal rapporto dell'intensità della fluorescenza rossa su quella totale (rossa+verde). Un $DFI < 30\%$ identificherebbe una popolazione nemaspermica con buona integrità cromatinica e un potenziale stato di fertilità, mentre un $DFI \geq 30\%$ indica una popolazione di spermatozoi con anomalie della struttura cromatinica (31)

SCD- Sperm Chromatin Dispersion test (32) identifica DNA nemaspermico frammentato sulla base della capacità della cromatina nemaspermica di denaturarsi. La tecnica prevede una fase di decondensazione cromatinica seguita dalla valutazione delle cellule nemaspermiche che se frammentate presenteranno un alone intorno alla testa. Il test SCD viene effettuato mediante Halosperm kit (Halotech DNA; Madrid, Spain). La preparazione dei vetrini è abbastanza rapida e la richiede un microscopio in campo chiaro.

Le conseguenze sul processo di fecondazione e di sviluppo embrionale dei danni subiti dal DNA, non sono ancora completamente note in quanto le lesioni che originano nel DNA dello spermatozoo sono molto diverse tra di loro e a seconda della tipologia di danno si possono verificare diverse condizioni 1) i meccanismi di riparo dell'ovocita non sono sufficienti e l'embrione non si sviluppa o non si impianta oppure la gravidanza esita in aborto 2) l'ovocita ripara la rottura dell'elica di DNA prima dell'inizio del clivaggio con generazione di una normale prole 3) l'ovocita può riparare il danno in modo parziale e il risultato potrebbero essere delezioni, errori di sequenza e anomalie nella prole. Tutto ciò indica che spermatozoi con DNA danneggiato possono fecondare e che l'impatto biologico della cromatina alterata dipende, quindi, dal tipo di danno e dalla capacità dell'ovocita di ripararlo. Diversi studi hanno valutato la relazione tra danni al DNA nemaspermico, valutato con SCSA e TUNEL, ed esito riproduttivo sia nel caso di gravidanze naturali che in PMA. In particolare, è stata evidenziata una forte associazione tra DNA danneggiato e fallimento del raggiungimento della gravidanza naturale, mentre elevati livelli di DNA alterato sono stati associati anche con basse percentuali di gravidanza mediante IUI (Intra Uterine Insemination) (33). Numerosi studi, invece, hanno esaminato l'influenza dell'integrità del DNA nemaspermico sulla percentuale di gravidanza dopo IVF (In Vitro Fertilization); con tale tecnica di riproduzione assistita la frammentazione del DNA era associata, anche se debolmente, con basse percentuali di gravidanza (OR 1.57); mentre i lavori che hanno considerato la tecnica ICSI hanno rilevato che la frammentazione del DNA non era associata con le percentuali di gravidanza in ICSI (OR 1.14) (34). Bungum et al. (2004), Gandini et al (2004) (35,36) hanno dimostrato, invece, che alterazioni dell'integrità cromatinica valutate mediante SCSA non sono incompatibili con gravidanze dopo IVF and ICSI. Diversi Autori, inoltre, hanno riportato una associazione significativa tra frammentazione del DNA e aborti dopo IVF e ICSI (OR 2.48) (34), mentre non ci sono dati relativi agli effetti post-

natali. Una meta-analisi (37) ha dimostrato una significativa relazione tra danno al DNA, valutato con SCSA, TUNEL e COMET e aborti dopo PMA, indipendentemente dalla tipologia di trattamento, ICSI o FIVET. Lo studio, inoltre, ha rilevato che l'associazione era più forte quando si consideravano i lavori che avevano utilizzato TUNEL ($RR = 3.94$ $p < 0.00001$). I risultati di review e metanalisi relativi a studi che hanno valutato l'associazione tra danni al DNA nemaspermico ed esito riproduttivo sia nel caso di gravidanze naturali che in PMA, hanno fornito risultati discordanti. Per questo motivo, nel 2013 (38) il Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine (ASRM) ha redatto delle linee guida basate su una metanalisi proveniente da 20 studi che hanno utilizzato TUNEL, SCSA e COMET. Tali linee guida hanno sottolineato che i dati pubblicati non permettono di definire una relazione tra integrità cromatinica e outcome riproduttivo; mentre esiste un'associazione significativa tra frammentazione e aborto dopo IVF o ICSI, anche se i risultati ottenuti, fino ad oggi, non sono sufficienti per poter inserire i test di integrità tra i test diagnostici routinari. Una recente meta analisi di Simon et al (2016) (39) effettuata su 41 studi (23 con SCSA, 18 TUNEL, 7 COMET e 8 SCD), invece, ha identificato un impatto negativo del danno al DNA nemaspermico sulla percentuale di gravidanza in IVF e ICSI. Nonostante i numerosi studi presenti in letteratura ci sono, quindi, numerosi dubbi riguardo alla applicazione clinica di test di valutazione dell'integrità cromatinica. Quando si valutano studi relativi all'integrità del DNA è necessario fare delle considerazioni sulle metodologie utilizzate. Sebbene molte metodiche affermano di identificare il "DNA frammentato" non è ancora ben definito quali informazioni molecolari forniscono. TUNEL e COMET misurano la quantità di DNA con rotture di doppio o singolo filamento, mentre SCSA fornisce una misura indiretta del danno all'acido nucleico, in quanto valuta la percentuale di DNA suscettibile alla denaturazione; le cellule più facilmente denaturabili sono portatrici di frammentazione del DNA. Il test SCD, invece, si basa sul principio che spermatozoi con DNA frammentato non riescono a produrre un alone intorno alla testa dello spermatozoo dopo denaturazione acida. Tale metodo, anche se molto utilizzato in diversi laboratori perché di semplice esecuzione e non necessita di grandi attrezzature, risulta essere ambiguo in quanto fornisce informazioni di difficile interpretazione e non riesce a definire la tipologia di danno molecolare del DNA nemaspermico. Tutte le metodiche ad oggi disponibili, infatti, non riescono a differenziare rotture del DNA fisiologiche da quelle patologiche e quindi il DNA frammentato, clinicamente importante, dalle rotture che avvengono fisiologicamente, durante il processo di condensazione cromatinica. Il DNA frammentato a singola elica può essere riparato dall'ovocita mentre rotture della doppia elica sono irreversibili. Infine, i test non identificano i geni che possono, eventualmente, essere coinvolti nella rottura dell'acido nucleico. Attualmente, le metodiche di valutazione dell'integrità cromatinica misurano, solamente, la quantità di cellule con

frammentazione dell'acido nucleico e si basano sul principio che maggiore è la quota di cellule con DNA danneggiato maggiore è la probabilità che la popolazione cellulare sia patologica (40). Alcuni studi hanno cercato di definire, anche, un valore soglia di danno al DNA nemaspermico, oltre il quale i campioni seminali vengano definiti patologici, ottenendo risultati differenti. Il livello soglia che discrimina tra individui fertili e non fertili, in realtà, non è ancora stato stabilito (41). Nella diagnostica molecolare del gamete maschile, un test ideale, dovrebbe essere quello che, aiuti nella diagnosi di infertilità, riesca a predire l'outcome riproduttivo nell'ambito di ART e fornisca notevoli evidenze relative all'integrità genomica del gamete maschile. Attualmente, invece, l'utilizzo dei test di integrità cromatinica, nella clinica, presenta delle limitazioni: mancano studi popolazionistici e il valore clinico si basa su dati provenienti dalla letteratura relativi a lavori, review e metanalisi. Queste ultime presentano il vantaggio di analizzare diversi studi aumentando la dimensione del campione e la potenza statistica, ma hanno lo svantaggio dell'eterogeneità dei dati, in quanto, includono studi che utilizzano diverse metodologie, differenti popolazioni e diversi cut-off.

E' importante, quindi, avere cautela quando si valuta il valore predittivo di un test di integrità cromatinica nell'ambito di tecniche di PMA. Non dobbiamo mai dimenticare che il valore clinico di queste metodologie deve essere valutato con gli stessi criteri di un test diagnostico: sensibilità, specificità, ripetibilità, predittività e soprattutto robustezza statistica; ad oggi, l'utilità clinica di questi test deve essere ancora stabilita. Per una corretta interpretazione dei dati sono necessari protocolli standardizzati con opportuni controlli di qualità e studi controllati con numero elevato di pazienti studiati.

BIBLIOGRAFIA

1. Steger K, Pauls K, Klonisch T, Franke FE, Bergmann M. Expression of protamine-1 and -2 mRNA during human spermiogenesis. *Mol Hum Reprod*. 2000 Mar;6(3):219-25.
2. Kramer JA, Krawetz SA. Nuclear matrix interactions within the sperm genome. *J Biol Chem*. 1996 May 17;271(20):11619-22.
3. Ward WS. Deoxyribonucleic acid loop domain tertiary structure in mammalian spermatozoa. *Biol Reprod*. 1993 Jun;48(6):1193-201.
4. Mohamed EE, Mohamed MA. Effect of sperm chromatin condensation on the outcome of intrauterine insemination in patients with male factor infertility. *J Reprod Med*. 2012 Sep-Oct;57(9-10):421-6.
5. Asmarinah, Syauby A, Umar LA, Lestari SW, Mansyur E, Hestiantoro A, Paradowska-Dogan A. Sperm chromatin maturity and integrity correlated to zygote development in ICSI program. *Syst Biol Reprod Med*. 2016 Oct;62(5):309-16.
6. Irez T, Sahmay S, Ocal P, Goymen A, Senol H, Erol N, Kaleli S, Guralp O. Investigation of the association between the outcomes of sperm chromatin condensation and decondensation tests, and assisted reproduction techniques. *Andrologia*. 2015 May;47(4):438-47.
7. Razavi S, Nasr-Esfahani MH, Mardani M, Mafi A, Moghdam A. Effect of human sperm chromatin anomalies on fertilization outcome post-ICSI. *Andrologia*. 2003 Aug;35(4):238-43.
8. Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Mozdarani H, Mardani M, Azvagi H. Relationship between protamine deficiency with fertilization rate and incidence of sperm premature chromosomal condensation post-ICSI. *Andrologia*. 2004 Jun;36(3):95-100.
9. Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Mardani M, Shirazi R, Javanmardi S. Effects of failed oocyte activation and sperm protamine deficiency on fertilization post-ICSI. *Reprod Biomed Online*. 2007 Apr;14(4):422-9.
10. Tavalae M, Razavi S, Nasr-Esfahani MH. Influence of sperm chromatin anomalies on assisted reproductive technology outcome. *Fertil Steril*. 2009 Apr;91(4):1119-26.
11. Iranpour FG. Impact of sperm chromatin evaluation on fertilization rate in intracytoplasmic sperm injection. *Adv Biomed Res*. 2014 Nov 29;3:229.
12. Iranpour FG, Nasr-Esfahani MH, Valojerdi MR, al-Taraihi TM. Chromomycin A3 staining as a useful tool for evaluation of male fertility. *J Assist Reprod Genet*. 2000 Jan;17(1):60-6.
13. Nijs M, Creemers E, Cox A, Franssen K, Janssen M, Vanheusden E, De Jonge C, Ombelet W. Chromomycin A3 staining, sperm chromatin structure assay and hyaluronic acid binding assay as predictors for assisted reproductive outcome. *Reprod Biomed Online*. 2009 Nov;19(5):671-84.
14. Iranpour FG. Impact of sperm chromatin evaluation on fertilization rate in intracytoplasmic sperm injection. *Adv Biomed Res*. 2014 Nov 29;3:229.
15. Garolla A, Cosci I, Bertoldo A, Sartini B, Boudjema E, Foresta C. DNA double strand breaks in human spermatozoa can be predictive for assisted reproductive outcome. *Reprod Biomed Online*. 2015 Jul;31(1):100-7. doi: 10.1016/j.rbmo.2015.03.009.
16. Sadeghi MR, Lakpour N, Heidari-Vala H, Hodjat M, Amirjannati N, Hossaini Jadda H, Binaafar S, Akhondi MM. Relationship between sperm chromatin status and ICSI outcome in men with obstructive azoospermia and unexplained infertile normozoospermia. *Rom J Morphol Embryol*. 2011;52(2):645-5.
17. Balhorn R, Reed S & Tanphaichitr N. Aberrant protamine 1/protamine 2 ratios in sperm of infertile human males. 1988 *Experientia* 44: 52-55.

18. Corzett M, Mazrimas J and Balhorn R (2002) Protamine 1: protamine 2 stoichiometry in the sperm of eutherian mammals, *Mol Reprod Dev* 61,519-527.
19. Rogenhofer N¹, Dansranjav T, Schorsch M, Spiess A, Wang H, von Schönfeldt V, Cappallo-Obermann H, Baukloh V, Yang H, Paradowska A, Chen B, Thaler CJ, Weidner W, Schuppe HC, Steger K. The sperm protamine mRNA ratio as a clinical parameter to estimate the fertilizing potential of men taking part in an ART programme. *Hum Reprod.* 2013 Apr;28(4):969-78.
20. Francis S, Yelumalai S, Jones C, Coward K. Aberrant protamine content in sperm and consequential implications for infertility treatment. *Hum Fertil (Camb).* 2014 Jun;17(2):80-9.
21. Simon L, Castillo J, Oliva R, Lewis SE. Relationships between human sperm protamines, DNA damage and assisted reproduction outcomes. *Reprod Biomed Online.* 2011 Dec;23(6):724-34. doi: 10.1016/j.rbmo.2011.08.010.
22. Depa-Martynow M, Kempisty B, Jagodziński PP, Pawelczyk L, Jedrzejczak P. Impact of protamine transcripts and their proteins on the quality and fertilization ability of sperm and the development of preimplantation embryos. *Reprod Biol.* 2012 Mar;12(1):57-72.
23. Grassetti D, Paoli D, Gallo M, D'Ambrosio A, Lombardo F, Lenzi A, Gandini L. Protamine-1 and -2 polymorphisms and gene expression in male infertility: an Italian study. *J Endocrinol Invest.* 2012 Nov;35(10):882-8. doi: 10.3275/8111. Epub 2011 Nov 21.
24. Aoki VW, Moskovtsev SI, Willis J, Liu L, Mullen JB, Carrell DT. DNA integrity is compromised in protamine-deficient human sperm. *2005J Androl.* Nov-Dec;26(6):741-8.
25. Gorczyca W, Gong J, Ardel B, Traganos F, Darzynkiewicz Z. The cell cycle related differences in susceptibility of HL-60 cells to apoptosis induced by various antitumor agents. *Cancer Res.* 1993 Jul 1;53(13):3186-92.
26. Gorczyca W, Traganos F, Jesionowska H, Darzynkiewicz Z. Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA in situ to denaturation in abnormal human sperm cells: analogy to apoptosis of somatic cells. *Exp Cell Res.* 1993 Jul;207(1):202-5.
27. Gandini L, Lombardo F, Paoli D, Caponecchia L, Familiari G, Verlengia C, Dondero F, Lenzi A. Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod.* 2000 Apr;15(4):830-9.
28. Muratori M, Tamburrino L, Marchiani S, Cambi M, Olivito B, Azzari C, Forti G, Baldi E. Investigation on the Origin of Sperm DNA Fragmentation: Role of Apoptosis, Immaturity and Oxidative Stress. *Mol Med.* 2015 Jan 30;21:109-22. doi: 10.2119/molmed.2014.00158.
29. Singh NP, Danner DB, Tice RR, McCoy MT, Collins GD, Schneider EL. Abundant alkali-sensitive sites in DNA of human and mouse sperm. *Exp Cell Res.* 1989 Oct;184(2):461-70.
30. Ostling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1984 Aug 30;123(1):291-8.
31. Evenson DP, Larson KL, Jost LK. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J Androl.* 2002 Jan-Feb;23(1):25-43.
32. Fernández JL, Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosálvez J, Enciso M, LaFromboise M, De Jonge C. Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. *Fertil Steril.* 2005 Oct;84(4):833-42.
33. Bungum M, Spanò M, Humaidan P, Eleuteri P, Rescia M, Giwercman A. Sperm chromatin structure assay parameters measured after density gradient centrifugation are not predictive for the outcome of ART. *Hum Reprod.* 2008 Jan;23(1):4-10.
34. Zini A, San Gabriel M, Baazeem A. Antioxidants and sperm DNA damage: a clinical perspective. *J Assist Reprod Genet.* 2009 Aug;26(8):427-32.
35. Bungum M, Humaidan P, Spano M, Jepson K, Bungum L, Giwercman A. The predictive value of sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters for the outcome of intrauterine insemination, IVF and ICSI. *Hum Reprod.* 2004;19:1401-8.

36. Gandini L, Lombardo F, Paoli D, Caruso F, Eleuteri P, Leter G, Ciriminna R, Culasso F, Dondero F, Lenzi A, Spanò M. Full-term pregnancies achieved with ICSI despite high levels of sperm chromatin damage. *Hum Reprod.* 2004 Jun;19(6):1409-17.
37. Robinson L, Gallos ID, Conner SJ, Rajkhowa M, Miller D, Lewis S, Kirkman-Brown J, Coomarasamy A. The effect of sperm DNA fragmentation on miscarriage rates: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod.* 2012 Oct;27(10):2908-17.
38. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. The clinical utility of sperm DNA integrity testing: a guideline. *Fertil Steril.* 2013 1;99:673-7.
39. Simon L, Zini A, Dyachenko A, Ciampi A, Carrell DT. A systematic review and meta-analysis to determine the effect of sperm DNA damage on in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection outcome. *Asian J Androl.* 2016 Jun 24. doi: 10.4103/1008-682X.182822.
40. Zini A, Sigman M. Are tests of sperm DNA damage clinically useful? Pros and cons. *J Androl.* 2009;30:219-29.
41. Simon L, Brunborg G, Stevenson M, Lutton D, McManus J, Lewis SE. Clinical significance of sperm DNA damage in assisted reproduction outcome. *Hum Reprod.* 2010 ;25:1594-608

ABERRAZIONI CROMOSOMICHE (FISH)

Gli spermatozoi umani sono cellule con corredo cromosomico aploide, contenenti 22 autosomi e 1 cromosoma sessuale, X o Y. Una variazione del numero di cromosomi è chiamata aneuploidia, condizione in cui una cellula ha uno o più cromosomi soprannumerari oppure in difetto rispetto all'assetto di base. L'aneuploidia può essere causata da una mancata disgiunzione dei cromosomi omologhi alla meiosi o dei cromatidi fratelli durante la mitosi. La produzione di gameti aneuploidi rappresenta un fattore di rischio molto importante per l'infertilità, ma anche per l'insorgenza di patologie come ritardo mentale, mortalità perinatale e aborti; infatti solamente pochi feti aneuploidi sopravvivono alla nascita (1) ed il 50% degli aborti spontanei nel primo trimestre è dovuto ad anomalie cromosomiche.

Il test della FISH, *fluorescence in-situ hybridization*, ha permesso lo studio della percentuale delle aneuploidie in spermatozoi umani di uomini infertili (2,3). Tale tecnica permette di localizzare specifiche sequenze di acido nucleico, tramite l'utilizzo di sequenze nucleotidiche complementari chiamate sonde (4).

Questa procedura è particolarmente indicata nei casi di ripetuti fallimenti riproduttivi, ma le sue applicazioni sono molteplici:

- test prenatali, postnatali e di preimpianto per predire l'esito della gravidanza e la futura qualità della vita del nascituro;
- determinazione di aberrazioni cromosomiche nei tumori solidi come il cancro al polmone, alla prostata e alla vescica;
- nei disordini del sistema ematopoietico come la leucemia mielogenosa cronica e acuta, la leucemia linfocitica cronica e acuta ed il mieloma multiplo, per determinare traslocazioni, delezioni e rotture cromosomiche.

L'ibridazione in situ consiste nel far avvenire la denaturazione del bersaglio e della sonda utilizzata, in modo che le rispettive regioni complementari si rinaturino tra loro. La sequenza verrà poi identificata in base al tipo di sonda usata: originariamente erano impiegati metodi isotopici, sensibili, ma poco pratici per i lunghi tempi di analisi ed i segnali generati spesso indistinti; attualmente vengono utilizzati metodi non isotopici, tra cui la FISH, che utilizza la marcatura con fluorocromi, tecnica vantaggiosa per la rapidità di esecuzione e per il contrasto (5). La marcatura con fluorocromi può avvenire con metodo diretto e indiretto.

Nel metodo diretto il fluorocromo viene incorporato direttamente nella sonda durante la sintesi, oppure si attacca covalentemente, in modo da permettere la visualizzazione del complesso DNA-sonda attraverso un microscopio a fluorescenza. L'unico svantaggio di questa tecnica è la ridotta sensibilità (6), sebbene questo non sia di solito una seria limitazione.

Nel metodo indiretto si utilizzano sonde di DNA che contengono un marcatore come la digossigenina o la biotina; dopo l'ibridazione, per identificare il DNA, il marcatore viene usato per riconoscere una proteina coniugata al fluorocromo oppure si procede con l'utilizzo di un anticorpo. I vantaggi di questa tecnica sono l'elevata sensibilità, la capacità di intensificare il segnale e la possibilità di avere un range di riconoscimento dei reagenti esteso; gli svantaggi sono i costi elevati e i tempi di marcatura del DNA lunghi (7,8).

Le sonde di DNA proposte per la FISH sono centromeriche, in grado cioè di riconoscere sequenze ripetitive di DNA localizzate nella regione centromerica, e sono state messe a punto per ogni cromosoma umano. Queste sonde producono un piccolo segnale nel centromero e sono usate di routine nella ricerca di aneuploidie (Fig. 1), e in minima parte anche per riconoscere la presenza di traslocazioni Robertsoniane.

Altri tipi di sonde sono quelle telomeriche, più adatte per la ricerca di anomalie strutturali dei cromosomi, come delezioni e riarrangiamenti che interessano i bracci dei cromosomi.

Esistono inoltre le sonde sito specifiche, che invece riconoscono determinate sequenze che sono poste all'interno dei cromosomi.

Numerose osservazioni cliniche indicano che anomalie cromosomiche dei gameti maschili influenzano negativamente il tasso di gravidanza, di impianto e di sopravvivenza fetale (9-11) ed il tasso di successo delle tecniche di fecondazione in vitro (ICSI). In particolare un aumento del tasso di disomie dei cromosomi sessuali è stato osservato nel liquido seminale dei partner maschili di coppie con aborto ricorrente (12). Inoltre i cariotipi prenatali degli embrioni generati mediante ICSI hanno una percentuale di aneuploidie cromosomiche maggiore rispetto a quella riscontrata nella popolazione generale (13-14) (Tabella 1).

Tale fenomeno in parte è spiegato dal fatto che una significativa percentuale dei soggetti sottoposti ad ICSI per grave oligozoospermia o azoospermia è portatore di anomalie genetiche e citogenetiche. Infatti un numero incrementato di aneuploidie cromosomiche è noto nei soggetti portatori di traslocazioni cromosomiche (15-18), poiché i cromosomi traslocati sono più suscettibili ad errori meiotici; nei soggetti affetti da Sindrome di Klinefelter, sia a carico dei cromosomi sessuali sia

degli autosomi, confermando l'ipotesi che cellule germinali geneticamente alterate (47XXY) possano comunque completare i processi meiotici, dando vita a spermatozoi XX o XY; inoltre in soggetti affetti da neoplasia maligna trattati con farmaci chemioterapici, almeno temporaneamente, è stato riportato un aumento delle aneuploidie spermatiche. Studi recenti tuttavia hanno messo in evidenza che anche soggetti sani e con normale corredo cromosomico, ma affetti da oligozoospermia, hanno un numero di spermatozoi aneuploidi maggiore rispetto a soggetti normozoospermici (19), ad indicare che la patologia testicolare responsabile dell'alterazione seminale è in grado di danneggiare anche i meccanismi di segregazione cromosomica durante la mitosi e/o la meiosi delle cellule germinali (20). In particolare è stata dimostrata una relazione inversa tra il tasso di aneuploidie spermatiche ed i tre principali parametri seminali (concentrazione, motilità e morfologia), suggerendo che più grave è il danno spermatogenetico, maggiore è la probabilità di trovare spermatozoi con alterazione del cariotipo (20). L'aumentata percentuale di anomalie cromosomiche spermatiche a sua volta si associa ad un minor tasso di impianto e gravidanza e ad un maggior tasso di aborto (21, 22).

Pur essendo stati definiti dei parametri di normalità nell'interpretazione dell'esame seminale, la scoperta di casi di infertilità maschile causati da anomalie nel potenziale di fertilizzazione dello spermatozoo (fenomeni apoptotici e/o alterazione dell'integrità cromatinica) ha portato alla ribalta nuove problematiche. Infatti, spermatozoi, persino con parametri tradizionali normali, possono presentare frammentazione del DNA, alterazione del potenziale di membrana mitocondriale o incremento delle aneuploidie spermatiche, che in natura difficilmente consentono un normale concepimento. Pertanto il valore dello spermiogramma nella diagnosi d'infertilità è relativo e va comunque integrato da esami specifici, che valutino l'integrità genomica della cellula spermatica e quindi la reale funzionalità dello spermatozoo. In particolare le metodiche più utili sono rappresentate dal test di frammentazione del DNA (TUNEL TEST), dallo studio dell'integrità cromatinica (Arancio di acridina), dal test di condensazione nucleare e dalla valutazione delle aneuploidie spermatiche mediante FISH. Tali approfondimenti sono indicati nei maschi con infertilità idiopatica e nelle coppie con storia di aborti ricorrenti o ripetuti fallimenti delle tecniche di riproduzione assistita o con cattiva qualità embrionale.

Bibliografia

1. Egozcue S, Blanco J, Vendrell JM, García F, Veiga A, Aran B, Barri PN, Vidal F, Egozcue J. Human male infertility: chromosome anomalies, meiotic disorders, abnormal spermatozoa and recurrent abortion. *Hum Reprod Update*. 2000; 6 (1): 93-105.
2. Chandley AC. Infertility and chromosome abnormality. *Oxf Rev Reprod Biol*. 1984; 6: 1-46.
3. Martin RH, Rademaker A. The relationship between sperm chromosomal abnormalities and sperm morphology in humans. *Mutat Res*. 1988; 207(3-4): 159-164.
4. Martin RH, Ko E, Chan K. Detection of aneuploidy in human spermatozoa by FISH. *Cytogenet Cell Genet* 1993; 64: 23-26.
5. Spriggs EL, Rademaker AW, Martin RH. Aneuploidy in human sperm: results of two-and three-color fluorescence in situ hybridization using centromeric probes for chromosomes 1, 12, 15, 18, X, and Y. *Cytogenet Cell Genet* 1995; 71(1): 47-53.
6. Ried T, Landes G, Dackowski W, Klinger K, Ward DC. Multicolor fluorescence in situ hybridization for the simultaneous detection of probe sets for chromosome 13, 18, 21, X and Y in uncultured amniotic fluid cells. *Hum Mol Genet* 1992; 1: 307-313.
7. Downie SE, Flaherty SP, Swann NJ, Matthews CD. Estimation of aneuploidy for chromosomes 3, 7, 16, X and Y in spermatozoa from 10 normospermic men using fluorescence in-situ hybridization. *Mol Hum Reprod*. 1997; 3(9): 815-819.
8. Bischoff FZ, Nguyen D, Burt KJ, Shaffer LG. Estimates aneuploidie using multi-colour FISH on human sperm. *Cytogenet Cell Genet* 1994; 66: 237-243.
9. Calogero AE, De Palma A, Grazioso C, Barone N, Burrello N, Palermo I, Gulisano A, Pafumi C, D'Agata R. High sperm aneuploidy rate in unselected infertile patients and its relationship with intracytoplasmic sperm injection outcome. *Hum Reprod* 2001; 16(7):1433-1439.
10. Burrello N, Vicari E, Shin P, Agarwal A, De Palma A, Grazioso C, D'Agata R, Calogero AE. Lower sperm aneuploidy frequency is associated with high pregnancy rates in ICSI programmes. *Hum Reprod* 2003; 18(7): 1371-1376.
11. Rubio C, Gil-Salom M, Simón C, Vidal F, Rodrigo L, Mínguez Y, Remohí J, Pellicer A. Incidence of sperm chromosomal abnormalities in a risk population: relationship with sperm quality and ICSI outcome. *Hum Reprod*. 2001; 16(10): 2084-2092.

12. Rubio C, Simón C, Blanco J, Vidal F, Mínguez Y, Egozcue J, Crespo J, Remohí J, Pellicer A. Implications of sperm chromosome abnormalities in recurrent miscarriage. *J Assist Reprod Genet.* 1999; 16 (5): 253-258.
13. In't Veld P, Brandenburg H, Verhoeff A, Dhont M, Los F. Sex chromosomal abnormalities and intracytoplasmic sperm injection. *Lancet.* 1995; 346 (8977): 773.
14. Bonduelle M, Aytoz A, Van Assche E, Devroey P, Liebaers I, Van Steirteghem A. Incidence of chromosomal aberrations in children born after assisted reproduction through intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 1998; 13(4): 781-782.
15. Spriggs EL, Martin RH. Analysis of segregation in a human male reciprocal translocation carrier, t(1;11) (p36.3;q13.1), by two-colour fluorescence in situ hybridization. *Mol Reprod Dev;* 38(3): 247-250.
16. Chevret E, Rousseaux S, Monteil M, Pelletier R, Cozzi J, Sèle B. Meiotic segregation of the X and Y chromosomes and chromosome 1 analyzed by three-color FISH in human interphase spermatozoa. *Cytogenet Cell Genet.* 1995; 71(2): 126-130.
17. Rousseaux S, Chevret E, Monteil M, Cozzi J, Pelletier R, Delafontaine D, Sèle B. Sperm nuclei analysis of a Robertsonian t(14q21q) carrier, by FISH, using three plasmids and two YAC probes. *Hum Genet* 1995; 96(6): 655-660.
18. Benet J, Oliver-Bonet M, Cifuentes P, Templado C, Navarro J. Segregation of chromosomes in sperm of reciprocal translocation carriers: a review. *Cytogenet Genome Res* 2005; 111 (3-4): 281-290.
19. Durakbasi-Dursun HG, Zamani AG, Kutlu R, Görkemli H, Bahce M, Acar A. A new approach to chromosomal abnormalities in sperm from patients with oligoasthenoteratozoospermia: detection of double aneuploidy in addition to single aneuploidy and diploidy by five-color fluorescence in situ hybridization using one probe set. *Fertil Steril* 2008; 89(6): 1709-1717.
20. Calogero AE, Burrello N, De Palma A, Barone N, D'Agata R, Vicari E. Sperm aneuploidy in infertile men. *Reprod Biomed Online.* 2003; 6(3): 310-317.
21. Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Fiorentino A, Garrisi J, Munné S. Preimplantation genetic diagnosis increases the implantation rate in human in vitro fertilization by avoiding the transfer of chromosomally abnormal embryos. *Fertil Steril.* 1997; 68 (6): 1128-1131.

22. Rubio C, Pehlivan T, Rodrigo L, Simón C, Remohí J, Pellicer A. Embryo aneuploidy screening for unexplained recurrent miscarriage: a minireview. *Am J Reprod Immunol*. 2005; 53 (4):159-165

L'epigenetica nello studio degli spermatozoi

Col termine “epigenetica” vuole intendersi lo studio delle modificazioni strutturali del genoma che influenzano l'espressione genica senza però alterare la sequenza nucleotidica sottostante (1,2). Tra i vari meccanismi epigenetici, uno dei principali, la metilazione del DNA, è stata spesso chiamata in causa in numerose funzioni biologiche tra cui la spermatogenesi, ed è considerata un meccanismo in grado di influenzare la fertilità maschile (3).

Molto brevemente, per “metilazione del DNA” s'intende la conversione della citosina, ad opera di almeno 5 tipi di DNA metil-transferasi (DNMTs), in 5-metilcitosina. Tale metilazione si verifica nelle cosiddette “isole CpG” (citosina-fosfato-guanina), cioè in quelle aree di DNA in cui la citosina è direttamente seguita da una guanina nella sequenza del DNA. Tale fenomeno, innesca un processo (potenziato dalla deacetilazione della lisina istonica) che si conclude con un addensamento della cromatina che inattiva i geni interessati, impedendo l'accesso dei fattori di trascrizione ai promotori. L'esito finale di tutto ciò consiste in una ridotta trascrizione genica e, *de facto*, in un silenziamento genico (4). Mentre nell'ovogenesi la metilazione si verifica solo in fase post-natale, nella gametogenesi maschile tale processo, pur completandosi durante la spermatogenesi, ha già inizio nella gonade fetale. Infatti l'andamento della metilazione nel genoma maschile è molto peculiare. In particolare, le PGC (Primordial germ cells), demetilate molto precocemente durante le prime fasi di sviluppo (4^a-6^a settimana di vita intrauterina), vengono successivamente rimetilate fino alla fecondazione e alla formazione dello zigote; quest'ultimo quindi subisce una nuova demetilazione.

Il motivo di tale intensa metilazione del DNA durante la spermatogenesi, oltre a regolare l'espressione genica, sembrerebbe legato alla necessità di organizzare adeguatamente la struttura cromatinica per le crescenti e nuove esigenze dei processi meiotici e spermiogenetici. Infatti recenti studi hanno dimostrato che topi knock-out per un tipo di DNA metil-transferasi sono sterili in quanto non riescono a terminare la meiosi. (5).

