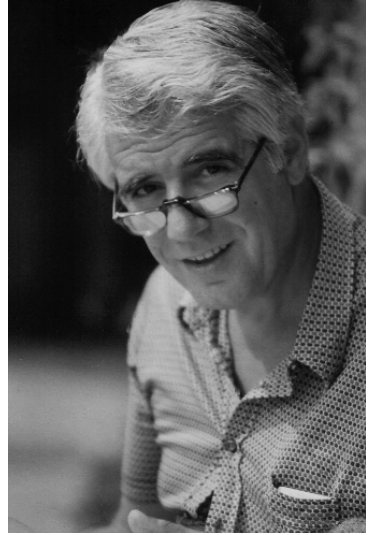


l'infertilità
maschile
oggi

male
infertility
today

editor: Giovanni M. Colpi

2 / 2002



Alberto Zanollo

(09-09-1933 / 09-09-2001)

*Al mio Maestro di scienza
e di vita*

Giovanni M. Colpi

PRESENTAZIONE

Il secondo volume di questa collana si apre con un rapido e pratico algoritmo diagnostico, estremamente utile specie per chi approccia per le prime volte l'infertilità maschile.

Nel secondo articolo si approfondiscono gli aspetti immunologici, uno dei temi più scottanti nella clinica del maschio infertile: l'indispensabilità di tests immunologici nella routine seminologica è ben messa in evidenza, per evitare grossolani errori diagnostici e conseguenti pericolose perdite di tempo per coppie altrimenti considerate inspiegabilmente infertili.

Le tecniche di crioconservazione degli spermatozoi recuperati chirurgicamente e la loro validità ai fini di ICSI sono riportate nel terzo capitolo: la loro importanza risulta essere ancora più emergente nelle nazioni dove non è consentito l'uso eventuale del seme di donatore in caso di mancato recupero chirurgico, come già adesso (prima ancora della imminente legge sull'argomento) nei centri pubblici italiani.

Sono stati poi inseriti due lavori sulla fisiologia e la fisiopatologia dell'epididimo ad opera rispettivamente di un famoso clinico e di un autorevolissimo ricercatore, con un aggiornamento delle nozioni in vista di una contraccezione maschile di cui si parla da due decenni ma che resta tuttora sostanzialmente priva di applicazioni sul piano clinico. Non poteva, infine, mancare un articolo sull'esame basilare per il giudizio di fertilità: l'analisi del seme e la ricerca degli indici di fertilità, con particolare riguardo alle tecniche computerizzate (CASA).

Anche questo volume si chiude con una appendice su un argomento di laboratorio: vengono illustrate le tecniche ed il significato del post-coital test e dei tests di penetrazione sperma-muco in vitro, esami nell'ultimo decennio piuttosto trascurati in campo ginecologico e che sembrano oggi riprendere una loro dignità nelle mani di vari andrologi clinici.

Guido Piediferro

Ringraziamenti: Ringrazio i miei collaboratori dr. Gianfranco Contalbi, dr. Alessandra Drovanti e dr. Cristina Grugnetti per la revisione dei testi.

Giovanni M. Colpi

INDICE

INDAGINI NELL'INFERTILITÀ MASCHILE

William F. Hendry 05

ASPETTI IMMUNOLOGICI DELL'INFERTILITÀ MASCHILE

Franco Dondero, Francesco Lombardo, Loredana Gandini, Andrea Lenzi 11

FREEZING AND THAWING OF SPERMATOZOA SURGICALLY RETRIEVED FOR ICSI: TECHNIQUES AND RESULTS

Manuel Gil-Salom & Josep Romero 23

IL RUOLO DELL'EPIDIDIMO NELL'INFERTILITÀ

Robert Schoysman 37

THE EPIDIDYMIS AS A TARGET FOR MALE CONTRACEPTION

Trevor G. Cooper 41

SEMEN ANALYSIS AND ESTIMATING OF FERTILITY POTENTIAL

Hans-Jürgen Glander 59

APPENDICE

POST COITAL TEST E TESTS DI PENETRAZIONE IN VITRO

Patrizia Sagone & Daniela Giacchetta 73

INDAGINI NELL'INFERTILITÀ MASCHILE

William F. Hendry

Consultant Urologist, St. Bartholomew's and Royal Hospitals, London

Introduzione

Il primo semplice esame da controllare in una coppia sterile è l'analisi del liquido seminale ed anche il dato più suscettibile di critiche. In presenza di pochi spermatozoi, troppo lenti e in caso di elevata percentuale di forme anomale, è facile riversare tutta la responsabilità dell'infertilità di coppia sul maschio, con pochi o nessuno sforzo di definire le cause sottostanti. Il "fattore maschile" è troppo spesso ritenuto responsabile dell'infertilità altrimenti inspiegabile, rimanendo quindi in molti casi non ulteriormente esaminato, investigato e trattato, e considerato da molti al di là di ogni serio sforzo terapeutico. L'indagine sull'infertilità maschile (*Hendry et al., 1973*) richiede infatti un dettagliato esame clinico con valutazione di fattori endocrinologici ed immunologici, così come una determinazione dei meccanismi termoregolatori locali e, in casi selezionati, la verifica della pervietà delle vie seminali. Sempre più spesso si reperta un fattore maschile correggibile in pazienti indirizzati alla fecondazione assistita o ai quali non sono state date speranze, addirittura inviati alla facile opzione dell'inseminazione da donatore. Un responsabile approccio all'infertilità di coppia dovrebbe includere una metodica e sistematica analisi del partner maschile.

Anamnesi

La storia clinica dovrebbe includere informazioni circa l'età, l'occupazione e la religione del

Versione italiana a cura di A. Drovanti & G. Piediferro

paziente e della moglie, da quanto tempo ricercano una gravidanza, insieme con la frequenza e l'adeguatezza dei rapporti sessuali. Andrebbero anche valutate le condizioni mediche generali attuali, specialmente la presenza di possibili disordini endocrini, e l'assunzione di farmaci o l'esposizione ad agenti chimici tossici (*Beeley, 1985*). Importante è evidenziare all'anamnesi una pregressa tubercolosi, una parotite contratta in età adulta, malattie veneree, anomalie della discesa dei testicoli nello scroto o interventi di ernioplastica. Dati rilevanti sono anche l'assunzione di tabacco, alcool e farmaci.

Esame obiettivo

Vanno valutate la costituzione fisica, la distribuzione dei peli, e il tipo di mutande usate. Il paziente va visitato in piedi in condizioni di buona illuminazione per ricercare un possibile varicocele. Si esaminano il pene, il prepuzio e il meato uretrale esterno. Si valutano quindi i testicoli, notandone le dimensioni e la consistenza; è utile annotare il volume di ogni testicolo, facendo particolarmente attenzione ad ogni asimmetria, mediante misurazione ecografica (*Lenz et al., 1993*) o con l'orchidometro di Prader. Gli epididimi e i vasi deferenti vengono palpati singolarmente, ricercando distensioni o riduzioni della consistenza che possono essere indicativi di ostruzione (*Hendry et al., 1982*). La cute dello scroto è esaminata per evidenziare segni di irritazione dovuti a dermatite eczematosa, che può condurre ad ispessimento o iperemia del derma (*Hendry & Munro, 1990*). Infine il paziente

viene posto in decubito laterale sinistro per esaminare la prostata e le vescicole seminali; se è presente una consistenza ridotta suggestiva di prostatite-vesciculite, va eseguito un delicato massaggio prostatico per ottenere secreto prostatico da porre in un medium di trasporto per accertamenti microbiologici, che includono una coltura con i tests di sensibilità.

Ecografia transrettale

Essa fornisce un utile supplemento all'esame digitale rettale, e può identificare con accuratezza malformazioni congenite come cisti dei dotti di Müller così come ostruzioni acquisite dei dotti eiaculatori (*Pryor & Hendry, 1991*).

Termografia scrotale

Lo scroto ha normalmente una temperatura di 5 gradi inferiore al resto del corpo e un varicocele significativo può essere scoperto valutando le anomalie termografiche che esso produce. La termografia (*Jones & Hendry, 1979*) può essere molto utile nel chiarire dubbi sulla possibile presenza di un piccolo varicocele o circa il significato di ogni vena residua ad un trattamento chirurgico o embolizzante, e per decidere se il varicocele è unilaterale o bilaterale.

Analisi del liquido seminale

È opinione corrente che una normale concentrazione di spermatozoi dovrebbe essere superiore ai 20 milioni/ml, di cui più del 30% dovrebbe avere motilità attiva entro quattro ore dalla raccolta del campione, con un volume di liquido seminale di almeno 1,5 ml. Indipendentemente da quanto riportato in testi più vecchi, è sempre prudente analizzare almeno altri due campioni in un laboratorio

conosciuto e fidato (per i dettagli sulle tecniche seminologiche validate vedi il Manuale del WHO). Il paziente viene istruito sulla raccolta del campione seminale mediante masturbazione, dopo almeno tre giorni di astinenza, direttamente in un appropriato contenitore di plastica sul quale viene scritto l'orario di produzione del campione.

Il condom per la raccolta del campione seminale dovrebbe essere evitato, a meno che esso non sia specificamente prodotto per la raccolta del seme per esame: quest'ultimo è talvolta necessario per pazienti ebrei ortodossi. L'analisi del campione deve essere effettuata entro due ore e deve comprendere la valutazione del volume dell'eiaculato, della concentrazione di spermatozoi e della loro motilità, con la percentuale di forme morfologicamente normali.

Dovrebbe essere segnalato il numero e il tipo di cellule nell'eiaculato: un aumento di leucociti polimorfonucleati può essere indicativo di una prostatite, e questo è provato essere correlato ad una alterata funzionalità degli spermatozoi (*Aitken et al., 1995*). L'analisi biochimica del plasma seminale ha evidenziato poche differenze nel contenuto di elettroliti tra pazienti fertili ed infertili. Comunque la misurazione del pH e della concentrazione di zinco nel secreto prostatico o nella prima frazione dell'eiaculato può fornire informazioni in pazienti con una ridotta motilità degli spermatozoi o con prostatite.

Il fruttosio è assente nel caso di agenesia dei vasi deferenti o delle vescicole, o nelle ostruzioni dei dotti eiaculatori; il volume dell'eiaculato è usualmente in questi casi ridotto (inferiore ad 1 ml), e il pH è acido (inferiore a 7). In presenza di una ridotta motilità, è importante una rivalutazione del campione seminale appena prodotto in ospedale e subito esaminato nel laboratorio di seminologia. In tale sede deve essere garantita al

paziente la possibilità di raccogliere il campione in un ambiente sufficientemente confortevole. Si possono anche fare una valutazione della liquefazione dello sperma, un dettagliato esame batteriologico e uno studio mediante microscopia elettronica. Occasionalmente possono essere scoperte anomalie dei microtubuli o assenza dei bracci di dineina nella coda degli spermatozoi (*Ryder et al., 1990*). Si può anche osservare agglutinazione degli spermatozoi, ma questo è un fenomeno non-specifico e non dovrebbe essere interpretato come una prova di anticorpi agglutinanti gli spermatozoi.

Test immunologici

Anticorpi antispermatozoi legati sugli spermatozoi stessi del paziente sono più facilmente individuati usando come marcatori o globuli rossi sensibilizzati nel Direct Mixed Antiglobulin Reaction (MAR) test (*Jager et al., 1978*) o, dopo lavaggio per allontanare completamente le immunoglobuline libere presenti nel plasma seminale, attraverso l'aggiunta di immunobeads (IB test diretto) (*Clarke et al., 1985*). Sebbene il primo test abbia il vantaggio di essere rapido, attendibile e facile da leggere (*Stedronska & Hendry, 1983*), questo è in realtà utile solo per l'individuazione di IgG, mentre con l'IB test specifico per classe, può essere identificata la classe di anticorpi legata agli spermatozoi. Di conseguenza, benchè il Mar test sia un eccellente test di screening, un risultato positivo potrebbe essere verificato ulteriormente con l'IB test (*Rajah et al., 1992*). In aggiunta, la quantità di anticorpi liberi dovrebbe essere misurata nel siero del paziente e nel plasma seminale mediante il Tray Test Agglutination (TAT) (*Friberg, 1974*), che utilizza spermatozoi da donatore e microquantità di reagente; questa metodica ha rimpiazzato il vecchio test macroscopico del Gelatin Agglutination test (GAT).

Post-coital test

Per valutare la potenziale fertilità dell'uomo, si dovrebbe dimostrare che i suoi spermatozoi possono dare luogo ad un post-coital test (PCT) normale nel muco ovarico normale della sua partner. Il test è definito normale in presenza di più di cinque spermatozoi mobili per HPF (High Resolution Field). Naturalmente, il PCT potrebbe essere inadeguato per diverse ragioni, ma la coesistenza di una conta spermatica normale e di un PCT persistentemente inadeguato è fortemente suggestiva dell'esistenza di anticorpi antispermatozoi, presenti nel marito nella maggior parte dei casi (*Kremer et al., 1978*). Il partner con anticorpi può essere identificato con la ricerca diretta di anticorpi spermatozoi, e la significatività di questi dovrebbe essere confermata con il test muco cervicale - spermatozoi usando spermatozoi di donatore e muco di donatrice come controlli (*Morgan et al., 1977*).

Dosaggi ormonali

Una spermatogenesi normale richiede tassi adeguati di FSH e LH, insieme a un testosterone elevato a livello del testicolo. Una spermatogenesi normale mantiene un feed back negativo per l'FSH, mentre livelli normali di testosterone in circolo controllano la produzione di LH. Una spermatogenesi insufficiente dovuta a una mancanza di gonadotropine è rara, ma è importante riconoscere questi casi in quanto rispondono bene alla terapia sostitutiva. Molto più spesso la causa è un difetto primitivo della spermatogenesi, che può essere riconosciuto da livelli di FSH usualmente elevati in questi casi. Infatti, la combinazione di azoospermia, testicoli di volume ridotto e valori di FSH molto elevati sono diagnostici di un importante deterioramento o della assenza della spermatogenesi per i quali non esiste un tratta-

mento (*Pryor et al., 1976*). La situazione è più complessa quando uno o entrambi i testicoli sono di volume accettabile e il livello di FSH è normale o solo di poco elevato (*Martin-du-Pan & Bischof, 1995*): una esplorazione scrotale e una biopsia testicolare sono necessari per valutare la spermatogenesi e escludere un'ostruzione. In caso di oligozoospermia l'ostruzione potrebbe essere unilaterale e bisognerebbe ricordare che un testicolo atrofico può far elevare il livello sierico di FSH anche quando è presente una spermatogenesi normale nel testicolo controlaterale. Esistono considerevoli variazioni, e non solo diurne, nei livelli sia di gonadotropine che di testosterone e questi ultimi andrebbero ridossi se esiste qualsiasi dubbio riguardo il loro significato.

La coesistenza di impotenza e infertilità impone un'indagine endocrinologica completa. Se i livelli di testosterone sono bassi, la valutazione dei livelli delle gonadotropine, dopo stimolazione con LHRH se necessario, permette di porre una diagnosi differenziale di causa primaria ipotalamica, ipofisaria o testicolare. Un elevato livello di prolattina dovrebbe essere interpretato con grande cautela: essa può essere aumentata dallo stress e da farmaci come le fenotiazine. Tuttavia livelli persistentemente elevati di prolattina nel siero in prelievi seriati, specialmente se associati a una parziale impotenza, possono essere indicativi di tumore ipofisario.

I livelli di ormoni tiroidei e adreno-corticoidei andrebbero misurati se esiste qualche sospetto clinico di anomalie.

Analisi cromosomica

È un'analisi importante nei pazienti con infertilità. I cromosomi somatici possono essere valutati da prelievo buccale o dal sangue periferico, e casi di sindrome di Klinef-

ter o di traslocazioni bilanciate possono essere repertate tra maschi subfertili. Lo studio della meiosi dei cromosomi può evidenziare considerevoli variazioni dalla norma, incluse traslocazioni, bassa frequenza chiasmatica e asinapsi, e presenza di cromosomi soprannumerari (*Hendry et al., 1976*). Pazienti con tali anomalie rispondono poco alle terapie, sebbene si siano ottenute alcune gravidanze: ai pazienti con dimostrate anomalie cromosomiche dovrebbe quindi essere proposta una consulenza genetica, e ad ogni gravidanza ottenuta consigliata la diagnosi prenatale per evidenziare possibili anomalie fetali.

Altri test

Qualsiasi malattia sistemica può affliggere il maschio infertile, ed è sensato valutare un emocromo completo, l'urea plasmatica, i livelli della glicemia, la funzione epatica e l'acido folico, e compiere le analisi di routine come parte di un check-up generale. L'anemia falciforme dovrebbe essere ricercata nei pazienti di origine africana.

Biopsia testicolare

In casi accuratamente selezionati è importante escludere la presenza di ostruzioni unilaterali o bilaterali nel momento stesso in cui si valuta la spermatogenesi; la biopsia testicolare è infatti usualmente associata con l'esplorazione scrotale, e con la deferentografia. La biopsia testicolare va eseguita di preferenza in anestesia generale e il prelievo dovrebbe essere fissato in soluzione di Bouin (non in formalina). Il sistema di Johnsen (*Johnsen, 1970*) prevede la valutazione della spermatogenesi utilizzando uno score medio compreso tra 0-10: i pazienti che rispondono bene al trattamento hanno uno score significativamente più alto degli altri.

Tuttavia si possono ottenere gravidanze da pazienti con uno score medio basso, fino a 6.0 (Hendry, 1992). Ciò include la maggior parte dei pazienti con moderata o severa oligozoospermia, ed indica che tale sistema di valutazione ha un valore prognostico limitato per i singoli pazienti. La biopsia è inutile in pazienti con testicoli piccoli e livelli di FSH molto elevati.

Conclusioni

Una volta che queste indagini sono completate, il paziente e la sua partner devono essere informati se c'è una anomalia specifica che può essere corretta o se sono più appropriati provvedimenti non specifici. Questa decisione è raramente semplice. I fattori negativi dovrebbero essere identificati e rimossi: questi includono un eccessivo utilizzo di alcool o fumo, e l'effetto negativo di droghe assunte dal paziente o di farmaci somministrati a scopo terapeutico. La temperatura del testicolo è un fattore critico importante per una sua normale funzione, e la correzione di difetti che interferiscono con la normale regolazione termica scrotale può condurre a un significativo miglioramento della qualità dello sperma. Il varicocele è la patologia che più frequentemente provoca tali problemi,

specialmente quando il testicolo destro è atrofico. Le infezioni genitali sono associate a un deterioramento della motilità dello sperma, probabilmente dovuto al rilascio di radicali superossidi, e un trattamento prolungato con antibiotici appropriati può correggere il difetto. La presenza di anticorpi antispermatozoi riduce la capacità di penetrazione nel muco cervicale, e può condurre ad oligozoospermia se è associata una orchite autoimmune; questo fenomeno può interferire con la fertilità, ma può rispondere ad una appropriata terapia con corticosteroidi. L'ostruzione testicolare, se unilaterale, può ridurre l'output di spermatozoi e stimolare la produzione di anticorpi antispermatozoi, o comportare sterilità se bilaterale: le moderne tecniche di microchirurgia permettono una accurata ricostruzione chirurgica con un alta probabilità di successo funzionale. Vi sono molte coppie in cui un difetto specifico non può essere identificato: questo non significa che un'accurata ricerca non debba essere comunque eseguita, dal momento che la correzione di un eventuale difetto può condurre a una definitiva ed economicamente vantaggiosa soluzione dei loro problemi di infertilità. Inoltre, con i moderni metodi di riproduzione assistita è possibile ora offrire una opportunità a quelle coppie a cui precedentemente non era data alcuna speranza.

BIBLIOGRAFIA

■ **Aitken RJ, Buckingham DW, Brindle J, Gomez E, Baker HWG, Irvine DS.**

Analysis of sperm movement in relation to the oxidative stress created by leukocytes in washed sperm preparations and seminal plasma. *Human Reprod* 10: 2061-2071, 1995.

■ **Clarke GN, Elliot PJ, Smaila C.**

Detection of antibodies in semen using the immunobead test; a survey of 813 consecutive patients. *Am J Reprod Immunol* 7: 118-123, 1985.

■ **Beeley L.**

The unwanted effects of drugs on the male reproductive system.

In: *Textbook of Genito-Urinary Surgery*, HN Whitfield & WF Hendry (eds), Edinburgh, Churchill Livingstone, p.1198-1203, 1985.

■ **Friberg J.**

A simple and sensitive micro-method for demonstration of sperm agglutinating Antibodies in serum from infertile men and women.

Acta Obstet Gynecol Scand 36 (Suppl.): 21-29, 1974.

■ **Hendry WF.**

Effects of left varicocele ligation in subfertile males with absent of atrophic right testes.

Fertil Steril 57: 1342-1343, 1992.

■ **Hendry WF & Munro DD.**

Wash leather scrotum (scrotal dermatitis): a treatable cause of male infertility.

Fertil Steril 53: 379-381, 1990.

■ **Hendry WF, Parslow JM, Stedronska J, Wallace DM.**

The diagnosis of unilateral testicular obstruction in subfertile males.

Br J Urol 54: 774-779, 1982.

■ **Hendry WF, Polani PE, Pugh RC, Somerville IF, Wallace DM.**

200 infertile males: correlation of chromosome, histological, endocrine and clinical studies.

Br J Urol 47: 899-908, 1976.

■ **Hendry WF, Sommerville IF, Hall RR, Pugh RC.**

Investigation and treatment of the subfertile male.

Br J Urol 45: 684-692, 1973.

■ **Kremer J, Jager S, Van Slochteren-Draaisma T.**

The "unexplained" poor post coital test.

Int J Fertil 23: 277-281, 1978.

■ **Jager S, Kremer J, Van Slochteren-Draaisma T.**

A simple method of screening for antisperm antibodies in the human male.

Int J Fertil 23: 12-21, 1978.

■ **Johnsen SG.**

Testicular biopsy score count. A method for registration of spermatogenesis in human testis: normal values and results in 355 hypogonadal males. Hormones 1: 1-24, 1970.

■ **Jones CH & Hendry WF.**

Thermographic examination of the scrotum.

Acta Thermographica 4: 38-43, 1979.

■ **Lenz S, Giwercman A, Elsorg A, Cohr KH, Jelnes JE, Carlsen E, Skakkebaek NE.**

Ultrasonic testicular texture and size in 444 men from the general population: correlation to semen quality.

Eur Urol 24: 231-238, 1993.

■ **Martin-du-Pan RC & Bischof P.**

Increased follicle stimulating hormone in infertile men: is increased plasma FSH always due to damaged germinal epithelium?

Human Reprod 10: 1940-1950, 1995.

■ **Morgan H, Stedronska J, Hendry WF, Chamberlain GF, Dewhurst CJ.**

Sperm/cervical-mucus crossed hostility testing and antisperm antibodies in the husband.

Lancet 1: 1228-1230, 1977.

■ **Pryor JP & Hendry WF.**

Ejaculatory duct obstruction in subfertile males: analysis of 87 patients.

Fertil Steril 56: 725-730, 1991.

■ **Pryor JP, Pugh RCB, Cameron KM, Newton JR, Collins WP.**

Plasma gonadotrophic hormones, testicular biopsy and seminal analysis in men of infertile marriages.

Br J Urol 48: 709-717, 1976.

■ **Rajah SV, Parslow JM, Howell RJ, Hendry WF.**

Comparison of mixed antiglobulin reaction and direct immunobead test for detection of sperm-bound antibodies in subfertile males.

Fertil Steril 57: 1300-1303, 1992.

■ **Ryder TA, Mobberley MA, Hughes L, Hendry WF.**

A survey of ultrastructural defects associated with absent or impaired human sperm motility.

Fertil Steril 53: 556-560, 1990.

■ **Stedronska J & Hendry WF.**

The value of the mixed antiglobulin reaction (MAR test) as an addition to routine seminal analysis in the evaluation of the subfertile couple.

Am J Reprod Immunol 3: 89-91, 1983.

ASPETTI IMMUNOLOGICI DELL'INFERTILITÀ MASCHILE

Franco Dondero, Francesco Lombardo, Loredana Gandini, Andrea Lenzi

Laboratorio di Seminologia ed Immunologia della Riproduzione - Dipartimento di Fisiopatologia Medica
1^a Facoltà di Medicina e Chirurgia - Università La Sapienza - Roma

Introduzione

Il processo riproduttivo coinvolge una serie di meccanismi immunologici che, da protettivi nei confronti del gamete maschile, dalla sua produzione sino alla fusione con la cellula uovo, possono in situazioni particolari trasformarsi in elementi aggressivi dello spermatozoo con conseguente impossibilità della cellula germinale ad esplicitare le sue potenzialità fecondanti (*Mazumdar & Levine, 1998*).

Il sistema immunocompetente può interferire positivamente o negativamente con la funzione riproduttiva a vari livelli. In particolare ricordiamo che: 1) lo spermatozoo ed il liquido seminale costituiscono un pool di antigeni protetti da un meccanismo specifico di tolleranza immunologica; lo spermatozoo maturo, dotato com'è di movimento autonomo, potrebbe essere considerato a tutti gli effetti un essere unicellulare aploide distinto in maniera netta sia dall'organismo produttore sia dal ricevente; 2) gli stessi antigeni vengono a contatto con il sistema immunocompetente femminile in maniera massiccia e ripetuta durante i rapporti sessuali, senza che questo induca nella stragrande maggioranza dei casi fenomeni di sensibilizzazione; 3) ad una cellula estranea quale lo spermatozoo, l'organismo femminile concede il "permesso" di penetrare e risalire lungo le vie genitali e di fecondare la cellula-uovo fondendo con essa i propri determinanti antigenici di istocompatibilità; 4) la cellula fecondata così formata si è in grado di impiantarsi per lungo tempo dando vita ad un nuovo individuo immunologica-

mente in parte estraneo, ma tollerato nonostante nessuna barriera evidente lo difenda, o difenda la madre, da una reazione di rigetto "reciproco", creando una catena di eventi ripetibili con eventuali successive gravidanze. Peraltro, vi sono individui nei quali questi normali eventi riproduttivi non avvengono ed in cui si instaura una infertilità o una ricorrente abortività su base sicuramente immunologica. Come conseguenza di tali alterazioni si possono instaurare nel maschio forme di patologia autoimmunitaria antispermatozoo spontanea o provocata e forme di infertilità femminili su base immunologica sia come isoimmunizzazione antispermatozoo che come modificazioni della "tolleranza" nei confronti del prodotto del concepimento.

Pertanto, lo studio dell'immunologia sembrerebbe poter rispondere ad alcuni degli interrogativi più complessi in tema di riproduzione umana e dischiudere prospettive nuove nella terapia dell'infertilità su base immunologica.

Gli studi condotti in questi anni hanno permesso di definire che lo spermatozoo maturo possiede una serie di antigeni specifici che non sono presenti nella vita fetale al momento dell' "imprinting" immunologico. Tuttavia *Lenzi et al. (1991)* hanno dimostrato una risposta immune antispermatozoo contro antigeni (Ag) nemaspermici anche in ragazzi in età prepubere. D'altra parte, nonostante questa antigenicità degli spermatozoi, la maggior parte degli uomini non produce anticorpi antispermatozoo (ASA), presupponendo, quindi, l'esistenza di meccanismi di soppressione di tale reazione sia nelle strutture

del tratto genitale sia negli stessi spermatozoi (Witkin, 1988).

Si ipotizza che durante la vita fetale l'attività dei cloni linfocitari in grado di reagire immunologicamente contro i determinanti antigenici del "self" sia soppressa e che i linfociti suppressor presenti durante l'embriogenesi svolgano un ruolo determinante nell'induzione della tolleranza verso le strutture "self".