Il meccanismo della metilazione è strettamente legato al ben noto fenomeno dell' *imprinting* genomico in cui alcuni geni vengono espressi quando ereditati o per via paterna o per via materna. La metilazione del DNA rappresenta infatti quel meccanismo che, inattivando l'espressione di quel determinato allele in uno dei due sessi, lo fa esprimere solo se questo è stato ereditato dal sesso opposto. Tale fenomeno pertanto, altro non è che un meccanismo di regolazione genica (che riguarda centinaia di geni noti) che serve a “bilanciare” il grado di attività di geni paterni e materni durante lo sviluppo embrionale. L'imprinting genomico, pertanto, rende peculiari alcune malattie che risultano quindi ereditati solo se la mutazione occorre sul gene paterno o materno. Il fenomeno dell'imprinting è stato scoperto grazie allo studio condotto fatto in due particolari sindromi: **la sindrome di Angelman e sindrome di Prader-Willi**. Queste, seppur causate dalla mutazione dello stesso gene, presentano degli effetti diversi a seconda che questo sia stato ereditato dal padre o dalla madre.

Un'altra interessante patologia da alterato imprinting, **la sindrome di Beckwith-Wiedemann**, caratterizzata da macrosomia fetale, macroglossia, visceromegalia, ipoglicemie e aumentato rischio di sviluppare neoplasie, è stata recentemente oggetto di un intenso dibattito in quanto la sua incidenza è superiore in bambini nati con tecniche di PMA (3). Il motivo di tale riscontro ancora sfugge ad una completa spiegazione e non può essere ricondotto unicamente all'ormai dimostrato incremento di metilazione in bambini nati con tecniche di PMA rispetto a quelli nati per via naturale (6).

Studi recenti hanno dimostrato chiaramente che alterazioni dell'imprinting genomico sono correlati ad un'alterata spermatogenesi (7).

Infatti un'anomala metilazione del DNA genomico, pari a circa il 14,4% dei geni paterni, è associata con la presenza di oligo- o oligo-astenoterazoospermia (8). Inoltre, in spermatozoi di uomini oligozoospermici, la presenza di ipermetilazione in geni materni diversi o

l'ipometilazione dell' allele 19, è risultata aumentata, in particolare in pazienti con meno di 10 milioni/ml di spermatozoi (8).

Pacheco et al (9) ha inoltre dimostrato che un'ipometilazione del DNA, possibile causa di un'alterata compattazione della cromatina, può essere responsabile di diversi casi di astenozoospermia.

Markers di metilazione del DNA sono stati rilevati in spermatogoni; pertanto alcune metilazioni anomale del DNA potrebbero esser dovute ad alterate ri-metilazioni in spermatogoni o ad alterato mantenimento delle metilazioni in spermatociti, spermatidi o spermatozoi. Infine un'alterata metilazione del DNA può essere associata ad anormale attivazione di DNMTs (10).

Tuttavia, anche se le alterazioni della metilazione nell'imprinting genomico sono stati osservati più frequentemente negli uomini con oligo- od oligo-asteno-terato-zoospermia, resta ancora da chiarire se i difetti di metilazione dei geni influenzano i processi di sviluppo e di crescita dei nati tramite tecniche di PMA. D'altronde, visto che modificazioni epigenetiche sono di certo un fattore chiave per la maturazione degli spermatozoi e che i bambini nati con tecniche di PMA presentano alterati livelli di metilazione se paragonati a bambini nati con fecondazione naturale, è ragionevole pensare che le tipiche complicanze delle tecniche di PMA (basso peso alla nascita, parto prematuro, aumento del tasso della mortalità perinatale e complicanze durante la gravidanza) possano essere associate ad alterazioni epigenetiche tipiche di molti maschi infertili (11,12). È stato infatti dimostrato che embrioni ottenuti da pazienti con ipospermatogenesi e quasi completa ipometilazione a carico dell'allele 19 dopo esseri sottoposti a tecniche di PMA presentavano tutti un arresto dello sviluppo (12). Inoltre, pazienti con oligo-asteno-terato-zoospermia e parziale ipometilazione sempre dell'allele 19 mostrano un tasso di fecondazione ridotta dopo ICSI. Zheng et al., in uno studio condotto su neonati tramite ICSI affetti da basso peso alla nascita, ha dimostrato la presenza di un'ipermetilazione del gene MEST (mesoderm specific transcript gene, improntato ed espresso preferenzialmente dall'allele paterno e con un importante ruolo nello sviluppo) in uno dei neonati inclusi nello studio (13).

Infine anche se diversi fattori ambientali e stili di vita (fumo, obesità, inquinanti ambientali, radiazioni, antiandrogeni, ecc.) sono stati associati ad alterata metilazione spermatica, ancora poche sono le evidenze in merito e saranno necessari ulteriori studi per chiarirne i meccanismi.

In conclusione, la metilazione del DNA è stata strettamente associata con infertilità maschile e ridotto outcome riproduttivo in tecniche di PMA, anche se gli intimi meccanismi devono essere ancora chiariti. Anche se gli studi su tali meccanismi sono ancora in fase iniziale e molte sono le domande che restano aperte, è certo che tali studi, specie nei pazienti in cui i classici test sul DNA spermatico non riescono ad evidenziare nulla di significativo, dovrebbero essere inseriti tra le tecniche di studio dello spermatozoo nel maschio infertile.

Bibliografia

- 1) Cawthon, R.M. et al. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat Rev Genet*; 2014, 3: 662–73;
- 2) Klose, R.J. et al. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem Sci*; 2006, 31:89–97.
- 3) Carrell, D.T. et al. Epigenetics of the male gamete. *Fertil Steril*; 2012, 97: 267-274.
- 4) Kläver, R. et al. DNA methylation in spermatozoa as a prospective marker in andrology. *Andrology*; 2013, 1: 731-740.
- 5) Oakes C.C. et al. A Unique configuration of genome-wide DNA methylation pattern in the testis. *Proc Nat Acad Sci USA*; 2007, 104:228-33.

- 6) Katari, S., et al. DNA methylation and gene expression differences in children conceived in vitro or in vivo. *Hum Mol Genet*; 2009, 18:3769-78
- 7) Hartmann, S., et al. Genetic imprinting during impaired spermatogenesis. *Mol Hum Reprod*; 2006, 12: 407-11.
- 8) Dada, R., et al. Epigenetics and its role in male infertility. *J Assist Reprod Genet* 2012, 29: 213-223.
- 9) Pacheco, S.E., et al. Integrative DNA methylation and gene expression analyses identify DNA packaging and epigenetic regulatory genes associated with low motility sperm. *PLoS One*; 2011, 6: e20280.
- 10) Cui, X., et al. DNA methylation in spermatogenesis and male infertility. *Exp & Ther Med*; 2016, 12: 1973-79.
- 11) Montjean, D., et al. Methylation changes in mature sperm deoxyribonucleic acid from oligozoospermic men: Assessment of genetic variants and assisted reproductive technology outcome. *Fertil Steril*; 2013, 100:1241-47.
- 12) Kobayashi, H., et al. DNA methylation errors at imprinted loci after assisted conception originate in the parental sperm. *Eur J Hum Genet*; 2009, 17:1582-91.
- 13) Zheng, H-Y., et al. Study of DNA methylation patterns of imprinted genes in children born after assisted reproductive technologies reveals no imprinting errors: A pilot study. *Exp Ther Med*; 2011, 2: 751-755.

La prima definizione di Stress Ossidativo risale al 1985 ad opera di Sies H. che così lo descrive come un'alterazione dell'equilibrio tra fattori pro- e anti- ossidanti in favore dei primi che può determinare un potenziale danno (Sies H, 1985).

Il termine stress ossidativo identifica, quindi, una condizione patologica causata dalla perdita del fisiologico equilibrio fra la produzione e l'eliminazione di specie chimiche ossidanti. Le specie ossidanti sono prodotti della normale attività metabolica ed a concentrazione fisiologica, svolgono importantissime funzioni a livello cellulare e sistemico.

In condizioni fisiologiche la cellula mantiene al suo interno uno stato riducente grazie ad un bagaglio di enzimi e molecole che controbilanciano la produzione di ROS. Se la generazione di ROS eccede le capacità antiossidanti della cellula stessa, o si verifica una diminuzione dei meccanismi di detossificazione, si viene ad instaurare una nuova condizione che prende appunto il nome di stress ossidativo (Turner and Lysiak, 2008). Questa condizione sembra giocare un ruolo di primaria importanza in numerose patologie e può provocare effetti tossici attraverso la produzione di specie chimiche reattive che danneggiano le componenti della cellula, incluse proteine, lipidi ed acidi nucleici (Mancuso et al., 2010). Pertanto, livelli non fisiologici di ROS sono deleteri per le cellule ed in particolare per gli spermatozoi che sono tra le cellule più sensibili allo stress ossidativo.

L'eccessiva quantità di ROS, può essere causa di alterazioni strutturali e funzionali dello spermatozoo, poiché la loro presenza in eccesso contribuisce alla perossidazione dei lipidi di membrana, all'ossidazione delle proteine e al danneggiamento del DNA.

Sappiamo che ad oggi, lo stress ossidativo è stato identificato come una delle possibili cause d'infertilità idiopatica: in uno studio in vivo condotto da Pasqualotto, è stato dimostrato che uomini con infertilità idiopatica presentano livelli significativamente più alti di ROS ed un ridotto potere antiossidante, confrontati con pazienti fertili (Pasqualotto et al., 2001).

Diversi studi in letteratura riportano che l'uso di antiossidanti, in uomini infertili, potrebbe migliorare sia la qualità spermatica che i tassi di gravidanze (Ross et al., 2010).

Poiché l'analisi diretta dei ROS è estremamente difficile a causa della loro elevata reattività e breve emivita, lo studio dello stress ossidativo si avvale principalmente di metodi in grado di rilevare le alterazioni da essi indotte su proteine, lipidi e DNA.

La comprensione del danno ossidativo a livello degli acidi nucleici si deve a Mecocci e coll. che, nel 1993, hanno studiato l'ossidazione di specifiche basi del DNA (Lovell et al., 2007). Un buon marcatore biologico di stress ossidativo a livello del DNA è rappresentato dall'8-idrossi-2'-deossiguanosina (8-OHdG). La deossiguanosina (dG) è uno dei costituenti del DNA e se ossidata si trasforma in 8-OHdG. L'analita viene tagliato da enzimi, le endonucleasi, del sistema di riparazione del DNA. Se il DNA non venisse correttamente riparato prima del meccanismo di replicazione, la presenza dell' 8-OHdG condurrebbe alla trasversione da G:C a T:A, mutagenesi o morte cellulare (Shen et al., 2006).

Numerose tecniche analitiche, in questi ultimi anni, sono state utilizzate per sviluppare metodi di quantificazione, tra cui l'elettroforesi capillare con detector elettrochimico ed il metodo immunoenzimatico ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbant Assay).

Tuttavia, questi metodi sono attualmente criticati perché responsabili della possibile formazione spontanea di 8-OHdG durante la fase di estrazione / digestione del DNA degli spermatozoi (Badouard et al. 2008). Recentemente, sono state riportate tecniche emergenti per rivelare 8-OHdG, che impiegano anticorpi (Kao et al. 2008) o proteine leganti (De Iuliis et al., 2009, Zribi et al. 2010).

In un recente studio (Cambi M et al. 2013), in particolare, sono stati confrontati due metodi per rilevare 8-OHdG a livello delle cellule spermatiche: l'OxyDNA Kit e tecniche di immunocitochimica. L'OxyDNA kit è basato sull'utilizzo di una sonda fluorescente coniugata a FITC di legame a 8-OHdG; la fluorescenza può essere monitorata sia tramite microscopia a fluorescenza che citometria a flusso (eccitazione 495 nm, emissione 515 nm). La procedura di immunocitochimica si avvale, invece, dell'utilizzo di anticorpi monoclonali diretti contro una sequenza di 8-OHdG.

Pertanto la rivelazione di 8-OHdG a livello spermatico, insieme ad altre metodiche di analisi del liquido seminale, utilizzate di routine, potrebbe fornire ulteriori informazioni sulla fertilità maschile.

Referenze

- Badouard C, Me´ne´zo Y, Panteix G, Ravanat JL, Douki T, Cadet J & Favier A** (2008) Determination of new types of DNA lesions in human sperm. *Zygote* 16 9–13. (doi:10.1017/S0967199407004340)
- Cambi M, Tamburrino L, Marchiani S, Olivito B, Azzari C, Forti G, Baldi E, Muratori M.** (2013) Development of a specific method to evaluate 8-hydroxy,2-deoxyguanosine in sperm nuclei: relationship with semen quality in a cohort of 94 subjects. *Reproduction*; 145: 227–235.
- De Iuliis GN, Thomson LK, Mitchell LA, Finnie JM, Koppers AJ, Hedges A, Nixon B & Aitken RJ** (2009) DNA damage in human spermatozoa is highly correlated with the efficiency of chromatin remodeling and the formation of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine, a marker of oxidative stress. *Biology of Reproduction* 81 517–524. (doi:10.1095/biolreprod.109.076836)
- Kao SH, Chao HT, Chen HW, Hwang TI, Liao TL & Wei YH** (2008) Increase of oxidative stress in human sperm with lower motility. *Fertility and Sterility* 89 1183–1190. (doi:10.1016/j.fertnstert.2007.05.029)
- Lovell M.A., Markesbery W.R.** (2007) Oxidative DNA damage in mild cognitive impairment and late-stage Alzheimer’s disease. *Nucleic Acids Res*;35:7497–7504. doi: 10.1093/nar/gkm821.
- Mancuso M, Orsucci D, Logerfo A, Rocchi A, Petrozzi L, Nesti C, et al.** (2010) Oxidative stress biomarkers in mitochondrial myopathies, basally and after cysteine donor supplementation. *J Neurol.* 2010;257:774–781
- Pasqualotto FF, Sharma RK, Kobayashi H, Nelson DR, Thomas AJ Jr & Agarwal A** (2001). Oxidative stress in normospermic men undergoing infertility evaluation. *Journal of Andrology* 22 316–322.
- Ross C, Morriss A, Khairy M, Khalaf Y, Braude P, Coomarasamy A, et al.** A systematic review of the effect of oral antioxidants on male infertility. *Reprod Biomed Online*.;20:711–723.
- Turner T. T., Lysiak J. J.** (2008) Oxidative stress: a common factor in testicular dysfunction. *Journal of Andrology*.29(5):488–498. doi: 10.2164/jandrol.108.005132
- Zribi N, Feki Chakroun N, El Euch H, Gargouri J, Bahloul A & Ammar Keskes L** (2010). Effects of cryopreservation on human sperm deoxyribonucleic acid integrity. *Fertility and Sterility* 93 159–166. (doi:10.1016/ j.fertnstert.2008.09.038)

Valutazione dei telomeri degli spermatozoi

La replicazione semi-conservativa del DNA comporta un progressivo accorciamento delle estremità cromosomiche, negli organismi con cromosomi lineari, e rappresenta pertanto una potenziale causa di perdita di materiale genetico. Nella specie umana, le estremità cromosomiche di DNA, dette “telomeri”, sono formate da filamenti a doppia elica di 5-20 kilobasi caratterizzate dalla ripetizione di sequenze 5'-TTAGGG-3'/3'-CCCTAA-5' che terminano in una coda 3' di 50-300 basi a singolo filamento ricca di basi G.

L'integrità dei telomeri ha un ruolo chiave nella stabilità cromosomica e rappresenta un importante check-point nel controllo della proliferazione cellulare; di conseguenza si tratta di un fattore chiave in processi biologici quali la senescenza o la crescita neoplastica.

Il mantenimento dei telomeri è affidato a meccanismi complessi non del tutto chiariti; uno di essi è rappresentato dall'attività dell'enzima telomerasi. Si tratta di un complesso proteico con diversi regolatori e cofattori dotato di attività di retrotrascrizione.

I telomeri degli spermatozoi presentano una importante peculiarità rispetto alle cellule somatiche: non subiscono accorciamento con l'avanzare dell'età per assicurare l'integrità del materiale genetico trasmesso alla prole.

Lo studio della correlazione tra lunghezza dei telomeri e potenziale di fertilità rappresenta un obiettivo attuale della medicina della riproduzione che tuttavia ha fornito, ad oggi, risultati contrastanti soprattutto sulla relazione tra lunghezza dei telomeri, ploidia e frammentazione del DNA. E' interessante notare come, secondo alcuni autori, esista una correlazione positiva tra lunghezza dei telomeri e quantità di spermatozoi prodotti (Ferlin et al., 2013, Yang et al., 2015, Cariati et al., 2016); in particolare, la condizione di oligospermia sarebbe associata a telomeri particolarmente corti.

Per quanto riguarda le tecniche di PMA, secondo un recente studio preliminare (Cariati et al., 2016), sarebbe molto ridotta, o nulla, la probabilità di ottenere una gravidanza in seguito a fecondazione in vitro in soggetti caratterizzati da spermatozoi con telomeri particolarmente lunghi o particolarmente corti. In precedenza era stato evidenziato che la lunghezza dei telomeri degli spermatozoi fosse correlabile con la qualità degli embrioni ottenuti in vitro, pur non essendo predittiva del tasso di gravidanza (Yang et al., 2015).

Queste osservazioni suscitano interesse per una possibile applicazione clinica dello studio della lunghezza dei telomeri nel percorso diagnostico e terapeutico del maschio infertile.

Allo stato attuale non esistono sufficienti evidenze per suggerire l'uso routinario di questo tipo di indagine, che rappresenta tuttavia un innovativo strumento per l'analisi genetica del gamete maschile (principalmente insieme a integrità del DNA e aneuploidie).

Lo studio della lunghezza dei telomeri presenta il vantaggio di essere semplice, economico e ripetibile basandosi generalmente su un saggio di PCR quantitativa (Cawthon 2002, Ferlin et al., 2013) da applicare con primer telomerici specifici al DNA degli spermatozoi dopo opportuna estrazione. Il risultato sarà riferito alla lunghezza media dei telomeri per pool di

spermatozoi utilizzati . Per aumentare l'accuratezza dell'analisi, la normalizzazione deve avvenire preferibilmente rispetto a un gene in singola copia.

Il valore diagnostico della lunghezza dei telomeri negli spermatozoi rimane ancora da validare. I dati presenti in letteratura rappresentano un importante bagaglio di conoscenze utili per disegnare e condurre appropriati studi clinici che possano evidenziare un ruolo nella diagnostica o nel trattamento dell'infertilità.

Referenze

Aston, K.I., Hunt, S.C., Susser, E., Kimura, M., Factor-Litvak, P., Carrell, D., Aviv, A. 2012. Divergence of sperm and leukocyte age-dependent telomere dynamics: implications for male-driven evolution of telomere length in humans. *Mol. Hum. Reprod.* 18: 517–522

Cariati F, Jaroudi S, Alfarawati S, Raberi A, Alviggi C, Pivonello R, Wells D. 2016. Investigation of sperm telomere length as a potential marker of paternal genome integrity and semen quality. *Reprod Biomed Online.* 33:404-411.

Cawthon RM. 2002. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Res.* 15;30:e47.

Ferlin, A., Rampazzo, E., Rocca, M.S., Keppel, S., Frigo, A.C., De Rossi, A., Foresta, C. 2013. In young men sperm telomere length is related to sperm number and parental age. *Hum. Reprod.* 28: 3370–3376.

Wright W.E., Tesmer V.M., Huffman K.E., Levene S.D., Shay J.W. 1997. Normal human chromosomes have long G-rich telomeric overhangs at one end. *Genes Dev.*;11:2801–2809.

Yang, Q., Zhang, N., Zhao, F., Zhao, W., Dai, S., Liu, J., Bukhari, I., Xin, H., Niu, W., Sun, Y. 2015. Processing of semen by density gradient centrifugation selects spermatozoa with longer telomeres for assisted reproduction techniques. *Reprod. Biomed. Online* 31: 44–50.

Yang Q, Zhao F, Dai S, Zhang N, Zhao W, Bai R, Sun Y. 2015. Sperm telomere length is positively associated with the quality of early embryonic development. *Hum Reprod.*30:1876-1881.

Le rotture a doppia elica del DNA possono essere predittive dell'outcome riproduttivo

La formazione e maturazione degli spermatozoi nei mammiferi avviene attraverso un delicato e continuo processo, conservato attraverso le specie e di fondamentale importanza per la fertilità del maschio, chiamato spermatogenesi. Al fine di garantire una totale protezione del genoma paterno fino al momento della fecondazione, durante la spermatogenesi, il DNA spermatico subisce un ulteriore impacchettamento (packing) che prevede la sostituzione degli istoni con delle proteine più basiche, le protamine (1). Questo processo è molto delicato infatti durante il packing si possono verificare errori che, assieme ad altri fattori esterni come radicali liberi, radioterapia, chemioterapia, infezioni e stile di vita, possono danneggiare seriamente il DNA degli spermatozoi compromettendone la capacità fecondante e di conseguenza la fertilità dell'individuo (2,3). Negli anni perciò è emersa la necessità di analizzare il nucleo dello spermatozoo soprattutto in pazienti con infertilità idiopatica e a tal fine sono stati introdotti numerosi test che, sia direttamente, come il Comet (single-cell gel electrophoresis assay) e il TUNEL (terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated 2'-deoxyuridine 5'-triphosphate (dUTP)-nick end-labeling test) che indirettamente, come l'AO (Acridine Orange), SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay) il test dell'Anilina e il test della condensazione, sono in grado di fornire informazioni sullo stato del DNA (4,5) (Tab 1.).

Studio funzionale dello spermatozoo		
Test	Oggetto di valutazione	Significato clinico
Annessina V	Esternalizzazione fosfatidilserina	Apoptosi in fase iniziale
JC-1	Potenziale di membrana mitocondriale	Apoptosi in fase iniziale
Arancio di acridina	Eterogeneità cromatinica	Stress ossidativo e alterazione dei meccanismi di riparazione del DNA
TUNEL	Frammentazione del DNA nucleare	Necrosi e apoptosi in fase avanzata
COMET	Frammentazione del DNA nucleare	Necrosi e apoptosi in fase avanzata
Anilina	Protaminazione del DNA nucleare	Alterazione dei processi di maturazione nucleare
Condensazione nucleare	Condensazione nucleare	Alterazione dei processi di condensazione nucleare

Tab 1. Tabella riassuntiva dei test funzionali degli spermatozoi.

Attualmente l'attenzione si sta focalizzando sempre di più sull'entità e sul tipo di rottura del DNA spermatico, che sembra essere predittivo ai fini della fecondazione. Lavori recenti, infatti, dimostrano che, anche se l'oocita è in grado di riparare più facilmente le DSBs (double strand breaks) piuttosto che le SSB (single strand breaks) del DNA paterno (6,7) la permanenza delle rotture a doppia elica durante il processo di fertilizzazione può essere responsabile di alterazioni genetiche e interruzioni dello sviluppo embrionale (8). A tal fine si è reso necessario sviluppare un metodo sensibile ed affidabile in grado di valutare le DSBs negli spermatozoi di pazienti infertili. Recentemente sulle cellule somatiche è stato applicato un nuovo test in grado di analizzare esclusivamente le rotture a doppia elica del DNA attraverso l'analisi diretta della forma fosforilata della variante istonica H2AX. Per capire la dinamica di questo test dobbiamo rifarci all'organizzazione del DNA all'interno di una cellula. La sistemazione di 2 m di DNA in 10 millimetri di nucleo di una cellula somatica è resa possibile grazie alla sua organizzazione in cromatina. L'unità di base della cromatina, chiamata nucleosoma, si compone di 147 paia di basi di DNA, avvolto intorno ad un ottamero che è separato dal successivo da una regione linker di lunghezza variabile (20–80 bp) ed è costituito da quattro piccole unità proteiche, H2A, H2B, H3, H4, chiamate istoni e presenti in coppia.

Ciascun istone presenta due code, una N-terminale che si estende al di fuori del nucleosoma (NH₂-) e una carbossi terminale (COOH-), che funzionano come target per modificazioni post trascrizionali (fosforilazione, acetilazione, metilazione, e ubiquitinazione). Oltre ai quattro tipi di istoni la cui natura è quasi esclusivamente strutturale ne esistono altri con diversi ruoli chiamati varianti istoniche, presenti in una piccola percentuale al livello del genoma, e che differiscono per piccole sequenze amminoacidiche nella loro struttura.

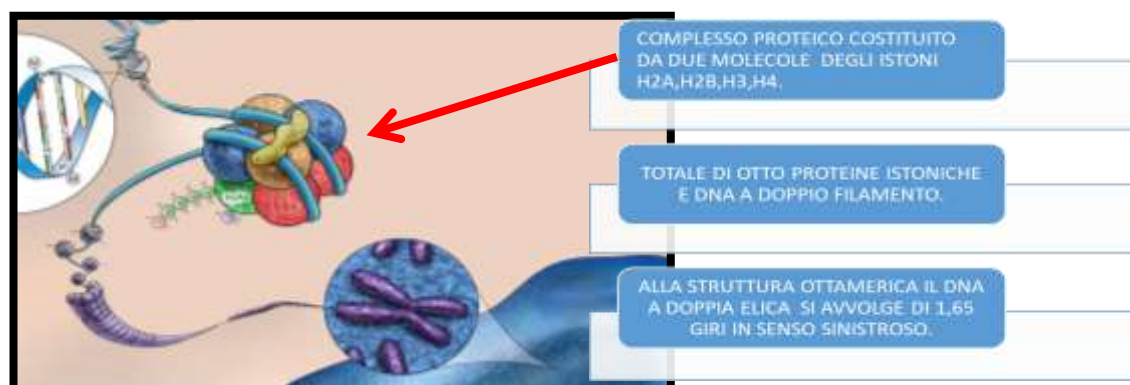


Fig 1.

Organizzazione del DNA nella cromatina. Centoquarantasette paia di basi di DNA sono avvolti intorno ad un nucleosoma composto da otto proteine istoniche (due dimeri H2A/H2B e due dimeri H3/H4).

Negli ultimi anni l'attenzione si è focalizzata sulla variante H2AX dell'istone H2A e in particolare sulla sua forma fosforilata γ H2AX. H2AX è un istone molto frequente nel genoma eucariotico e la sua funzione è implicata nella riparazione del DNA, specie nel danno indotto da radiazioni. Infatti in caso di DSBs viene fosforilato l'istone H2AX più vicino al sito di rottura fungendo da segnale per richiamare in loco tutte le proteine e gli enzimi necessari alla riparazione del genoma.

Recenti studi hanno evidenziato che la fosforilazione di questo istone avviene grazie all'intervento di proteine di riparazione richiamate dal sistema di difesa cellulare nel momento in cui il DNA subisce una rottura a doppia elica. Questa reazione a catena, che vede coinvolte molte proteine appartenenti alla famiglia della phosphoinositide 3-kinase (PIKK) come per esempio Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM), Ataxia Telangiectasia e Rad3 (ATR), si conclude con la fosforilazione della Serina 139 posizionata presso la porzione carbossilica dell'istone H2AX, generando così la forma fosforilata γ H2AX (9).

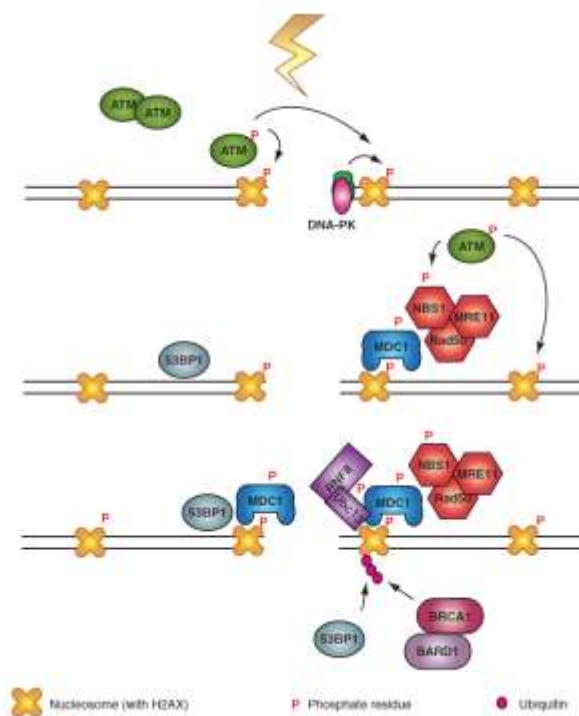


Fig 2.

La fosforilazione di H2AX viene effettuata dai membri della fosfatidilinositolo 3-chinasi (PI3KK) famiglia che include ATM, ATR, e PK DNA. La chinasi ATM è attivata, a monte dal legame del complesso Mre11 / Rad50 / Nbs1 al punto di rottura del DNA.

Da Andrea Kinner, *et al.*, 2008 (10)

Grazie all' utilizzo di un anticorpo anti γ H2AX è stato possibile, quindi, individuare e analizzare specificatamente le DSBs delle cellule somatiche (10-11-12). Negli spermatozoi maturi la sostituzione degli istoni con le protamine non è completa; infatti una piccola frazione del DNA, circa il 15%, rimane legata agli istoni; tra questi è presente la variante istonica H2AX (13-15) grazie alla quale è stato possibile studiare il danno specifico a doppia elica anche negli spermatozoi. Una aumentata presenza di γ H2AX è stata infatti dimostrata in spermatozoi maturi dopo esposizione a stress ossidativo mediante incubazioni in H₂O₂ o con agenti mutageni come l'Adriamicina (16,17). In questi studi la frammentazione è stata valutata in parallelo con γ H2AX e COMET test: quest'ultimo però si è dimostrato meno sensibile rispetto al primo.

DISCUSSIONE

Attualmente sono disponibili numerosi test per lo studio del nucleo spermatico, ma manca un esame specifico per determinare e quantificare la presenza di rotture a doppia elica sul filamento di DNA. A questo scopo, la valutazione della fosforilazione dell'istone H2AX è stata proposta recentemente come test diagnostico sulle cellule somatiche (11). Essendo questa variante istonica presente anche negli spermatozoi, il test è stato utilizzato per la valutazione delle rotture a doppia elica del DNA spermatico. Da studi recenti è emerso che l'analisi della frammentazione del DNA mediante anticorpo anti- γ H2AX negli spermatozoi sembra essere più predittiva del successo riproduttivo rispetto ad altri test perciò può essere considerato come più specifico e sensibile per predire il successo di ICSI in pazienti infertili. Pertanto, in futuro, l'analisi della fosforilazione dell'istone H2AX potrà essere presa in considerazione come strumento predittivo per la fertilità naturale e assistita e per valutare l'efficacia della terapia nel trattamento dell'infertilità maschile.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Rathke, C. et al. Chromatin dynamics during spermiogenesis. *Biochim Biophys Acta*. 2014; 1839: 155-68.
- 2) Harrouk, W. et al. Paternal exposure to cyclophosphamide dysregulates the gene activation program in rat preimplantation embryos. *Mol Reprod Dev*. 2000; 57: 214-223.
- 3) Sakkas, D et al. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome and analysis. *Fertil Steril*. 2010; 93: 1027-1036.
- 4) Chohan, K.R. et al. Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. *J Androl*. 2006; 27: 53-9.

- 5) Ribas-Maynou, J. et al. Comprehensive analysis of sperm DNA fragmentation by five different assays: TUNEL assay, SCSA, SCD test and alkaline and neutral Comet assay. *Andrology* 2013; 1:715-722.
- 6) Ribas-Maynou, J. Et al. Double stranded sperm DNA breaks, measured by Comet assay, are associated with unexplained recurrent miscarriage in couples without a female factor. *PLoS One*. 2012; 7(9): e44679.
- 7) Ribas-Maynou, J. et al. Double-stranded DNA breaks hidden in the neutral Comet assay suggest a role of the sperm nuclear matrix in DNA integrity maintenance. *Mol Hum Reprod*. 2014; 20: 330-40.
- 8) Derijck, A. et al. DNA double-strand break repair in parental chromatin of mouse zygotes, the first cell cycle as an origin of de novo mutation. *Hum Mol Genet*. 2008; 17: 1922-1937.
- 9) Revet, I. Et al. Functional relevance of the histone gamma H2Ax in the response to DNA damaging agents. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108: 8663-8667.
- 10) Fernandez-Capetillo, O. et al. H2AX: the histone guardian of the genome. *DNA Repair (Amst)*. 2004; 3: 959-967.
- 10) Kinner, A. et al. Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Res*. 2008; 36: 5678-5694.
- 11) Hernández, L. et al. Highly sensitive automated method for DNA damage assessment: gamma-H2AX foci counting and cell cycle sorting. *Int J Mol*. 2013; 30: 15810-26.
- 13) Gatewood, J.M. Et al. Isolation of four core histones from human sperm chromatin representing a minor subset of somatic histones. *J Biol Chem*. 1990; 265: 20662-6.
- 14) Oliva, R. et al. Vertebrate protamine genes and the histone to protamine replacement reaction. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 1991A; 40: 25-94.
- 15) Wykes, S.M. Et al. The structural organization of sperm chromatin. *J Biol Chem*. 2003; 278: 29471-29477.
- 16) Li, Z. et al. Oxidative stress induces H2AX phosphorylation in human spermatozoa. *FEBS Lett*. 2006; 580: 6161-6168.
- 17) Li, Z.X. et al. Adriamycin induces H2AX phosphorylation in human spermatozoa. *Asian J Androl*. 2008; 10: 749-57.

MOTILITÀ IPERATTIVATA/IPERMOTILITÀ ED UTILIZZO DEI SISTEMI CASA

La motilità progressiva è una caratteristica funzionale degli spermatozoi umani che regola la loro capacità di migrare attraverso il muco cervicale, risalire attraverso i differenti distretti dell'apparato riproduttivo femminile, penetrare la zona pellucida ed in ultima analisi fecondare l'ovocita.

La motilità iperattivata è una proprietà specifica acquisita dagli spermatozoi lungo il processo di capacitazione che li rende in grado di essere "fecondanti". La possibilità che uno spermatozoo motile sia ipermotile è un passaggio cruciale perché lo stesso possa fecondare l'ovocita. Questa caratteristica dipende prevalentemente dalla concentrazione di calcio intracellulare e dai livelli di cAMP .

Quando si applicano le differenti tecniche di riproduzione assistita, a prescindere dal livello di complessità delle stesse, la capacitazione avviene artificialmente in laboratorio, generalmente ricorrendo a centrifugazioni su gradiente di densità o a separazione per migrazione in base ai parametri del campione seminale di partenza.

Tuttavia nella sospensione di nemaspermii ottenuti non è sempre facile discriminare tra le forme mobili che abbiano le caratteristiche di ipermotilità attese.

Utilizzando il sistema più comune di analisi computerizzato dello sperma (Computer-aided Sperm Analysis, acronimo CASA), è possibile l'esecuzione di valutazioni affidabili delle caratteristiche del movimento degli spermatozoi ("cinematica") nel liquido seminale. Il protocollo può essere utilizzato anche con sospensioni di spermatozoi lavati in cui è possibile discriminare tra percentuali di spermatozoi mobili e progressivamente mobili. Utilizzando la tecnologia CASA è anche possibile identificare biologicamente, e quindi clinicamente, importanti sottopopolazioni di spermatozoi - ad esempio quelli con buone caratteristiche di iperattivazione.

La tecnologia computer-aided per l'analisi dello sperma (CASA) è stato sviluppato alla fine del 1980 per analizzare caratteristiche di movimento degli spermatozoi ed ha avuto molto successo nell'ampliare questo campo di ricerca. CASA è stato utilizzato anche con successo per la misura di caratteristiche del liquido seminale come la concentrazione di spermatozoi e le proporzioni relative di motilità progressiva in molte specie animali trovando vasta applicazione nei laboratori di produzione di animali domestici e di tossicologia riproduttiva. Tuttavia, i tentativi di utilizzare

CASA per l'analisi del seme in ambito clinico sull'umano hanno incontrato scarso successo a causa delle difficoltà intrinseche presentate dall'analisi di molti campioni di sperma umano e dovuti prevalentemente ad aggregazioni e detriti che, fino ad ora, hanno precluso un'accurata analisi di immagine digitale. Inoltre in ambito clinico diagnostico la condizione seminale di base è favorevole ad una conta e valutazione della motilità di tipo computerizzato mentre in ambito di riproduzione assistita i parametri del campione sono spesso così alterati da sfuggire alla standardizzazione tipica degli algoritmi e necessitare di una valutazione microscopica accurata.

Nonostante l'analisi del liquido seminale attraverso l'utilizzo del CASA si siano evoluti nel corso di circa 30 anni sia attraverso i progressi dei dispositivi per catturare l'immagine dal microscopio che con l'aumento sorprendente delle potenzialità di calcolo dei sistemi informatici e dei software applicativi, i concetti di base per valutare gli spermatozoi ed i loro schemi di movimento sono cambiati ben poco. Ogni sistema commercializzato è differente ma i principi costitutivi sostanzialmente non lo sono. I moderni sistemi CASA possono visualizzare automaticamente più campi in una camera registrando il numero contemporaneo ed il movimento da 500 fino ad oltre 2000 spermatozoi, catturando fino a 50/60 fotogrammi al secondo. Quando la metodologia è accuratamente convalidata, gli attuali sistemi CASA forniscono, specialmente in ambito riproduttivo veterinario, informazioni importanti per la garanzia della qualità dello sperma previste dal marketing, tuttavia nella routine clinica di un laboratorio di fecondazione assistita le possibilità predittive dell'analisi computerizzata restano limitate.

Tra i vari gruppi che si sono dedicati alla valutazione dell'applicazione dei sistemi CASA, uno dei maggiori risulta quello di David e Sharon Mortimer. Nel più completo degli studi condotti, gli autori hanno analizzato le funzionalità migliorate di due piattaforme CASA moderni (Hamilton Thorne CASA-II e Microptic SCA6) e preso in considerazione le loro applicazioni attuali e future, con particolare riferimento all'utilizzo di questa tecnologia per valutazioni di tipo funzionale piuttosto che semplici caratteristiche descrittive degli spermatozoi.

Chiaramente in una camera di conta le condizioni di studio del movimento degli spermatozoi sono un compromesso poiché gli spermatozoi sono osservati in situazioni ben diverse da qualsiasi altra incontreranno in vivo. In particolare la sospensione viene visualizzato in una camera di conta in cui i nemaspermici nuotano diversamente a seconda che si trovino nella porzione centrale o vicino all'interfaccia aria/sospensione. Le leggi dell'ottica impongono una profondità minima di campo in cui un spermatozoo oggetto di osservazione può essere rilevato nel suo movimento pertanto sono necessari sistemi sofisticati in grado di rilevare il movimento degli spermatozoi in tre dimensioni. Tuttavia è improbabile che il passaggio dagli attuali approcci disponibili alla misurazione del

movimento degli spermatozoi in una camera di conta più adeguata possa migliorare o sostituire il processo decisionale sulla scelta della tecnica di riproduzione assistita da applicare.

Alcuni studi hanno suggerito che l'analisi del liquido seminale attraverso il CASA, in funzione delle relative caratteristiche di concentrazione e ipermotilità, identificata come sottopopolazione degli spermatozoi mobili, siano legati ai tassi di fecondazione in vitro. Tuttavia, è stato anche suggerito che il maggior numero di parametri di motilità valutati da CASA non implica necessariamente una maggiore precisione nel predire la fertilità.

Gli studi effettuati si sono prevalentemente focalizzati sui tassi di fecondazione di ovociti in cicli di fecondazione in vitro prodotti utilizzando spermatozoi di cui fosse stata valutata tramite CASA la tipologia di movimento dopo selezione con swim-up. I risultati in piccole coorti di pazienti indicano correlazioni significative tra i tassi di fecondazioni e le stime CASA soprattutto per i parametri che riguardano l'ampiezza dello spostamento laterale della testa (AHL), la velocità curvilinea (VCL), la velocità in linea retta (VSL), la velocità media di percorso (VAP) ed in particolare il movimento rapido. Tuttavia mancano studi solidi che correlino i tassi di fecondazione all'outcome del trattamento e soprattutto resta la problematica della valutazione "a campione" della sospensione di nemaspermi in quanto l'aliquota utilizzata per l'inseminazione non è mai la medesima analizzata.

La letteratura evidenzia inoltre che, benchè nella routine della diagnostica clinica il CASA abbia trovato vasta applicazione, tuttavia gli operatori dei laboratori hanno una conoscenza relativa sui principi di funzionamento del CASA, i fattori che ne influenzano l'attendibilità e di conseguenza la necessità formativa. Questi fattori, uniti alla mancanza di un controllo interno adeguato possono risultare in differenze interpretative anche molto grandi fra differenti laboratori. Pertanto in ambito clinico l'utilizzo dei sistemi CASA non può prescindere dalla standardizzazione e dal controllo di qualità.

BIBLIOGRAFIA

1. Yanagimachi R (1994). Mammalian fertilization. In: "The Physiology of Reproduction", E. Knobil and JD Neill (eds.) Raven Press, New York, 189-317
2. Mortimer D1, Mortimer ST. Computer-Aided Sperm Analysis (CASA) of sperm motility and hyperactivation. *Methods Mol Biol.* 2013;927:77-87.
3. Lu JC et al., Computer-aided sperm analysis: past, present and future. *Andrologia.* 2014

May;46(4):329-38.

4. Mortimer ST, van der Horst G, Mortimer D. The future of computer-aided sperm analysis. *Asian J Androl*. 2015 Jul-Aug;17(4):545-53.
5. S.P. Boyers, R.O. Davis, D.F. Katz. Automated semen analysis *Curr Probl Obstet Gynecol Fertil*, 12 (1989), pp. 167–200
6. R.P. Amann, D.F. Katz. Reflections on CASA after 25 years *J Androl*, 25 (2004), pp. 317–325
7. R.P. Amann, R.H. Hammersted. Validation of a system for computerized measurement of spermatozoal velocity and percentage of motile sperm. *Biol Reprod*, 23 (1980), pp. 647–656
8. J.F. Moruzzi, A.J. Wyrobek, B.H. Mayall, B.L. Gledhill Quantification and classification of human sperm morphology by computer-assisted image analysis *Fertil Steril*, 50 (1988), pp. 142–162
9. R.P. Amann, R.H. Hammerstedt. In vitro evaluation of sperm quality: an opinion. *J Androl*, 14 (1993), pp. 397–406
10. M.L. Broekhuijse, E. Šoštarič, H. Feitsma, B.M. Gadella. Additional value of computer assisted semen analysis (CASA) compared to conventional motility assessments in pig artificial insemination. *Theriogenology*, 76 (2011), pp. 1473–1486
11. B. Bartoov, D. Klay, A. Mayevsky. Sperm motility analyzer (SMA), a practical tool of motility and cell concentration determinations in artificial insemination centers. *Theriogenology*, 15 (1981), pp. 173–182
12. S.D. Olson, S.S. Suarez, L.J. Fauci. Coupling biochemistry and hydrodynamics captures hyperactivated sperm motility in a simple flagellar model. *J Theoretical Biol*, 283 (2011), pp. 203–216
13. M.J. Tomlinson, K. Pooley, T. Simpson, T. Newton, J. Hopkisson, K. Jayaprakasan, et al. Validation of a novel computer-assisted sperm analysis (CASA) system using multi-tracking algorithms *Fertil Steril*, 93 (2010), pp. 1911–1920
14. W.V. Holt, J. O'Brien, T. Abaigar. Applications and interpretation of computer-assisted sperm analyses and sperm sorting methods in assisted breeding and comparative research. *Reprod Fertil Dev*, 19 (2007), pp. 709–718

15. F. Martínez-Pastor, E.J. Tizado, J.J. Garde, L. Anel, P. de Paz. Statistical series: opportunities and challenges of sperm motility subpopulation analysis. *Theriogenology*, 75 (2011), pp. 783–795
16. Brito L, Beckman B, Cardwell B, DeJarnette JM, Hutchens L, Kaya A, et al. NAAB-CSS semen quality control program minimum guidelines. *Proceedings of the 24th Technical Conference on Artificial Insemination and Reproduction* 2012;37–41.
17. C. Schleh, A.L. Leoni. How to optimize the benefits of computer-assisted sperm analysis in experimental toxicology. *J Occup Med Toxicol*, 8 (2013), p. 6
18. J. Verstegen, M. Iguer-Ouada, K. Onclin. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, 57 (2002), pp. 149–179
19. ESHRE Andrology Special Interest Group. Guidelines on the application of CASA technology in the analysis of spermatozoa. *Hum Reprod*, 13 (1998), pp. 142–145
20. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. World Health Organization (Fifth edition), Geneva (2010), pp. 179–202
21. Lu JC, Huang YF, Lü NQ. Computer-aided sperm analysis: past, present, future [e-pub ahead of print]. *Andrologia*, published online 1 April 2013.
22. G. Corkidi, B. Taboada, C.D. Wood, A. Guerro, A. Darszon. Tracking sperm in three-dimensions. *Biochem Biophys Res Commun*, 373 (2008), pp. 125–129
23. J. Ehlers, M. Behr, H. Bollwein, M. Beyerbach, D. Waberski. Standardization of computer-assisted semen analysis using an e-learning application. *Theriogenology*, 76 (2011), pp. 448–454
24. C. Hansen, T. Vermeiden, J.P. Vermeiden, C. Simmet, B.C. Day, H. Feitsma. Comparison of FACSCount AF system, improved Neubauer hemocytometer, Corning 254 photometer, SpermVision, UltiMate and NucleoCounter SP-100 for determination of sperm concentration of boar semen. *Theriogenology*, 66 (2006), pp. 2188–2194

2. Valutazione di alcune funzioni spermatiche in aggiunta ai parametri dello spermioγραμμα

Le funzioni spermatiche necessarie per una corretta fecondazione dell'ovocita sono numerose e vanno dalla motilità iperattivata, necessaria per la penetrazione del cumulo ooforo, al processo di fusione con l'oolemma (Fig. 1)

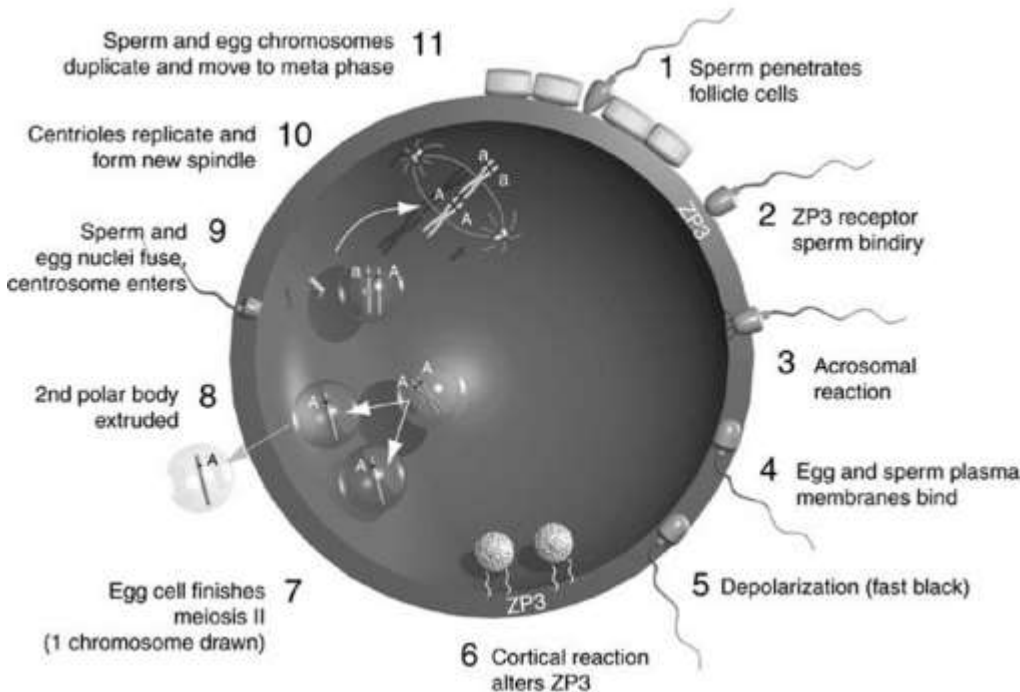


Figura 1: I vari step del processo di fecondazione

Difetti delle funzioni dello spermatozoo che impediscano la realizzazione di uno solo di questi step provocheranno la mancata fertilizzazione dell'ovocita. Negli anni sono stati sviluppati dei test in grado di studiare la capacità degli spermatozoi di oltrepassare ciascuno di questi step, al fine di identificare il o i difetti spermatici dei soggetti con bassa o nulla capacità fecondante. L'avvento della tecnica ICSI, che oltrepassa tutti gli step della fecondazione, ha fatto cadere in disuso questi test [EB1].

a. **motilità iperattivata (de santis)**

b. **Capacitazione.** Come è noto, lo spermatozoo appena eiaculato ha una limitata capacità fecondante in quanto deve andare incontro ad una serie di complesse modificazioni che riguardano l'assetto della membrana citoplasmatica e l'attivazione di vie di segnalazione intracitoplasmatiche note collettivamente come processo di capacitazione. Tale processo avviene durante l'attraversamento delle vie genitali femminili nel caso della fecondazione naturale ma può anche essere ottenuto in vitro in appositi mezzi di coltura ed è necessario per preparare lo spermatozoo a rispondere agli stimoli che inducono la reazione acrosomiale e per l'ottenimento della motilità iperattivata. Il processo di capacitazione avviene sotto una complicata regolazione di vari fattori (per una trattazione completa e aggiornata sul processo di capacitazione si veda Jin and Yang 2016). Gli studi in vitro hanno evidenziato l'attivazione di numerose vie di segnalazione ma certamente, tra queste, le più importanti riguardano l'incremento intracitoplasmatico della concentrazione dello ione calcio, la rimozione di colesterolo dalle membrane (che avviene grazie alla presenza di proteine nel mezzo di coltura quale l'albumina e che rende più fluida la membrana stessa

preparandola all'evento di fusione con la membrana acrosomiale durante la reazione acrosomiale) e l'attivazione, ad opera del bicarbonato, dell'adenilato ciclasi solubile presente negli spermatozoi, che aumentando la concentrazione dell'AMPc favorisce una serie di processi che porta ad un incremento della fosforilazione di alcune proteine della coda. Appare chiaro che il completamento del processo di capacitazione è necessario per la fecondazione, in vivo ed in vitro, dell'ovocita.

La capacitazione può essere studiata in vitro con vari metodi, di cui il più usato è il test CTC (chlortetracycline), che prevede, dopo capacitazione degli spermatozoi in un mezzo capacitante a 37°C, una colorazione con CTC fluorescente (Green et al., 1994) e la rivelazione al microscopio a fluorescenza della percentuale di spermatozoi che presentano i tre diversi pattern di colorazione, ovvero pattern F (fluorescenza diffusa su tutta la testa dello spermatozoo) tipico degli spermatozoi appena eiaculati non capacitati, pattern B (fluorescenza limitata alla regione acrosomiale) tipica degli spermatozoi capacitati e pattern AR (fluorescenza limitata al segmento equatoriale) indicativo dell'avvenuta reazione acrosomiale. La percentuale di spermatozoi con pattern B sarà dunque indicativa degli spermatozoi in cui è avvenuta la capacitazione.

Da notare che la ditta Androvia Life Science sta sviluppando un test (Cap-Score™ Sperm Function Test, che dovrebbe essere in commercio a breve come kit) che valuta la capacitazione degli spermatozoi basandosi sul pattern di localizzazione del ganglioside GM1 mediante l'uso di anticorpi. Tale test è di facile uso e replicabile. I primi risultati sono stati presentati durante il congresso ASA 2016 (Travis et al, 2016a e b) e gli studi, ancora preliminari e in corso di pubblicazione, dimostrerebbero risultati anomali del test in circa il 50% dei pazienti infertili che presentano parametri seminali nella norma e che pertanto il test è di aiuto nella "decision making" riguardo il test PMA più appropriato da adottare. In particolare il test sembra essere particolarmente utile per evitare cicli IUI, in quanto predice il mancato successo con questa tecnica.

[EB2]

c. reazione acrosomiale. La reazione acrosomiale (RA) è l'evento che permette la liberazione all'esterno del contenuto della vescicola acrosomiale permettendo l'attraversamento dei rivestimenti oocitari. Si è discusso a lungo su quale possa essere la sede reale dove la reazione acrosomiale avvenga e su quale sia il reale stimolo, tra i tanti conosciuti, a indurre la RA nello spermatozoo che effettivamente fertilizza l'ovocita. Studi recenti effettuati in vivo ed in vitro utilizzando spermatozoi di topo ingegnerizzati in modo da poterli seguire nel loro percorso sia durante la fertilizzazione dell'ovocita in vitro che nelle vie genitali femminili, hanno dimostrato che la RA avviene comunque prima del raggiungimento della zona pellucida (Jin et al, 2011) e pertanto verosimilmente in risposta ad un induttore presente nel cumulo ooforo e comunque nel fluido tubarico in prossimità del sito di fecondazione. Il candidato più accreditato a svolgere quest'azione è il progesterone (Baldi et al, 2009), ormone femminile noto per la sua capacità di indurre la RA, le cui concentrazioni diventano elevatissime (circa micromolari) sia nel cumulo ooforo che nel fluido tubarico nel periodo ovulatorio. Poiché è noto dalla letteratura che solo gli spermatozoi reattivi riescono a fecondare l'ovocita in vitro (Jin et al, 2011) appare chiaro che la valutazione della RA rappresenta un possibile test di valutazione delle funzioni spermatiche. Infatti numerosi lavori dimostrano che la responsività al progesterone correla con la capacità fertilizzante in vitro (es: Krausz et al, 1996). Prima della ICSI, molti laboratori utilizzavano questo test di responsività al progesterone per valutare la capacità fertilizzante degli spermatozoi, che è poi caduto in disuso. Dopo la selezione degli spermatozoi mobili mediante swim up o gradiente di densità, gli spermatozoi vengono stimolati con il progesterone per circa un'ora. Oltre alla metodica sopra descritta che utilizza la CTC fluorescente, la RA può essere rivelata utilizzando lectina fluorescente (FITC-Peanut lectin) che si lega alla membrana degli spermatozoi e che quindi evidenzia l'acrosoma negli spermatozoi non reattivi e il solo segmento equatoriale in quelli reattivi, o con altri reagenti

(come la concanavalina A e il soybean trypsin inhibitor) che marcano gli spermatozoi reatti (legandosi alla membrana acrosomiale interna). E' possibile anche utilizzare anticorpi in grado di legarsi alla membrana e rivelare gli spermatozoi reatti e non mediante microscopia a fluorescenza o citometria a flusso.

d. **hemizona assay**. E' il test che meglio correla e predice la capacità fertilizzante dello spermatozoo. Tuttavia la sua esecuzione è fortemente dipendente dalla disponibilità di ovociti, che vengono tagliati in due emizone poi messe a contatto con gli spermatozoi di un soggetto di controllo e con quelli del soggetto di cui si vuole studiare la capacità fertilizzante (Franken et al, 1998). Recentemente un gruppo australiano (Liu et al, 2007) ha messo a punto una tecnica che permette di valutare il legame alla zona pellucida degli ovociti e "recuperare" gli ovociti per un nuovo test (vedi Figura 2) ovviando alla ridotta disponibilità di ovociti:

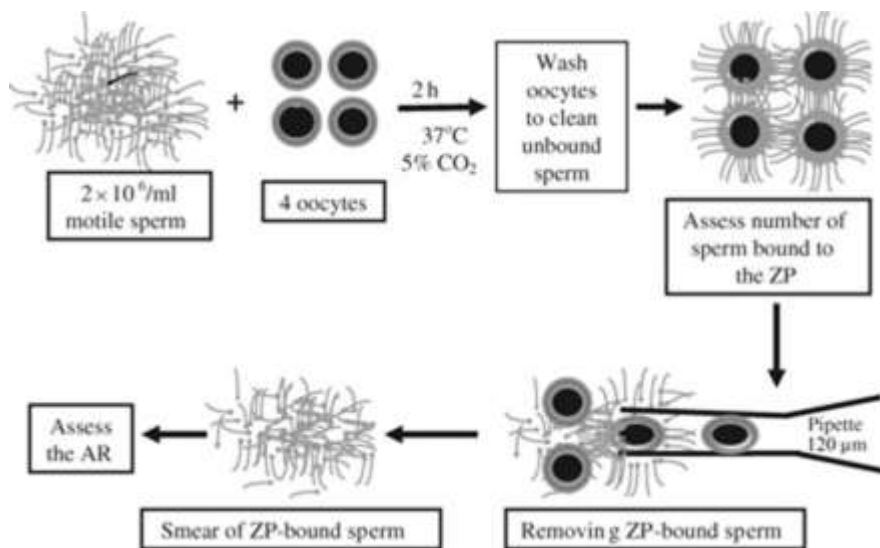


Figura 2: rappresentazione schematica del test di valutazione di interazione spermatozoi-ovociti sviluppata da Liu et al (2007).

e. **fusione spermatozoo-oolemma**. Il processo di fusione tra la membrana ovocitaria e quella dello spermatozoo rappresenta l'ultimo, importantissimo, step del processo di fecondazione. Oggi è noto che l'interazione tra le due membrane avviene mediante un meccanismo recettoriale che coinvolge la proteina izumo sullo spermatozoo e juno sull'ovocita (Aydin et al, 2016; Ohto et al, 2016). La capacità dello spermatozoo di fondersi e di penetrare gli ovociti può essere studiata mediante l'hamster egg penetration test (HEPT) che presenta un'elevata capacità predittiva (circa 80%) della capacità fertilizzante in IVF (Ford et al, 2001). Il test utilizza ovociti di hamster denudati della zona pellucida che vengono messi in contatto con gli spermatozoi e vengono poi contati quelli penetrati e decondensati all'interno del citoplasma degli ovociti.

f. **legame all'acido ialuronico** (selezione dei gameti maturi, che presentano il recettore per l'acido ialuronico vs gli immaturi che non lo possiedono) Rienzi

References:

Jin SK, Yang WX. Factors and pathways involved in capacitation: how are they regulated? Oncotarget. 2016 Sep 27. doi: 10.18632/oncotarget.12274. [Epub ahead of print]

Green CM, Cockle SM, Watson PF and Fraser LR (1994) Stimulating effect of pyroglutamyl-glutamylprolineamide, a prostatic, TRH-related tripeptide, on mouse sperm capacitation and fertilizing ability in vitro. *Mol Reprod Dev* 38,215–221.

Baldi E, Luconi M, Muratori M, Marchiani S, Tamburrino L, Forti G. Nongenomic activation of spermatozoa by steroid hormones: facts and fictions. *Mol Cell Endocrinol*. 2009 Sep 24;308(1-2):39-46.

Jin M, Fujiwara E, Kakiuchi Y, Okabe M, Satouh Y, Baba SA, Chiba K, Hirohashi N. Most fertilizing mouse spermatozoa begin their acrosome reaction before contact with the zona pellucida during in vitro fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Mar 22;108(12):4892-6.

Krausz C, Bonaccorsi L, Maggio P, Luconi M, Criscuoli L, Fuzzi B, Pellegrini S, Forti G, Baldi E. Two functional assays of sperm responsiveness to progesterone and their predictive values in in-vitro fertilization. *Hum Reprod*. 1996 Aug;11(8):1661-7.

Franken DR, Burkman LJ, Oehninger SC, Coddington CC, Veeck LL, Kruger TF, Rosenwaks Z, Hodgen GD. Hemizona assay using salt-stored human oocytes: evaluation of zona pellucida capacity for binding human spermatozoa. *Gamete Res*. 1989 Jan;22(1):15-26

Liu DY, Liu ML, Garrett C, Baker HW. Comparison of the frequency of defective sperm-zona pellucida (ZP) binding and the ZP-induced acrosome reaction between subfertile men with normal and abnormal semen. *Hum Reprod*. 2007 Jul;22(7):1878-84.

Ford WC, Williams KM, Harrison S, Rees JM, Ray BD, McLaughlin EA, Hull MG. Value of the hamster oocyte test and computerised measurements of sperm motility in predicting if four or more viable embryos will be obtained in an IVF cycle. *Int J Androl*. 2001 Apr;24(2):109-19

Aydin H, Sultana A, Li S, Thavalingam A, Lee JE. Molecular architecture of the human sperm IZUMO1 and egg JUNO fertilization complex. *Nature*. 2016 Jun 15;534(7608):562-5.

Ohto U, Ishida H, Krayukhina E, Uchiyama S, Inoue N, Shimizu T. Structure of IZUMO1-JUNO reveals sperm-oocyte recognition during mammalian fertilization. *Nature*. 2016 Jun 15;534(7608):566-9

Travis, AJ, Cardona C, Moody MA, Simpson AJ, Seaman EK, Ostermeier GC, Sperm from fertile men and those seeking fertility exams differ in their ability to capacitate. American Society of Andrology annual conference 2016a. Poster 140

Travis, AJ, Cardona C, Moody MA, Simpson AJ, Seaman EK, Ostermeier GC, Consistent Differences Among Men In Capacitation Timing Could Personalize IUI/ART. American Society of Andrology annual conference 2016b. Oral presentation 12.

e. Legame all'acido ialuronico (selezione dei gameti maturi, che presentano il recettore per l'acido ialuronico vs gli immaturi che non lo possiedono)

Alcuni autori hanno ipotizzato che la selezione degli spermatozoi con maggiore potenziale di fertilità potrebbe essere eseguita sfruttando la loro capacità chemiotattica di migrare verso l'Acido Ialuronico (AI) e di legarsi allo stesso (19). Il razionale di questa metodica presuppone che gli spermatozoi normali dal punto di vista genetico e funzionale siano quelli che esprimono elevati livelli della proteina HSPA2 (20, 21), la chaperonina che prende parte al complesso sinaptonemale che dirige e controlla i processi meiotici (22, 23). Sarebbero questi gli spermatozoi che hanno completato correttamente il processo spermiogenetico (transizione da spermatide rotondo, a spermatide allungato, a spermatozoo maturo), che prevede vari processi maturativi: rimodellamento della membrana plasmatica, estrusione del citoplasma e sostituzione delle proteine nucleari degli istoni con le protammine. Solo questi gameti possiederebbero i recettori per l'AI. Questa sostanza, che è normalmente presente nel tratto riproduttivo femminile e ad alte concentrazioni nella matrice extracellulare del cumulo ooforo che avvolge l'ovocita, parteciperebbe del processo di fertilizzazione. In accordo con tale ipotesi, l'analisi degli spermatozoi che si legano all'AI hanno mostrato un minor grado di frammentazione nucleare (25, 25) e una minor percentuale di aneuploidie rispetto ai campioni seminali pre-trattamento (19, 26). Nonostante questo metodo riduca ma non sia in grado di escludere la possibilità di selezionare spermatozoi con alterazioni cromosomiche, è stato ipotizzato che la sua associazione alla ICSI potesse migliorare i risultati di questa tecnica.

Esistono sul mercato due sistemi ready-to-use disegnati appositamente allo scopo di selezionare in modo non invasivo gli spermatozoi prima della iniezione intracitoplasmatica sulla base della loro capacità di legarsi al AI. Nel primo caso si tratta di una piastra di Petri contenete AI hydrogel attaccato sul fondo (PICSI Sperm Selection Device; MidAtlantic Diagnostic-Origio) nel secondo caso invece è stato più semplicemente concepito un mezzo di coltura viscoso contenente AI (Sperm Slow; MediCult-Origio).

Gli spermatozoi in grado di legarsi al AI durante la PICSI rimangono adesi col la testa sul fondo della piastra mentre il flagello rimane mobile inducendo un movimento a spirale. Gli spermatozoi vengono quindi aspirati uno ad uno immobilizzati e quindi iniettati.

Quando viene utilizzato lo Sperm slow, la viscosità stessa del mezzo rallenta il movimento degli spermatozoi che appaiono, quando in grado di legarsi al AI, lenti e allineati. Dopo la selezione si procede con la immobilizzazione e la ICSI direttamente in questa soluzione.

Uno studio prospettico randomizzato (7) ha dimostrato che i due sistemi (PICSi e Sperm slow) sono sostanzialmente equivalenti e permettono di ottenere risultati comparabili in termini di tasso di fertilizzazione e sviluppo embrionale.

Alcuni Autori suggeriscono inoltre che questi sistemi che non comportano l'utilizzo del polyvinylpyrrolidone (PVP) possano essere considerati più fisiologici e meno invasivi per l'ovocita (8).

Le evidenze ad oggi riportate in letteratura ed analizzate in due review indipendenti (9,10) sono risultate insufficienti per suggerire che l'utilizzo del AI nella selezione degli spermatozoi possa migliorare le possibilità di gravidanza in PMA. Le evidenze sono inoltre insufficienti per dimostrare un beneficio in termini di efficacia laboratoristica (tasso di fertilizzazione e qualità embrionale). L'uso routinario di questa tecnica non è quindi raccomandata e ulteriori studi sono necessari per identificare eventuali benefici collegati alla selezione degli spermatozoi sulla base del legame con AI.

Referenze

1. Cayli S, Jakab A, Ovari L, Delpiano E, Celik-Ozenci C, Sakkas D, et al. Biochemical markers of sperm function: male fertility and sperm selection for ICSI. *Reprod Biomed Online* 2003;7:462–8.
2. Huszar G, Ozenci CC, Cayli S, Zavaczki Z, Hansch E, Vigue L. Hyaluronic acid binding by human sperm indicates cellular maturity, viability, and unreacted acrosomal status. *Fertil Steril* 2003;79(Suppl 3):1616–24.
3. Huszar G, Jakab A, Sakkas D, Ozenci CC, Cayli S, Delpiano E, et al. Fertility testing and ICSI sperm selection by hyaluronic acid binding: clinical and genetic aspects. *Reprod Biomed Online* 2007;14:650–63.