Il riconoscimento che un antigene è "self" oppure estraneo, con conseguente formazione di una reazione anticorpale, è basato sulla teoria della selezione clonale, elaborata oltre 30 anni orsono da Sir Frank Macfarlane Burnet (1959), insignito del premio Nobel per la Medicina nel 1960, insieme con Sir Peter Brian Medawar, per la scoperta della tolleranza immunitaria acquisita. Tale teoria prevede che il sistema immunitario si sviluppi durante le prime fasi della vita fetale quando si sviluppa la tolleranza verso il "self" dopo la presentazione e il successivo riconoscimento del "self" da parte del timo. Gli antigeni non presenti durante la vita fetale vengono in seguito riconosciuti come estranei, con successiva formazione di anticorpi e distruzione o inattivazione delle cellule portatrici di tali antigeni. Questa serie di eventi è in grado di prevenire, nella maggioranza degli individui, lo sviluppo di un'autoimmunizzazione. Gli antigeni dello spermatozoo non sono presenti in questa fase di auto-riconoscimento in quanto la spermatogenesi non è attivata sino al periodo puberale. Per tale motivo il processo spermatogenetico ha luogo in un milieu che limita l'esposizione nei confronti del sistema immunocompetente dell'ospite maschile agli antigeni dello spermatozoo.

La spermatogenesi, infatti, ha luogo in un ambiente protetto dal contatto con il sistema immunocompetente dalle giunzioni serrate tra le cellule del Sertoli. Queste cellule sono ancorate da un lato alla membrana basale del tubu-

lo seminifero e si estendono in senso radiale dalla membrana verso il lume del tubulo. Il versante luminale delle cellule del Sertoli possiede dei prolungamenti citoplasmatici che circondano le cellule germinali. Queste cellule oltre ad avere un effetto nutritivo sul gamete maschile, sembrerebbero deputate ad isolare completamente l'ambiente intratubulare (barriera emato-testicolare) (Tung, 1980). Infatti, le 40-50 giunzioni serrate che esistono tra ogni paio di cellule di Sertoli formano quella che è stata definita la più efficiente barriera tessutale dell'organismo (Friend & Gilula, 1972). Questa barriera è in grado sia di prevenire il contatto di significative quantità di antigeni nemaspermici con le cellule immunocompetenti che di bloccare i linfociti e gli anticorpi impedendone l'ingresso a livello dei tubuli seminiferi contenenti gli spermatozoi maturi. Peraltro, tale barriera formata dalle giunzioni serrate è in grado di far passare piccole quantità di antigeni spermatici solubili nell'ospite. Tali piccole dosi sarebbero in grado di stimolare i linfociti T suppressor inducendo uno stato di tolleranza immunologica.

Un altro meccanismo in grado di ridurre la possibilità dell'innescarsi di una reazione immune da parte degli spermatozoi a livello dell'interstizio dei tubuli seminiferi, è la ridotta presenza di linfociti T helper (El-Demiry et al., 1985; Barrat et al., 1990).

I tubuli seminiferi convergono a livello della rete testis che si prolunga nei dotti efferenti. Quindi gli spermatozoi attraversano l'epididimo, i deferenti e, dopo la diluizione nelle secrezioni prostatiche e vescicolari, l'uretra al momento dell'ejaculazione. L'iniezione endovenosa di anticorpi antispermatozoo porta al legame di anticorpi sugli spermatozoi provenienti dalla rete testis ma non su quelli testicolari (Tung et al., 1971). Questo implica che la rete testis sia più permeabile dei tubuli seminiferi alla fuoriuscita di antigeni spermatici e all'ingresso di anticorpi antispermatozoo solubili. Tuttavia, Jones (1977) ha notato che

la concentrazione di spermatozoi a livello della rete testis è circa la metà di quelli riscontrati a livello del segmento distale del tratto genitale maschile. Si ritiene quindi che la diluizione degli antigeni spermatici e la ridotta vascolarizzazione della rete testis (*Kormana & Reijonen, 1976*) contribuiscano alla immunoprotezione dello spermatozoo.

Dai dotti efferenti, gli spermatozoi sono convogliati nella testa, nel corpo e nella coda dell'epididimo. Si ritiene che gli spermatozoi acquisiscano la loro potenzialità fecondante, durante il passaggio attraverso l'epididimo, grazie al legame sulla superficie nemaspermica di sostanze presenti nel fluido epididimario (*Amman & Howards, 1980*). L'acquisizione della capacità fecondante si associa quindi a modificazioni nella struttura nemaspermica nel senso della perdita di strutture presenti a livello testicolare e, soprattutto, nel senso dell'acquisizione di nuove molecole (*Overstreet, 1986; Singer et al., 1985; Fusi & Bronson, 1990*). L'immunoprotezione a livello epididimario sarebbe garantita dalla presenza di un elevato numero di T suppressor e dalla produzione di sostanze coat immunosoppressive. A proposito dell'attività immunosoppressiva di queste sostanze, *Liu et al. (1993)* hanno dimostrato che pazienti positivi agli ASA presentano una maggiore percentuale di linfociti B ed una riduzione nella concentrazione totale di CD4 e CD8; in conseguenza di ciò vi è un aumento nell'attività mitogena delle cellule B con una concomitante riduzione dell'attività mitogena sulle cellule T. Il declino nell'attività dei T suppressor è considerata la causa principale della formazione di ASA. Infatti, i linfociti T suppressor controllano la produzione anticorpale da parte dei linfociti B.

Queste barriere anatomo-funzionali predisposte a livello testicolare e lungo le vie genitali maschili possono venire alterate mettendo a contatto con il sistema immunocompetente

le strutture dello spermatozoo e le sostanze immunogene del plasma seminale.

Varie patologie andrologiche possono causare alterazioni di questa barriera emato-testicolare inducendo una sorta di "autovaccinazione" antispermatozoo. I fattori scatenanti possono essere molteplici: flogosi, traumi, stasi vascolare, macro- e micro- necrosi, torsioni testicolari, neoplasie, ostruzioni anche transitorie, incomplete e monolaterali.

Una volta che gli anticorpi siano presenti a livello sistemico, essi possono avere libero accesso, attraverso la barriera danneggiata, al testicolo o ad altre regioni del tratto genitale maschile, e possono interferire, una volta che hanno reagito con la superficie nemaspermica, con la potenzialità fecondante del seme. D'altra parte, esiste un'enorme variabilità nel tipo di immunizzazione, a parità di stimolo antigenico, legata alla "flessibilità" del sistema immunocompetente a fronte delle molteplici situazioni genetiche ed ambientali. A questo proposito particolarmente interessanti risultano gli studi sulla reazione antispermatozoo nei soggetti sottoposti a vasectomia volontaria a scopo anticoncezionale. In tal caso infatti è possibile studiare basalmente, durante e dopo il riassorbimento di antigeni nemaspermici, un soggetto precedentemente sano e fertile. Il follow-up dei soggetti vasectomizzati ha documentato un graduale incremento della percentuale e del titolo degli ASA, un incremento nei primi mesi e quindi una graduale scomparsa degli immunocomplessi circolanti ed un andamento simile della immunità cellulo-mediata antispermatozoo (*Dondero, 1983*). Studi successivi hanno dimostrato che il fattore principale nell'induzione della risposta immune non è solo il verificarsi del riassorbimento massivo di antigene nemaspermico, come postulato in passato, quanto l'esistenza di un terreno genetico predisponente all'immunizzazione stessa, come dimostra lo studio condotto su gemelli monocoriali sottoposti in tempi diversi

a vasectomia, in un caso secondo la metodica classica e nell'altro provocando precedentemente una condizione di azoospermia farmacologicamente indotta (Lenzi *et al.*, 1987). In effetti, anche sulla base delle risultanze cliniche, dobbiamo distinguere fra a) soggetti affetti da una vera patologia autoimmune con tutte le caratteristiche di automantenimento legata più al terreno geneticamente predisposto che alle patologie scatenanti, e b) soggetti affetti da una semplice disregolazione del sistema immunocompetente deputato alla tolleranza verso gli antigeni seminali; in tal caso la reazione immune, talora solo transitoria, sarebbe legata alla patologia scatenante e potrebbe essere addirittura interpretata finalisticamente come una reazione fisiologica di blocco della fertilità in un soggetto affetto da una patologia seminale.

Diagnosi dell'autoimmunità antispermatozoo

La patologia immune antispermatozoo è caratterizzata dalla comparsa di un elevato titolo anticorpale in più fluidi biologici in assenza di sintomatologia specifica: pertanto lo studio dell'infertilità immunologica è basato sulla diagnostica di laboratorio.

Le metodologie a nostra disposizione consentono di dare una valutazione qualitativa e quantitativa dell'immunoreazione, di studiare l'attività biologica in vitro degli anticorpi, di definire la classe immunoglobulinica coinvolta e di individuare il sito di reazione antigene-anticorpo.

Le metodiche per lo studio dell'immunità antispermatozoo possono essere divise in tecniche indirette che studiano la risposta immune nei fluidi biologici, siero di sangue, plasma seminale e muco cervicale, e in tecniche dirette che evidenziano la patologia autoimmune a livello della cellula nemaspermica.

Le **metodiche indirette** sfruttano differenti presupposti teorici e differenti sistemi di rilevazione ma tutte utilizzano la cellula nemaspermica in toto come antigene. Infatti, la complessità strutturale dello spermatozoo ha reso fino ad oggi impossibile la caratterizzazione del sistema antigenico sicuramente correlato con il fenomeno immunologico e con quello riproduttivo.

Tra le tecniche indirette il Gelatin Agglutination Test ed il Tray Agglutination Test vengono, ad oggi, considerate come le metodiche di riferimento nello studio dell'immunità antispermatozoo .

Prima di descrivere brevemente tali tecniche bisogna ricordare che gli anticorpi antispermatozoo possono essere ricercati nel siero di sangue e nel plasma seminale dell'uomo, e nel siero di sangue e nel muco cervicale della donna. Particolare cura deve essere posta nella preparazione e nella conservazione dei campioni prima dell'esecuzione delle metodiche.

Il Gelatin Agglutination Test (GAT) ed il Tray Agglutination Test (TAT) utilizzano, come antigene, liquidi seminali di soggetti normozoospermici, con assenza di componente cellulare non nemaspermica, di zone di spermioagglutinazione e di reazione autoimmune antispermatozoo.

Ogni metodica è eseguita a partire da una diluizione di 1:4, in Baker buffer, dei campioni in esame, includendo sempre sieri sicuramente positivi e negativi al fine di controllare la perfetta esecuzione del test ed evitare falsi risultati.

I campioni risultati positivi alla diluizione basale devono essere titolati (1:8, 1:16, ecc.) sino alla negativizzazione del fenomeno.

Il **GAT** (Kibrick *et al.*, 1952) è il primo

metodo messo a punto per la determinazione macroscopica degli anticorpi spermioagglutinanti.

È un test di flocculazione in gelatina che usa spermatozoi mobili come antigene; la positività è indicata dalla comparsa di un flocculato di dimensioni variabili, secondo l'intensità della reazione antigene-anticorpo. I campioni negativi appaiono uniformemente torbidi. È necessario effettuare la titolazione dei campioni positivi mediante diluizioni progressive del campione in esame.

Il **TAT** (*Friberg, 1974*) è un metodo di microagglutinazione che, con successive modifiche, rappresenta, ad oggi, per la sua sensibilità e specificità il metodo di elezione fra le tecniche microscopiche. Come antigene sono impiegati solo spermatozoi mobili ottenuti per mezzo della tecnica dello "swim up", cioè dopo la spontanea migrazione degli spermatozoi in un terreno di coltura stratificato sul seme.

L'esame è effettuato con un microscopio invertito valutando il numero di spermatozoi mobili agglutinati in relazione al numero di spermatozoi mobili liberi; sono inoltre valutati l'intensità e il tipo di agglutinazione.

Tali tecniche sono specifiche, sensibili e riproducibili e hanno consentito di poter identificare come immunologici casi di infertilità altrimenti considerati idiopatici.

Nei protocolli diagnostici dell'infertilità immune è indicato eseguire entrambe le metodiche in quanto tali tecniche, impiegando sistemi antigeni differenti, consentono di evidenziare la variabilità antigenica della risposta immune antispermatozoo. Tale risposta può essere più o meno intensa e la gravità del fenomeno dipende, come in tutte le patologie a base immune, dal titolo anticorpale rilevato. Nella infertilità immunologica è considerato clinicamente significativo un titolo

anticorpale maggiore o uguale a 1:32 nel siero di sangue e maggiore o uguale a 1:16 nel plasma seminale e nel muco cervicale.

La patologia immune antispermatozoo, peraltro, non è caratterizzata solo dalla presenza di anticorpi nel plasma seminale, nel muco cervicale e nel siero di sangue, ma è evidenziabile anche sulla superficie della cellula nemaspermica. Lo spermatozoo, infatti, presenta una complessa espressione delle molecole antigeniche sulla sua superficie che si manifesta in una differente localizzazione del legame antigene-anticorpo a livello dei vari distretti cellulari (testa, coda o mista).

Tali anticorpi possono essere diagnosticati grazie all'impiego delle **tecniche dirette**, fra queste ricordiamo il Mixed Antiglobulin Reaction Test (MAR Test) e l'Immunobead Test (IBT).