4. Jakab A, Sakkas D, Delpiano E, Cayli S, Kovanci E, Ward D, et al. Intracytoplasmic sperm injection: a novel selection method for sperm with normal frequency of chromosomal aneuploidies. *Fertil Steril* 2005;84:1665–73.
5. Parmegiani L, Cognigni GE, Bernardi S, Troilo E, Ciampaglia W, Filicori M. “Physiologic ICSI”: hyaluronic acid (HA) favors selection of spermatozoa without DNA fragmentation and with normal nucleus, resulting in improvement of embryo quality. *Fertil Steril* 2010;93:598–604.
6. Parmegiani L, Cognigni GE, Ciampaglia W, Pocognoli P, Marchi F, Filicori M. Efficiency of hyaluronic acid (HA) sperm selection. *J Assist Reprod Genet* 2010;27:13–6.
7. Parmegiani L, Cognigni GE, Bernardi S, Troilo E, Taraborrelli S, Arnone A, Maccarini AM, Filicori M. Comparison of two ready-to-use systems designed for sperm-hyaluronic acid binding selection before intracytoplasmic sperm injection: PICSI vs. Sperm Slow: a prospective, randomized trial. *Fertil Steril*. 2012 Sep; 98(3):632-7.
8. Strehler E, Baccetti B, Sterzik K, Capitani S, Collodel G, De SM, et al. Detrimental effects of polyvinylpyrrolidone on the ultrastructure of spermatozoa (*Notulae seminologicae* 13). *Hum Reprod* 1998;13:120–3.
9. McDowell S, Kroon B, Ford E, Hook Y, Glujovsky D, Yazdani A. Advanced sperm selection techniques for assisted reproduction. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014 Oct 28;(10):CD010461
10. Beck-Fruchter R, Shalev E, Weiss A. Clinical benefit using sperm hyaluronic acid binding technique in ICSI cycles: a systematic review and meta-analysis. *Reprod Biomed Online*. 2016 Mar;32(3):286-98.

VALUTAZIONE ECOGRAFICA DEL PAZIENTE INFERTILE

Indice

1. Indicazione diagnostiche, tecnica di esame e limiti dell'ecografia didimo epididimaria
2. Indicazione diagnostiche, tecnica di esame e limiti dell'ecografia prostato vescicolare
3. Caratterizzazione ecografica del paziente con varicocele
4. Caratterizzazione ecografica del paziente con neoplasia testicolare
5. Caratterizzazione ecografica del paziente con flogosi delle ghiandole sessuali accessorie

1. Indicazione diagnostiche, tecnica di esame e limiti dell'ecografia didimo epididimaria

ANATOMIA ECOGRAFICA (1-7)

Il testicolo e l'epididimo sono avvolti da una serie di membrane sovrapposte di differente natura.

Partendo dall'esterno, esse sono rappresentate dallo scroto e dalle tonache (denominate anche tuniche) del testicolo.

In particolare, lo scroto è costituito dalla cute, dal connettivo sottocutaneo, dal dartos e dallo strato sottodartico.

Le tonache formano inoltre una serie di strati, costituiti in successione da: a) fascia cremasterica del Cooper, che riveste il muscolo cremasterico; b) muscolo cremastere esterno; c) tonaca vaginale comune, che dà origine al legamento scrotale che ancora il polo inferiore del testicolo e la coda dell'epididimo alla parete scrotale; d) tonaca vaginale propria (definita anche "sacco vaginale"), che comprende un foglietto parietale e un foglietto viscerale; tra i due foglietti c'è uno spazio virtuale, in cui è presente una falda liquida, ben visibile a livello del recesso funicolare; e) muscolo cremastere interno, costituito da fini fasci di muscolatura presenti al di sotto della lamina parietale; f) tunica albuginea, che si trova immediatamente al di sotto della lamina viscerale e che è costituita da una membrana fibrosa e inestensibile.

TECNICHE D'ESAME

L'esame ecografico, da effettuare preferibilmente in ambiente parzialmente oscurato, viene eseguito in due fasi (1-7).

1^ fase. Il paziente viene posto in posizione supina ed è invitato a mantenere il pene appoggiato alla regione sovra pubica;

2^ fase. Il paziente viene invitato a porsi in posizione ortostatica; tale posizione consente di valutare in modo più idoneo la presenza di reflussi a carico del plesso pampiniforme, eventuali raccolte di fluido o posizionamenti testicolari anomali.

Fino agli anni '80 l'ecografia veniva eseguita mediante la tecnica di immersione dei testicoli in acqua (8). Attualmente l'esame ecografico scrotale viene effettuato con sonde lineari ad alta risoluzione ed alta frequenza (da 7.5 a 12 MHz), dedicate allo studio delle parti molli, con Color Doppler in grado di rilevare flussi molto

lenti e superfici e con superficie di scansione non inferiore ai 5 cm. Tra lo scroto e la sonda deve essere apposto uno strato di gel.

È stata inoltre proposta l'ecografia testicolare tridimensionale, ma ad oggi non è utilizzata routinariamente in quanto non sembra aggiungere informazioni particolari rispetto all'esame bidimensionale (9).

È stata inoltre messa a punto la tecnica di ecografia con mezzo di contrasto, utile per la diagnosi differenziale delle lesioni testicolari (10).

Infine, accanto all'esame ecografico standard, è possibile utilizzare, anche per il testicolo, l'elastonosografia, ossia una tecnica che permette di avere informazioni riguardo l'elasticità dei tessuti, e che potrebbe essere utile per la diagnosi differenziale delle varie lesioni (11-12).

Considerato il basso costo e la non invasività, nell'ambito della diagnostica andrologica l'esame ecografico è sempre più utilizzato. Tuttavia, nonostante il perfezionamento delle sonde a sempre più alta definizione, le tecniche ecografiche presentano tutt'ora dei limiti legati prevalentemente all'operatore-dipendenza (13).

ESAME ECOGRAFICO DELLO SCROTO

Nell'esame ecografico dello scroto devono essere esaminati: a) i testicoli, b) gli epididimi, c) i dotti deferenti, d) gli involucri esterni.

TESTICOLI

Le informazioni che possono essere desunte dall'esame ecografico riguardano la sede, il volume, la morfologia, l'ecogenicità e la vascolarizzazione intraparenchimale (14-17).

Sede: La sede naturale del testicolo è all'interno del rispettivo sacco emi-scrotale, destro e sinistro. In condizioni normali il testicolo è tenuto in sede, ossia all'interno della borsa scrotale, dalla presenza di legamenti, la cui lassità può determinare la rotazione o la risalita del testicolo all'interno del canale inguinale dopo contrazione del muscolo cremastere. Se dopo il rilassamento del suddetto muscolo il testicolo scende nuovamente all'interno dello scroto viene definito "mobile", se, invece, tende a rimanere nel contesto del canale inguinale si definisce "retrattile". In caso di criptorchidismo, il testicolo è dislocato in sedi anomale, ossia nel canale inguinale o in ambito pelvico.

Morfologia e volume: i testicoli post-puberali presentano forma ovoidale e superficie liscia; l'asse maggiore è disposto verticalmente, in posizione leggermente obliqua. Vi si distinguono due poli (superiore ed inferiore, con lunghezza 40-50 mm), due facce (laterale e mediale, con larghezza 18-22 mm) e due margini (anteriore e posteriore, con spessore 28-34 mm). Il volume del testicolo viene calcolato con la formula dell'ellissoide ($\text{lunghezza} \times \text{larghezza} \times \text{spessore} \times 0.52$) in modo molto semplice e ripetibile e può essere calcolato automaticamente dal sistema di lettura dell'ecografo. Il testicolo viene considerato di normali dimensioni quando presenta un volume compreso tra 12 e 25 ml, ai limiti inferiori della norma quando il volume è compreso tra 10 e 12 ml ed infine ipotrofico se il volume è inferiore ai 10 ml. Il testicolo pre-puberale presenta invece un volume di circa 2 ml. Nell'età avanzata vi è una progressiva riduzione del volume testicolare. La determinazione ecografica ha evidenziato infine una sopravvalutazione del volume testicolare se eseguita con l'orchidometro di Prader.

Ecostruttura: la normale ecostruttura parenchimale, nel testicolo post-puberale, è caratterizzata da echi fini e addensati, disposti con elevata omogeneità. In corrispondenza della porzione postero superiore del testicolo frequentemente si evidenzia un'area triangolariforme iperecogena (ilo testicolare) caratterizzata da un ispessimento dell'albuginea (corpo di Highmore) che include i dotti efferenti della *rete testis* (conosciuto come corpo di Haller). La *rete testis* non è invece generalmente visualizzabile. La presenza di un *ecopattern*

finemente disomogeneo, di aree ipo- o iper-ecogene sono espressioni di una testicolopatia che può riconoscere varie eziologie (es. lesioni flogistiche, post traumatiche, varicocele, alterazioni geniche). L'intensità dell'ecogenicità è ridotta nel testicolo prepubere.

Vascolarizzazione: L'arteria testicolare, proveniente dall'arteria spermatica, penetra nel testicolo attraverso la tonaca albuginea a livello del polo testicolare inferiore, dando origine all'arteria capsulare, da cui si originano le arterie centripete e quindi le arteriole centrifughe. Nel 50% dei casi è inoltre presente al terzo superiore del testicolo l'arteria trans-mediastinica. Alla valutazione ColorDoppler, le arterie testicolari, capsulare e transmediastiniche sono ben rilevabili, mentre le arterie centripete e centrifughe frequentemente appaiono come *spot* colorati omogeneamente distribuiti all'interno del parenchima testicolare. Lo studio Doppler pulsato delle arterie intratesticolari evidenzia curve velocitometriche caratterizzate da basso indice di resistenza.

EPIDIDIMI

Gli epididimi sono situati in sede supero- e postero-laterale dei testicoli e presentano tre segmenti: testa, corpo e coda. La testa è rappresentata sicuramente il segmento esplorabile con maggiore facilità (18-19). Ha una conformazione "a cimiero" e sovrasta il polo superiore del testicolo; presenta ecostruttura omogenea e generalmente isoecogena rispetto al parenchima testicolare ed ha uno spessore compreso tra 10-12 mm. L'appendice epididimale ("Idatide del Morgagni"), *remnant* embrionale del dotto di Wolff, appare, quando visualizzabile, come una formazione cistica al margine superiore della testa epididimale, con diametro compreso tra 3 e 5 mm. Il corpo, non sempre ben visualizzabile, presenta un'ecostruttura finemente disomogenea e lievemente ipoecogena rispetto alla porzione cefalica ed ha uno spessore massimo compreso tra 2 e 5 mm. La porzione caudale, infine, viene visualizzata in prossimità del margine postero inferiore del testicolo, presenta un'ecostruttura finemente disomogenea e moderatamente ipoecogena rispetto alla porzione cefalica ed ha spessore massimo inferiore ai 5 mm.

DOTTI DEFERENTI

Il dotto deferente, curvilineo nel primo tratto e rettilineo nel tratto che si dirige verso il canale inguinale, appare come un condotto a parete muscolare spessa, con lume anecogeno e con diametro compreso tra 1 e 2 mm. Esso risulta esplorabile quasi per intero, ad eccezione del tratto pelvico. Può non essere visualizzabile per agenesia parziale o completa.

INVOLUCRI ESTERNI

Parete scrotale. Lo studio della parete scrotale riproduce un'immagine stratificata, senza però la possibilità di differenziare le diverse tuniche, ad eccezione delle due lamine, interna ed esterna, della vaginale propria, soprattutto nei casi di idrocele. Anche in condizioni di normalità, è presente una piccola quantità di liquido nel sacco vaginale, che si localizza nel recesso funicolare.

ECOGRAFIA SCROTALE ED INFERTILITÀ

L'esame ecografico riveste un ruolo fondamentale nell'identificare quadri patologici causa di infertilità (lesioni testicolari ed epididimali, varicocele, idrocele, etc.). Vengono di seguito elencate le condizioni patologiche più frequentemente associate all'infertilità e le loro peculiarità ecografiche (20-23).

FLOGOSI E INFEZIONI (24-26)

ORCHITE ACUTA: L'orchite isolata è un evento infrequente, osservabile in corso di un'infezione virale, batterica o nella sindrome da immunodeficienza acquisita. Infatti, l'orchite si presenta generalmente in associazione con un'epididimite. Ecograficamente il testicolo appare aumentato di dimensioni (>25 ml) ad ecostruttura disomogenea e tendenzialmente ipoecogena. È però possibile riscontrare un testicolo con ecostruttura

omogenea e diffusa iperemia alla valutazione ColorDoppler. Il picco di flusso sistolico può aumentare di 2 o più volte e l'indice di resistenza lungo l'arteria testicolare è ridotto.

EPIDIDIMITE ACUTA: l'epididimite è una delle più frequenti cause di dolore scrotale e costituisce il 75% delle lesioni flogistiche dello scroto. Frequentemente è causata da una diffusione ematica di vari batteri (es. E. Coli, Chlamydia Trachomatis, Mycoplasmi, *etc.*) o retrograda (dai dotti deferenti). Alle scansioni ecografiche, l'epididimo appare aumentato di dimensioni, in particolare nella sua parte cefalica (diametro massimo > 12 mm), ad ecostruttura diffusamente ipoecogena o con aree ipo-anecogene multifocali. La vascolarizzazione appare diffusamente aumentata e la sua presenza ha una notevole sensibilità nell'identificare una epididimite. La parete scrotale appare spesso ispessita (>5 mm), per la presenza di edema reattivo.

EPIDIDIMITE CRONICA: l'epididimite cronica, conseguenza di microtraumi frequenti oppure di epididimiti ricorrenti o di trattamenti inadeguati, costituisce uno dei più frequenti riscontri ecografici nei soggetti ipofertili. Ecograficamente, l'epididimo può apparire lievemente ingrandito, soprattutto nella parte cefalica, ad ecostruttura disomogenea, tendenzialmente ipoecogena con lieve iperemia intraparenchimale. E' rilevabile in questi casi un'alterazione di vario grado dei parametri nemaspermici; è soprattutto ridotta la percentuale di motilità nemaspermica, dal momento che l'epididimo rappresenta la sede in cui gli spermatozoi completano la propria maturazione ed acquisiscono le proprietà cinetiche. Si può inoltre associare il riscontro di benderelle fibrotiche iperecogene, di calcificazioni o di cisti ipo-anecogene di varie dimensioni e numero, che possono essere causa frequente di ostruzioni complete o parziali delle vie seminali.

In rari casi è inoltre possibile una localizzazione epididimaria dell'infezione tubercolare. In tali casi, gli epididimi appaiono aumentati di volume e ipo-ecogeni; talvolta è possibile un coinvolgimento dei testicoli, che risultano anch'essi aumentati di volume, non lesioni ipoecogene nel loro contesto e calcificazioni extra-testicolari (26).

CISTI EPIDIDIMARIE: cisti e spermatocei sono di frequente riscontro a livello della testa tanto da essere rinvenuti in circa il 70% dei soggetti che si sottopongono ad una ecografia scrotale. Possono essere espressione di un'ostruzione, il più delle volte parziale, delle vie seminali e sono di origine congenita o acquisita (infezioni o traumi). Possono inoltre essere singole o multiple, piccole o estremamente grandi tanto da essere difficilmente distinte dall'idrocele. Le cisti presentano, alla palpazione, una consistenza teso-elastica e presentano una parete relativamente iperecogena che le delimita, e che può apparire ispessita in condizioni di flogosi.

DOTTO DEFERENTE: Anche il dotto deferente può presentare un diametro aumentato e disomogeneità ecostrutturale in caso di infezioni, flogosi, cisti o ostruzioni distali a carico dei dotti eiaculatori.

PATOLOGIE VASCOLARI

Varicocele e torsioni del funicolo spermatico (Vedi capitolo apposito).

CRIPTORCHIDISMO (27-30)

Per criptorchidismo si intende la mancata discesa, all'interno del sacco scrotale, di uno o entrambi i testicoli, che si localizzano lungo la normale via della migrazione fetale e quindi tra il polo renale inferiore e l'eminanza esterna del canale inguinale. Riguarda approssimativamente l'1-2% della popolazione maschile ed è monolaterale nell'80-90% dei casi e bilaterale nel restante 10-20%. Il testicolo viene invece definito ectopico se si trova al di fuori di questo fisiologico percorso (perineale, *etc.*). Il testicolo criptorchide deve inoltre essere ben distinto dal testicolo retrattile o mobile.

Il criptorchidismo rappresenta un importante fattore di rischio per l'infertilità e lo sviluppo di neoplasie testicolari, per cui necessita di una diagnosi e di un trattamento precoce. L'esame ecografico scrotale in questi soggetti, inoltre, deve essere eseguito anche nel *follow-up* post-orchidopessi per valutarne il successivo sviluppo.

La localizzazione ecografica del testicolo può risultare difficile in cavità addominale mentre risulta più agevole lungo il canale inguinale o in prossimità dell'orificio inguinale esterno, dove risulta localizzato nel 75-80% dei casi. La difficoltà è accentuata, in fase pre-puberale, dalle dimensioni ridotte dei testicoli.

Anche l'ecostruttura del testicolo criptorchide è ovviamente variabile a seconda dell'età del soggetto. In epoca pre-puberale le alterazioni dell'ecogenicità sono scarsamente rilevabili. Il testicolo criptorchide post-puberale, sia nei casi non trattati, sia nei casi post-orchidopessi, risulta invece frequentemente ipotrofico (volume < di 10 ml) e con ecostruttura disomogenea e nel complesso ipoecogena.

Nei casi in cui un testicolo clinicamente non evidenziabile rimane tale, bisogna ricorrere ad una TAC o direttamente alla laparoscopia esplorativa.

IPOGONADISMI

Forme congenite (31-34)

La sindrome di Klinefelter, caratterizzata da un cariotipo 47 XXY, costituisce la più frequente alterazione cromosomica riscontrata nei maschi infertili. La sua incidenza nella popolazione generale 0,2%. Il quadro ecografico è variabile: infatti in molti casi, oltre una ipoplasia bilaterale (volume gonadico compreso tra 2 e 6 ml), è rilevabile una fine disomogeneità ecostrutturale, dovuta a spot iperecogeni; in altri casi invece, oltre all'ipoplasia, vi è un'ecostruttura disomogenea dovuta alla presenza di aree iperecogene (fibrosi e ialinizzazione tubulare) o ipoecogene (iperplasia delle cellule del Leydig), a cui si possono associare micro-o macrocalcificazioni. Anche nella Sindrome di Kallmann il volume testicolare è ridotto (<6 ml), e l'ecostruttura è caratterizzata da ipoecogenicità.

Forme acquisite (34)

Le forme acquisite sono invece dovute a esiti di traumi, infezioni, radioterapia, chemioterapia, torsioni funicolari o di interventi chirurgici. In questi casi i testicoli. In queste forme, i testicoli presentano riduzione di volume, disomogeneità ecostrutturale e riduzione della vascolarizzazione.

In tutti i soggetti con azoospermia non ostruttiva, gli epididimi non presentano particolari alterazioni. Inoltre, il recupero di spermatozoi dal parenchima testicolare è frequentemente di estrema difficoltà. Lo studio della vascolarizzazione parenchimale del testicolo mediante ColorDoppler può migliorare la percentuale di recupero in quanto, indicando la presenza di vasi, specialmente nelle regioni periferiche può favorire l'identificazione di aree del parenchima testicolare dove vi possono essere residue aree di spermatogenesi.

ALTRE PATOLOGIE ENDOCRINE (35-36)

In pazienti affetti da Sindromi Adreno Genitali (SAG) sono frequentemente riscontrabili aree di tessuto surrenalico ectopico intratesticolari, definite *Testicular Adrenal Rest Tumors* (T-ART). Si tratta di lesioni benigne e reversibili, più frequentemente bilaterali, ipoecogene e scarsamente vascolarizzate. L'origine di questa anomalia è legata al fatto che aree di tessuto surrenalico possono migrare erroneamente assieme al tessuto gonadico, con il quale condividono la stessa origine embriologica, discendendo in sede scrotale; i ridotti livelli di cortisolo, presenti nelle SAG, causano un ridotto feedback negativo a livello ipofisario con

conseguente aumento dei livelli di ACTH, che causa iperstimolazione delle cellule surrenaliche ectopiche intratesticolari. Si accompagnano ad alterazioni dei parametri seminali.

OSTRUZIONI VIE SEMINALI (34,37)

Nei soggetti con azoospermia ostruttiva i testicoli si presentano in genere nella norma per dimensioni, ecostruttura e vascolarizzazione intraparenchimale.

Il quadro ecografico post-testicolare è variabile in base alla tipologia dell'agenesia/ostruzione.

L'agenesia epididimaria è in genere limitata al corpo o alla coda; quindi è esplorabile soltanto la testa, che appare solitamente ipertrofica ed ipoecogena, per la stasi del secreto epididimario nei canalicoli efferenti; può coesistere, in questi casi, una dilatazione della *rete testis*.

In caso di agenesia del deferente, non è visualizzabile l'ansa epididimo-deferenziale, per cui tutto l'epididimo appare dilatato e iporeflettente.

IDROCELE (38-39)

L'idrocele è caratterizzato da un patologico accumulo di fluido tra i foglietti della tonaca vaginale e può essere monolaterale o bilaterale. Viene inoltre distinto in comunicante e non comunicante. L'idrocele comunicante è dovuto alla pervietà del processo vaginale, per cui, dalla cavità addominale, i fluidi possono raggiungere lo scroto in conseguenza di un'aumentata pressione addominale o semplicemente passando dal clino all'ortostatismo. L'idrocele non comunicante, invece, non si modifica con la palpazione o con il variare del decubito e possono essere di natura idiopatica o conseguenza di traumi, processi flogistici, neoplastici o di interventi chirurgici. All'esame ecografico il liquido sieroso può apparire anecogeno, presentare al suo interno materiale corpuscolato fluttuante (cristalli di colesterolo, cellule di sfaldamento, fibrina, calcificazioni libere) espressione di processo flogistico in atto o presentare aspetto più torbido in caso di raccolta ematica (ematocele) o di pus (piocele). Se cronicizzato, l'idrocele appare con pareti marcatamente ispessite e con sepimenti fibrotici al loro interno. L'aspetto ecografico del linfocele, conseguenza di processi neoplastici o di interventi chirurgici, è totalmente sovrapponibile all'idrocele. L'idrocele non è causa di infertilità; se però è di grado assai elevato, l'aumento di pressione determina un incremento delle resistenze al flusso intra-testicolare, con conseguente sofferenza della spermatogenesi.

LESIONI NEOPLASTICHE (vedi apposito capitolo)

QUADRI ECOGRAFICI DI RISCONTRO OCCASIONALE

Vi sono alcuni quadri ecografici che spesso sono di riscontro occasionale durante l'esecuzione di un'ecografia scrotale. Non vi sono in genere alterazioni specifiche dei parametri seminali.

DILATAZIONE DELLA RETE TESTIS (40-41): l'ectasia dei tubuli seminiferi o la presenza di cisti della *rete testis* rappresentano la conseguenza di un'ostruzione delle vie seminali insorta dopo processi infiammatori e traumatici o di alterazioni genetiche (fibrosi cistica). Malgrado l'ectasia della *rete testis* abbia un aspetto ecografico caratteristico, in alcuni casi può essere difficoltoso distinguere da lesioni neoplastiche o infiammatorie o dalla presenza di un'ectasia delle vene intratesticolari (varicocele intratesticolare). È assai utile la valutazione Color-Doppler per la diagnosi differenziale tra le varie forme.

CISTI TESTICOLARI (39,42-43): ecograficamente appaiono come aree rotondeggianti, anecogene e non vascolarizzate, frequentemente con rinforzo iperecogeno posteriore. Sono generalmente conseguenza di un'ostruzione dei dotti spermatici e possono essere di origine congenita o acquisita (infezioni o traumi). Tali

cisti possono inoltre formarsi a livello della tonaca albuginea ed in tal caso sono clinicamente evidenziabili come una tumefazione di consistenza duro-elastica sul margine testicolare.

Si tratta quindi di lesioni ben distinguibili da quelle neoplastiche, che presentano ecostruttura disomogenea (iso-ipocogena) e incremento della vascolarizzazione.

CALCIFICAZIONI INTRA-TESTICOLARI E MICROLITIASI (44-47): anche le aree iperecogene intratesticolari sono dei reperti accidentali relativamente frequenti e possono coinvolgere uno o entrambi i testicolari. In particolare può essere definita condizione di Microlitiasi Testicolare (MT) (o aspetto ecografico a “cielo stellato”) la presenza, all’interno del parenchima testicolare, di almeno 5 spot iperecogeni, con diametro compreso tra 1 e 3 mm, mentre si parla di calcificazioni testicolari (CT) quando si ha presenza di non più di un’area iperecogena per campo ecografico con diametro ≥ 4 mm. La prevalenza di MT è variabile tra 1.5 e 5.6%. Segnalazioni contrastanti sono infine presenti in letteratura sulla possibile correlazione tra la MT e lesioni precancerose, sindrome di Klinefelter e criptorchidismo. Nei soggetti affetti da micro litiasi è pertanto consigliabile eseguire un *follow up* ecografico annuale da ridurre a 6 mesi nel caso di concomitanti patologie associate allo sviluppo di neoplasie testicolari (criptorchidismo, sindrome di Klinefelter, altre alterazioni genetiche).

Bibliografia

1. Morelli G, Cecchi M, Giannotti P, Fiorentini L. Ecografia scrotale. Monduzzi Ed. 1990.
2. Hricak H, Hamm B, Kim B. Imaging of the scrotum: textbook and atlas. Raven Press, New York 1995
3. Sarteschi LM, Menchini-Fabris GF. Ecografia andrologica. Athena Ed. 2013.
4. Isidori AM, Lenzi A. Scrotal Ultrasound: morphological and functional atlas. Forum Service Ed. 2008.
5. Jungwirth A T, Dohle GR, Giwercman A, Kopa Z, Krausz C, Tournaye H. Guidelines on male infertility, European Association of Urology Guidelines. EAU Guidelines, 2015.
6. Dogra VS, Gottlieb RH, Oka M, Rubens DJ. Sonography of the scrotum. Radiology. 2003;227:18-36.
7. Akin EA, Khati NJ, Hill MC. Ultrasound of the scrotum. Ultrasound Q 2004; 20: 181-200.
8. Friedrich M, Claussen CD, Felix R. Immersion ultrasonography of scrotal and testicular pathology. Eur J Radiol.1981;1:60-6.
9. Elwagdy S, Razmy S, Ghoneim S, Elhakim S. Diagnostic performance of three-dimensional ultrasound extended imaging at scrotal mass lesions. Int J Urol. 2007;14:1025-33.
10. Isidori AM, Pozza C, Gianfrilli D, Giannetta E, Lemma A, Pofi R, Barbagallo F, Manganaro L, Martino G, Lombardo F, Cantisani V, Franco G, Lenzi A. Differential Diagnosis of nonpalpable Testicular lesions: Qualitative and Quantitative Contrast-enhanced US of Benign and Malignant Testicular Tumors. Radiology 2014;2:606-618.
11. Grasso M, Blanco S, Raber M, Nespoli L. Elasto-sonography of the testis: preliminary experience. Arch Ital Urol Androl. 2010;82:160-3.
12. Pozza C, Gianfrilli D, Fattorini G, Giannetta E, Barbagallo F, Nicolai E, Cristini C, Di Pierro GB, Franco G, Lenzi A, Sidhu PS, Cantisani V, Isidori AM. Diagnostic value of qualitative and strain ratio elastography in the differential diagnosis of non-palpable testicular lesions. Andrology. 2016;4: 1193–1203.
13. Wasnik AP, Maturen KE, Shah S, Pandya A, Rubin JM, Platt JF. Scrotal pearls and pitfalls: ultrasound findings of benign scrotal lesions. Ultrasound Q. 2012;28:281-91.
14. Foresta C, Garolla A, Frigo AC, Carraro U, Isidori AM, Lenzi A, Ferlin A. Anthropometric, penile and testis measures in post-pubertal Italian males. J Endocrinol Invest. 2013; 36: 287-92.

15. Sakamoto H, Ogawa Y, Yoshida H. Relationship between testicular volume and testicular function: comparison of the Prader orchidometric and ultrasonographic measurement in patients with infertility. *Asian J Androl* 2008; 10: 319-24.
16. Middleton WD, Bell MW. Analysis of intratesticular arterial anatomy with emphasis on transmediastinal arteries. *Radiology* 1993; 189: 157-160.
17. Handelsman DJ, Staraj S. Testicular size: the effects of aging, malnutrition, and illness. *J Androl*. 1985;6:144-51.
18. Lee JC, Bhatt S, Dogra VS. Imaging of the epididymis. *Ultrasound Q* 2008; 24: 3-16.
19. Kantarki F, Ozer H, Adaletli I, Mihmanli I. Cystic appendix epididymis: a sonomorphologic study. *Surg Radiol Anat* 2005; 27: 557-561.
20. Mihmanli I, Kantarci F. Sonography of scrotal abnormalities in adults: an update. *Diagn Interv Radiol* 2009; 15: 64-73.
21. Schuric M, Aigner F, Frauscher F, Pallwein L. The role of ultrasound in assessment of male fertility. *Eur J Ob Gyn Reprod* 2009; 144S: S192-S198.
22. Lotti F, Maggi M. Ultrasound of the male genital tract in relation to male reproductive health. *Hum Reprod Update*. 2015;21:56-83.
23. Gordon SJ, Otite U, Maheshkumar P, Cannon P, Nargund VH. The use of scrotal ultrasonography in male infertility. *BJU International* 2001; 87: 417.
24. Redshaw JD, Tran TL, Wallis MC, deVries CR. Epididymitis: a 21-year retrospective review of presentations to an outpatient urology clinic. *J Urol*. 2014;192:1203-7.
25. La Vignera S, Calogero AE, Condorelli RA, Vicari LO, Catanuso M, D'Agata R, Vicari E. Ultrasonographic evaluation of patients with male accessory gland infection. *Andrologia*. 2012;44 Suppl 1:26-31.
26. Das A, Batabyal S, Bhattacharjee S, Sengupta A. A rare case of isolated testicular tuberculosis and review of literature. *J Family Med Prim Care*. 2016 ;5:468-470.
27. Ward JF, Cilento BG, Kaplan GW, Velling TE, Puckett M, Stock J. The ultrasonic description of postpubertal testicle in men who have undergone prepubertal orchiopexy for cryptorchidism. *J Urol* 2000; 163: 1448-1450.
28. Taran I, Elder JS. Results of orchiopexy for the undescendent testis. *WJUrol* 2006; 24: 231-239.
29. Taskinene S, Lehtinen A, Hovatta O, Wikstrom S. Ultrasonography and colour Doppler flow in the testes of adult patients after treatment of cryptorchidism. *Br J Urol* 1996; 78: 248-51.
30. Holland AJ, Nassar N, Schneuer FJ. Undescended testes: an update. *Curr Opin Pediatr*. 2016 ;28:388-94
31. Westlander G, Ekerhovd E, Granberg S, Hanson L, Hanson C, Brgh C. Testicular ultrasonography and extended chromosome analysis in men with nonmosaic Klinefelter syndrome: a prospective study of possible predictive factors for successful sperm recovery. *Fert Ster* 2001; 75: 1102-1105.
32. Radicioni AF, Ferlin A, Balercia G, Pasquali D, Vignozzi L, Maggi M, Foresta C, Lenzi A. Consensus statement on diagnosis and clinical management of Klinefelter syndrome. *J Endocrinol Invest*. 2010;33:839-50.
33. Ekerhovd E, Westlander G. Testicular sonography in men with Klinefelter syndrome shows irregular echogenicity and blood flow of high resistance. *J Ass Reprod Gen* 2001; 11: 517-522.
34. Foresta C, Garolla A, Bettella A, Ferlin A, Rossato M, Candiani F. Doppler ultrasound of the testis in azoospermic subjects as a parameter of testicular function. *Hum Reprod* 1998; 13: 3090-3093.
35. Stikkelbroeck NM, Otten BJ, Pasic A, Jager GJ, Sweep CG, Noordam K, Hermus AR. High prevalence of testicular adrenal rest tumors, impaired spermatogenesis, and Leydig cell failure in adolescent and adult males with congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:5721-8.
36. Delfino M, Elia J, Imbrogno N, Argese N, Mazzilli R, Toscano V, Mazzilli F. Testicular adrenal rest tumors in patients with congenital adrenal hyperplasia: prevalence and sonographic, hormonal, and seminal characteristics. *J Ultrasound Med*. 2012;31:383-8.

37. Foresta C, Ferlin A, Bettella A. Diagnostic and clinical features in azoospermia. *Clin End* 1995; 43: 537-543.
38. Mihmanli I, Kantarci F, Kulaksizoglu H, Gurses B, Ogut G, Unluer E, Uysal O, Altug A. Testicular size and vascular resistance before and after hydrocelectomy. *Am J Roent* 2004; 183: 1379-1385.
39. Patil V, Shetty SM, Das S. Common and Uncommon Presentation of Fluid within the Scrotal Spaces. *Ultrasound Int Open*. 2015;1:E34-40.
40. Jequier AM, Phillips N. Cystic dilation of the rete testis: a hidden diagnosis among infertile men. *Reprod Biomed Online* 2009; 18: 190-194.
41. Mahlknecht A, Mahlknecht P, Fallaha M, Wieser A. Tubular ectasia of the rete testis (TERT). Differential diagnosis of cystic testicular disorders. *Arch Ital Urol Androl*. 2015;87:5-7.
42. Delfino M, Elia J, Imbrogno N, Argese N, Mazzilli F. Intratesticular isolated anechoic areas: prevalence, seminal profile, and longitudinal study. *J Ultrasound Med*. 2010;29:1589-93.
43. Chou SJ, Liu HY, Fu YT, Shyu JS, Sun GH. Cyst of the tunica albuginea. *Arch Androl* 2004; 50: 89-92.
44. Peterson AC, Bauman JM, Light DE, McMann LP, Costabile RA. The prevalence of testicular microlithiasis in an asymptomatic population of men 18 to 35 years old. *J Urol* 2001; 166: 2061-2064.
45. Mazzilli F, Delfino M, Imbrogno N, Elia J, Spinosa V, Di Nardo R. Seminal profile of subjects with testicular microlithiasis and testicular calcifications. *Fertil Steril*. 2005;84:243-5.
46. Pedersen MR, Osther PJ, Soerensen FB, Rafaelsen SR. Testicular Microlithiasis: Patient Compliance in a Two-Year Follow-Up Program. *Ultrasound Int Open*. 2016 ;2:E113-E116.
47. Richenberg J, Belfield J, Ramchandani P, Rocher L, Freeman S, Tsili AC, Cuthbert F, Studniarek M, Bertolotto M, Turgut AT, Dogra V, Derchi LE. Testicular microlithiasis imaging and follow-up: guidelines of the ESUR scrotal imaging subcommittee. *Eur Radiol*. 2015;25:323-30.

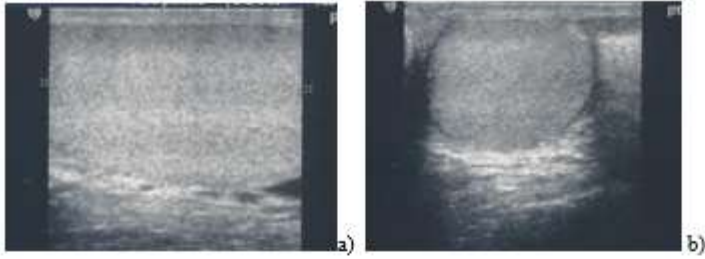


Figura 1: Testicolo in sede con normale volumetria e con ~~ecostruttura~~ ~~ecotextura~~ omogenea nelle varie scansioni, longitudinale (a) e trasversa (b).

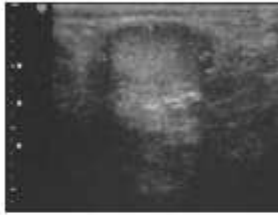


Figura 2: Testicolo prepubere.

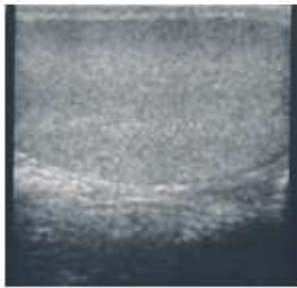


Figura 3: Testicolo con ~~normoechogenicità~~ ~~normoeogenicità~~.

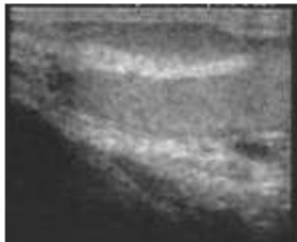


Figura 4: Accentuazione ilo testicolare.



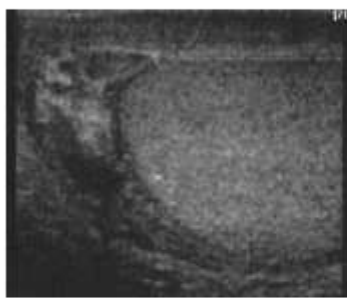
Figura 5: Vascolarizzazione intra-testicolare in condizioni standard.



Figura 6: Ectasie intratesticolari.



Figura 7: Testa epididimaria con normale ecogenicità.



a)



b)

Figura 8: Ipertrofia testa (a) e corpo (a, b) dell'epididimo e spot iperecogeni intratesticolari.



Figura 9: Ipoplasia testicolare con concomitante ipertrofia epididimaria omolaterale



Figura 10: Idatide del Morgagni in idrocele settato

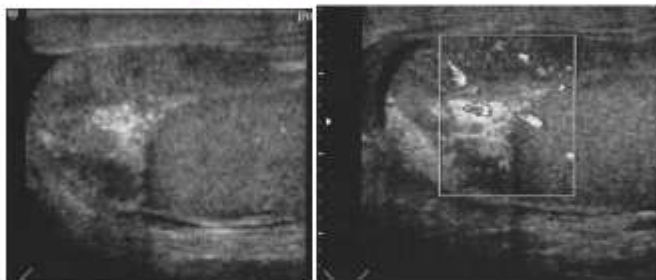


Figura 11: Epididimite acuta con accentuazione della vascolarizzazione epididimaria.



Figura 12: Piccola cisti epididimaria.

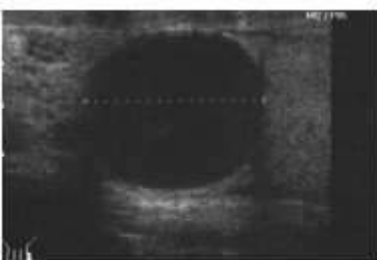


Figura 13: Voluminosa cisti epididimaria

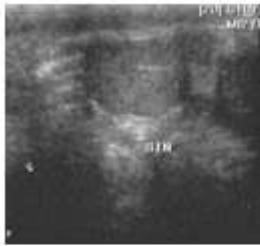


Figura 14: Testicolo ipoplasico in prossimità dell'orificio inguinale esterno.

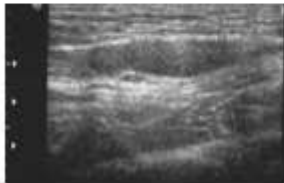


Figura 15: Testicolo ipoplasico post-~~orchidopessi~~.

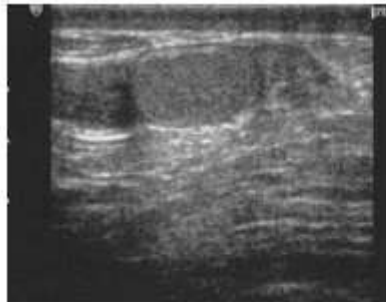


Figura 16: Testicolo ipoplasico in soggetto con ~~Sindrome di Klinefelter~~.



Figura 17: Esiti di orchite con calcificazione peri-ilare

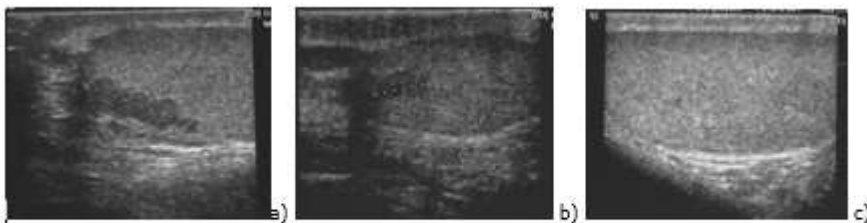


Figura 18: ~~Testicular Adrenal Rest Tumors~~ (T-ART) in paziente affetto da Sindrome Adrenogenitale ~~pre~~ (a) e post (b, c) adeguamento terapia con ~~glucocorticoidi~~.

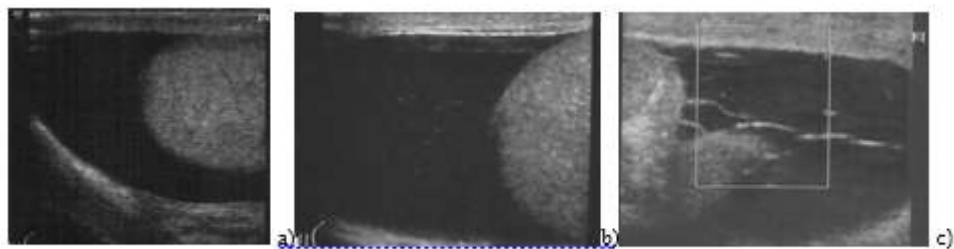


Figura 19: Idrocele anecogeno (a), parzialmente corpuscolato (b) e settato (c)

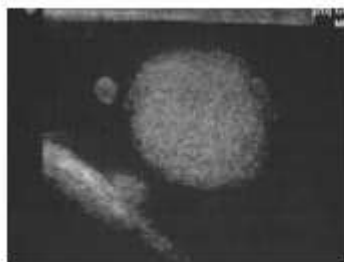


Figura 20: Testicolo in condizione di idrocele con *scrotolite*.

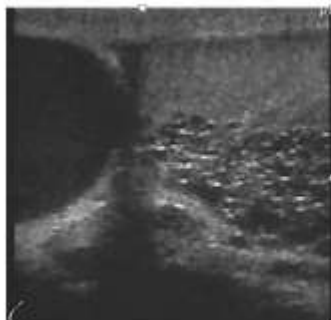


Figura 21: Cisti epididimaria con ectasia della *rete testis*.

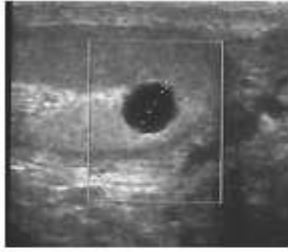


Figura 22: Cisti e dilatazione rete testis.

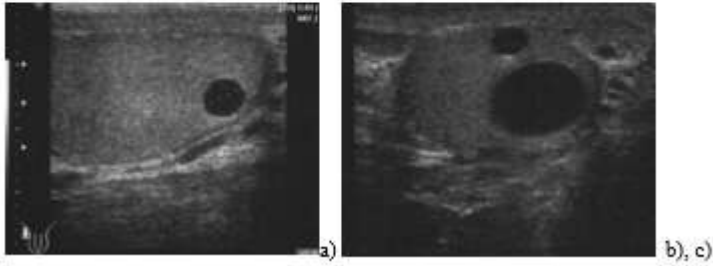


Figura 23: Cisti testicolari: singola (a), multiple (b).

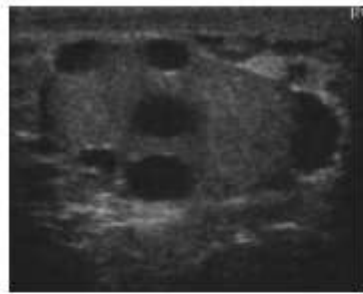


Figura 24: Testicolo "polistico".

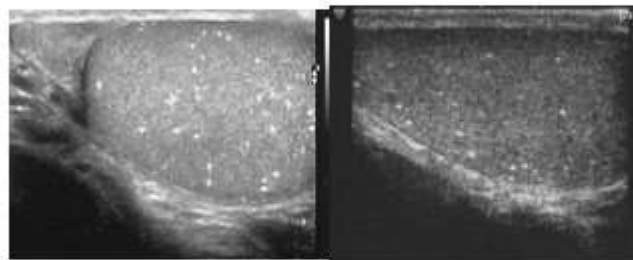


Figura 25: Microlitiasi testicolare (aspetto a cielo stellato).



Figura 26: Calcificazioni intratesticolari: isolata (a, b) e multiple (c).

2. Indicazione diagnostiche, tecnica di esame e limiti dell'ecografia prostatica vescicolare

1. Tecniche di esame

La regione prostatica-vescicolare può essere studiata sia per via sovrapubica che transrettale (TransRectal UltraSound, TRUS) (1). Sebbene alcuni autori riportino che non vi sia differenza significativa tra le due tecniche nella misura del volume prostatico, altri sostengono che la TRUS sia più accurata nel valutare il volume dell'adenoma nei pazienti con iperplasia prostatica benigna (1). Inoltre, la TRUS ha maggiore accuratezza nello studio dei parametri ecostrutturali e vascolari di prostata e vescichette seminali (1). Pertanto, in questo capitolo ci focalizzeremo sulla TRUS. La TRUS può essere eseguita utilizzando una sonda endocavitaria biplanare, dotata di trasduttori lineare e convex da 6.5-7.5 MHz, e/o una sonda 'end fire' (6.5 MHz, campo di vista 50–200°), più accurata per lo studio delle vescichette seminali, con il paziente posizionato in decubito laterale, studiando gli organi in sezione trasversale, longitudinale e obliqua (1-7).

2. Quadro normale

2.1 Prostata

La prostata è una ghiandola esocrina, che circonda l'uretra, localizzata appena sotto il collo della vescica. Produce liquido prostatico, una secrezione acida che costituisce circa il 30% del volume totale dell'eiaculato (1). Alla TRUS, la prostata normale appare diversa in funzione dell'età, con una forma "triangolare" nei soggetti giovani (Fig. 1A) e "a pera/arancia" nei più anziani (2,8). La sua base si trova a livello del collo vescicale, all'inizio dell'uretra, che in scansione longitudinale appare come un dotto ipoecogeno che curva verso l'apice prostatico (1) (Fig. 1 B,C). La TRUS individua una zona periferica, che si estende lateralmente e posteriormente dal vertice alla base, ed una zona transizionale, situata in posizione centrale e leggermente ipoecogena (Fig. 1A). Le zone periferica e transizionale presentano un rapporto 3:1 nei maschi giovani (1). Il volume della prostata (VP) è valutato mediante metodo planimetrico (3-5) misurando tre diametri (d_1 =antero-posteriore, d_2 =trasversale e d_3 =longitudinale; Fig. 1A,B) e utilizzando la formula matematica dell'ellissoide ($d_1 \times d_2 \times d_3 \times 0.52$) (1,9). Il "volume della zona transizionale" è calcolato in modo simile (9). Un VP di 20-25 ml è stata proposto come normale nei giovani (1,8). La prostata normale presenta echi sottili, densamente ed omogeneamente distribuiti (1). Il plesso venoso periprostatico è rilevabile come un sistema di vasi lievemente ipoecogeno (1) (Fig. 1A,B). Le arterie intraprostatiche sono raggruppate nelle arterie centrali / periuretrali e periferiche / capsulari, irrorando le zone transizionale e periferica, rispettivamente (1,2,8).

2.2 Vescichette seminali (VS), ampolle deferenziali e dotti eiaculatori (DE)

Le vescichette seminali (VS) sono due strutture saccolari, localizzate superiormente e posteriormente alla prostata, tra la vescica e il retto (1, 10-12). Le VS producono un liquido alcalino che contribuisce al 50-80% del volume seminale (10,12).

Alla TRUS, le VS hanno un tipico aspetto "a farfalla" in scansione trasversale (Fig. 1D), e una forma "claviforme" in scansione longitudinale (Fig. 1E). L'ecostruttura delle VS è caratterizzata da echi sottili

omogeneamente distribuiti e la loro ecogenicità è leggermente inferiore rispetto a quella della prostata (10,11). Nei giovani, il volume delle VS è associato inversamente all'età e tende a diminuire dopo la quinta decade, mostrando una riduzione significativa nell'ottava rispetto alla quarta decade (1,6). Il volume delle VS aumenta con l'astinenza sessuale (6), ed è ridotto nei fumatori in funzione dell'abitudine tabagica (13). Il volume delle VS è positivamente influenzata da testosterone (14), prolattina (15) e triiodotironina libera (fT3) (16). Mentre la maggior parte degli studi del passato riporta i "diametri" delle VS, il nostro gruppo di ricerca ha recentemente proposto di calcolare il "volume" delle VS misurandone il massimo diametro longitudinale e antero-posteriore e utilizzando la formula matematica dell'"ellissoide / sferoide prolato" (6) (Fig1E). Il volume delle VS varia con l'eiaculazione ed è correlato positivamente con il volume seminale, ma non con i parametri spermatici (6). Lo svuotamento delle VS con l'eiaculazione è positivamente correlata con i livelli di fT3 (16), e soggetti con ipertiroidismo subclinico mostrano una maggiore riduzione dei diametri longitudinali delle VS dopo l'eiaculazione rispetto ai soggetti eu- e ipo-tiroidei (16).

Le ampole deferenziali appaiono alla TRUS come strutture ovali localizzate medialmente rispetto alle VS nelle scansioni trasversali, o dilatazioni dei deferenti distali nelle scansioni longitudinali, con ecostruttura simile a quella delle VS (1) (Fig. 1C-E).

I dotti eiaculatori appaiono alla TRUS come sottili dotti ipoecogeni, con un calibro normale < 2 mm. Sono rilevabili nelle scansioni longitudinali e attraversano la prostata fino all'uretra (8,11) (Fig. 1C).

3.Quadri patologici: indicazioni diagnostiche e limiti dell'ecografia prostatica-vescicolare

3.1 Prostata

3.1.1 Alterazioni del volume: iperplasia prostatica benigna e ipogonadismo.

La valutazione del volume prostatico (VP) con la TRUS è utile nei pazienti con sintomi del basso tratto urinario, mentre ha un ruolo modesto nella valutazione dell'infertilità maschile.

Un *incremento del VP* è indicativo di *iperplasia prostatica benigna (IPB)*. Un $VP > 30$ ml è suggestivo di iniziale incremento della prostata, mentre un $VP > 60$ ml indica un incremento severo (1). L'incremento del VP può associarsi a quadri vari, da un incremento della zona transizionale allo sviluppo di un adenoma. Le tipiche caratteristiche ecografiche di IPB sono: ecostruttura disomogenea, presenza di cisti, pseudonoduli e/o calcificazioni, specialmente in sede di "capsula chirurgica" (6) (Fig. 1F) Recentemente l'IPB è stata associata a sovrappeso/obesità (5) e sindrome metabolica (9).

Un *VP ridotto* è suggestivo di *ipogonadismo*, perché la prostata è una ghiandola androgeno-dipendente (1). La TRUS permette in di valutare l'incremento del VP nei soggetti ipogonadici sottoposti a trattamento con testosterone o hCG (1,14).

3.1.2 Flogosi prostatica

Numerose caratteristiche ecografiche sono suggestive di infiammazione della prostata (Tabella) (1). In passato sono stati proposti alcuni criteri di flogosi prostatica, quali asimmetria lobare, dilatazione del plesso venoso

periprostático, presenza di aree ipoecogene associate a edema o iperecogene associate a calcificazioni (3). La combinazione di alcuni di questi criteri, associata ad alterazioni ecostrutturali di VS e/o epididimi, è suggestiva di “infezione/flogosi delle ghiandole accessorie maschili” (“male accessory gland infection/inflammation”, MAGI), definizione che individua una sindrome infiammatoria a carico degli organi del tratto genitale maschile (17). Sono state riconosciute due principali forme ecografiche di MAGI: quella “ipertrofico-congestizia” e quella “fibro-sclerotica” (18). Tuttavia, ad oggi, riferendosi alla prostata, chiari cut-off che distinguano le caratteristiche normali dalle patologiche per i parametri “asimmetria” e “plesso venoso periprostático”, o una standardizzazione relativa ai parametri “ipo-” e “iper-ecogenicità” non sono ancora stati definiti. Recentemente sono stati proposti parametri eco-color-Doppler (ECD) dinamici associati a sintomi simil-prostatitici, quali l’iperemia (semi-quantitativo) (Fig. 1 G) e la velocità di picco sistolico delle arterie transizionali (quantitativo) (7,19). In particolare, una velocità > 11 cm/s nei soggetti giovani (19) e > 15 cm/s nei soggetti con IPB sono considerate indicative di flogosi florida e associate a dolore pelvico cronico (1). Tuttavia, ad oggi, le linee guida dell’European Association of Urology (EAU) considerano la TRUS una tecnica con valore limitato nel valutare il dolore pelvico cronico (20). Analogamente, la valutazione delle anomalie ECD prostatiche mediante TRUS ha scarso impatto sulla gestione del maschio infertile (1). Infatti, l’impatto della prostatite sui parametri seminali è oggi dibattuta (1,19), e la relazione tra flogosi prostatica, alterazioni ECD correlate e qualità seminale è controversa.

3.1.3 Tumore della prostata

Il sospetto clinico di tumore della prostata si basa sull’esplorazione rettale e/o sui livelli di PSA. Alla TRUS il tumore prostatico può apparire come una lesione ipoecogena nella regione mantellare della ghiandola, tuttavia il tumore può presentarsi anche iso- o iper-ecogeno rispetto al tessuto circostante, e spesso non risulta anatomicamente ben definito (1). La diagnosi definitiva è solo istologica (21). Secondo le linee guida dell’EAU, la TRUS non è un’indagine affidabile per rilevare la presenza del tumore prostatico (22). Analogamente, non vi è evidenza per il suo impiego nella routine clinica, né che le biopsie eco-guidate su sospette lesioni prostatiche siano più accurate delle biopsie sistematiche (21).

3.1.4 Ostruzione/anomalie dei dotti eiaculatori (DE)

L’ostruzione dei dotti eiaculatori (ODE) ha una prevalenza di 1-5% nei maschi infertili, e può essere congenita o acquisita (23). Cause congenite includono l’atresia/stenosi dei DE, cisti prostatiche mediane e cisti congenite dei DE. Cause acquisite possono essere secondarie a infezione/infiammazione, calcificazioni o iatrogene (24). Il rilievo di ODE bilaterale mediante TRUS è utile nella diagnostica e gestione chirurgica dell’azospermia ostruttiva. I soggetti con cause di ODE congenite o non infettive, o con ODE parziale, hanno un miglioramento dei parametri seminali dopo trattamento maggiore di quelli con ODE secondarie a infezioni o complete (24). I reperti suggestivi per ODE alla TRUS includono le cisti prostatiche mediane e le anomalie dei DE (dilatazione, calcificazioni o cisti; vedi Fig. 2 e Tabella). Dilatazioni delle VS (vedi 3.2.1) e delle ampolle deferenziali (diametro > 6 mm) sono state suggerite come reperti ODE-correlati (1,25). Il nostro gruppo di

ricerca ha recentemente proposto un nuovo parametro associato alla capacità di svuotamento delle VS con l'eiaculazione, la "frazione d'eiezione delle VS", riportando un cut-off (21.6%) suggestivo per ODE completo o parziale (6). Tuttavia, sono necessari ulteriori studi per confermare la rilevanza clinica di questo parametro.

-Le *cisti prostatiche mediane* appaiono alla TRUS come formazioni anecogene rotondeggianti in scansione trasversale e piriformi/a goccia in scansione longitudinale (Fig. 1 H), che possono causare ODE mediante deviazione o compressione dei DE (1,23). L'aspirazione TRUS-guidata di cisti voluminose può ridurre il volume e portare a un miglioramento dei parametri seminali (1). Tuttavia le cisti possono riformarsi, e ulteriori TRUS e aspirazioni possono essere necessarie.

-Le *cisti dei DE* sono congenite o acquisite, associate o meno a mutazione del gene della fibrosi cistica (23). Possono essere mono- o bi-laterali Fig. 1 I), e alcuni gruppi riportano che il loro trattamento chirurgico può migliorare i parametri seminali (1).

-La *dilatazione dei DE* è definita per un diametro dei DE > 2 mm (1,24) (Fig. 1 I) e può essere associata ad una stenosi distale post-infiammatoria.

-Le *calcificazioni dei DE* (Fig. 1 I) possono associarsi a ODE ma non ne rappresentano un indicatore affidabile (1,23). Sono state associate anche a emospermia (1) e sintomi simil-prostatitici (19).

3.1.5 Agenesia dei dotti deferenti

La TRUS, associata a ecografia scrotale, riveste un ruolo chiave nella diagnostica dell'agenesia dei dotti deferenti (1). In particolare, la TRUS evidenzia con elevata accuratezza l'assenza di una o entrambe le ampolle deferenziali. Per la trattazione di questo argomento si rimanda al capitolo sull'ecografia scrotale.

3.2 Vescichette seminali (VS)

3.2.1 Alterazione del volume

La *dilatazione delle VS* è definita in presenza di un diametro antero-posteriore > 14 (3) o 15 mm (24,25), misurato dopo eiaculazione (6), suggestivo di ODE (25) (Fig. 1 J). Recentemente il nostro gruppo di ricerca ha proposto un algoritmo per valutare il volume delle VS (6), e riportato un cut-off suggestivo per dilatazione (volume totale delle VS post-eiaculazione > 7 ml) (1) che tuttavia deve essere confermato da ulteriori studi.

L'*ipoplasia delle VS* è stata definita in presenza di un diametro antero- posteriore < 5 o 7 mm o longitudinale < 25 mm (1). Ad oggi, manca una definizione di ipoplasia basata sul volume. Il termine ipoplasia si riferisce sia a VS congenitamente piccole (12), sia a forme acquisite secondarie a deficit di testosterone (14). In quest'ultimo caso, la TRUS può valutare l'incremento delle dimensioni delle VS nei soggetti in terapia con testosterone o hCG (14).

3.2.2 Flogosi

Anomalie dell'ecostruttura sono state associate a flogosi o stasi (vedi Tabella) (Fig. 1 J)

3.2.3 Reperti associati a ostruzione

La dilatazione delle VS (vedi 3.2.1) (11,26) e/o la presenza di *lacune anecogene* (“aree di endocapsulazione”) sono state associate a ODE (Tabella e Fig. 1 J). Alcuni autori hanno riportato la probabilità percentuale di ODE parziale in funzione della variazione del diametro antero-posteriore delle VS (26). Inoltre, una ridotta “frazione d’iezione delle VS” (<21.6%) è suggestiva di alterato svuotamento delle VS e ODE parziale, e si associa ad una maggior frequenza di anomalie dei DE o megacisti delle VS (6). Una contrazione ridotta o assente delle VS durante l’ejaculazione è stata definita “*atonia funzionale delle VS*” (27,28), riportata specialmente in pazienti con diabete tipo 2 con e senza neuropatia (27,28).

3.2.4 Agenesia, ipoplasia e cisti delle VS

Le anomalie congenite delle VS includono difetto di numero (agenesia, fusione), maturazione (ipoplasia) e canalizzazione (cisti) (1,29). La loro osservazione è clinicamente importante perché sono spesso associate ad anomalie di sviluppo di altre strutture di derivazione mesonefrica o metanefrica, quali i dotti deferenti, i reni e gli ureteri (30). Anomalie delle VS si osservano nel 50% dei bambini e nel 90% degli adulti con fibrosi cistica (1).

L’agenesia monolaterale delle VS è spesso associata a agenesia renale omolaterale (79%) o altre anomalie renali (12%) (1,12).

L’agenesia bilaterale delle VS si associa a mutazione del gene della fibrosi cistica nel 64–73% dei casi, con agenesia bilaterale congenita dei deferenti nella metà dei casi e reni normali (1,12).

L’ipoplasia congenita delle VS può essere isolata o associata a altre anomalie genito-urinarie (1,12).

Le *cisti delle VS* sono rare e possono essere congenite o acquisite. Le cisti congenite possono essere isolate o, più spesso, associate a altre anomalie genito-urinarie. Sono spesso secondarie a ODE causata da anomalie nello sviluppo della porzione distale del dotto mesonefrico (30). Sono associate a agenesia renale omolaterale o disgenesia in due terzi dei casi (1). Più raramente si associano a inserzione ectopica ureterale in VS, DE, dotti deferenti o uretra prostatica, o ad agenesia dei dotti deferenti (12). Cisti bilaterale delle VS sono state osservate nel 44–60% dei pazienti con rene policistico (1). Pertanto, rilevare cisti delle VS mediante TRUS è clinicamente rilevante, portando a valutare attentamente il tratto urinario mediante ecografia. Cisti acquisite sono raramente unilaterali e associate a ODE flogosi-correlate (30). La dilatazione cistica delle VS è stata associata a dolore perineale (1).

4. Conclusioni

La TRUS riveste un ruolo chiave nella diagnostica dell’azospermia ostruttiva, portando a decisioni operative in base ai reperti riscontrati, quali aspirazione eco-guidata di voluminose cisti prostatiche, chirurgia in presenza di anomalie dei dotti eiaculatori, biopsia testicolare in presenza di agenesia bilaterale dei deferenti. La TRUS riveste un ruolo importante nell’identificare agenesia o anomalie delle vescichette seminali e/o dei deferenti distali, che si associano spesso ad altre anomalie genito-urinarie, che devono essere indagate.

La TRUS è utile nel valutare la presenza di flogosi prostatico-vescicolare e nella diagnostica del dolore pelvico cronico, anche se le linee guida internazionali non suggeriscono l'impiego routinario della TRUS per lo studio di queste affezioni.

La TRUS ha scarsa importanza nella diagnostica del tumore prostatico.

Bibliografia

1. Lotti F, Maggi M. Ultrasound of the male genital tract in relation to male reproductive health. *Hum Reprod Update*. 2015;21(1):56-83.
2. Older RA, Watson LR. Ultrasound anatomy of the normal male reproductive tract. *J Clin Ultrasound* 1996;24:389-404.
3. Vicari E. Seminal leukocyte concentration and related specific reactive oxygen species production in patients with male accessory gland infections. *Hum Reprod* 1999;14:2025-2030.
4. Lotti F, Corona G, Mancini M, Filimberti E, Degli Innocenti S, Colpi GM, Baldi E, Noci I, Forti G, Adorini L, Maggi M. Ultrasonographic and clinical correlates of seminal plasma interleukin-8 levels in patients attending an andrology clinic for infertility. *Int J Androl* 2011a;34:600-613.
5. Lotti F, Corona G, Colpi GM, Filimberti E, Degli Innocenti S, Mancini M, Baldi E, Noci I, Forti G, Adorini L, Maggi M. Elevated body mass index correlates with higher seminal plasma interleukin 8 levels and ultrasonographic abnormalities of the prostate in men attending an andrology clinic for infertility. *J Endocrinol Invest* 2011b;34:e336-42.
6. Lotti F, Corona G, Colpi GM, Filimberti E, Innocenti SD, Mancini M, Baldi E, Noci I, Forti G, Maggi M. Seminal vesicles ultrasound features in a cohort of infertility patients. *Hum Reprod* 2012a;27:974-982.
7. Lotti F, Corona G, Rastrelli G, Forti G, Jannini EA, Maggi M. Clinical correlates of erectile dysfunction and premature ejaculation in men with couple infertility. *J Sex Med* 2012c;9:2698-2707.
8. Raza SA, Jhaveri KS. Imaging in male infertility. *Radiol Clin North Am* 2012;50:1183-1200.
9. Lotti F, Corona G, Vignozzi V, Rossi M, Maseroli E, Cipriani S, Gacci M, Forti G, Maggi M. Metabolic syndrome and prostate abnormalities in male subjects of infertile couples. *Asian J Andr* 2013c, 16(2):295-304.
10. Ramchandani P, Banner MP, Pollack HM. Imaging of the seminal vesicles. *Semin Roentgenol* 1993;28:83-91.
11. Kim ED, Lipshultz LI. Role of ultrasound in the assessment of male infertility. *J Clin Ultrasound* 1996;24:437-453.
12. Kim B, Kawashima A, Ryu JA, Takahashi N, Hartman RP, King BF Jr. Imaging of the seminal vesicle and vas deferens. *Radiographics* 2009;29:1105-1121.
13. Lotti F, Corona G, Vitale P, Maseroli E, Rossi M, Fino MG, Maggi M. Current smoking is associated with lower seminal vesicles and ejaculate volume, despite higher testosterone levels, in male subjects of infertile couples. *Hum Reprod*. 2015 Mar;30(3):590-602.
14. Sasagawa I, Nakada T, Kazama T, Satomi S, Terada T, Katayama T. Volume change of the prostate and seminal vesicles in male hypogonadism after androgen replacement therapy. *Int Urol Nephrol* 1990;22:279-84.

15. Lotti F, Corona G, Maseroli E, Rossi M, Silverii A, Degl'Innocenti S, Rastrelli G, Forti G, Maggi M. Clinical implications of measuring prolactin levels in males of infertile couples. *Andrology* 2013a;1:764-771.
16. Lotti F, Maseroli E, Fralassi N, Degl'Innocenti S, Boni L, Baldi E, Maggi M. Is thyroid hormones evaluation of clinical value in the work-up of males of infertile couples? *Hum Reprod*. 2016b Mar;31(3):518-29.
17. Lotti F, Maggi M. Interleukin 8 and the male genital tract. *J Reprod Immunol*. 2013; 100(1):54-65.
18. La Vignera S, Vicari E, Condorelli R, D'Agata R, Calogero AE. Hypertrophic-congestive and fibro-sclerotic ultrasound variants of male accessory gland infection have different sperm output. *J Endocrinol Invest*. 2011 Nov;34(10):e330-5.
19. Lotti F, Corona G, Mondaini N, Maseroli E, Rossi M, Filimberti E, Noci I, Forti G, Maggi M. Seminal, clinical and color-Doppler ultrasound correlations of prostatitis-like symptoms in males of infertile couples. *Andrology* 2013d, 2(1):30-41.
20. Engeler D, Baranowski AP, Borovicka J, Dinis-Oliveira P, Elneil S, Hughes J, Messelink EJ, de C Williams AC. Guidelines Associates: Cottrell A, Goonewardene S. EAU guidelines on chronic pelvic pain, 2016; EAU Guidelines Office, Arnhem, The Netherlands.
21. Mottet N et al., Guidelines on Prostate Cancer, European Association of Urology Guidelines, 2016; <https://uroweb.org/guideline/prostate-cancer/>
22. Smeenge M et al., Role of transrectal ultrasonography (TRUS) in focal therapy of prostate cancer: report from a Consensus Panel. *BJU Int*, 2012. 110: 942.
23. Singh R, Hamada AJ, Bukavina L, Agarwal A. Physical deformities relevant to male infertility. *Nat Rev Urol* 2012;9:156-174.
24. Fisch H, Kang YM, Johnson CW, Goluboff ET. Ejaculatory duct obstruction. *Curr Opin Urol* 2002;12:509-515.
25. Jungwirth A, Diemer T, Dohle GR, Kopa Z, Krausz C, Tournaye H. EAU guidelines on male infertility, 2016; EAU Guidelines Office, Arnhem, The Netherlands.
26. Colpi GM, Negri L, Nappi RE, Chinea B. Is transrectal ultrasonography a reliable diagnostic approach in ejaculatory duct sub-obstruction? *Hum Reprod* 1997;12:2186-2191.
27. La Vignera S, Vicari E, Condorelli R, D'Agata R, Calogero AE. Ultrasound characterization of the seminal vesicles in infertile patients with type 2 diabetes mellitus. *Eur J Radiol* 2011b;80:e64-7.
28. La Vignera S, Condorelli RA, Vicari E, D'Agata R, Calogero AE. Seminal vesicles and diabetic neuropathy: ultrasound evaluation in patients with couple infertility and different levels of glycaemic control. *Asian J Androl* 2011d;13:872-876.
29. Vohra S, Morgentaler A. Congenital anomalies of the vas deferens, epididymis, and seminal vesicles. *Urology* 1997;49:313-321.
30. Patel B, Gujral S, Jefferson K, Evans S, Persad R. Seminal vesicle cysts and associated anomalies. *BJU Int* 2002;90:265-271.