Il **MAR Test** (*Hendry & Stedronska, 1980*) si basa su una modificazione del test di Coombs ed è in grado di rilevare nel liquido seminale gli anticorpi della classe IgG adesi alla superficie nemaspermica. La tecnica utilizza, come marker di reazione antigene/anticorpo, eritrociti umani di gruppo 0 Rh+ sensibilizzati con antisiero anti-D incompleto. La notevole semplicità e rapidità di esecuzione hanno reso questa tecnica un valido mezzo di screening nello studio della risposta anticorpale antinemaspermica. Peraltro, i suoi limiti sono legati al fatto che esso è in grado di valutare solo la presenza di immunoglobuline della classe G e che non può essere eseguito su campioni seminali con severa oligozoospermia e con ipomotilità marcata. Se gli spermatozoi presentano anticorpi antispermatozoo sulla loro superficie, si formeranno delle agglutinazioni miste con gli eritrociti, in presenza dell'antisiero anti-immunoglobulina; in assenza di anticorpi gli spermatozoi si muoveranno liberi tra le emazie. Per una cor-

retta interpretazione del test debbono essere contati almeno 100 spermatozoi mobili. Durante la lettura viene valutato il numero degli spermatozoi mobili agglutinati alle emazie, il tipo di agglutinazione (testa, coda, mista) ed il numero degli spermatozoi mobili liberi. Sono considerati positivi i campioni che mostrano una percentuale di legame \geq 20%.

Lo **SpermMar test** (*Vermeulen & Coomhaire, 1983*) rappresenta una modifica della metodica precedente e utilizza come marker di reazione al posto delle emazie, particelle di latex rivestite di immunoglobuline della classe G ed A; l'esecuzione della metodica rimane invariata rispetto alla precedente.

L'**IBT** (*Bronson et al., 1984*) si basa sull'utilizzazione di sferule di poliacrilamide rivestite di anti-immunoglobuline della classe G, A, M; la reazione avviene tra il gruppo N-terminale della sferula ed il gruppo carbossilico del frammento Fc dell'anti-immunoglobulina umana creando così un complesso sferula-anti-immunoglobulina. Tale tecnica presenta il vantaggio rispetto al MAR Test di valutare tutte le classi Ig presenti sulla superficie nemaspermica. L'IBT fornisce risultati fortemente correlati con le metodiche classiche indirette (Gelatin Agglutination Test e Tray Agglutination Test) e con il MAR test diretto e consente di definire in maniera più completa la patologia autoimmune antinemaspermica.

Il Mar test, lo SpermMar e l'IBT possono essere utilizzati come test "indiretti" per la ricerca degli anticorpi antispermatozoo nel siero, nel plasma seminale e nel muco cervicale. In questo caso si esegue una preincubazione (60 min a 37°C) dei campioni in esame con un pool di spermatozoi normali (seme in toto o spermatozoi separati per swim up) utilizzati come antigene. Dopo questa fase si procede come per i test diretti.

Le tecniche dirette sopra riportate sono specifiche, sensibili e riproducibili e consentono di completare la diagnostica dell'infertilità autoimmune. Infatti, un corretto approccio diagnostico a tale patologia deve prevedere l'esecuzione di almeno due metodiche indirette (GAT e TAT) e di una metodica diretta (MAR o IBT). Tali metodiche risultano strettamente correlate con le tecniche indirette; infatti, ad alti titoli anticorpali sierici (\geq 1:128) corrisponde sempre una elevata percentuale di legame sulla superficie nemaspermica (\geq 70%) delle classi immunoglobuliniche più frequentemente coinvolte (IgG ed IgA).

Fra le tecniche sviluppate recentemente e caratterizzate dalla teorica obiettività dei loro risultati svolgono un ruolo di primaria importanza il metodo radioimmunologico e quello immunoenzimatico.

Haas et al. (1980) hanno impiegato, in patologia umana, una applicazione radioimmunologica del test di Coombs usando una sospensione antigenica di spermatozoi.

Una revisione critica dei risultati ottenuti con tali tecniche ha dimostrato una scarsa sensibilità a causa delle caratteristiche della preparazione antigenica. Infatti, parte della sospensione antigenica di spermatozoi viene persa durante la procedura di lavaggio, portando ad una difficile interpretazione dei risultati. Le difficoltà sono state parzialmente superate impiegando un antigene in fase solida rappresentato da un'aliquota di spermatozoi fissati per mezzo di glutaraldeide al fondo di provette di polietilene.

L'Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) (*Witkin et al., 1981*) è simile come procedura ed utilizza un antigene in fase solida (preparato come precedentemente descritto). Alcune considerazioni devono essere fatte sulle tecniche RIA e ELISA per

anticorpi antispermatozoo: nessuno dei metodi sopra menzionati è stato sottoposto ad un sufficiente numero di prove cliniche e di laboratorio per essere utilizzato di routine; una definitiva valutazione della loro applicabilità sarà possibile solo dopo studi su una ampia serie di correlazioni con i classici metodi di riferimento sopra menzionati. In questi ultimi anni con sempre maggiore frequenza vengono proposti kit preparati per semplificare la valutazione routinaria della presenza di anticorpi antispermatozoo. In un recente lavoro sono stati testati dei campioni di riferimento impiegando due tecniche indirette classiche quali il GAT ed il TAT ed alcuni dei sistemi commerciali attualmente disponibili sotto forma di kit ELISA e RIA. Nessuno dei kit impiegati in questo studio ha fornito risultati coerenti per la ricerca degli anticorpi antispermatozoo presenti in sieri di riferimento a titolo noto per le metodiche classiche ottenuti dalla sieroteca del Laboratorio di Immunologia della Riproduzione e Seminologia della V Clinica Medica dell'Università di Roma "La Sapienza", dalla WHO Bank for Reproductive Immunology e dallo Antisperm Antibody Committee dell'American Society of Immunology of Reproduction (*Lenzi et al., 1990*). Sino ad oggi, i tentativi nostri e di altri gruppi (*Clark et al., 1987; Saji et al., 1988; Gandini et al., 1991*) di ottimizzare le suddette metodiche si sono dimostrati inapplicabili in sede di produzione commerciale; infatti, solo l'utilizzazione come antigene dell'intera cellula spermatica, e non di antigeni estrattivi (su cui sono basati tali kit), ha consentito la riproducibilità delle metodiche per la ricerca degli anticorpi antispermatozoo.

In conclusione, sono opportune alcune considerazioni riepilogative sulla diagnostica di laboratorio degli anticorpi antispermatozoo. Tali indicazioni sono indispensabili per una corretta esecuzione dei test, al fine di poter fornire al clinico dei risultati attendibili

che gli permettano di valutare e, ove possibile, curare l'infertilità su base immunologica. Al fine di evitare risultati falsamente negativi, ogni campione deve essere analizzato con più di uno dei metodi sopra descritti, impiegando le tecniche più sperimentate. Un protocollo pratico potrebbe essere quello che prevede l'impiego del GAT e del TAT nel siero di sangue e nel plasma seminale e l'IBT diretto per lo studio degli anticorpi adesi alla superficie degli spermatozoi.

È necessario impiegare la maggiore varietà di sistemi antigenici possibile; per tale motivo tutti i campioni devono essere testati impiegando come antigeni gli spermatozoi provenienti da vari donatori. Infatti, recenti ricerche, impiegando la citofluorimetria, hanno dimostrato che nell'ambito dell'eiaculato esistono varie popolazioni di spermatozoi con differenze antigeniche qualitative e quantitative. Si può quindi supporre che nell'eiaculato di un singolo donatore e, in misura ancora maggiore, negli eiaculati provenienti da diversi donatori, gli spermatozoi siano coinvolti nella reazione immune in maniera differente e che queste differenze possano essere l'espressione di un diverso grado di maturità e di potenzialità fecondante. Probabilmente la variabilità nel ruolo svolto dagli anticorpi antispermatozoo sulla capacità fecondante del seme potrebbe dipendere da un'immunizzazione contro antigeni presenti su spermatozoi dotati di differenti gradi di potenzialità fecondante (*Lenzi et al., 1989*).

È indispensabile titolare sino alla diluizione finale i campioni positivi ai metodi indiretti. Bisogna sempre inserire in ogni analisi un controllo sicuramente positivo ed uno sicuramente negativo. Deve essere posta una particolare cura nella preparazione dell'antigene nemaspermico; tale momento laboratoristico richiede una particolare cura ed attenzione, in quanto l'attendibilità dei test dipende fondamentalmente da questo passaggio. Le metodiche

descritte condotte con tutte le precauzioni sopra dette ed associate ad una corretta analisi seminale, rendono possibile l'identificazione certa di casi di infertilità immunologica consentendo un approccio terapeutico sia pur complesso. Negli ultimi anni la mancanza di una metodica standardizzata ed universalmente accettata per la rilevazione degli ASA ha portato alcuni autori a mettere in discussione "tout court" il significato della patologia autoimmune nella patogenesi dell'infertilità maschile (*Helmerhorst et al., 1999*). Peraltro, l'opinione del gruppo di ricercatori di Griningen è stata, in alcuni casi violentemente, contestata da alcuni dei maggiori esperti nel campo dell'immunologia della riproduzione (*Bronson, 1999; Hjort, 1999; Kutteh, 1999; Mahmoud & Comhaire, 2000*).

Terapia dell'infertilità autoimmune antispermatozoo

Gli ASA possono ridurre la fertilità di un soggetto ma raramente sono in grado di annullare completamente la fertilità della coppia (*Dondero et al., 1979; Marshburn & Kutteh, 1994*).

Per quanto riguarda la terapia dell'infertilità immunologica maschile è opportuno distinguere casi in cui al momento dell'inquadramento diagnostico del paziente infertile la reazione autoimmune antispermatozoo rappresenta l'unico elemento patologico rilevabile e casi in cui la reazione autoimmune si accompagna ad un evento patologico attuale a carico del tratto genitale maschile, eventualmente in grado di per sé di determinare l'infertilità e comunque di indurre la risposta autoimmune.

In quest'ultimo caso, prima di impostare qualsiasi protocollo farmacologico mirato alla risoluzione della patologia immunitaria, sarà necessario risolvere dapprima la patologia scatenante di base. La risoluzione di una flogosi prostatico-vescicolare può eliminare o

ridurre la concomitante reazione autoimmune scatenata dalla flogosi stessa. L'eliminazione mediante orchietomia di un testicolo ipotrofico per trauma, torsione funicolare o orchite, può portare al normalizzarsi del quadro immunologico e quindi, successivamente, di quello seminologico, grazie all'eliminazione della fonte di stimolo antigenico; lo stesso accade eliminando cisti epididimarie o correggendo ostruzioni dei dotti deferenti. Poiché le suddette patologie sono assai frequenti nei giovani e possono rappresentare la causa scatenante di un'autoimmunizzazione non sempre reversibile, sarà opportuno, ai fini preventivi, tentare di diagnosticare e curare tali patologie sin dalla pubertà. Al contrario, nei casi in cui la patologia autoimmune è, o è divenuta, il fattore etiopatogenetico principale,

Tab. 1: Schemi terapeutici basati sull'uso di corticosteroidi impiegati nella terapia dell'infertilità su base immunologica

- 96 mg/die di metilprednisolone per sette giorni, dal 21° al 28°, o dal 1° al 7° giorno del ciclo della partner per ottenere il massimo dell'effetto immunosoppressivo di questa alta dose di steroidi durante l'ovulazione successiva;
- 2-3 mg/die di desametasone per 13 settimane e dosi decrescenti per altre 7 settimane;
- 15 mg/die di prednisone per 3-12 mesi;
- azoospermia transitoriamente indotta mediante la somministrazione di 250 mg/settimana di testosterone enantato al fine di eliminare o ridurre la stimolazione antigenica seguita, alla ripresa della spermatogenesi, da un trattamento con 16 mg/die di metilprednisolone per 30 giorni ed 8 mg/die nei 30 giorni successivi;
- 40 mg/die di metilprednisolone dal 1° al 10° giorno del ciclo seguito da 5 mg /die l'11° ed il 12° giorno per 3 cicli.

è necessario intervenire con protocolli terapeutici agenti direttamente sulla patologia immunologica.

Gli schemi terapeutici più utilizzati in campo umano si basano sull'uso dei corticosteroidi a vari dosaggi e con varie modalità di somministrazione (Tab. 1) (*Shulman, 1985b*).

Gli autori che hanno riportato effetti positivi degli steroidi nel ridurre gli ASA circolanti o legati agli spermatozoi non hanno, tuttavia, osservato un aumento nelle percentuali di gravidanza (*De Almeida & Jouannet, 1981; Haas & Manganiello, 1987; Bals-Pratsch et al., 1992*). In uno studio in cui i livelli anticorpali sono stati monitorizzati tramite citofluorimetria, non sono state ottenute gravidanze in tre cicli di trattamento (*Räsänen et al., 1994*). Impiegando le stesse dosi di prednisolone invece, altri autori (*Läahteenmäki et al., 1985*) non hanno ottenuto più di una gravidanza in un trattamento steroideo ciclico di 32 coppie affette da ASA. Impiegando un regime ciclico a basso dosaggio, non è stata osservata alcuna fluttuazione nei livelli di anticorpi legati agli spermatozoi, tuttavia, impiegando il Tray Agglutination Test si è verificato un netto calo nel titolo sierico dopo la terapia. D'altra parte, una variazione spontanea del titolo anticorpale è stata notata anche durante il trattamento con placebo ed inoltre è stato riportato un effetto positivo dei corticosteroidi sulle IgG, ma non sulle IgA (*Haas & Manganiello, 1987*). La spiegazione di questo fenomeno sarebbe legata ad un effetto differente degli steroidi sull'immunità sistemica rispetto a quella locale.

Nel caso di una notevole immunizzazione antinemaspermica, negli ultimi anni, sono

state proposte la FIVET e, più di recente, la ICSI come le metodiche di elezione (*Acosta et al., 1989; Dmowski et al., 1995*). Impiegando la FIVET, infatti, è stata ottenuta una percentuale di fecondazione dell'82% ed una percentuale di gravidanze del 33% per paziente, 22% per ciclo e 24% per transfer (*Acosta et al., 1989*).

Nagy et al. (1995), in una serie di 55 cicli di ICSI, hanno ottenuto un tasso di fecondazione del 75.7% in casi in cui la percentuale di spermatozoi positivi al Mixed Antiglobulin Reaction test (MAR) risultava pari o superiore all'80%. La qualità degli embrioni e la percentuale di gravidanze in corso non era correlata con la percentuale di ASA legati alla superficie degli spermatozoi. Tuttavia, un dato molto interessante riportato in questo studio riguarda il fatto che quando questi cicli sono stati confrontati con un gruppo di controllo negativo agli ASA è stata notata una ridotta percentuale di embrioni di qualità eccellente o buona. Inoltre, la percentuale di embrioni di qualità povera era più alta nei pazienti con MAR test positivo rispetto alla popolazione generale delle ICSI (gruppo di controllo).

In conclusione, la presenza degli ASA rappresenta un importante fattore in grado di interferire con varie tappe del processo riproduttivo, pur se ancora oggi l'esatto meccanismo patogenetico non è stato chiarito. È, pertanto, assolutamente necessario valutare correttamente la loro presenza ed impostare il trattamento più idoneo ed evitare alla coppia interventi medici o chirurgici inutili se non, addirittura, dannosi.

BIBLIOGRAFIA

- **Acosta A, Oehninger S, Morshedi M, Swanson RJ, Scott R, Irianni F.**
Assisted reproduction in the diagnosis and treatment of the male factor.
Obstet Gynecol Surv 44: 1-10, 1989.
- **Amann RP & Howards SS.**
Daily spermatozoal production and epididymal spermatozoal reserves of the human male.
J Urol 124: 211, 1980.
- **Bals-Pratsch M, Doren M, Karbowsky B, Schneider HPG, Nieschlag E.**
Cyclic corticosteroid immunosuppression is unsuccessful in treatment of sperm antibody related male infertility: a controlled study.
Hum Reprod 7: 99-104, 1992.
- **Barratt CLR, Bolton AE, Cooke ID.**
Functional significance of white blood cells in the male and female reproductive tract.
Human Reprod 5: 639, 1990.
- **Bronson R.**
Detection of antisperm antibodies: an argument against therapeutic nihilism.
Human Reprod 14: 1671-1673, 1999.
- **Bronson RA, Cooper GW, Rosenfeld DL.**
Membrane bound sperm-specific antibodies: their role in infertility.
In: *Bioregulators of Reproduction*, H Vogel & G Jagiello (eds), New York, Academic Press, p. 521, 1984.
- **Burnet FM.**
The clonal selection theory of acquired immunity.
Cambridge: Cambridge University Press, 1959.
- **Clark JS, Clark DA, Hendry WF.**
Antisperm antibodies detected by ZER enzyme-linked immunosorbent assay kits are not those detected by tray agglutination test.
AJRIM 13: 76, 1987.
- **De Almeida M & Jouannet P.**
Dexamethasone therapy of infertile men with sperm autoantibodies: immunological and sperm follow-up.
Clin Exp Immunol 44: 567-575, 1981
- **Dmowski WP, Rana N, Michalowska J.**
The effect of endometriosis, its stage and activity, and of autoantibodies on in vitro fertilization and embryo transfer success rates.
Fertil Steril 63: 555-562, 1995.
- **Dondero F.**
Immunology of vasectomy.
In: *Immunological Factors in Human Contraception*, S Shulman & F Dondero (eds), Roma, Field Educational Italia, p. 194, 1983.
- **Dondero F, Isidori A, Lenzi A, Cerasaro M, Mazzilli F, Giovenco P, Conti C.**
Treatment and follow-up of patients with infertility due to sperm agglutinins.
Fertil Steril 31: 48-51, 1979.
- **Dondero F, Lenzi A, Gandini L, Lombardo F, Culasso F.**
A comparison of the direct immunobead test and other tests for antisperm antibodies detection.
J Endocr Invest 14: 443, 1991.
- **El-Demiry, Hargreave TB, Busuttill A, James K, Ritchie AWS, Chisholm GD.**
Lymphocyte sub-populations in the male genital tract.
Br J Urol. 57: 569, 1985.
- **Friberg J.**
A simple and sensitive micromethod for demonstration of sperm agglutinating in serum from infertile men and women.
Acta Obstet Gynecol Scand 36 (Suppl): 21, 1974.
- **Friend DS, Gilula NB.**
Variations in tight and gap junctions in mammalian tissues.
J Cell Biol 53: 758, 1972.
- **Fusi F & Bronson RA.**
Effects of incubation time in serum and capacitation on spermatozoal reactivity with antisperm antibodies.
Fertil Steril 54: 887, 1990.

- **Gandini L, Lenzi A, Lombardo F, Dondero F.** Radio Immuno Binding Test for antisperm antibody detection: Analysis and critical revision of various methodological steps. *Andrologia* 23: 61, 1991.
- **Haas GG Jr, Cines DB, Schreiber AD.** Immunology infertility: identification of patients with antisperm antibody. *NEJM* 303: 722, 1980.
- **Haas GG Jr & Manganiello PA.** A double blind, placebo-controlled study of the use of methylprednisolone in infertile men with sperm associated immunoglobulins. *Fertil Steril* 47: 295-301, 1987.
- **Helmerhorst FM, Finken MJJ, Erwich JJ.** Detection assays for antisperm antibodies: what do they test? *Hum Reprod* 14: 1669-1671, 1999.
- **Hendry WF & Stedronska J.** Mixed erythrocyte-spermatozoa antiglobulin reaction (MAR test) for the detection of antibodies against spermatozoa in infertile males. *J Obstet Gynecol* 1: 59-62, 1980.
- **Hjort T.** Antisperm antibodies and infertility: an unsolvable question? *Hum Reprod* 14: 2423-2429, 1999.
- **Jones RC.** The nature of the barrier to autoimmunity in the excurrent ducts of the mammalian testes. In: *Immunological Influences on Human Fertility*. B Boettcher (ed), New York, Academic Press, p. 67, 1977.
- **Kibrick S, Belding DL, Merrill B.** Methods for the detection of antibodies against mammalian spermatozoa. II. A gelatin agglutination test. *Fertil Steril* 3: 430, 1952.
- **Kormana M & Reijonen K.** Microvascular structure of the human epididymis. *Am J Anat* 145: 23, 1976.
- **Kutteh WH.** Do antisperm antibodies bound to spermatozoa alter normal reproductive function? *Hum Reprod* 14: 1669-1671, 1999.
- **Läahteenmäki A, Veilahti J, Hovatta O.** Intra-uterine insemination versus cyclic, low-dose prednisolone in couples with male antisperm antibodies. *Hum Reprod* 10: 142-147, 1985.
- **Lenzi A, Gandini L, Claroni F, Dondero F.** Post vasectomy antisperm immune reaction after testosterone-induced azoospermia. *Br J Urol* 59: 277, 1987.
- **Lenzi A, Gandini L, Lombardo F, Alfano P, Anticoli Borza L, Morrone S, Dondero F.** Hypothesis on antigenic heterogeneity of human spermatozoa as identified with a cytofluorimetric system. In: *Biochemical Aspects on the Immunopathology of Reproduction*. G Spera, AB Mukherjee, G Ravagnan, S Metafora (eds). Acta Medica Edizioni e Congressi, p. 59, 1989.
- **Lenzi A, Gandini L, Lombardo F, Dondero F.** Sperm manipulation for assisted reproduction in immunological infertility: a physiological approach. Proceedings of the X Congress of the American Society of Immunology of Reproduction. Chicago, 1990. *AJRI*, 1990.
- **Lenzi A, Gandini L, Lombardo F, Dondero F.** Antisperm antibodies in young boys. *Andrologia* 23: 233-235, 1991.
- **Liu J, Zhang Y, Shen G, Wang X, Su N, Zhu H.** An approach to pathogenesis of male infertility with anti-sperm antibodies. *Int J Fertil* 38: 187-191, 1993.
- **Mahmoud A & Comhaire F.** Use of the mixed agglutination reaction (MAR) test using latex beads. *Hum Reprod* 15: 231-233, 2000.
- **Marsburn PB & Kutteh WH.** The role of antisperm antibodies in infertility. *Fertil Steril* 47: 644-651, 1994.
- **Mazumdar S & Levine AS.** Antisperm antibodies: etiology, pathogenesis, dia-

gnosis, and treatment.

Fertil Steril 70: 799-810, 1998.

■ **Nagy ZP, Verheyen G, Liu J, Joris H, Janssenswillen C, Wisanto A, Devroey P, Van Steirteghem AC.**

Results of 55 intracytoplasmic sperm injection cycles in the treatment of male-immunological infertility.

Hum Reprod 10: 1775-1780, 1995.

■ **Overstreet JW.**

Human sperm function: acquisition in the male and expression in the female.

In: Male Reproductive Function, RJ Santen & RW Swerdloff (eds). New York, Marcel Dekker, Inc., p. 29, 1986.

■ **Räsänen M, Läähtenmäki A, Saarikoski S, Agrawal YP.**

Comparison of flow cytometric measurement of seminal antispermatid antibodies with the mixed antiglobulin reaction and the serum tray agglutination test.

Fertil Steril 61: 143-150, 1994.

■ **Saji F, Ohashi K, Kato M, Negoro T, Tanizawa O.**

Clinical evaluation of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit for antispermatid antibodies.

Fertil Steril 50: 644, 1988.

■ **Shulman S.**

Autoimmune aspects of human reproduction.

In: Concepts in Immunopathology, S Shulman

(ed), Basel, Karger, Vol. 2, p.189, 1985.

■ **Singer SL, Lambert H, Cross NL, Overstreet J.W.**

Alteration of the human sperm surface during in vitro capacitation as assessed by lectin-induced agglutination.

Gamete Res 12: 291, 1985.

■ **Tung KSK, Unanue ER, Dizon FJ.**

Pathogenesis of experimental allergic orchitis II: the roles of antibodies.

J Immunol 106: 1463, 1971.

■ **Tung KSK.**

Autoimmunity of the testis. In: Immunological Aspects of Infertility and Fertility Regulation.

DS Dhindsa & GFB Schumacher (eds), New York, Elsevier-North Holland, p. 33, 1980.

■ **Vermeulen L & Comhaire F.**

Le test "MAR" aux particules de Latex, et le test spermotoxique selon Suominen: simplification et nouveauté dans l'arsenal du diagnostic immunologique.

Contraception-Fertilité-Sexualité 11 (Suppl): 381-384, 1983.

■ **Witkin SS, Zelikovsky G, Good RA, Day NK.**

Demonstration of 11S IgA antibody to spermatozoa in human seminal fluid.

Clin Exp Immunol 44: 368, 1981.

■ **Witkin SS.**

Mechanisms of active suppression of the immune response to spermatozoa.

Am J Reprod Immunol Microbiol 17: 61-64, 1988

FREEZING AND THAWING OF SPERMATOZOA SURGICALLY RETRIEVED FOR ICSI: TECHNIQUES AND RESULTS

Manuel Gil-Salom* & Josep Romero

Instituto Valenciano de Infertilidad.

*Department of Surgery (Urology), University of Valencia, Spain.

Introduction

Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) using surgically retrieved spermatozoa either from epididymis or testicle has become during the last years a routine procedure in most IVF (in-vitro fertilization) units. This methodology has proved to be successful both in patients suffering from obstructive (*Tournaye et al., 1994; Silber et al., 1994; Schoysman et al., 1993; Silber et al., 1995; Gil-Salom et al., 1995a*) and non-obstructive azoospermia (*Devroey et al., 1995a; Gil-Salom et al., 1995b; Tournaye et al., 1996; Gil-Salom et al., 1998*). In addition, the minimal sperm quality required for ICSI has made possible to cryopreserve defective sperm samples. This strategy is of major interest in the case of valuable sperm samples, such as surgically retrieved sperm. Herein advantages, techniques and results of freezing and thawing surgically retrieved spermatozoa for ICSI are discussed.

Advantages of cryopreservation

There are several reasons for implementing cryopreservation of surgically retrieved spermatozoa for ICSI:

1) *Cryopreservation may reduce the number of sperm retrieval procedures in patients who have to undergo several ICSI cycles.*

Repetition of surgical procedures at

each ICSI cycle is troublesome for the patients and, more importantly, can damage the epididymis and the testicle. Significant complications have been described after repeated extensive testicular sperm extraction (TESE) procedures by multiple testicular biopsies in patients with non-obstructive azoospermia: transient adverse physiological effects (inflammation or hematoma at the biopsy site) are common for up to six months following TESE, and occasionally permanent testis devascularization and extensive testicular fibrosis can occur (*Schlegel & Su, 1997*). A decrease in testosterone blood concentrations after extensive testicular sperm sampling, only partially reversible within one year of follow-up, has also been reported (*Manning et al., 1998*).

Percutaneous epididymal sperm aspiration (PESA) and percutaneous testicular sperm aspiration (TESA) techniques have been developed to minimize both troubles to the patient and traumatic effects on the epididymis and testicle (*Shrivastav et al., 1994; Craft & Tsirigotis, 1995*). Percutaneous methods have been reported to be, however, less effective than open procedures in recovering sperm from patients with non-obstructive azoospermia (*Friedler et al., 1997a; Ezeh et al., 1998*), and it is not yet clear if they are completely free of causing epididymal and testicular damage (*Shufaro et al., 2001*).

2) Cryopreservation allows the temporal dissociation of the sperm retrieval procedure in the male and the oocyte pick-up in the wife.

This approach solves scheduling difficulties between two surgical teams for simultaneous sperm and oocyte retrieval. In addition, this strategy is again of great value for couples suffering from non-obstructive azoospermia. TESE is successful in only 40-70% of non-obstructive azoospermia patients, and there are no reliable pre-operative parameters that can accurately predict TESE outcome in the individual patient (*Mulhall et al., 1997; Tournaye et al., 1997, Gil-Salom et al., 1998*). If TESE is performed on the same day scheduled for oocyte recovery and the procedure fails, the consequences of an unnecessary ovarian stimulation treatment in the wife are important from physical, emotional and financial point of view. First-line TESE, followed by sperm freezing when successful, ensures sperm availability prior to the initiation of the ICSI cycle. Consequently, an appropriate selection of patients with non-obstructive azoospermia who are candidates for ICSI can be accomplished, avoiding unnecessary treatments in the wife in a significant proportion of couples (*Salzbrunn et al., 1996, Oates et al., 1997, Gil-Salom et al., 1998, Ben-Yosef et al., 1999; Gianaroli et al., 1999*).