Legende delle figure

Figura 1. **A**, prostata in scansione trasversale; ZP, zona periferica; ZT, zona transizionale; LD, lobo destro; LS, lobo sinistro; dt, diametro trasversale; dap, diametro antero-posteriore; PVP, plesso venoso periprostatico. **B**, prostata in scansione longitudinale; ZP, zona periferica; ZT, zona transizionale; U, uretra, dl, diametro longitudinale; otricolo (*); A, apice prostatico; V, vescica; PVP, plesso venoso periprostatico. **C**, prostata in scansione longitudinale; frecce, dotto eiaculatore; U, uretra; V, vescica; VS, vescichetta seminale; AD, ampolla deferenziale. **D**, vescichette seminali (VS) e ampolle deferenziali (AD), d, destra; s, sinistra, in scansione trasversale. **E**, vescichetta seminale e ampolle deferenziali (AD) in scansione longitudinale; dap, diametro antero-posteriore; dl, diametro longitudinale. **F**, iperplasia prostatica benigna; A, adenoma; CC calcificazioni in capsula chirurgica. **G**, iperemia prostatica. **H**, cisti prostatica mediana (*); freccia, otricolo; V,m vescica; punta di freccia, plesso venoso periprostatico. **I**, vescichetta seminale (VS) in scansione longitudinale; pannello superiore: megacisti (#) della VS e dilatazione del dotto eiaculatore (freccia) con calcificazione distale (punta di freccia); pannello inferiore: cisti del dotto eiaculatore (*); V, vescica; U, uretra, Pr, prostata. **J**, vescichetta seminale in scansione longitudinale, dilatata, con lacune anecogene. (Adattata da referenza #1)

Figura 2. Rappresentazione schematica dei reperti ecografici alla TRUS suggestivi di ostruzione distale. Lato destro, anatomia normale; lato sinistro, reperti patologici. (Adattata da referenza #1)

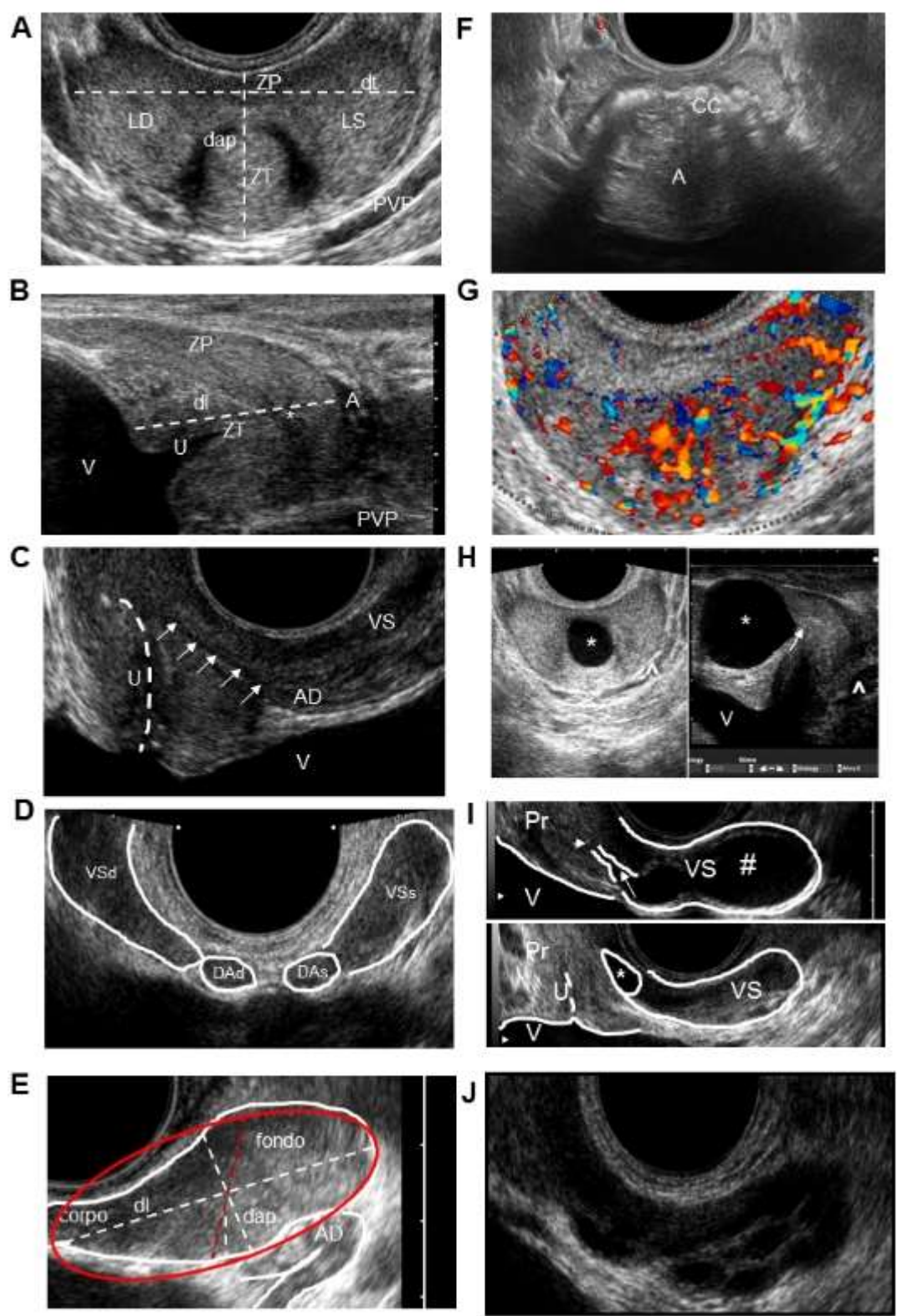


Fig. 1

REPERTI ECOGRAFICI SUGGERITIVI DI OSTRUZIONE DISTALE

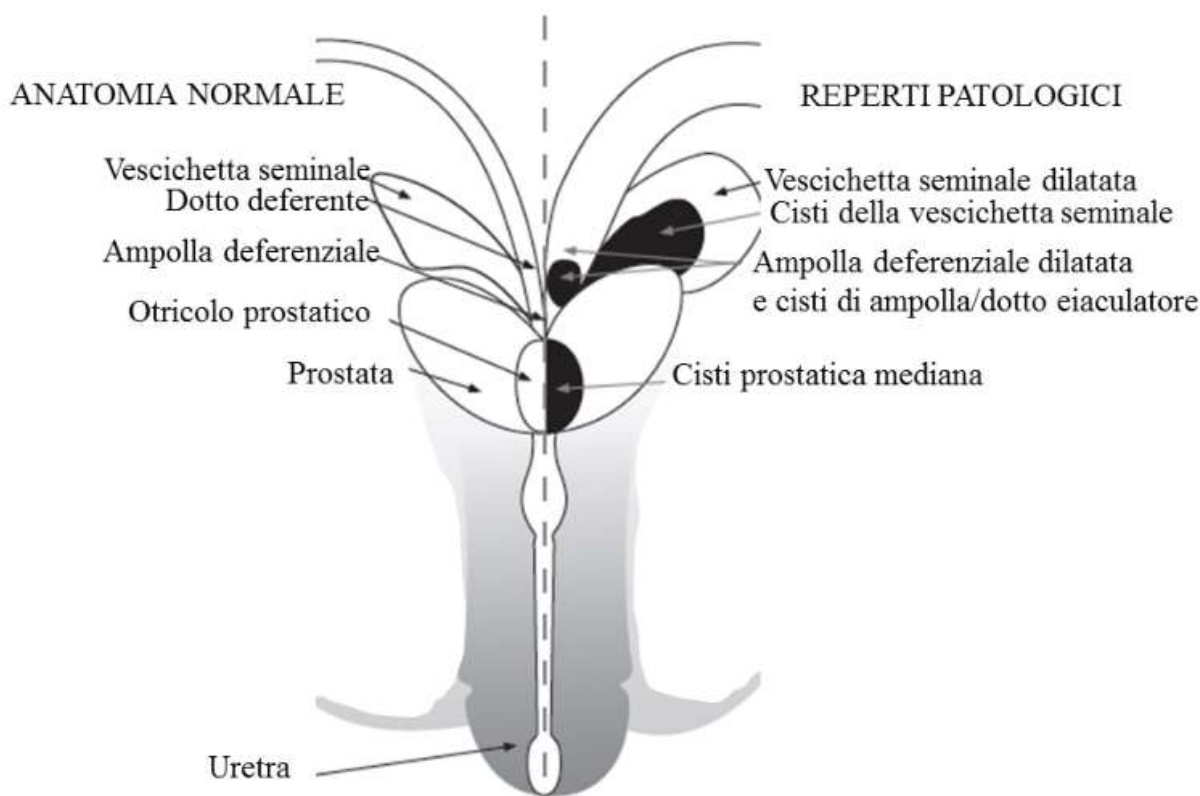


Fig. 2

Alterazioni eco-color-Doppler	Associazioni	Cut-off
Prostata		
<u>Asimmetria ghiandolare</u>	-MAGI (fibro-sclerotica)	Non riportata; proposta: 5 mm
<u>Disomogeneità</u>	-MAGI, prostatite cronica/dolore pelvico cronico -Sintomi <u>simil</u> -prostatitici -Sovrappeso/obesità e sindrome metabolica	Pattern anomalo: grado 1, lieve, 2 moderata, 3 severa
<u>Ipoecogenicità</u>	-Edema, flogosi acuta/subacuta, MAGI ipertrofico-congestizia -Sintomi <u>simil</u> -prostatitici -Elevata interleuchina 8 seminale	Non riportata;
<u>Iperecogenicità</u>	-MAGI, prostatite cronica/dolore pelvico cronico -MAGI fibro-sclerotica	Non riportata;
<u>Calcificazioni</u>	-MAGI, prostatite cronica/dolore pelvico cronico, mantenimento, batteri -Sintomi <u>simil</u> -prostatitici -Sovrappeso/obesità e sindrome metabolica	Macro-calcificazioni: > 3 mm
<u>Iperemia</u>	-Flogosi florida e attività clinica -PI ^{brighter} frammentazione del DNA spermatico	≥15 Doppler spots
Velocità di picco sistolico delle arterie prostatiche	-Flogosi florida e attività clinica -Sintomi <u>simil</u> -prostatitici -PI ^{brighter} frammentazione del DNA spermatico	-Sintomi <u>simil</u> -prostatitici moderati-severi nei giovani: 11cm/s -IPB: > 15 cm/s
Dilatazione del plesso venoso periprostatico	-MAGI e prostatite cronica/dolore pelvico cronico -Varicocele	Non ben definita - area >150 mm ² o diametro >3 o 4 mm
Dotti eiaculatori (DE)		
<u>Dilatazione</u>	-Ostruzione DE parziale o completa	>2 mm
<u>Cisti</u>	-Ostruzione DE parziale o completa	Non riportata
<u>Calcificazioni</u>	-Ostruzione DE parziale o completa -Emospermia	Non riportata
Vescichette seminali (VS)		
<u>Dilatazione</u>	-MAGI -Ostruzione DE parziale	Diametro antero-posteriore > 14-15 mm Volume totale post eiaculazione >7 ml
<u>Ipoplasia</u>	VS congenitamente piccole -MAGI/fibrosi -Deficit di testosterone	Non ben definita -Diametro antero-posteriore < 5 o 7 mm -Diametro longitudinale <25 mm
<u>Asimmetria</u>	-MAGI	Non riportata
<u>Ispessimento di parete e dei setti</u>	-MAGI -Diabete mellito-Alterazioni dello svuotamento	Non riportato Persiste dopo eiaculazione
<u>Rapporto anomalo fondo/corpo</u>	-MAGI: basso o elevato -diabete mellito: elevato	Basso < 1; alto >2.5
<u>Calcificazioni</u>	-MAGI -Emospermia e dolore con l'eiaculazione	Non riportato
<u>Aree di endocapsulazione</u>	-MAGI -Alterazione dello svuotamento	Non riportato Riduzione con eiaculazione

Tabella. Alterazioni eco-color-Doppler di prostata e vescichette seminali, associazioni cliniche, e cut-off pubblicati che distinguono normale e patologico. (Adattata da referenza #1)

3. Caratterizzazione ecografica del paziente con varicocele

Il varicocele è una dilatazione delle vene del plesso pampiniforme, presente in circa il 15% della popolazione maschile e in circa il 40% degli uomini infertili, che nel 78-93% dei casi interessa l'emiscroto sinistro (1-3). Il riscontro di varicocele, raro in ragazzi di età inferiore ai 10 anni, è più frequente all'inizio della pubertà; l'alta prevalenza negli uomini anziani e nei pazienti con infertilità secondaria suggerisce la natura progressiva della patologia (4-5).

Per comprenderne l'esatta fisiopatologia occorre accennare al quadro anatomico normale del drenaggio venoso testicolare.

L'anatomia venosa del contenuto delle borse scrotali è assai complessa e può essere suddivisa in una rete superficiale (o sottocutanea) ed in una rete profonda. La rete superficiale è costituita dalle vene scrotali anteriori, che sboccano nelle pudende esterne, e dalle vene scrotali posteriori, che drenano nelle pudende interne attraverso la vena dorsale profonda del pene. La rete venosa profonda origina in maniera plessiforme (plesso pampiniforme anteriore e posteriore) e prosegue con un marcato decremento numerico dei costituenti.

Il plesso pampiniforme anteriore, costituito da un minimo di tre fino a un massimo di nove vene spermatiche, anastomizzate con le deferenziali e le cremasteriche, è a stretto contatto con l'arteria testicolare, la cui legatura accidentale in corso di intervento può provocare atrofia testicolare o azoospermia.

Le vene spermatiche, oltrepassato l'orifizio inguinale interno, si dirigono posteriormente nel retroperitoneo, fino a sboccare con un angolo retto nella vena renale omolaterale a sinistra e con angolo ottuso nella vena cava inferiore a destra. L'angolo retto di anastomosi con l'arteria renale sembra essere il motivo per cui il varicocele si riscontra prevalentemente a sinistra.

Dal plesso pampiniforme posteriore originano la vena deferenziale, la vena cremasterica e la pudenda esterna. Fra questi gruppi venosi esiste una libera circolazione collaterale, data l'esistenza di numerosi rami anastomotici, tuttavia il contributo al drenaggio venoso della gonade maschile da parte delle vene deferenziali e cremasteriche sembra essere molto limitato, sia in condizioni normali che nel varicocele (6-7).

Il meccanismo con cui il varicocele induce il danno testicolare non è stato ancora del tutto chiarito tuttavia l'ipertensione venosa sembra rivestire un ruolo chiave. Normalmente le valvole presenti lungo la parete delle vene spermatiche interne facilitano l'efflusso venoso unidirezionale (verso l'alto, contro la forza di gravità); quando tali valvole diventano incompetenti, le vene spermatiche interne cessano di svolgere la loro funzione di drenaggio e divengono vasi passivi. Poiché ciascuna vena spermatica interna contiene una colonna verticale di sangue (circa 40 cm a sinistra e 35 cm a destra), nel sistema di drenaggio venoso testicolare si produce un'elevata pressione idrostatica (circa 31 mmHg a sinistra e 27 mmHg a destra), che determina una progressiva alterazione del sistema venoso. Nello stadio iniziale le vene reagiscono senza dilatarsi, aumentando lo spessore delle pareti; l'ipertrofia della media aumenta l'efficienza del meccanismo di pompa venosa e non si sviluppa la stasi. Successivamente, l'ulteriore incremento della tensione venosa porta al cedimento del manicotto

muscolare compensatorio della media e questo induce un iniziale ristagno del sangue. Prolungando ulteriormente l'ipertensione venosa, si verificano la frammentazione e la ialinizzazione delle pareti venose, a cui corrispondono sul piano macroscopico lo sviluppo di varicosità. L'atrofia e la fibrosi, che rappresentano l'ultimo stadio della malattia, peggiorano ulteriormente il quadro rendendo i vasi ancora più tortuosi e sacculati (8-9).

In alcuni casi il varicocele si associa ad infertilità. Perché il varicocele abbia un effetto dannoso sulla spermatogenesi solo in alcuni uomini non è ancora chiarito e numerosi meccanismi fisiopatologici sono stati invocati quali causa del danno testicolare: ipossia, ipertermia, disfunzioni ormonali, autoimmunità, stress ossidativo, apoptosi ed aumento della pressione idrostatica nel sistema di drenaggio venoso testicolare (10).

Quest'ultimo meccanismo, in particolare, sembra sicuramente coinvolto: nel testicolo il flusso ematico è possibile solo in direzione della pressione negativa, perciò, quando la pressione idrostatica del sistema venoso di drenaggio supera la pressione del microcircolo arteriolare intratesticolare (18-20 mmHg), compaiono il ristagno venoso a livello scrotale e la relativa ipossia del parenchima testicolare; il conseguente stato ipossico-ischemico determina un'alterazione a carico dei tubuli seminiferi, delle cellule del Sertoli, delle cellule germinali ed infine delle cellule del Leydig e questo, a sua volta danneggia la qualità seminale, portando ad una lieve, moderata o grave oligoastenoteratozoospermia. L'esito finale del processo, in alcuni casi, è la comparsa di ipotrofia testicolare, mono- o bilaterale (11).

Il varicocele può essere individuato attraverso l'esame clinico, anche se l'esame obiettivo tende a sottostimare la reale incidenza di tale patologia. Dubin e Amelar hanno proposto nel 1978 una classificazione clinica del varicocele (12), tutt'oggi universalmente accettata:

- I grado: varicocele rilevabile con la palpazione, solo durante la manovra di Valsalva;
- II grado: varicocele rilevabile con la palpazione già in condizioni di base;
- III grado: varicocele visibile all'ispezione;
- Subclinico: non palpabile o visibile a riposo e durante manovra del Valsalva ma rilevabile con esame Ecocolor Doppler (ECD).

L'esame obiettivo deve essere effettuato sia in clinostatismo che in ortostatismo, in condizioni di riposo e dopo manovra di Valsalva (aumento della pressione endoaddominale). In molti casi, soprattutto in pazienti con una storia di pregressa chirurgia scrotale, concomitante idrocele oppure obesità grave, lo studio clinico del varicocele può non essere conclusivo: pertanto è necessario effettuare uno studio ECD testicolare, che consentirà di studiare bilateralmente il grado di ectasia e il flusso venoso a livello del plesso pampiniforme, in sede funicolare, sovratesticolare e peritesticolare.

Dal punto di vista ecografico (Fig.2) gli obiettivi dello studio ECD del plesso pampiniforme sono:

- dimostrare la presenza del reflusso venoso patologico;
- classificare il varicocele in base alla sua estensione endoscrotale;

- distinguere le forme monolaterali da quelle bilaterali;
- valutare lo stato delle gonadi e degli epididimi, con particolare attenzione al calcolo del volume testicolare;
- dimostrare l'eventuale presenza di recidiva di varicocele dopo intervento chirurgico.

L'esplorazione inizia da sinistra (sede più frequente di varicocele), con l'esame della regione peritesticolare a paziente in ortostatismo. Dapprima lo studio viene effettuato in condizioni basali (B-Mode); se già in questa situazione sono presenti vasi venosi dilatati (diametro maggiore di 3 mm), l'indagine ECD ci darà informazioni sulla presenza o meno di un reflusso e se quest'ultimo è presente in condizioni basali e/o dopo aumento della pressione endoaddominale (manovra di Valsalva). A tal fine, dopo aver studiato la regione peritesticolare in condizioni basali, si invita il paziente ad eseguire un ponzamento progressivo, non brusco ed un reflusso viene considerato patologico quando si prolunga per oltre due secondi. Reflussi di minore durata, se la manovra di Valsalva è eseguita correttamente, sono considerati brevi e non riferibili a ritorno di sangue dalle vene spermatiche.

Se lo studio in B-Mode non rileva varicosità peritesticolari, si dovrà indagare la regione funicolare sovrastesticolare con le stesse modalità descritte in precedenza.

Quando non siano visibili vasi dilatati anche in questa sede e l'ECD non percepisca segnali, si passerà all'esame del funicolo all'emergenza scrotale. Per essere sicuri di aver localizzato il funicolo, con la sonda puntata verso l'anello inguinale superficiale, si centra l'arteria testicolare e si invita il paziente ad eseguire la manovra di Valsalva evidenziando la presenza o meno di reflusso prolungato. Naturalmente dopo aver esplorato il plesso pampiniforme sinistro, anche in caso di reperti negativi, andrà esaminato anche il plesso pampiniforme controlaterale con le medesime modalità.

Sulla base dei reperti ottenuti mediante le suddette procedure possiamo ottenere informazioni sulla presenza o meno di varicocele e sull'entità e localizzazione dei reflussi venosi patologici.

Attualmente la classificazione ecografica che, a nostro parere, sembra più completa per la definizione del varicocele, è quella introdotta da Sarteschi e collaboratori (13) (Fig.2):

- **Grado 1:** non si osservano varicosità in B-mode. L'ECD, con sonda posizionata all'emergenza scrotale, evidenzia un prolungato reflusso venoso.
- **Grado 2:** si osservano piccole varicosità posteriori, spesso accompagnate da un tronco venoso rettilineo ventrale, che però non scendono al di sotto del livello del polo superiore del testicolo. Il diametro delle varicosità aumenta in maniera più o meno apprezzabile con la manovra di Valsalva eseguita in B-Mode. L'ECD rivela la presenza di reflusso venoso nella regione sovrastesticolare.

- **Grado 3:** in ortostatismo i vasi venosi si dilatano prontamente durante manovra di Valsalva in B-Mode, raggiungendo il polo inferiore del testicolo. L'ECD non evidenzia reflusso in condizioni basali ma dimostra reflussi prolungati durante manovra di Valsalva.
- **Grado 4:** i vasi venosi del funicolo appaiono dilatati in B-Mode a livello funicolare peritesticolare; la manovra di Valsalva determina un ulteriore allargamento dei calibri venosi. L'ECD documenta presenza di reflussi patologici già in condizioni basali, che aumentano durante manovra di Valsalva. Spesso può essere presente ipotrofia del testicolo omolaterale.
- **Grado 5:** i vasi venosi appaiono estremamente dilatati in B-Mode a livello funicolare e peritesticolare, talvolta in maniera abnorme. La manovra di Valsalva determina aumento del calibro venoso. L'ECD rivela un reflusso patologico presente in condizioni basali che comunque non aumenta o aumenta pochissimo durante l'esecuzione delle manovre funzionali. Talvolta possono essere presenti varici intratesticolari. Può, inoltre, coesistere ipotrofia del testicolo omolaterale.

In caso di rilievo di varicocele solo a destra è necessario studiare l'eventuale presenza di reflusso venoso anche nel corrispondente canale inguinale. Se si dimostrano anche in questa sede vasi venosi con segnali di reflusso, è possibile escludere che il varicocele destro sia sostenuto da collaterali prepubici o transrettali. In questo caso, nel sospetto clinico di varicocele secondario, è necessario affrontare lo studio ecografico delle logge renali, del fegato e del retroperitoneo alla ricerca di cause ostruttive venose, congenite o acquisite (14).

La terapia del varicocele si basa sulla scleroterapia (anterograda o retrograda) o sull'embolizzazione retrograda dei vasi venosi o è di tipo chirurgico. L'approccio chirurgico può essere scrotale o inguinale, con tecniche di microchirurgia o laparoscopia (15).

Attualmente una precisa indicazione chirurgica per il trattamento del varicocele si ha solo nei maschi adolescenti che mostrano un progressivo danno testicolare (documentato dalla riduzione del volume testicolare, dall'aumento dell'FSH e dal peggioramento dei parametri spermatici) (16), nei soggetti con varicocele clinicamente sintomatico o nei maschi adulti con alterazione dei parametri spermatici e partner femminile senza evidenti cause di infertilità (17). Negli altri casi, anche in considerazione dell'elevata percentuale di recidive e delle possibili complicanze post-operatorie, l'opportunità della terapia chirurgica va attentamente valutata con il paziente.

L'obiettivo futuro è mettere a punto tecniche di diagnosi che permettano di selezionare precocemente quei soggetti in cui il varicocele altera il flusso ematico intratesticolare e che, quindi, probabilmente causerà un danno della spermatogenesi. In tal senso vanno letti gli innovativi studi sul microcircolo testicolare, condotti mediante mezzo di contrasto iniettato per via endovenosa. Questa metodica ecografica, dopo l'infusione endovenosa di esafluoruro di zolfo, permette di studiare la perfusione ematica testicolare nelle sue varie fasi [arteriosa (TTP), arteriolare (wash-in), venulare (wash-out)] e di valutare il tempo di transito medio nel microcircolo parenchimale (MTT: Wash-in+Wash-out) (Fig.3).

Recentemente Caretta et al (18) hanno dimostrato che, l'alterazione del microcircolo testicolare, ed in particolare del deflusso venulare (wash-out) e del tempo di transito medio (MTT>36 s), riveste un ruolo fondamentale nella patogenesi della oligozoospermia associata al varicocele. L'Ecografia scrotale con mezzo di contrasto, nei soggetti oligozoospermici con varicocele, può quindi costituire un elemento diagnostico fondamentale per dare indicazione all'intervento chirurgico mentre, nei soggetti con varicocele normozoospermici, può individuare i soggetti a maggior rischio di sviluppare una testicolopatia e quindi che necessitano di un follow-up di controllo più ravvicinato.

Bibliografia

1. Gorelick JJ, Goldstein M. Loss of fertility in men with varicocele. *Fertil Steril* 1993; 59: 613-6.
2. Damsgaard J, Joensen UN, Carlsen E, Erenpreiss J, Jensen MB, Matulevicius V, Zilaitiene B, Olesen IA, Perheentupa A, Punab M, Salzbrunn A, Toppari J, Virtanen HE, Juul A, Skakkebaek NE, Jorgensen N. Varicocele is associated with impaired semen quality and reproductive hormone levels: a study of 7035 healthy young men from six european countries. *Eur Urol* 2016; 70: 1019-29.
3. The influence of varicocele on parameters of fertility in a large group of men presenting to infertility clinics. World Health Organization. *Fertil Steril* 1992; 57: 1289-93.
4. Akbay E, Cayan S, Doruk E, Duce MN, Bozlu M. The prevalence of varicocele and varicocele-related testicular atrophy in Turkish children and adolescent. *BJU Int* 2000; 86: 490-3.
5. Levinger U, Gornish M, Gat Y, Bachar GN. Is varicocele prevalence increasing with age? *Andrologia* 2007; 39: 77-80.
6. Vijsha P, Muganthan N, Devi JR, Anbalagan J. A study of renal vein and gonadal vein variations. *NJCA* 2012; 1: 125-28
7. Gupta R, Gupta A, Aggarwal N. Variations of gonadal veins: embryological prospective and clinical significance. *J Clin Diagn Res* 2015; 9: 8-10
8. Eid RA, Radad K, Al-Shraim M. Ultrastructural changes of smooth muscles in varicocele veins. *Ultrastruct Pathol* 2012; 36:201-6
9. Macchi V, Porzionato A, Iafrate M, Ebugheme E, Paoli A, Vigato E, Parenti A, Ficarra V, Artibani W, De Caro R. Morphological characteristics of the wall of pampiniform plexus veins and modifications in patients with varicocele. *Ital J Anat Embryol.* 2008; 113:1-8
10. Fretz PC and Sandlow JJ: Varicocele: current concepts in pathophysiology, diagnosis and treatment. *Urol Clin North Am* 2002; 29: 921-37.
11. Gat Y, Bachar GN, Zukerman Z, Belenky A, Gornish M. Varicocele: a bilateral disease. *Fertil Steril* 2004; 81: 424-9.
12. Dubin L, Amelar R. Varicocele size and results of varicolectomy in selected subfertile men with varicocele. *Fertil Steril* 1970; 21: 606-609.
13. Sarteschi LM and Menchini Fabris LS: *Ecografia Andrologica*. Modena: Athena 2006; chapt 13.

- Figura 1:** Anatomia del drenaggio venoso: A) Drenaggio venoso scrotale; B) Drenaggio venoso plesso pampiniforme

Diagram illustrating the female reproductive system, showing internal and external organs. Labels include:

- Vasculature (V.)
- Cervix/vagina (v.)
- Parametrial plexus
- Res. tissue
- Mediastrium
- Tunica albuginea
- Collecting ducts
- Tunica vasculosa

ANATOMIA GENERALE
DEL DRENAGGIO VENOSO

V. DELLA CAPSULA RENALE
V. SPERMATICA INFER.
V. LOMBARE ASCEND.
V. EPIGASTRICA INFER.
VV. DIFFERENZIALI
V. SPERMATICA SUPER.
V. SAFENA INFER.
V. PUDENDA SUPER.

Figura 2: A) Determinazione del volume scrotale; B) Valutazione ectasia del plesso pampiniforme;
C-D) Dimostrare la presenza di reflusso e sua estensione ~~endoscrotale~~

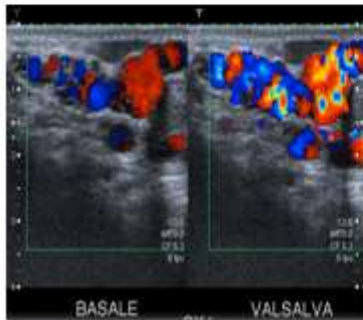
A)



B)



C)



D)

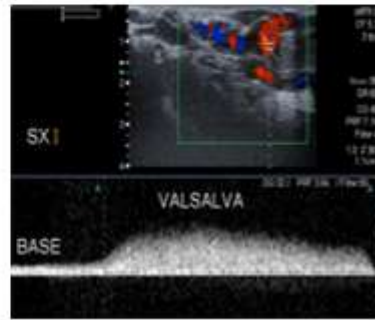
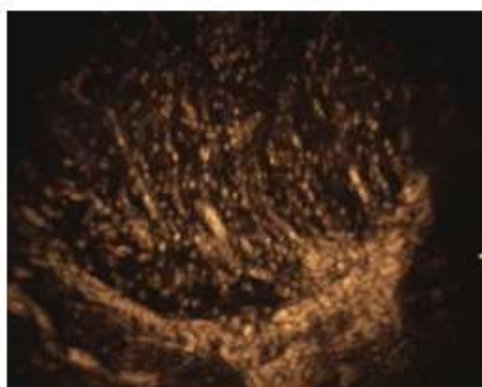
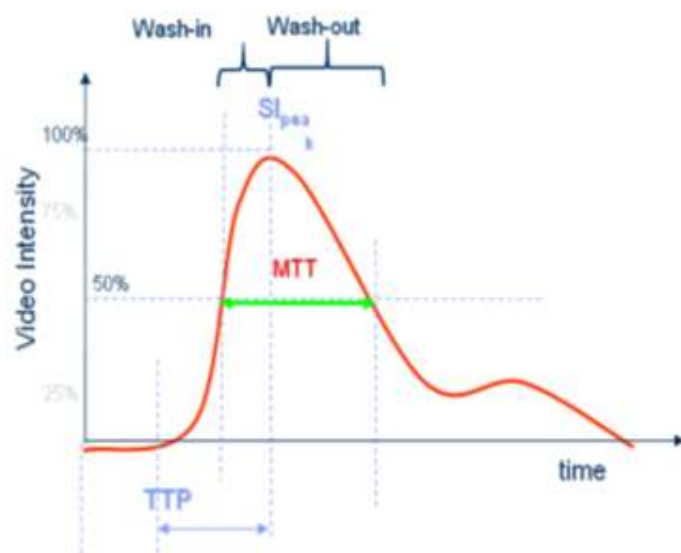


Figura 3: A) Immagine del microcircolo testicolare dopo infusione di esafloruro di zolfo; B) Parametri di perfusione analizzabili

A)



B)



4. Caratterizzazione ecografica del paziente con neoplasia testicolare

Nello studio delle cause di infertilità maschile e in generale nel percorso clinico diagnostico della coppia infertile, la metodica ultrasonografica rappresenta uno strumento essenziale per lo specialista, in quanto utile e necessario strumento da integrare all'esame clinico e alla valutazione ormonale e della fertilità del paziente. L'utilizzo sempre più diffuso e standardizzato dell'ecocolorDoppler (ECD) testicolare nello screening del maschio infertile è alla base dell'aumento della diagnosi incidentale di lesioni testicolari, per lo più non palpabili(1-3). Non è infrequente, d'altro canto, anche in considerazione del basso costo e della non-invasività dell'esame, il riscontro di una lesione testicolare in occasione di un ECD o un esame clinico effettuato per altro quesito (screening andrologico, varicocele, dolore testicolare). Accade meno spesso che una lesione testicolare venga diagnosticata in seguito ad autopalpazione da parte del paziente e da qui l'importanza di istruire il paziente all'autopalpazione testicolare che permane però un atto fondamentale per la prevenzione.