Therefore, sperm cryopreservation should be strongly considered when performing the first diagnostic testicular biopsy in azoospermic patients, with the purpose to reduce to a minimum the scrotal surgeries the patient has to undergo (*Gil-Salom et al., 1996; Oates et al., 1997; Ben-Yosef et al., 1999; Gianaroli et al., 1999*). Similarly, cryopreservation of epididymal or testicular sperm at the time of microsurgical repair of an obstructed seminal tract is highly recommended (*Matthews et al., 1997*).

3) Cryopreservation is also a valuable alternative for azoospermic patients with testis cancer.

Spermatozoa retrieved from radical orchiectomy specimens have been successfully frozen-thawed for ICSI and several pregnancies have been achieved, even in patients with a solitary testis (*Yavetz et al., 1997; Scherr et al., 1999*).

Feasibility of cryopreservation of surgically retrieved spermatozoa

ICSI using frozen-thawed spermatozoa retrieved by microsurgical epididymal sperm aspiration (MESA) was first reported by *Devroey et al. (1995b)* in seven patients who did not become pregnant after a first MESA-ICSI attempt. Sperm concentration and motility are usually high in samples obtained by MESA, which favours cryopreservation of the recovered epididymal spermatozoa. In fact, several studies document the feasibility of freezing and thawing spermatozoa retrieved by MESA for ICSI (*Oates et al., 1996; Holden et al., 1997; Tournaye et al., 1999*). Nevertheless, reports in the literature concerning microinjection of frozen-thawed epididymal spermatozoa recovered by less invasive methods, like PESA, are scarce (*Friedler et al., 1998; Patrizio, 2000*).

Cryopreservation of testicular spermatozoa for ICSI involves more difficulties, because of their usually low concentration and motility. In our preliminary experience using a cryopreservation technique in pills (*Nagase & Niwa, 1964*), we showed that cryopreservation of testicular spermatozoa is feasible, and that satisfactory fertilization rates can be achieved after ICSI using frozen-thawed testicular spermatozoa (*Romero et al., 1996*). We also reported on the first live births following ICSI with cryopreserved testi-

cular spermatozoa (*Gil-Salom et al., 1996*), these results being confirmed by other authors (*Podsiady et al., 1996, Fischer et al., 1996; Hovatta et al., 1996, Khalifeh et al., 1997*). Nonetheless, results of comparative studies on ICSI outcome using fresh or frozen-thawed testicular spermatozoa are still controversial (*Gil-Salom et al., 1996, Friedler et al., 1997b; De Croo et al., 1998; Ben-Yosef et al., 1999; Gianaroli et al., 1999; Habermann et al., 2000*).

For adopting surgically recovered spermatozoa cryopreservation as a valid alternative to repeat sperm retrieval techniques two important issues should be clarified: firstly, effective sperm cryopreservation techniques should be available, offering high sperm survival rates after thawing. Secondly, ICSI outcome with frozen-thawed surgically retrieved spermatozoa has to be comparable to that of ICSI with fresh spermatozoa.

Cryopreservation techniques

There is not a standard cryopreservation technique for surgically retrieved spermatozoa. Several methods have been used, which differ in the sperm retrieval techniques, in the material that is frozen, in the vials used for storing, as well as in the cryoprotectants and freezing protocols.

Open surgical procedures (testicular biopsy or MESA) have been most widely used with the intention to recover a maximum of sperm numbers. However, less invasive techniques have also been employed to retrieve and cryopreserve epididymal spermatozoa, such as the mini-MESA technique (*Nudell et al., 1998; Cayan et al., 2001*), the open macroscopic epididymal aspiration method described by *Cha et al. (1997)* and the PESA procedure (*Craft & Tsirigotis, 1995; Friedler et al., 1998; Patrizio, 2000*).

Likewise, successful cryopreservation of testicular spermatozoa retrieved by biopsy gun percutaneous needle biopsy (*Tuuri et al., 1998*) and by testicular fine needle aspiration (*Lewin et al., 1999*) has also been reported.

Most groups cryopreserve epididymal and testicular sperm suspensions, the latter after processing the biopsy specimen and checking for the presence of free spermatozoa in the medium. However, small testicular tissue pieces (*Salzbrunn et al., 1996*) and even isolated seminiferous tubules (*Allan & Cotman, 1997*) can also be directly frozen. Freezing of testicular spermatozoa as minced suspensions, however, has been reported to better preserve sperm quality than when intact biopsy specimens are directly frozen, at least when slowly permeating glycerol is used as cryoprotectant (*Crabbe et al., 1999*).

Several vials have been used for storing surgically retrieved spermatozoa. Epididymal and testicular spermatozoa have been cryopreserved using straws (*Devroey et al., 1995b; Verheyen et al., 1997, Friedler et al., 1997b; 1998; De Croo et al., 1998; Gianaroli et al., 1999*), polypropylene cryotubes (*Oates et al., 1996; 1997*), ampoules (*Ben Yosef et al., 1999*) or pills (*Romero et al., 1996, Gil-Salom et al., 1996*). *Cohen et al. (1997)* described an original procedure that allows cryopreservation of single testicular spermatozoa by injecting them into empty zona pellucidae.

TEST (TES and Tris) yolk buffer (Irvine Scientific, Santa Ana, CA), Glycerol, Sperm Freeze Medium (Medicult, Jyllinge, Denmark), and Human Semen Preservation Medium are some of the diverse cryoprotectants used. Freezing protocols are also variable in different series; in some of them, rapidly vapor-freezing was performed (*Devroey et al., 1995b; Friedler et al., 1997*), whereas in

others, slow controlled freezing programs were used (*Verheyen et al., 1997; Oates et al., 1997*). Nevertheless, reports about the real efficacy of surgically retrieved sperm cryopreservation techniques in large series are scarce (*Batchell et al., 1999*).

Cryopreservation in pills: technique

From the beginning, we chose a cryopreservation technique in pills (*Nagase & Niwa, 1964*), because we looked for a method which permits the distribution of the few spermatozoa retrieved by TESE into as much aliquots as possible. We also utilize this method for cryopreserving epididymal and poor quality ejaculated sperm samples.

For epididymal sperm retrieval, we use an aspiration technique similar to that described by *Cha et al. (1997)*. Under spermatic cord block, a small vertical incision of 1 cm is performed in the scrotum over the upper pole of the testis. The tunica vaginalis is opened and the testis is pushed downwards until the head of the epididymis can be seen through the incision. Epididymal tubules are punctured under direct view with a 23-gauge butterfly needle attached to a 10 ml syringe containing Sperm medium (Medicult, Copenhagen, Denmark), in a similar way as in PESA. Suction is applied to the syringe and epididymal fluid is seen entering the tubing of the butterfly needle. When the fluid ceases to flow, an occlusive artery forceps is applied across the tubing before the needle is withdrawn from the epididymis. The aspirate is then washed out of the needle and tubing into a sterile conical tube. The procedure can be repeated as many times as the good quality of the sample is assessed microscopically. This method allows a direct view of the epididymis, helping in the selection of the areas of the head of the epididymis for aspiration and in the hemostasis, should some bleeding occur. It is an outpatient procedure not

requiring hospitalisation, general anesthesia or intravenous sedation (*Gil-Salom et al., 1999*).

For testicular sperm retrieval, a standard TESE procedure (*Silber et al., 1995*) is performed by open testicular biopsies under spermatic cord block. After dispersing mechanically the testicular tissue in a Petri dish containing Sperm medium (Medicult, Copenhagen, Denmark), the presence of motile spermatozoa is checked under an inverted microscope at 400x. Only samples with at least a few motile spermatozoa are frozen. The fluid content of the dish is then aspirated, placed in a 10 ml conical tube, and centrifuged at 600xg for 5 minutes.

Details of the cryopreservation technique have been previously described (*Romero et al., 1996, Gil-Salom et al., 1996*). Briefly, before freezing, 1 ml of Test Yolk Buffer cryopreservation medium containing glycerol (Irvine Scientific, Santa Ana, CA) is added to the sperm pellet. The mixture is then homogenized and placed in a 4°C bath for 45 minutes. Thereafter, the mixture is again homogenized, and disposed, with the help of an automatic pipette, in 10-15 100µl-droplets on a dry ice surface. Frozen droplets ("pills") are plunged into liquid nitrogen (-196°C) and stored. Since 1998, Sperm Freezing Medium (Medicult, Jyllinge, Denmark) was used as cryoprotectant.

For thawing, three pills are removed from the liquid nitrogen and placed in a 5 ml conical tube for 5 min at room temperature. The tube with the pills is then placed in a 37°C and 5% CO₂ chamber for 15 min. For removing the cryopreservation medium the specimens are washed by centrifugation with 2 ml IVF medium at 600xg for 5 min. After elimination of the supernatant, the pellet is resuspended in 100 µl. This final suspension is incubated at 37°C and 5% CO₂ for two hours. Thereafter, the presence of motile spermatozoa for ICSI is checked under an inverted microscope.

When all spermatozoa are initially immotile, 1µl of pentoxifylline (20mg/ml) is added to the sperm suspension to enhance sperm motility (Terriou *et al.*, 2000). If no motile spermatozoa are observed after waiting for 2-3 hours, additional three-pill sets are thawed until sperm motility is assessed.

Cryopreservation in pills: results

Between February 1995 and September 2001, we have applied this technique to 467 patients who underwent a total of 182 epididymal aspiration and 476 TESE procedures. In 147 surgical sessions, epididymal and testicular spermatozoa were obtained simultaneously; in 35 cases only epididymal spermatozoa were retrieved, and in 329 cases only TESE was performed. TESE and/or epididymal sperm retrieval were performed during a ICSI cycle, on the same day scheduled for oocyte retrieval, in 134 and 49 cases, respectively. In these cases, after performing ICSI with fresh spermatozoa, spermatozoa in excess were frozen. In 342 cases, TESE was performed during the diagnostic testicular biopsy as part of the diagnostic work-up in the male, all the retrieved spermatozoa being directly frozen for eventually performing ICSI later on. Similarly, in 113 cases, epididymal sperm aspiration was performed prior to initiating ovarian stimulation in the wife.

A total of 155 epididymal sperm samples have been already thawed, and in 151 of them, motile spermatozoa were obtained after thawing, for a survival rate of 97%. The four thawing failures occurred during the first months of experience with the technique; no thawing failures of epididymal sperm frozen samples have been observed since 1996. In 92 cases, one ICSI cycle with frozen-thawed epididymal spermatozoa was performed, whereas in 47, 8 and 4 cases, two, three and four consecutive ICSI cycles were carried out using thawed aliquots from the same frozen sperm samples, respectively. Overall, frozen aliquots from 137 epididymal spermatozoa samples still remain for eventual future use or have been destroyed according to the patients instructions.

Out of the 332 frozen testicular sperm samples that have been already thawed, in 311 cases (94%) enough motile spermatozoa for ICSI were obtained. One ICSI cycle was performed after successfully thawing aliquots from 203 samples. In 89 cases, two ICSI cycles were carried out using aliquots from the same frozen sample. Three and four consecutive ICSI cycles could be done using aliquots from the same frozen samples in 18 and one case, respectively. Frozen aliquots from 213 frozen testicular sperm samples still remain for eventual future use and have not yet been thawed, or, alternatively, have been discarded according to patients instructions. Post-thaw motility rates according to the etiology of infertility are shown in table 1.

Table 1: Post-thaw motility rate of frozen testicular spermatozoa according to the etiology of infertility

	No. thawed samples	No. samples with motile sperm	Post-thaw motility rate (%)
Obstructive azoospermia	193	187	97
Non-obstructive azoospermia	105	92	88
Anejaculation	20	19	95
Necrozoospermia	10	9	90
Azoospermia*	4	4	100
Total	332	311	94

*Azoospermia of unknown origin (histology not available)

In 21 frozen testicular sperm samples (6%) no motile spermatozoa were found after thawing. In one of these patients, epididymal spermatozoa had been simultaneously frozen, and ICSI was carried out with thawed epididymal spermatozoa. In two patients who refused a second testicular biopsy, ICSI was carried out using the immotile frozen-thawed testicular spermatozoa. In the remaining 18 patients, a second TESE attempt was performed on the day of oocyte retrieval as a backup procedure. In 14 of them, motile spermatozoa were retrieved, and ICSI was carried out using these fresh motile testicular spermatozoa. However, in 4 cases (all of them suffering from non-obstructive azoospermia) no spermatozoa were found after a second TESE attempt. Two ICSI cycles using donor sperm were performed, but the other two couples did not accept donor sperm and ICSI was carried out using the immotile frozen-thawed testicular spermatozoa.

ICSI outcome of the four cycles using immotile frozen-thawed testicular sperm was variable: there was one fertilization failure, but normal fertilization was observed in the other three cycles, one of which finished with a clinical pregnancy and a live birth. On this matter, *Batchell et al. (1999)* have shown, using vital stains and the hypo-osmotic swelling (HOS) assay, that a high proportion of immotile testicular spermatozoa after thawing have, in fact, survived cryopreservation. Confirming these results, several studies (*Rives et al., 1998; Gianaroli et al., 1999*) document that immotile spermatozoa recovered from cryopreserved testicular tissue are capable of fertilization, organizing embryo development and yield pregnancies. It has been suggested that the HOS test can be useful as a method for selecting the immotile, but alive, spermatozoa for microinjection (*Batchell et al., 1999*). HOS test reliability in cryopreserved sperm samples, however, has been questioned because of the freezing-thawing damage to cell membrane of the sperma-

tozoa (*Esteves et al., 1996*). Alternatively, in-vitro culture during 72 hours of testicular spermatozoa before freezing has been tested with the intention to increase both initial and post-thaw sperm motility. Results of this approach, however, are controversial (*Emiliani et al., 2000; Liu et al., 2000*). In any case, when only non-motile spermatozoa are found on the initial TESE procedure, they usually remain non-motile after in-vitro culture (*Liu et al., 1997*).