Nella caratterizzazione del paziente con neoplasia testicolare l'indagine ultrasonografica ha sensibilità pressoché assoluta nella dimostrazione delle lesioni focali del testicolo (dal 98% al 100% - operatore dipendente) (4-6) e, pertanto, è considerata l'indagine di scelta a fronte di un simile sospetto clinico. L'ECD testicolare infatti rappresenta l'indagine di primo livello nella valutazione della morfologia e struttura testicolare, permette di riconoscere masse non palpabili clinicamente, discernere la localizzazione (intra o extratesticolare) delle masse palpabili ed ha elevata capacità di discriminare la struttura (cistica, solida, mista). Poiché la prognosi e il trattamento delle varie affezioni neoplastiche testicolari possono essere diversi, la diagnostica differenziale di una lesione focale deve essere mirata a permettere di impostare il miglior approccio terapeutico e/o la programmazione di un adeguato follow-up.

Il tumore del testicolo rappresenta l'1 % delle neoplasie maschili e, in generale, il 5% dei tumori del tratto urogenitale, con un'incidenza di 3-10 nuovi casi per 100.000 maschi all'anno nel mondo occidentale(7-9). In Italia i tumori del testicolo rappresentano la neoplasia maligna più frequente nei maschi con meno di 50 anni (12%) (10). Circa il 95% dei tumori testicolari maligni origina dall'epitelio germinativo dei tubuli seminiferi e costituisce, pertanto, il gruppo dei *tumori a cellule germinali*. Il restante 5 % comprende il gruppo dei *tumori dello stroma e dei cordoni sessuali*, con riferimento alle cellule stromali specializzate interstiziali, le cellule di Leydig e alle cellule stromali di sostegno dei tubuli seminiferi, le cellule del Sertoli. I tumori a cellule germinali del testicolo vengono classicamente suddivisi in due categorie: i seminomi e i tumori non seminomatosi. Il gruppo dei *seminomi* (42% dei tumori a cellule germinali) comprende tre tipi istologici: il seminoma tipico (il più frequente, circa l'80% dei tumori diagnosticati), anaplastico (10%), e spermatocitico (4-7%); i *tumori non seminomatosi* (58% dei tumori a cellule germinali) comprendono, invece: il carcinoma embrionale, il tumore del sacco vitellino, il corioncarcinoma e il teratoma. Frequenti sono le associazioni di più tipi istologici.

Altre rare condizioni neoplastiche possono interessare il parenchima testicolare: linfomi, leucemie e metastasi da tumori primitivi extratesticolari.

La tabella 1 mostra i principali fattori di rischio per lo sviluppo di una neoplasia testicolare (11). La maggior parte delle lesioni testicolari, specie se di piccole dimensioni, sono asintomatiche. Possono essere riscontrate a livello di un testicolo di normali dimensioni e morfologia, oppure in un testicolo sofferente, atrofico e/o in presenza di alterazioni parenchimali di altro genere (ad es. microlitiasi o calcificazioni). In generale, nella pratica clinica, una lesione focale intratesticolare di aspetto solido deve essere considerata, in prima ipotesi maligna. La natura della stessa, quindi, nella gran maggioranza dei casi deve essere accertata con esame istologico per via escissionale.

Caratterizzazione ecografica dei tumori testicolari

All'indagine ecografica una lesione testicolare deve essere classificata in base alle sue caratteristiche ultrasonografiche. Nello specifico si valuteranno: morfologia (cistica –se anecogena- o solida), ecostruttura (omogenea o disomogenea), vascolarizzazione (vascolarizzata o avascolarizzata), ecogenicità (ipoecogena o iperecogena rispetto al restante parenchima), eventuali disomogeneità ecostrutturali interne (come microlitiasi, macrocalcificazioni o aree anecogene cistiche), margini (regolari o irregolari, definiti o sfumati). Il ruolo principale dell'ecocolor Doppler testicolare nella diagnosi di una neoplasia testicolare sta nel chiarirne in prima istanza la sua localizzazione, dal momento che è molto più probabile che una lesione intratesticolare sia maligna rispetto ad una lesione extratesticolare (12). Le lesioni cistiche sono generalmente benigne ed appaiono come aree anecogene a margini più o meno netti, con all'interno spot ecogeni nel caso in cui il loro contenuto sia corpuscolato. Al contrario, la maggior parte dei tumori testicolari maligni appare come una lesione solida, ipoecogena rispetto al restante parenchima testicolare ma può mostrare un aspetto eterogeneo nel caso in cui siano presenti all'interno delle aree cistiche, necrotiche o emorragiche. Sono poche le caratteristiche ecografiche che possono essere d'aiuto nella diagnosi differenziale tra un tumore a cellule germinali e un tumore non a cellule germinali. In generale, i seminomi mostrano una struttura più omogenea, più nettamente ipoecogena e con margini ben demarcati. I tumori non seminomatosi si presentano anch'essi ipoecogeni ma con disomogeneità ecostrutturale caratterizzata frequentemente dalla presenza di parti cistiche o calcifiche che all'esame ecografico si presentano come aree ipo-anecogene o iperecogene. Sia i seminomi che i tumori non seminomatosi tendono ad avere margini netti, tuttavia seminomi di grandi dimensioni e i tumori misti possono apparire non uniformi, multifocali, multilobati e con margini poco netti. I rari linfomi e le leucemie a localizzazione testicolare si associano a caratteristiche ecografiche aspecifiche: possono presentarsi come noduli a margini ben definiti oppure infiltrare in maniera diffusa e multifocale il parenchima testicolare. L'utilizzo del Color e del power Doppler è cruciale nella valutazione di una lesione intratesticolare. I tumori maligni mostrano più spesso una vascolarizzazione aumentata, ma questa caratteristica non può essere considerata come un criterio di malignità certo, dal momento che anche lesioni a comportamento benigno (come i tumori a cellule di Leydig) possono mostrare lo stesso pattern di vascolarizzazione. Un ulteriore reperto, riconoscibile solo all'ecografia, che può essere considerato come fattore di rischio di neoplasia è la microlitiasi testicolare. Senza associate alterazioni dell'adiacente parenchima, essa si caratterizza per minuti spot iperecogeni, limitata ad un didimo o bilaterale, che corrispondono, all'analisi istologica, a

microcalcificazioni nei tubuli seminiferi, che hanno possibile origine da cellule sfaldate e degenerate. In base al numero di microliti presenti all'interno del parenchima testicolare si può distinguere una forma “classica” o diffusa (>5 microcalcificazioni per testicolo), da una forma “limitata” (<5 microcalcificazioni). La microlitiasi è un reperto relativamente comune nei pazienti con tumore testicolare. Microliti testicolari sono stati osservati anche in altre condizioni cliniche, come criptorchidismo, atrofia testicolare o infertilità, oppure in alcune patologie specifiche, come la sindrome di Klinefelter, tutte condizioni associate ad una disgenesia testicolare. Per essere più precisi, è la condizione di disgenesia, piuttosto che la microlitiasi in sé, che pone il testicolo a rischio di neoplasia. Benché sembri ragionevole offrire a questi soggetti una sorveglianza ecografica, ad oggi non esiste consenso in letteratura sul timing e sull'efficacia di una simile strategia (13) e probabilmente la strategia del medico nella scelta di un corretto follow-up deve tener conto, unitamente ai dati strumentali derivanti dall'ECD testicolare, degli altri fattori clinici, ormonali e anamnestici.

Le tipiche caratteristiche ecografiche dei vari istotipi verranno descritte in breve di seguito, tuttavia nessuna di esse può essere considerata patognomonica in quanto la diagnosi certa della natura maligna o benigna di una massa testicolare resta esclusivamente istologica.

Seminoma: appare di solito come una lesione solida omogenea, ipoecogena di forma ovalare a margini netti. I seminomi possono presentarsi come lesioni piccole nel contesto di un parenchima testicolare integro oppure, se di grandi dimensioni, possono completamente occupare tutto il parenchima testicolare con sovvertimento dell'architettura e ingrossamento notevole dell'organo. Possono apparire come lesioni singole o occasionalmente come lesioni multinodulari con margini polilobati. Raramente presentano al loro interno componenti cistiche o necrotiche e nella maggior parte dei casi restano confinati all'interno dell'albuginea. Reperto di frequente riscontro (in circa un terzo dei casi) è la contemporanea presenza di microlitiasi. Al colorDoppler i seminomi mostrano di solito aumentata vascolarizzazione (Figura 1).

Carcinoma embrionario: appare come una massa ipoecogena con una ecostruttura più disomogenea rispetto al seminoma, dovuta alla presenza di aree di degenerazione cistica, emorragiche e calcificazioni. Molto spesso si presenta di grosse dimensioni, ha una crescita rapida e quando in posizione eccentrica causa infiltrazione e distorsione del profilo dell'albuginea (Figura 2).

Teratoma: è un tumore caratterizzato da un disordinato arrangiamento di tessuti fetali derivanti dai tre foglietti germinali (endoderma, mesoderma ed ectoderma) e da tessuti adulti. L'aspetto eterogeneo della lesione riflette la complessità della sua natura istologica: i teratomi presentano una architettura prevalentemente cistica con spot iperecogeni al suo interno, dovuti alla presenza di focali calcificazioni, cartilagine, osso immaturo e fibrosi; la componente cistica può essere completamente anecogena o presentare una struttura complessa per la presenza di contenuto fluido di natura sierosa, mucosa o cheratinica. Importante è la diagnosi differenziale con le cisti epidermoidi, formazioni cistiche complesse intratesticolari di natura benigna (Figura 3).

Coriocarcinoma: è uno dei più rari tumori a cellule germinali. Ecograficamente si presenta come una massa solida disomogenea con all'interno aree di emorragia, di necrosi e calcificazioni.

Tumori non a cellule germinali: a questa categoria appartengono i tumori derivanti dalle cellule stromali interstiziali: le cellule del Sertoli e le cellule di Leydig. I tumori a cellule del Sertoli si presentano spesso come un nodulo singolo ipoecogeno ma non è infrequente il riscontro di multipli foci ipoecogeni con aree iperecogene, se presenti calcificazioni. E' di gran lunga più frequente il riscontro di un tumore a cellule di Leydig, neoplasia dal comportamento benigno, anche se sono stati descritti rari casi di comportamento maligno. Questa neoplasia viene riscontrata il più delle volte in maniera incidentale: si presenta infatti come una lesione singola, non palpabile, ipoecogena e con vascolarizzazione aumentata (Figure 4 e 5).

Indagini di secondo livello per la caratterizzazione delle lesioni non palpabili

In considerazione dell'alta percentuale di lesioni benigne riscontrate all'esame istologico, lo specialista può oggi ricorrere all'utilizzo di nuove metodiche non invasive atte ad aumentare il potere diagnostico dell'ecografia basale, nell'ottica di un approccio sempre meno invasivo e personalizzato per il caso. A questo proposito, la recente introduzione nella pratica clinica dell'esame ultrasonografico con mezzo di contrasto (CEUS) e dell'elastosonografia consentendo di incrementare notevolmente il ruolo informativo dell'ecografia nella caratterizzazione delle lesioni intratesticolari non palpabili. Lo studio CEUS si inserisce in questo contesto aggiungendo informazioni importanti per lo specialista: la metodica, infatti, potrebbe consentire di definire nell'ambito delle lesioni intratesticolari, non palpabili e vascolarizzate, la natura neoplastica ed il comportamento benigno o maligno, con una accuratezza diagnostica pari al 93%, come dimostrato in alcuni studi (14). Nello specifico l'utilizzo del mezzo di contrasto per ultrasuoni (Sonovue® Bracco) e l'analisi dei dati raccolti dall'esame attraverso software dedicati forniscono informazioni circa la vascolarizzazione della lesione: in base alla cinetica di acquisizione (wash in) e di smissione (wash out) del mezzo all'interno della lesione, messo a confronto con il restante parenchima testicolare, può essere possibile differenziare la natura benigna o maligna di una lesione vascolarizzata (Figura 6). Le lesioni benigne sembrerebbero presentare caratteristicamente un rapido wash in ed un ritardato wash out del mezzo di contrasto, mentre le lesioni maligne un rapido wash in e un rapido wash out.

La metodica elastosonografica rappresenta un ulteriore strumento per il clinico nella caratterizzazione di una lesione testicolare: tramite questo software ecografico, si può esprimere l'elasticità, e quindi la "durezza", della lesione rispetto al parenchima circostante attraverso una scala colorimetrica che va dal rosso (tessuto più elastico) al blu (tessuto più duro). Nel testicolo in genere al colore verde corrisponderanno le lesioni più "soffici", quindi verosimilmente non neoplastiche, mentre le lesioni più "dure", verosimilmente neoplastiche, appariranno in blu. Il colore blu dimostra che la zona studiata si presenta meno elastica, e quindi alterata, rispetto al parenchima circostante (Figura 7). Dal momento che, tipicamente all'esame elastosonografico lesioni maligne, come i seminomi, presentano le stesse caratteristiche di durezza delle lesioni benigne, come

i tumori a cellule del Leydig, l'elastosonografia attualmente possiede un potere diagnostico minore rispetto all'ecografia con mezzo di contrasto, nel discernere, nell'ambito di una lesione neoplastica, la natura benigna o maligna della stessa. Pertanto la procedura è ancora in corso di validazione per lo studio delle lesioni testicolari (15).

Bibliografia

1. Increased incidence of testicular cancer in men presenting with infertility and abnormal semen analysis. Raman JD¹, Nobert CF, Goldstein M. J Urol. 2005 Nov;174(5):1819-22
2. Detection of testicular ultrasonographic lesions in severe male infertility. Carmignani L¹, Gadda F, Mancini M, Gazzano G, Nerva F, Rocco F, Colpi GM. J Urol. 2004 Sep;172(3):1045-7.
3. High incidence of benign testicular neoplasms diagnosed by ultrasound. Carmignani L¹, Gadda F, Gazzano G, Nerva F, Mancini M, Ferruti, Bulfamante G, Bosari S, Coggi G, Rocco F, Colpi GM. J Urol. 2003 Nov;170(5):1783-6.
4. Scrotal ultrasound in adults. Appelbaum L¹, Gaitini D, Dogra VS. Semin Ultrasound CT MR. 2013 Jun;34(3):257-73.
5. Scrotal ultrasound. Oyen RH. Eur Radiol. 2002 Jan;12(1):19-34.
6. Scrotal Ultrasound: Morphological and Functional Atlas. Isidori AM, Lenzi A (eds). Genoa, Italy: National Academy of Medicine-ANM, 2008
7. Cancer Mortality in Europe, 2000-2004, and an overview of trends since 1995. La Vecchia C, Bosetti C, Lucchini F, et al. Ann Oncol 2010 Jun;21(6):1323-60.
8. Cancer Incidence in Five Continents, Vol IX. Curado MP, Edwards B, Shin R, et al eds. IARC Scientific Publication 2007, No. 160.
9. NORDCAN--a Nordic tool for cancer information, planning, quality control and research. Engholm G, Ferlay J, Christensen N, et al. Acta Oncol 2010 Jun;49(5):725-36.
10. I numeri del cancro in Italia. AIOM-AIRTUM 2016
11. Epidemiology of testicular cancer. Manecksha RP, Fitzpatrick JM (2009) BJU Int 104(9 Pt B):1329–1333
12. Sonography of testicular tumors and tumor-like conditions: a radiologic-pathologic correlation. Geraghty MJ¹, Lee FT Jr, Bernstein SA, Gilchrist K, Pozniak MA, Yandow DJ. Crit Rev Diagn Imaging. 1998 Feb;39(1):1-63.
13. Testicular microlithiasis imaging and follow-up: guidelines of the ESUR scrotal imaging subcommittee. Richenberg J, Belfield J, Ramchandani P, Rocher L, Freeman S, Tsili AC, Cuthbert F, Studniarek M, Bertolotto M, Turgut AT, Dogra V, Derchi LE. Eur Radiol. 2015 Feb;25(2):323-30
14. Differential diagnosis of nonpalpable testicular lesions: qualitative and quantitative contrast-enhanced US of benign and malignant testicular tumors. Isidori AM, Pozza C, Gianfrilli D, Giannetta E, Lemma A, Pofi R, Barbagallo F, Manganaro L, Martino G, Lombardo F, Cantisani V, Franco G, Lenzi A. Radiology. 2014 Nov;273(2):606-18.

15. Diagnostic value of qualitative and strain ratio elastography in the differential diagnosis of non-palpable testicular lesions. Pozza C, Gianfrilli D, Fattorini G, Giannetta E, Barbagallo F, Nicolai E, Cristini C, Di Pierro GB, Franco G, Lenzi A, Sidhu PS, Cantisani V, Isidori AM. Andrology. 2016 Aug 27

Tabella 1
Fattori di rischio di neoplasia testicolare
Criptorchidismo
Sindrome disgenetica testicolare
Interferenti endocrini
Familiarità per neoplasia testicolare
Ipotrofia testicolare
Infertilità
Sindromi genetiche

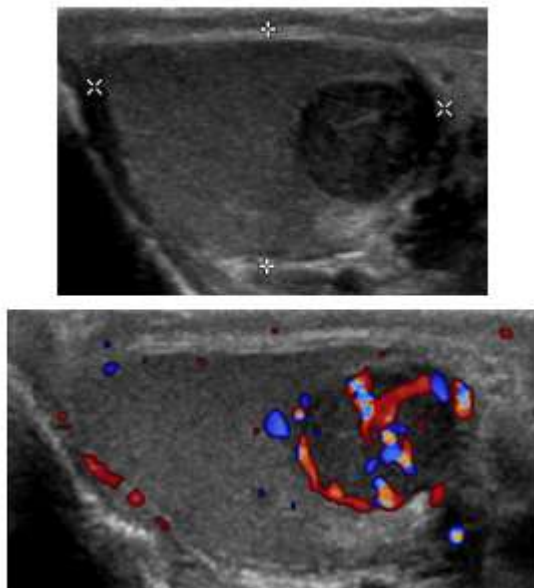


Figura 1: Seminoma

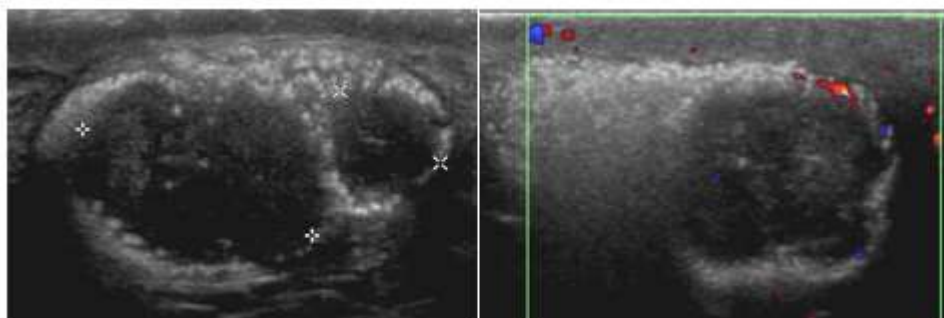


Figura 2: Carcinoma embrionario

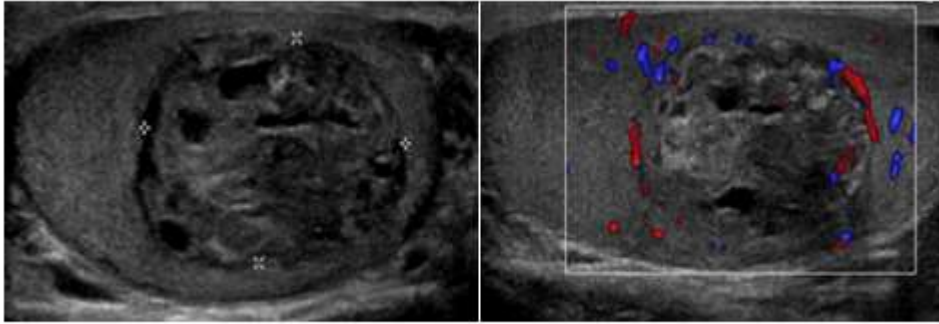


Figura 3: Teratoma

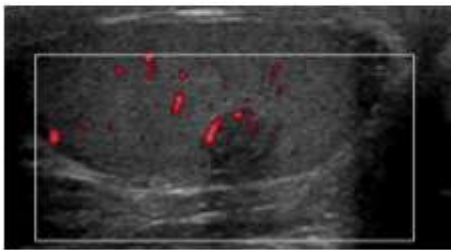
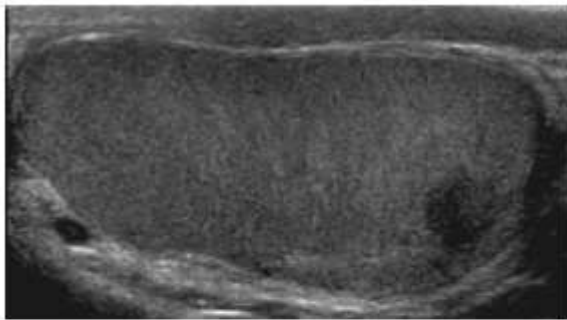


Figura 4: Tumore a cellule del Sertoli

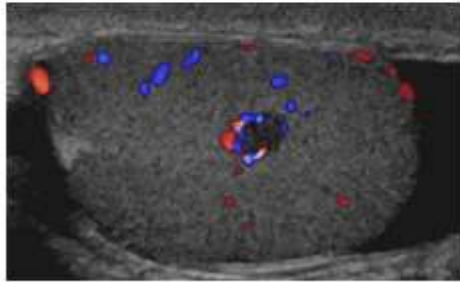
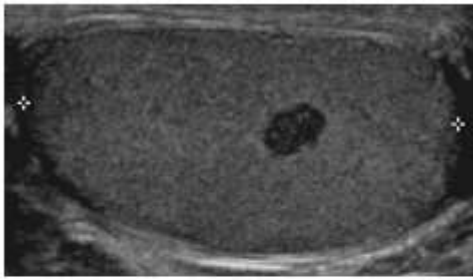


Figura 5: Tumore a cellule di Leydig

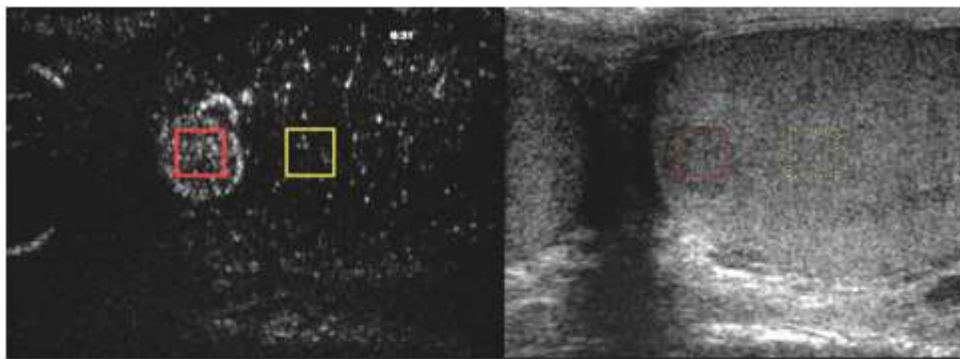


Figura 6: Studio con CEUS di un Tumore a cellule di Leydig

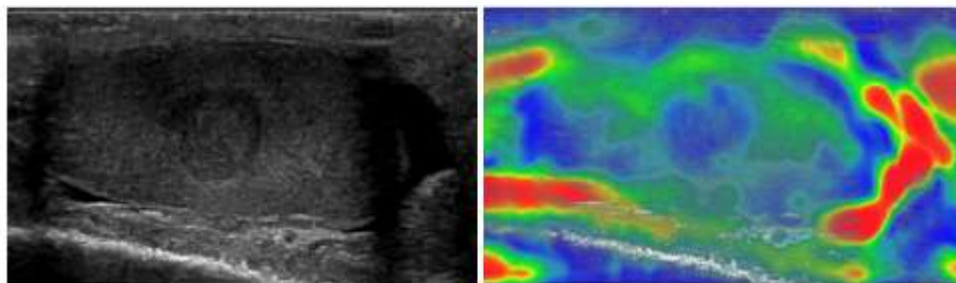


Figura 7: Elastosonografia di un Seminoma

6. Caratterizzazione ecografica del paziente con flogosi delle ghiandole sessuali accessorie

La caratterizzazione ecografica del paziente con flogosi delle ghiandole sessuali accessorie, denominate MAGI (Male Accessory Gland Infection) viene routinariamente effettuata attraverso la valutazione della regione didimo epididimaria e prostato vescicolare (preferibilmente in scansione transrettale endocavitaria). L'utilità nella pratica clinica è molto controversa. Se da una parte infatti, l'impiego del mezzo ecografico rappresenta uno strumento di valutazione diagnostica molto diffuso, dall'altra, la ridotta specificità e sensibilità diagnostica nello studio in particolare delle flogosi che si realizzano a carico della regione prostatica ne condiziona l'impiego nella pratica clinica (1).

L'AIUM (American Institute of Ultrasound in Medicine) suggerisce l'impiego della TRUS (Transrectal Ultrasound) per lo studio della regione prostato-vescicolare negli uomini con condizione clinica di infertilità. Altre indicazioni sono rappresentate da : a. biopsia eco guidata nel caso di noduli prostatici sospetti all'esplorazione rettale, oppure in caso di PSA (Antigene Prostatico Specifico) elevato e/o di immagini sospette mediante studio in risonanza magnetica; b. calcolo del volume prostatico prima di procedure chirurgiche e/o radioterapia, oppure per il calcolo del PSA density; c. guida per il posizionamento di aghi nel corso di radioterapia; d. valutazione dei disordini legati a sintomi del basso tratto urinario; e. studio di anomalie morfostrutturali congenite; f. emospermia; g. recidiva di malattia in pazienti sottoposti in precedenza a prostatectomia (2).

Le linee guida di EAU (European Association of Urology) riconoscono l'impiego della TRUS solamente limitata ai casi di sospetta azoospermia ostruttiva. In particolare queste linee guida suggeriscono di concentrare l'attenzione ai pazienti azoospermici con basso volume di eiaculato. Anche la valutazione ecografica della regione didimo epididimaria, andrebbe limitata solamente ai pazienti con segni sospetti di ostruzione : dilatazione della rete testis, dilatazione cistica del tratto cefalico epididimario, sospetta assenza dei vasi deferenti (3). In particolare, un recente studio di Pezzella e coll. (4) ha dimostrato che il rilevamento ecografico di un diametro longitudinale >10.85 mm a carico del tratto cefalico dell'epididimo, combinato al riscontro di concentrazioni sieriche di FSH <7.8 IU/ml appare suggestivo di azoospermia ostruttiva (sensibilità=58.8%; specificità=91.4%).

Una recente review sistematica della letteratura scientifica, elaborata dall'Università di Firenze, ha dimostrato che l'impiego dello studio in ecografia della regione didimo epididimaria e prostato vescicolare (in scansione transrettale) è utile nello studio dei pazienti con flogosi cronica della regione epididimaria e prostato vescicolare, favorendo la possibilità di rilevare segni ecografici associati a fenomeni infiammatori e pertanto suggerendo l'impiego di tali metodiche rivolto anche alla comprensione delle diverse fasi infiammatorie che coinvolgono la regione epididimaria, prostatica e le vescicole seminali nel corso di MAGI (5).

Questo tipo di interpretazione appare più coerente con la pratica clinica, infatti le MAGI rappresentano una categoria nosografica responsabile di infertilità maschile, la cui prima proposta classificativa risale al 1980 (6), ripresa nel 1993 dalla Organizzazione Mondiale di Sanità che ne detta i criteri (7), ed infine inserita all'interno delle attuali linee guida EAU tra le cause di infertilità maschile (3). Poiché i

meccanismi attraverso cui le MAGI possono determinare alterazioni dei parametri spermatici sono differenti e non prevedono solamente l'ostruzione dei condotti eiaculatori, la cui diagnosi è peraltro di natura ecografica (8), ma riguardano anche altri aspetti fisiopatologici, quali ad esempio : stress ossidativo e sbilanciamento delle citochine, alterata capacità secretoria delle ghiandole sessuali accessorie, danno diretto microbico, lo studio ecografico di prostata, epididimi e vescicole seminali, riconosce importanti aspetti clinico-traslazionali, che verranno di seguito sintetizzati (9).

In precedenza sono stati riportati dei criteri ecografici suggestivi per P (prostatite), PV (prostato-vescicolite), PVE (prostato-vescicolo-epididimite), riassunti in **Tabella 1** (10). L'importanza di riconoscere criteri riconducibili ad una diversa estensione del processo infiammatorio cronico, è legata alle differenti ricadute di gravità sulla qualità dei parametri spermatici (9) e della sintomatologia (11), che sembrano peggiori nella PVE vs PV e P, così come nella PV vs P.

Aspetti laboratoristici

I pazienti con segni ecografici di PVE presentano concentrazioni seminali di IL-10 (interleuchina 10), (tra le principali citochine ad azione antiinfiammatoria) significativamente ridotte rispetto ai pazienti con quadro ecografico di PV e P. Allo stesso tempo nella PVE vengono riportate concentrazioni seminali di IL-6 (interleuchina 6) e TNF-alfa (Tumor Necrosis Factor), con azione pro-infiammatoria, significativamente aumentate rispetto PV e P. Si realizza pertanto uno sbilanciamento della risposta citochinica nel plasma seminale e la valutazione ecografica risulta importante per definire le categorie diagnostiche (12).

I pazienti con segni ecografici di PVE presentano concentrazioni seminali di fruttosio significativamente ridotte rispetto ai pazienti con sola P, anche le concentrazioni seminali di ROS (radicali liberi di ossigeno) di origine leucocitaria appaiono significativamente aumentate nella PVE rispetto alla P. Tuttavia le concentrazioni seminali di fruttosio e ROS non differiscono in maniera statisticamente significativa tra pazienti con quadro ecografico di PVE mono e bilaterale infiammatoria post microbica, sottolineando l'importanza dell'imaging ecografico per la diagnosi differenziale (13).

Uno studio condotto mediante citometria a flusso sul liquido seminale di pazienti con MAGI ha evidenziato un aumento significativo della percentuale di spermatozoi con DNA frammentato, segnalando l'assenza di differenze statisticamente significative tra i pazienti con MAGI microbica e MAGI infiammatoria (14). I segni ecografici suggestivi per flogosi del tratto prostatovesicolare risultano associati ad aumentata percentuale di spermatozoi con DNA frammentato (15). In particolare l'aumento della percentuale di spermatozoi con frammentazione del DNA di tipo brighter (somma di spermatozoi vitali e non vitali, fortemente ossidati) risulta significativamente elevata nei pazienti con segni ecografici compatibili con flogosi del tratto prostatovesicolare (aumento del valore di picco sistolico di velocità parenchimale, presenza di macrocalcificazioni, zone di iperemia parenchimale). I pazienti con segni ecografici riconducibili a testicolopatia primaria presentano un aumento significativo della concentrazione di spermatozoi con frammentazione del DNA di tipo dimmer (spermatozoi non vitali la cui concentrazione nel liquido seminale risulta associata alla qualità dei parametri spermatici convenzionali) (15).

Infine l'estensione anatomica del processo infiammatorio valutata mediante esame ecografico (P-PV-PVE), dimostra l'associazione con un aumento proporzionale dei valori di viscosità del plasma seminale valutata con metodo di quantificazione originale in viscosimetria ed espressa in centipoise (PVE>PV>P) (16).

Aspetti microbiologici

La presenza di micro e macrocalcificazioni parenchimali prostatiche disposte per contiguità associate a presenza di segni ecografici riconducibili ad aree di ectasia acinare assieme alla rilevazione di aree policicliche endoluminali a carico di una o di entrambe le vescicole seminali rappresentano criteri ecografici statisticamente associati a persistenza di batteriospermia nel liquido seminale (17).

Dopo trattamento farmacologico con levofloxacina (prima scelta nei pazienti con MAGI microbica) la percentuale di eradicazione risulta significativamente più bassa nella categoria ecografica PVE rispetto PV e P. Anche la variante ecografica PVE bilaterale si associa a minore tasso di eradicazione dopo trattamento rispetto la PVE monolaterale (18).

Nei pazienti con infezione da HPV (papillomavirus), la cui frequenza appare significativamente aumentata nei pazienti con MAGI (19) il riscontro di criteri ecografici suggestivi per P maggiormente concentrati in corrispondenza della regione periuretrale e transizionale del parenchima prostatico, rappresenta un elemento diagnostico di ausilio per tale ipotesi diagnostica (20).

La TRUS può essere di ausilio diagnostico anche nel migliorare la specificità diagnostica dell'esame batterioscopico effettuato su secrezione prostatica ottenuta mediante massaggio. Questo test, tradizionalmente conosciuto nella pratica clinica come Test di Meares e Stamey (21), può pertanto essere integrato da TRUS con la finalità di identificare prima del massaggio prostatico aree parenchimali caratterizzate da ectasia acinare e/o micro e macrocalcificazioni (22).

Convenzionalmente la diagnostica microbiologica su liquido seminale viene effettuata in presenza di leucocitospermia (leucociti >1 milione/ml) (23), tuttavia in presenza di segni ecografici suggestivi per flogosi prostatica vescicolare, specie se persistenti, sarebbe opportuno integrare la valutazione della risposta leucocitaria nel liquido seminale, con l'impiego di anticorpi monoclonali, ad esempio CD45 (antigene panleucocitario) capace di caratterizzare la presenza di popolazione linfocitaria, espressione di possibile viraggio della iniziale risposta leucocitaria, fenomeno frequentemente osservato nei processi infiammatori cronicizzati (22).

Aspetti endocrinologici

L'ipogonadismo rappresenta un fattore di rischio per progressione della flogosi prostatica nel modello sperimentale ed anche nella pratica clinica basse concentrazioni di testosterone totale si associano a maggiore frequenza di sintomi riferibili a prostatite cronica (24,25). Sul piano ecografico è stata riportata una frequenza di PVE bilaterale significativamente ridotta nei pazienti con normali concentrazioni sieriche di testosterone totale (26), a suggerire un ruolo protettivo degli androgeni sulla maggiore estensione del processo infiammatorio a più ghiandole sessuali accessorie. Allo stesso tempo, i pazienti eugonadici presentano frequenza significativamente ridotta di variante ecografica fibro-sclerotica di MAGI, associata a peggiore qualità spermatica in risposta a trattamento farmacologico (26).

Nei pazienti con diabete mellito di tipo 2, le vescicole seminali si caratterizzano per minime o assenti variazioni del diametro antero-posteriore dopo atto ejaculatorio e alterato rapporto anatomico tra la porzione prossimale e distale del corpo ghiandolare. Tali modifiche ecografiche sono associate a segni riconducibili alla presenza di neuropatia autonoma, rappresentando pertanto un possibile criterio diagnostico non convenzionale della stessa (10; 27-29).

Aspetti internistici

I pazienti con patologia funzionale del colon (colon irritabile) presentano una frequenza di MAGI significativamente più alta rispetto ai controlli (30), in particolare i pazienti con P cronica batterica associata a IBS (irritable bowel symptoms) presentano una frequenza di MAGI significativamente maggiore rispetto ai pazienti con P cronica batterica senza IBS (31). In questa categoria di pazienti il criterio ecografico suggestivo di MAGI maggiormente rappresentato è la dilatazione del plesso venoso periprostato (32).

Aspetti urologici

I pazienti con varicocele scrotale, presentano frequentemente associata, una concomitante dilatazione del plesso venoso periprostato rilevata mediante ecografia transrettale. E' stato riportato che questi pazienti dopo correzione chirurgica del varicocele, mantengono elevati valori di viscosità seminale (parametro condizionante in particolare il grado di motilità progressiva degli spermatozoi), anche dopo l'intervento, rispetto ai controlli (varicocele scrotale senza dilatazione del plesso venoso periprostato), suggerendo pertanto una minore efficacia della correzione del varicocele sui parametri spermatici in questa categoria di pazienti (33).

Aspetti sessuali

I pazienti con EP (ejaculazione precoce) acquisita, presentano un aumento significativo del diametro anteroposteriore del tratto caudale dell'epididimo e delle vescicole seminali. Tali parametri ecografici mostrano una relazione lineare. I punteggi PEDT (premature ejaculation diagnostic tool) correlano in maniera positiva con gli stessi parametri ecografici (34).

L'impiego di PDE5I (inibitori selettivi della V fosfodiesterasi), farmaci comunemente impiegati per il trattamento della disfunzione erettile, si associa a modifiche ecografiche del tratto prostato vescicolare rappresentate da : aumentata differenza del diametro anteroposteriore delle vescicole seminali rilevato prima e dopo atto ejaculatorio, aumento della frazione di eiezione delle vescicole seminali. Queste modifiche ecografiche correlano con aumento della concentrazione seminale di fruttosio (35).

Conclusioni

La valutazione ecografica della regione epididimaria e prostato vescicolare nei pazienti con MAGI consente al clinico di migliorare la conoscenza dei seguenti aspetti :

- a. Diagnosi di sede;
- b. Distinzione tra forme mono e bilaterali;
- c. Ausilio alla valutazione prognostica (prima dell'inizio del trattamento farmacologico);
- d. Valutazione della possibile persistenza (dopo il trattamento farmacologico);
- e. Conferma dell'avvenuta eradicazione (dopo il trattamento farmacologico);

f. Ausilio nella valutazione diagnostica di possibili infezioni virali.

Bibliografia

1. Doble A, Carter SS. Ultrasonographic findings in prostatitis. *Urol Clin North Am*. 1989 Nov;16:763-72.
2. AIUM (American Institute of Ultrasound in Medicine) Practice Parameter - Ultrasound Evaluation of the Prostate (2015).
3. EAU (European Association of Urology) – Guidelines on Male Infertility (2015).
4. Pezzella A, Barbonetti A, Micillo A, D'Andrea S, Necozone S, Gandini L, Lenzi A, Francavilla F, Francavilla S. Ultrasonographic determination of caput epididymis diameter is strongly predictive of obstruction in the genital tract in azoospermic men with normal serum FSH. *Andrology*. 2013;1:133-8.
5. Lotti F, Maggi M. Ultrasound of the male genital tract in relation to male reproductive health. *Hum Reprod Update*. 2015;21:56-83.
6. Comhaire F, Verschraegen G, Vermeulen L. Diagnosis of accessory gland infection and its possible role in male infertility. *Int J Androl*. 1980;3:32-45.
7. World Health Organization. Manual for the Standardized Investigation and Diagnosis of the infertile couple. Cambridge University Press, Cambridge, New York (1993).
8. Jurewicz M, Gilbert BR. Imaging and angiography in male factor infertility. *Fertil Steril*. 2016 ;105:1432-42.
9. La Vignera S, Vicari E, Condorelli RA, D'Agata R, Calogero AE. Male accessory gland infection and sperm parameters (review). *Int J Androl*. 2011 Oct;34:330-47.
10. Condorelli RA, Vicari E, Calogero AE, La Vignera S. Male accessory gland inflammation prevalence in type 2 diabetic patients with symptoms possibly reflecting autonomic neuropathy. *Asian J Androl*. 2014;16:761-6.
11. La Vignera S. Male accessory gland infections: anatomical extension of inflammation and severity of symptoms evaluated by an original questionnaire. *Andrologia*. 2012;44:739-46.
12. La Vignera S, Calogero AE, Castiglione R, D'Agata R, Giammusso B, Condorelli R, Vicari E. IL-6, TNF α , IL-10 in the seminal plasma of patients with bacterial male accessory gland infections after sequential therapy. *Minerva Urol Nefrol*. 2008;60:141-5.
13. Vicari E, La Vignera S, Castiglione R, Calogero AE. Sperm parameter abnormalities, low seminal fructose and reactive oxygen species overproduction do not discriminate patients with unilateral or bilateral post-infectious inflammatory prostatic-vesiculo-epididymitis. *J Endocrinol Invest*. 2006 ;29:18-25.
14. La Vignera S, Condorelli R, D'Agata R, Vicari E, Calogero AE. Semen alterations and flow-citometry evaluation in patients with male accessory gland infections. *J Endocrinol Invest*. 2012;35:219-23.
15. Lotti F, Tamburrino L, Marchiani S, Maseroli E, Vitale P, Forti G, Muratori M, Maggi M, Baldi E. DNA fragmentation in two cytometric sperm populations: relationship with clinical and ultrasound characteristics of the male genital tract. *Asian J Androl*. 2016 Feb 26. doi: 10.4103/1008-682X.174854. [Epub ahead of print].
16. La Vignera S, Condorelli RA, Vicari E, D'Agata R, Salemi M, Calogero AE. Hyperviscosity of semen in patients with male accessory gland infection: direct measurement with quantitative viscosimeter. *Andrologia*. 2012;44:556-9.
17. La Vignera S, Calogero AE, Arancio A, Castiglione R, De Grande G, Vicari E. Transrectal ultrasonography in infertile patients with persistently elevated bacteriospermia. *Asian J Androl*. 2008 ;10:731-40.
18. La Vignera S, Condorelli RA, Calogero AE, Bellanca S, Salmeri M, Vicari E. Persistence of ultrasound alterations after antibiotic treatment with levofloxacin in patients with male accessory gland infection. *Asian J Androl*. 2012;14:879-83.
19. La Vignera S, Vicari E, Condorelli RA, Franchina C, Scalia G, Morgia G, Perino A, Schillaci R, Calogero AE. Prevalence of human papilloma virus infection in patients with male accessory gland infection. *Reprod Biomed Online*. 2015;30:385-91.

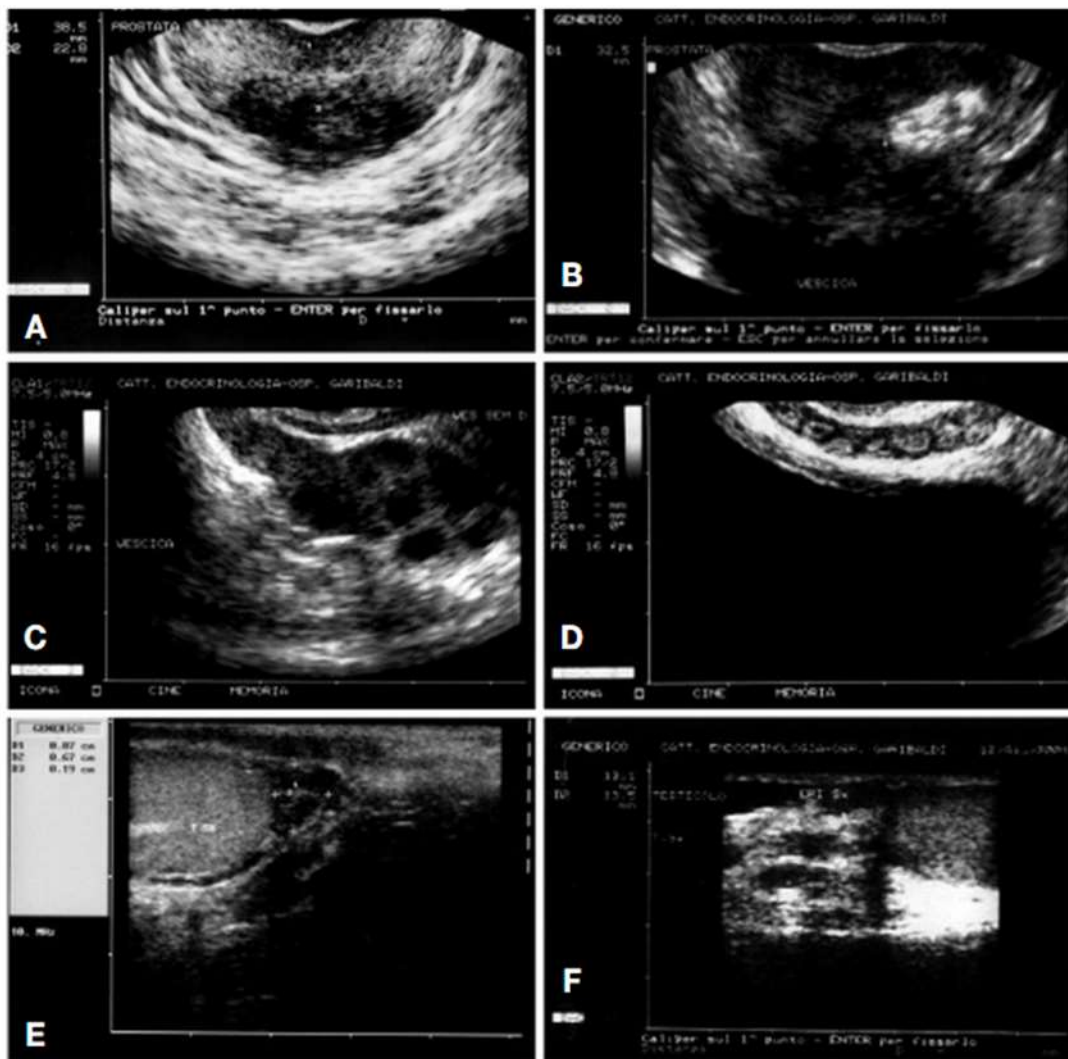
20. Condorelli RA, Vicari E, Mongioi LM, Russo GI, Morgia G, La Vignera S, Calogero AE. Human Papilloma Virus Infection in Patients with Male Accessory Gland Infection: Usefulness of the Ultrasound Evaluation. *Int J Endocrinol*. 2016;2016:9174609.
21. Meares EM, Stamey TA. Bacteriologic localization patterns in bacterial prostatitis and urethritis. *Invest Urol*. 1968;5:492-518.
22. La Vignera S, Condorelli RA, Vicari E, Salmeri M, Morgia G, Favilla V, Cimino S, Calogero AE. Microbiological investigation in male infertility: a practical overview. *J Med Microbiol*. 2014;63:1-14.
23. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. Fifth edition. World Health Organization, Department of Reproductive Health and Research. (2010).
24. Vignozzi L, Morelli A, Sarchielli E, Comeglio P, Filippi S, Cellai I, Maneschi E, Serni S, Gacci M, Carini M, Piccinni MP, Saad F, Adorini L, Vannelli GB, Maggi M. Testosterone protects from metabolic syndrome-associated prostate inflammation: an experimental study in rabbit. *J Endocrinol*. 2012;212:71-84.
25. Lee JH, Lee SW. Testosterone and Chronic Prostatitis/Chronic Pelvic Pain Syndrome: A Propensity Score-Matched Analysis. *J Sex Med*. 2016;13:1047-55.
26. Condorelli RA, Calogero AE, Vicari E, Favilla V, Cimino S, Russo GI, Morgia G, La Vignera S. Male accessory gland infection: relevance of serum total testosterone levels. *Int J Endocrinol*. 2014;2014:915752.
27. La Vignera S, Condorelli RA, Vicari E, D'Agata R, Calogero AE. Seminal vesicles and diabetic neuropathy: ultrasound evaluation in patients with couple infertility and different levels of glycaemic control. *Asian J Androl*. 2011;13:872-6.
28. La Vignera S, Condorelli RA, Di Mauro M, D'Agata R, Vicari E, Calogero AE. Seminal vesicles and diabetic neuropathy: ultrasound evaluation. *J Androl*. 2011;32:478-83.
29. La Vignera S, Vicari E, Condorelli R, D'Agata R, Calogero AE. Ultrasound characterization of the seminal vesicles in infertile patients with type 2 diabetes mellitus. *Eur J Radiol*. 2011;80:64-7.
30. Vicari E, La Vignera S, Arcoria D, Condorelli R, Vicari LO, Castiglione R, Mangiameli A, Calogero AE. High frequency of chronic bacterial and non-inflammatory prostatitis in infertile patients with prostatitis syndrome plus irritable bowel syndrome. *PLoS One*. 2011;6:18647.
31. Vicari E, Calogero AE, Condorelli RA, Vicari LO, La Vignera S. Male accessory gland infection frequency in infertile patients with chronic microbial prostatitis and irritable bowel syndrome: transrectal ultrasound examination helps to understand the links. *J Androl*. 2012;33:404-11.
32. Vicari E, Calogero AE, Condorelli RA, Vicari LO, La Vignera S. Male accessory gland infection frequency in infertile patients with chronic microbial prostatitis and irritable bowel syndrome. *Int J Androl*. 2012;35:183-9.
33. Condorelli RA, Calogero AE, Mongioi' L, Vicari E, Russo GI, Lanzafame F, La Vignera S. Varicocele and concomitant dilation of the periprostatic venous plexus: effects on semen viscosity sperm parameters. *J Endocrinol Invest*. 2016;39:543-7.
34. La Vignera S, Condorelli RA, Vicari E, Favilla V, Morgia G, Calogero AE. Acquired premature ejaculation and male accessory gland infection: relevance of ultrasound examination. *Asian J Androl*. 2016;18:769-72.
35. La Vignera S, Condorelli RA, Vicari E, Lotti F, Favilla V, Morgia G, Maggi M, Calogero AE. Seminal vesicles and diabetic neuropathy: ultrasound evaluation after prolonged treatment with a selective phosphodiesterase-5 inhibitor. *Andrology*. 2013;1:245-50.

Tabella 1. Criteri ecografici nella diagnosi di MAGI.

Prostatite	1. Asimmetria del volume ghiandolare prostatico 2. Riscontro di area/e parenchimali a bassa ecogenicità 3. Riscontro di area/e parenchimali ad alta ecogenicità 4. Dilatazione del plesso venoso periprostatico 5. Riscontro di area/e di ectasia acinare nel contesto del parenchima 6. Area/e di aumentata vascolarizzazione nel contesto del parenchima
Vescicolite	1. Aumento mono o bilaterale del diametro anteroposteriore (>14 mm) 2. Riduzione mono o bilaterale del diametro anteroposteriore (<7 mm) 3. Asimmetria del diametro anteroposteriore > 2.5 mm tra VS destra e sinistra (7-14 mm) 4. Ispessimento e/o presenza di calcificazioni della parete ghiandolare 5. Presenza di aree policicliche endoluminali separate da setti iperecogeni 6. Rapporto tra fondo e corpo ghiandolare >2.5 7. Rapporto tra fondo e corpo ghiandolare < 1 8. Diametro anteroposteriore immodificato dopo atto ejaculatorio
Epididimite	1. Aumento mono o bilaterale del diametro anteroposteriore (>12 mm) del tratto cefalico e/o del tratto caudale (>6 mm) 2. Presenza di microcisti nel contesto del tratto cefalico e/o caudale, mono o bilaterale 3. Riscontro di area/e parenchimali a bassa o elevata ecogenicità 4. Idrocele mono o bilaterale 5. Rapporto tra diametro trasverso del polo superiore vs polo inferiore del tratto cefalico > 1 6. Diametro anteroposteriore del tratto caudale immodificato dopo atto ejaculatorio

Legenda : necessari almeno 2 criteri per ogni categoria.

Figura 1. Immagini ecografiche suggestive di MAGI.



Legenda : Nel riquadro A aree di alterata omogeneità nel contesto del parenchima prostatico, nel riquadro B presenza di grossolana calcificazione disposta in sede lobare anteriore destra, nel riquadro C vescicola seminale con aree policicliche endoluminali separate da setti iperecogeni, nel riquadro D vescicola seminale con riduzione significativa del diametro anteroposteriore, nel riquadro E tratto caudale dell'epididimo con aumento di diametro anteroposteriore, nel riquadro F tratto cefalico dell'epididimo con echi grossolanamente disomogenei.

Il ruolo della ecografia transrettale nella diagnostica dell'infertilità

L'ecografia prostatico-vescicolare transrettale (*transrectal ultrasound*, TRUS) è una metodica efficace nella diagnostica delle vie seminali distali. Questo strumento diagnostico ha ormai quasi del tutto soppiantato la deferento-vesciculografia, un tempo considerata il gold standard per la diagnosi di ostruzione delle vie seminali distali, per via della sua maggiore tollerabilità, non sottoponendo il paziente alla esposizione radiologica o al rischio di stenosi secondarie iatrogene dei deferenti. E' una indagine minimamente invasiva, ripetibile ed economica.

La TRUS può essere indicata nelle seguenti condizioni:

- emospermia
- eiaculazione dolorosa o fastidiosa
- uretriti/prostatiti
- sintomi ostruttivi o irritativi delle vie urinarie
- pregressi interventi sull'apparato urogenitale basso
- modificazioni qualitative o quantitative dell'eiaculato (oligoposia)
- aneiaculazione
- eiaculazione retrograda
- anomalie palpatorie prostatiche
- ipospadia
- stenosi del meato urinario
- oligo-asteno-teratozoospermia
- azoospermia
- leucospermia persistente

La sonda da utilizzare è una endocavitaria biplanare ad alta risoluzione con frequenza da 6,5 a 7,5 mHz. Come preparazione alla TRUS è sempre opportuno che il paziente esegua una enteroclisma ed evacui prima della procedura, allo scopo di preparare l'ampolla rettale all'esame. La vescica non deve essere sovradistesa. Inoltre è auspicabile che il paziente eiaculi poco prima dell'esame in quanto ciò permette di standardizzare le immagini ecografiche, specialmente delle vescicole seminali, il cui aspetto e le cui dimensioni sono correlate al periodo di astinenza sessuale. In tali condizioni i dotti eiaculatori dovrebbero essere non identificabili risultando visibili nel caso in cui siano affetti da processi ostruttivi. Se l'ostruzione è a livello iuxtauretrale, quindi distale, questi saranno spiccatamente anecoici e dilatati in toto, mentre il tratto dilatato sarà più breve o assente in caso di ostruzione più prossimale o extraprostatica.

In particolare la TRUS è sempre da consigliare nei casi di sospetta ostruzione delle vie seminali distali che comprendono le vescicole seminali, le ampolle deferenziali e i dotti eiaculatori. Le ostruzioni anatomiche della via seminale distale di rilievo clinico e con possibilità di ricanalizzazione sono quasi sempre localizzate ai dotti eiaculatori. Esse si riscontrano nell'1-5%

degli uomini infertili e nel 5-10% degli azoospermici e riconoscono cause congenite e acquisite. Le cause congenite di ostruzione dei dotti eiaculatori sono essenzialmente costituite da patologie cistiche e condizioni di atresia-aplasia totale o parziale della via seminale distale. Le cause acquisite di ostruzione dei dotti deferenti sono rappresentate da infezioni aspecifiche o specifiche, concrezioni litiasiche o detriti cellulari incuneati nei dotti e danni iatrogeni, per lo più in seguito a interventi endoscopici nell'uretra prostatica.

Segno tipico della ostruzione distale è la oligoposia, cioè la riduzione del volume dell'eiaculato (< 1,5 mL), con bassa concentrazione di fruttosio nel liquido seminale e pH usualmente acido. Tipicamente il volume testicolare e i livelli plasmatici dell'ormone follicolostimolante (FSH), della inibina B e del testosterone sono nella norma, mentre non è rara un'associazione con disturbi eiaculatori di tipo algico e, raramente, con disturbi minzionali.

Fondamentale è identificare e documentare le cosiddette "cisti prostatiche" del carrefour uro seminale mediane (residui dei dotti di Müller) o paramediane (residui del dotto di Wolff). La discriminazione diagnostica di queste cisti risulterà importante per approntare il trattamento chirurgico più adatto:

- TURED (*resezione transuretrale dei dotti eiaculatori*), prima linea nel trattamento delle ostruzioni dei dotti eiaculatori postflogistiche o da cisti intraprostatiche comunicanti con la via seminale.
- TRUCA (*aspirazione e sclerotizzazione ecoguidata di cisti prostatiche*), utilizzata nelle cisti prostatiche non comunicanti e ostruenti i dotti eiaculatori.

Se effettuate correttamente queste tecniche garantiscono un immediato aumento del volume dell'eiaculato e la risoluzione dei disturbi eiaculatori. Anche lo spermioγραμμα migliora in poco tempo per quanto riguarda concentrazione e mobilità degli spermatozoi. Alcuni studi propongono di associare alla TRUS la vesciculodeferentografia per via transperineale o transrettale ecoguidata tramite puntura con ago sottile di cisti prostatiche o dei DE dilatati o delle vescicole seminali ectasiche (Jarow 1994, Franco 2009). In questo modo, secondo gli autori, è possibile abbinare lo studio diagnostico al momento terapeutico ed evitare il ricorso alla tradizionale vesciculodeferentografia per via scrotale.

Quando è un processo flogistico il responsabile dell'ostruzione, può essere evidente un orletto iperecogeno periduttale e talvolta si identificano delle formazioni litiasiche all'interno del lume del dotto eiaculatore. Nel caso si sospetti una anomalia dello svuotamento del tratto ampullo-vescicolare come causa della dispermia, alcuni autori suggeriscono l'esecuzione di una TRUS prima (con 4-5 gg di astinenza sessuale) e poco dopo l'eiaculazione (ecografia dinamica dei dotti eiaculatori). Ciò consente di visualizzare la via seminale distale, evidenziandone una eventuale stenosi, e di confermare il sospetto disturbo dello svuotamento allorché, dopo l'eiaculazione, i diametri antero-posteriori delle vescicole seminali appaiano aumentati rispetto a prima dell'eiaculazione.

Esistono anche dei lavori che, nell'ambito della diagnostica della azoospermia ostruttiva, e nello specifico dei difetti delle vescicole seminali (agenesia e ipoplasia), mettono in comparazione i risultati ottenuti tramite la Risonanza Magnetica con quelli ottenuti tramite l'ecografia transrettale, giungendo alla conclusione che questi siano pressoché sovrapponibili, con il vantaggio che la TRUS rappresenta una metodica più economica e ripetibile. Gli autori

suggeriscono di integrare l'esame diagnostico con una RM soltanto qualora il responso della TRUS non dovesse dimostrarsi dirimente.

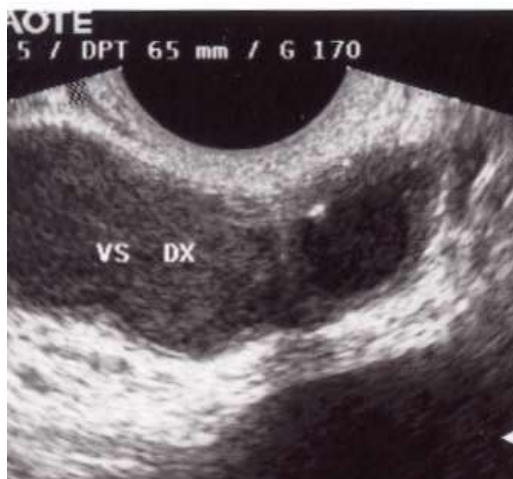


Fig 1



Fig 2



Fig 3

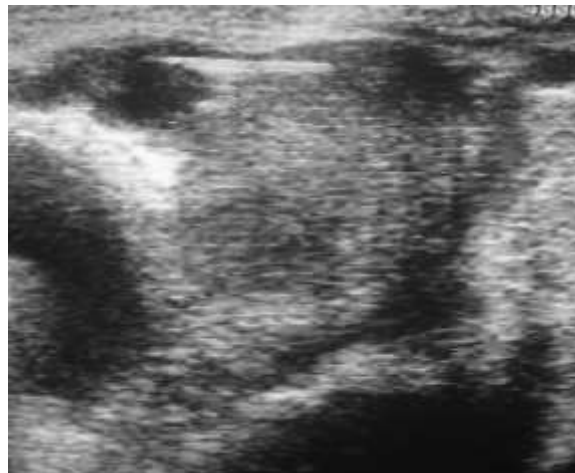


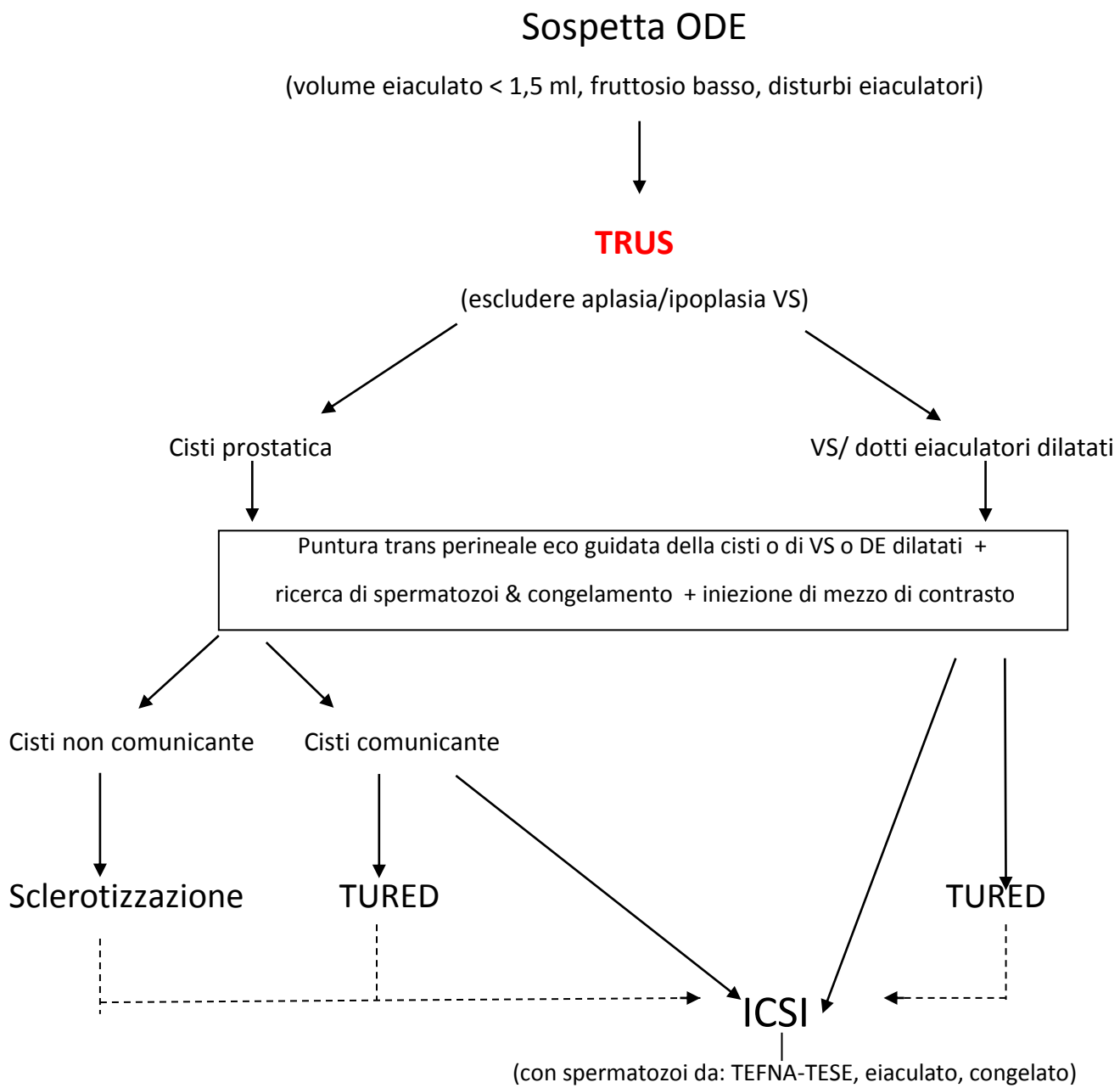
Fig 4

Figura 1: TRUS, dilatazione vescicola seminale di destra

Figura 2: TRUS, dilatazione vescicola seminale e dotto eiaculatore di destra

Figura 3: TRUCA, puntura PCN transperineale sotto guida ecografica transrettale

Figura 4: TRUCA, immagine ecografica transrettale



Algoritmo diagnostico-terapeutico nelle ostruzioni dei dotti eiaculatori

Bibliografia:

- Is transrectal ultrasonography a reliable diagnostic approach in ejaculatory duct sub-obstruction?
Colpi GM, Negri L, Nappi RE, Chinea B.
Hum Reprod. 1997 Oct;12(10):2186-91
- Ultrasonographic evaluation of patients with male accessory gland infection.
La Vignera S, Calogero AE, Condorelli RA, Vicari LO, Catanuso M, D'Agata R, Vicari E.
Andrologia. 2012 May;44 Suppl 1:26-31
- Male accessory gland infection frequency in infertile patients with chronic microbial prostatitis and irritable bowel syndrome: transrectal ultrasound examination helps to understand the links.
Vicari E, Calogero AE, Condorelli RA, Vicari LO, La Vignera S.
J Androl. 2012 May-Jun;33(3):404-11
- Transrectal ultrasonography in infertile patients with persistently elevated bacteriospermia.
La Vignera S, Calogero AE, Arancio A, Castiglione R, De Grande G, Vicari E.
Asian J Androl. 2008 Sep;10(5):731-40
- The performance of transrectal ultrasound in the diagnosis of seminal vesicle defects: a comparison with magnetic resonance imaging.
Chen X, Wang H, Wu RP, Liang H, Mao XP, Mao CQ, Zhu HZ, Qiu SP, Wang DH
Asian J Androl. 2014 Nov-Dec;16(6):907-11
- Evaluation of the azoospermic patient.
Jarow JP, Espeland MA, Lipshultz LI.
J Urol 1989; 142: 62-5
- Transrectal ultrasound in the evaluation of men with low volume azoospermia.
Worischek JH, Parra RO.
J Urol 1993; 149: 1341-4.
- Seminal vesicles ultrasound features in a cohort of infertility patients.
Lotti F, Corona G, Colpi GM, Filimberti E, Innocenti SD, et al.
Hum Reprod 2012; 27: 974-82

- Ricanalizzazioni delle vie seminali

Franco G

In: "Infertilità umana - Principi e Pratica"; La Sala GB, Colpi G. Ed: EDRA, Milano, 2014; 423:431

- Treatment of ejaculatory duct obstruction: a new algorithm

Franco G, Leonardo C, Dente D, et al.

J Urol 181:735A, 2009

- Le azoospermie

Franco G, Gentile V

In "Medicina della riproduzione umana"; Borini A, Ubaldi FM. Ed. Cic Ed. internazionali, Roma 2010; 597:606