Finally, it should be mentioned that 9 of the 21 testicular sperm thawing failures occurred during the first year of experience with the technique (1995). From 1996 until now, only 12 failures have been observed after thawing 299 testicular sperm frozen samples, so increasing the overall survival rate to 96%. Using a second TESE procedure on the day of oocyte retrieval as a backup procedure, should the thawing attempt fail, 98% of the ICSI cycles in this series could be performed using motile testicular spermatozoa.

These results confirm that cryopreservation of epididymal and testicular spermatozoa in pills is an effective and rather safe technique, which can be used both in obstructive and in non-obstructive azoospermia, obviously with better results in patients with normal spermatogenesis. This technique is also effective when epididymal spermatozoa are retrieved by a simplified retrieval procedure.

ICSI results using cryopreserved spermatozoa

Although most studies show no differences in overall ICSI outcome using fresh or frozen-thawed epididymal spermatozoa (*Devroey et al., 1995b; Nagy et al., 1995; Oates et al., 1996; Cha et al., 1997; Friedler et al., 1998; Cayan et al., 2001*) fewer top grade embryos (*Hutchon et al., 1998*) and lower overall pregnancy rates (*Palermo et al., 1999; Tournaye et al., 1999*)

have been reported in some series in the frozen-thawed group. In studies focused on PESA, ICSI outcomes using fresh and frozen-thawed epididymal spermatozoa were found to be comparable (Friedler et al., 1998; Patrizio, 2000).

Concerning testicular sperm, we showed in a preliminary series of 12 couples, that results after ICSI with fresh and with cryopreserved testicular spermatozoa were not significantly different (Gil-Salom et al., 1996). These results agree with those reported in more recent series (Ben-Yosef et al., 1999; Habermann et al., 2000; Gil-Salom et al., 2000). In other studies, however, lower cleavage rates (Verheyen et al., 1997), ongoing pregnancy rates (Friedler et al., 1997b) and implantation and live birth rates (De Croo et al., 1998) were found after ICSI with frozen-thawed testicular spermatozoa.

These differences may be due to several factors: different cryopreservation techniques, distinct sperm retrieval methods, low number of patients studied, etc. Moreover, there are intrinsic difficulties in the design of comparative studies that may play an important role. For comparing fertilization and embryo cleavage rates, a prospective study on sibling oocytes randomly assigned to a fresh or to a frozen-thawed sperm groups would be, probably, the design of choice. Unfortunately, this is not possible for obvious reasons: to obtain surgically fresh spermatozoa from patients who already have frozen sperm samples would be an unacceptable overtreatment. Therefore, comparative studies are invariably nonrandomized and retrospective, and this approach has several limitations.

If the study is conducted during a short period, only few cases are included, which limits the power of any statistical analysis. On the contrary, if the study period is increased to include a large number of patients, evolution of technical details on sperm retrieval methods, cryopreservation techniques and ICSI methodology itself usually leads to an improvement of results with

time. Indications of ICSI with fresh or frozen-thawed spermatozoa can also change with time, and this may influence overall ICSI results. This bias is evident in the large series that will be here analyzed. As shown in figure 1, our fertilization and pregnancy rates after ICSI with testicular spermatozoa have improved with time, but, simultaneously, the proportion of ICSI cycles with cryopreserved testicular sperm has also increased considerably (Fig. 2).

Fig. 1 Evolution of fertilization and pregnancy rates

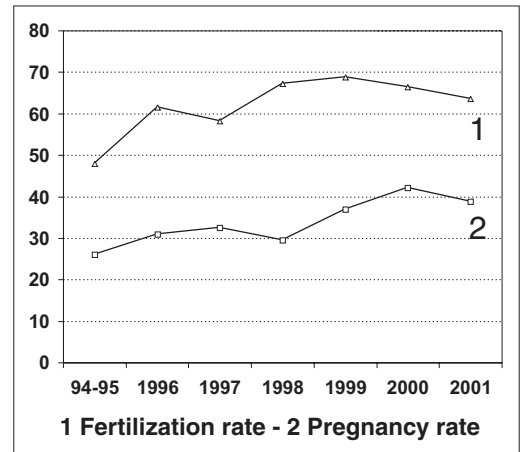
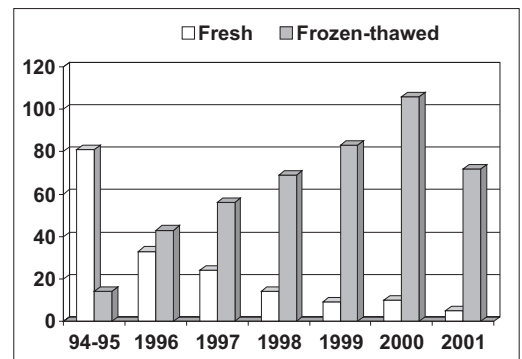


Fig. 2 Evolution of the number of ICSI cycles with fresh and frozen-thawed testicular spermatozoa



This evolution clearly favours ICSI results using cryopreserved testicular sperm.

In addition, some series include couples

that undergo a first ICSI cycle with fresh spermatozoa and a second cycle using spermatozoa that have been frozen during the first one, in order to control better female factor variables (*Gil-Salom et al., 1996; Friedler et al., 1997b; 1998; Hutchon et al., 1998; Tournaye et al., 1999; Cayan et al., 2001*). Nevertheless, when this strategy is applied, besides of the unfeasibility to compare pregnancy rates, a clear selection bias exists: most couples proceed to a second or more ICSI cycles because of pregnancy failure in the initial cycle. In addition, knowledge about the female partner gained from the clinical experience of the first ICSI cycle may also

influence the results (*Cayan et al., 2001*).

Despite these caveats, we have analyzed a large retrospective series, which includes 604 couples that underwent from April 1994 to September 2001 a total of 926 ICSI cycles. In 197 couples, the male partner suffering from obstructive azoospermia, 75 ICSI cycles with fresh epididymal sperm and 226 ICSI cycles with frozen-thawed epididymal spermatozoa were performed. The testicular group is composed by 407 couples, which underwent 176 ICSI cycles with fresh testicular spermatozoa and 443 ICSI cycles using frozen-thawed testicular sperm. Indications for TESE and ICSI are shown in table 2. All

Table 2: Indications for TESE and ICSI

	No. ICSI cycles		
	Total	Fresh	Frozen-thawed
Obstructive azoospermia	352	90	262
Non-obstructive azoospermia	173	39	134
Anejaculation	56	29	27
Necrozoospermia	30	16	14
Azoospermia*	8	2	6
Total	619	176	443

*Azoospermia of unknown origin (histology not available)

Table 3: Oocyte characteristics, fertilization and cleavage rates after ICSI using fresh and cryopreserved epididymal spermatozoa

	Fresh	Cryopreserved
No. of cycles	75	226
Mean female age (years, \pm SD)	32.7 (4.1)	34.1 (4.2)
No. of oocytes injected (mean \pm SD) ^a	761 (10.2 \pm 5.6)	2,235 (9.9 \pm 5.6)
Intact oocytes (% of injected)	683 (89.8)	2,005 (89.7)
No. 2-pronuclear oocytes (% of intact)	418 (61.2)	1,310 (65.3)
Mean 2-pronuclear fertilization rate (\pm SD) ^a	66.2 (\pm 25.4)	69.7 (\pm 23.7)
No. of fertilization failures	2	4
No. of cleaved embryos (% of 2-PN)	366 (87.6)	1,103 (84.2)

^a Value is mean \pm standard deviation of the variable within each cycle

patients showed a normal 46, XY karyotype except for three patients with a non-mosaic 47,XXY Klinefelter syndrome. In congenital bilateral absence of vas deferens couples, cystic fibrosis carrier status was evaluated in both partners. Informed consent about ICSI procedures was obtained from all patients.

ICSI outcomes using epididymal spermatozoa are shown in tables 3 and 4. No significant differences were found when comparing results after ICSI with fresh and with frozen-thawed

spermatozoa (Mann-Whitney U test or Chi-square test, when required). Results after ICSI with testicular spermatozoa are shown in tables 5 and 6. Although mean fertilization rate per cycle, as well as implantation and pregnancy rate, was higher in the cryopreserved group, these differences did not reach statistical significance. Despite the abovementioned limitations, these results confirm that high fertilization and pregnancy rates can be achieved after ICSI with frozen-thawed surgically retrieved spermatozoa from the epididymis and testicle.

Table 4: Pregnancy rates after ICSI using fresh and cryopreserved epididymal spermatozoa

	Fresh	Cryopreserved
No. of cycles with embryo transfer (%)	73 (97.3)	203 (90.2)
Mean no. of embryos per transfer (\pm SD) ^a	3.3 (\pm 1.1)	3.0 (\pm 1.4)
No. of cryopreserved embryos	120	347
No. of clinical pregnancies	23	64
Clinical pregnancy rate per started cycle (%)	30.7	28.3
Clinical pregnancy rate per embryo transfer (%)	31.5	31.5
Implantation rate (%)	12.6	13.8
No. of miscarriages (%)	5 (22)	14 (22)
No of ectopic pregnancies	0	1
No. of ongoing pregnancies	18	49
No. of deliveries ^b	18	45
Live births	24	62
Singleton	12	29
Sets of twin	6	15
Sets of triplets	0	1
Congenital malformations	0	1

^a Value is mean \pm standard deviation of the variable within each cycle

^b Four pregnancies in the cryopreserved group are still ongoing

Conclusions

Cryopreservation of surgically retrieved spermatozoa is a very useful tool in assisted reproduction, avoiding repetition of surgical sperm retrieval procedures and allowing a proper selection of non-obstructive azoospermia couples for ICSI. Cryopreservation in pills of surgically retrieved spermatozoa is an effective and rather safe technique, offering high sperm survival rates after thawing. Stu-

dies comparing results after ICSI using fresh or frozen-thawed surgically retrieved spermatozoa have intrinsic, design-related limitations. Nevertheless, ICSI with cryopreserved epididymal and testicular spermatozoa offers high fertilization, pregnancy, and live birth rates. Therefore, freezing of spermatozoa should always be considered when performing a diagnostic testicular biopsy or a microsurgical reconstruction of the seminal tract.

Table 5 Oocyte characteristics, fertilization and cleavage rates after ICSI using fresh and cryopreserved testicular spermatozoa

	Fresh	Cryopreserved
No. of cycles	176	443
Mean female age (years, \pm SD)	33.4 (4.5)	33.7 (4.5)
No. of oocytes injected (mean \pm SD) ^a	2,009 (11.4 \pm 9.7)	4,813 (10.9 \pm 6.4)
Intact oocytes (% of injected)	1,800 (89.6)	4,369 (90.8)
No. 2-pronuclear oocytes (% of intact)	1,016 (56.4)	2,814 (64.4)
Mean 2-pronuclear fertilization rate (\pm SD) ^a	64.4 (\pm 24.5)	68.1 (\pm 22.6)
No. of fertilization failures	3	10
No. of cleaved embryos (% of 2-PN)	863 (84.9)	2,321 (82.5)

^a Value is mean \pm standard deviation of the variable within each cycle

Table 6: Pregnancy rates after ICSI using fresh and cryopreserved testicular spermatozoa

	Fresh	Cryopreserved
No. of cycles with embryo transfer (%)	169 (97.7)	413 (94.3)
Mean no. of embryos per transfer (\pm SD) ^a	3.4 (\pm 1.4)	3.0 (\pm 1.2)
No. of cryopreserved embryos	239	589
No. of clinical pregnancies	51	148
Clinical pregnancy rate per started cycle (%)	29.0	33.4
Clinical pregnancy rate per embryo transfer (%)	30.2	35.8
Implantation rate (%)	12.3	16.4
No. of miscarriages (%)	10 (20)	27 (18)
No of ectopic pregnancies	1	3
No. of ongoing pregnancies	40	118
No. of deliveries ^b	38	98
Live births	52	138
Singleton	25	62
Sets of twin	12	32
Sets of triplets	1	4
Congenital malformations	0	2

^a Value is mean \pm standard deviation of the variable within each cycle

^b Two pregnancies in the fresh and 20 in the cryopreserved group are still ongoing

REFERENCES

■ **Allan JA & Cotman AS.**

A new method for freezing testicular biopsy sperm: 3 pregnancies with sperm extracted from cryopreserved sections of seminiferous tubule.

Fertil Steril 68: 741-744, 1997.

■ **Batchell NE, Conaghan J, Turek PJ.**

The relative viability of human spermatozoa from the vas deferens, epididymis and testis before and after cryopreservation.

Hum Reprod 14: 3048-3051, 1999.

■ **Ben-Yosef D, Yogev L, Hauser R, Yavetz H, Azem F, Yovel I., Lessing JB, Amit A.**

Testicular sperm retrieval and cryopreservation prior to initiating ovarian stimulation as the first line approach in patients with non-obstructive azoospermia.

Hum Reprod 14: 1794-1801, 1999.

■ **Cayan S, Lee D, Conaghan J, Givens CA, Ryan IP, Schriock ED, Turek PJ.**

A comparison of ICSI outcomes with fresh and cryopreserved epididymal spermatozoa from the same couples.

Hum Reprod 16: 495-499, 2001.

■ **Cha KY, Oum KB, Kim HJ.**

Approaches for obtaining sperm in patients with male factor infertility.

Fertil Steril 67: 985-995, 1997.

■ **Cohen J, Garrisi GJ, Congedo-Ferrara AA, Kieck KA, Schimmel TW, Scott RT.**

Cryopreservation of single human spermatozoa.

Hum Reprod 12: 994-1001, 1997.

■ **Crabbe E, Verheyen G, Tournaye H, Van Steirteghem A.**

Freezing of testicular tissue as a minced suspension preserves sperm quality better than whole-biopsy freezing when glycerol is used as cryoprotectant.

Int J Androl 22: 43-48, 1999.

■ **Craft I & Tsirigotis M.**

Simplified recovery, preparation and cryopreservation of testicular spermatozoa.

Hum Reprod 10: 1623-1627, 1995.

■ **De Croo I, Van der Elst J, Everaert K, De Sutter P, Dhont M.**

Fertilization, pregnancy and embryo implantation rates after ICSI with fresh or frozen-thawed testicular spermatozoa.

Hum Reprod 13: 1893-1897, 1998.

■ **Devroey P, Liu J, Nagy Z, Goosens A, Tournaye H, Camus M, Van Steirteghem A.**

Pregnancies after testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection in non-obstructive azoospermia.

Hum Reprod 10: 1457-1460, 1995a.

■ **Devroey P, Silber S, Nagy Z, Liu J, Tournaye H, Joris H, Verheyen G, Van Steirteghem AC.**

Ongoing pregnancies and birth after intracytoplasmic sperm injection with frozen-thawed epididymal spermatozoa.

Hum Reprod 10: 903-906, 1995b.

■ **Emiliani S, Van den Bergh M, Vannin AS, Birmane J, Verdoodt M, Englert Y.**

Increased sperm motility after in-vitro culture of testicular biopsies from obstructive azoospermic patients results in better post-thaw recovery rate.

Hum Reprod 15: 2371-2374, 2000.

■ **Esteves SC, Sharma RK, Thomas AJ Jr, Agarwal A.**

Suitability of hypo-osmotic swelling test for assessing the viability of cryopreserved sperm.

Fertil Steril 66: 798-804, 1996.

■ **Ezeh UIO, Moore HDM, Cooke ID.**

A prospective study of multiple needle biopsies versus a single open biopsy for testicular sperm extraction in men with non-obstructive azoospermia.

Hum Reprod 13: 3075-3080, 1998.

■ **Fischer R, Baukloh V, Naether OGJ, Schulze W, Salzbrunn A, Benson DM.**

Pregnancy after intracytoplasmic sperm injection of spermatozoa from frozen-thawed testicular biopsy.

Hum Reprod 11: 2197-2199, 1996.

■ **Friedler S, Raziel A, Strassburger D, Soffer Y, Komarovsky D, Ron-El R.**

Testicular sperm retrieval by percutaneous fine needle aspiration compared with testicular open extraction by open biopsy in men with non-obstructive azoospermia.

Hum Reprod 12: 1488-1493, 1997a.

■ **Friedler S., Raziel A, Soffer Y, Strassburger D, Komarovskiy D, Ron-El R.**

Intracytoplasmic sperm injection of fresh and cryopreserved testicular spermatozoa in patients with non-obstructive azoospermia. A comparative study. Fertil Steril 68: 892-897, 1997b.

■ **Friedler S., Raziel A, Soffer Y, Strassburger D, Komarovskiy D, Ron-El R.**

The outcome of intracytoplasmic sperm injection of fresh and cryopreserved epididymal spermatozoa from patients with obstructive azoospermia. A comparative study.

Hum Reprod 13: 1872-1877, 1998.

■ **Gianaroli L, Magli MC, Selman HA, Colpi G, Belgrano E, Trombetta C, Vitali G, Ferraretti AP.**

Diagnostic testicular biopsy and cryopreservation of testicular tissue as an alternative to repeat surgical openings in the treatment of azoospermic men. Hum Reprod 14: 1034-1038, 1999.

■ **Gil-Salom M, Mínguez Y, Rubio C, Remohí J, Pellicer A.**

Intracytoplasmic testicular sperm injection: an effective treatment for otherwise intractable obstructive azoospermia.

J Urol 154: 2074-2077, 1995a.

■ **Gil-Salom M, Remohí J, Mínguez Y, Rubio C, Pellicer A.**

Pregnancy in an azoospermic patient with markedly elevated serum follicle-stimulating hormone levels.

Fertil Steril 64: 1218-1220, 1995b.

■ **Gil-Salom M, Romero J, Mínguez Y, Rubio C, De los Santos MJ, Remohí J, Pellicer A.**

Pregnancies after intracytoplasmic sperm injection with cryopreserved testicular spermatozoa.

Hum Reprod 11: 1309-1313, 1996.

■ **Gil-Salom M, Romero J, Rubio C, Mínguez Y, Remohí J, Pellicer A.**

Testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection: A chance of fertility in non-obstructive azoospermia.

J Urol 160: 2063-2067, 1998.

■ **Gil-Salom M, Romero J, Mínguez Y, Rubio C, Ruiz A, Molero MD, Remohí J, Pellicer A.**

Punción-aspiración macroscópica de espermatozoides de epidídimo para ICSI.

In: Libro de comunicaciones del IX Congreso Nacional de Andrología, Oviedo, March 10-12, 1999, p 65-66.

■ **Gil-Salom M, Romero J, Rubio C, Ruiz A, Remohí J, Pellicer A.**

Intracytoplasmic sperm injection with cryopreserved testicular spermatozoa.

Mol Cell Endocrinol 169: 15-19, 2000.

■ **Habermann H, Seo R, Cieslak J, Niederberger C, Prins GS, Ross L.**

In vitro fertilization outcomes after intracytoplasmic sperm injection with fresh or frozen-thawed testicular spermatozoa.

Fertil Steril 73: 955-960, 2000.

■ **Holden CA, Fuscaldo GF, Jackson P, Cato A, Southwick GJ, Hauser R, Temple-Smith PD, McLachlan RI.**

Frozen-thawed epididymal spermatozoa for intracytoplasmic sperm injection.

Fertil Steril 67: 81-87, 1997.

■ **Hutchon S, Thornton S, Hall J, Bishop M.**

Frozen-thawed epididymal sperm is effective for intracytoplasmic sperm injection: implications for the urologist.

Br J Urol 81: 607-611, 1998.

■ **Hovatta O, Foudila T, Sieberg R, Johansson K, von Smitten K, Reima I.**

Pregnancy resulting from intracytoplasmic sperm injection of spermatozoa from a frozen-thawed testicular biopsy specimen.

Hum Reprod 11: 2472-2473, 1996.

■ **Khalifeh FA, Sarraf M, Dabit ST.**

Full-term delivery following intracytoplasmic sperm injection with spermatozoa extracted from frozen-thawed testicular tissue.

Hum Reprod 12: 87-88, 1997.

■ **Lewin A, Reubinoff B, Porat-Katz A, Weiss D, Eisenberg V, Arbel R, Bar-el H, Safran A.**

Testicular fine needle aspiration: The alternative method for sperm retrieval in non-obstructive azoospermia.

Hum Reprod 14: 1785-1790, 1999.

■ **Liu J, Tsai YL, Katz E, Compton G, Garcia JE, Baramki TA.**

Outcome of in-vitro culture of fresh and frozen-thawed human testicular spermatozoa.
Hum Reprod 12: 1667-1672, 1997.

■ **Liu J, Zheng XZ, Baramki TA, Compton G, Yazigi RA, Katz E.**

Cryopreservation of a small number of fresh human testicular spermatozoa and testicular spermatozoa cultured in-vitro for 3 days in an empty zona-pellucida.
J Androl 21: 409-413, 2000.

■ **Manning M, Jünemann KP, Alken P.**

Decrease in testosterone blood concentrations after testicular sperm extraction for intracytoplasmic sperm injection in azoospermic men.
Lancet 352: 37, 1998.

■ **Matthews GJ, McGee K, Goldstein M.**

Microsurgical reconstruction following failed vasectomy reversal.
J Urol 157: 844-846, 1997.

■ **Mulhall JP, Burgess CM, Cunningham D, Carson R, Harris D, Oates RD.**

Presence of mature sperm in testicular parenchyma of men with non-obstructive azoospermia: Prevalence and predictive factors.
Urology 49: 91-95, 1997.

■ **Nagase H & Niwa T.**

Deep freezing bull semen in concentrated pellet form. I. Factors affecting survival.
In: Proceedings of V Congresso Internazionale per la Riproduzione Animale e la Fecondazione Artificiale 4: 410-415, 1964.

■ **Nagy Z, Liu J, Cecile J, Silber S, Devroey P, Van Steirteghem AC.**

Using ejaculated, fresh, and frozen-thawed epididymal and testicular spermatozoa give rise to comparable results after intracytoplasmic sperm injection.
Fertil Steril 63: 808-815, 1995.

■ **Nudell DM, Conaghan J, Pedersen RA, Givens CR, Schriock ED, Turek PJ.**

The mini-micro-epididymal sperm aspiration for sperm retrieval: a study of urological outcomes.
Hum Reprod 13: 1260-1265, 1998.

■ **Oates RD, Lobel SM, Harris DH, Pang S, Burgess CM, Carson RS.**

Efficacy of intracytoplasmic sperm injection using intentionally cryopreserved epididymal spermatozoa.

Hum Reprod 11: 133-138, 1996.

■ **Oates RD, Mulhall J, Burgess C, Cunningham D, Carson R.**

Fertilization and pregnancy using intentionally cryopreserved testicular tissue as the sperm source for intracytoplasmic sperm injection in 10 men with non-obstructive azoospermia.
Hum Reprod 12: 734-739, 1997.

■ **Palermo GP, Schlegel PN, Hariprashad JJ, Ergün B, Mielnick A, Zaninovic N, Veeck LL, Rosenwaks Z.**

Fertilization and pregnancy outcome with intracytoplasmic sperm injection for azoospermic men.
Hum Reprod 14: 741-748, 1999.

■ **Patrizio P.**

Cryopreservation of epididymal sperm.
Mol Cell Endocrinol 169: 11-14, 2000.

■ **Podsiadly BT, Woolcott RJ, Stanger JD, Stevenson K.**

Pregnancy resulting from intracytoplasmic injection of cryopreserved spermatozoa recovered from testicular biopsy.
Hum Reprod 11: 1306-1308, 1996.

■ **Rives N, Sibert L, Clavier B, Delabroye V, Marpeau L, Macé B.**

Full-term delivery following intracytoplasmic sperm injection with frozen-thawed immotile testicular spermatozoa.
Hum Reprod 13: 3399-3401, 1998.

■ **Romero J, Remohí J, Mínguez Y, Rubio C, Pellicer A, Gil-Salom M.**

Fertilization after intracytoplasmic sperm injection with cryopreserved testicular spermatozoa.
Fertil Steril 65: 877-879, 1996.

■ **Salzbrunn A, Benson DM, Holstein AF, Schulze W.**

A new concept for the extraction of testicular spermatozoa as a tool for assisted fertilization (ICSI).
Hum Reprod 11: 752-755, 1996.

■ **Scherr D, Choi B, Su LM, Moomjy M, Schlegel PN, Goldstein M.**

Pregnancy after testicular sperm extraction at the time of radical orchiectomy for cancer in a solitary testis.

In: Proceedings of the American Urological Association 94th Annual Meeting. *J Urol* 161: 353, 1999.

■ **Schlegel PN & Su LM.**

Physiological consequences of testicular sperm extraction.

Hum Reprod 12: 1688-1692, 1997.

■ **Schoysman R, Vanderzvalmen P, Nijs M, Segal-Bertin G, Geerts L, van Roosendaal E, Schoysman D.**

Pregnancy after fertilization with human testicular spermatozoa.

Lancet 342: 1237, 1993.

■ **Shrivastav P, Nadkarni P, Wensvoort S, Craft I.**

Percutaneous epididymal sperm aspiration for obstructive azoospermia.

Hum Reprod 9: 2058-2061, 1994.

■ **Shufaro Y, Prus D, Laufer N, Simon A.**

Impact of repeated fine needle aspiration (TEFNA) and testicular sperm extraction (TESE) on the microscopic morphology of the testis: an animal model.

In: Proceedings of the 17th Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology, Lausanne, July 1-4, 2001, *Hum Reprod* 16 (Suppl): 11, 2001.

■ **Silber SJ, Nagy Z, Liu J, Godoy H, Devroey P, Van Steirteghem AC.**

Conventional in-vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection for patients requiring microsurgical sperm aspiration.

Hum Reprod 9: 1705-1709, 1994.

■ **Silber SJ, Van Steirteghem AC, Liu J, Nagy Z, Tournaye H, Devroey P.**

High fertilization and pregnancy rates after intracytoplasmic sperm injection with spermatozoa obtained from testicle biopsy.

Hum Reprod 10: 148-152, 1995.

■ **Terriou P, Hans E, Giorgetti C, Spach JL, Salzmann J, Urrutia V, Roulier R.**

Pentoxifylline initiates motility in spontaneously immotile epididymal and testicular spermatozoa and allows normal fertilization, pregnancy, and birth after intracytoplasmic sperm injection.

J Assist Reprod Genet 17: 194-199, 2000.

■ **Tournaye H, Devroey P, Liu J, Nagy Z, Lis-**

sens W, Van Steirteghem AC.

Microsurgical epididymal sperm aspiration and intracytoplasmic sperm injection: A new effective approach to infertility as a result of congenital bilateral absence of vas deferens.

Fertil Steril 61: 1045-1051, 1994.

■ **Tournaye H, Liu J, Nagy PZ, Camus M, Goosens A, Silber S, Van Steirteghem AC, Devroey P.**

Correlation between testicular histology and outcome after intracytoplasmic sperm injection using testicular spermatozoa.

Hum Reprod 11: 127-132, 1996.

■ **Tournaye H, Verheyen G, Nagy P, Ubaldi E, Goosens A, Silber S, Van Steirteghem AC, Devroey P.**

Are there any predictive factors for successful testicular sperm recovery in azoospermic patients?

Hum Reprod 12: 80-86, 1997.

■ **Tournaye H, Merdad T, Silber S, Joris H, Verheyen G, Devroey P, Van Steirteghem AC.**

No differences in outcome after intracytoplasmic sperm injection with fresh or with frozen-thawed epididymal spermatozoa.

Hum Reprod 14: 90-95, 1999.

■ **Tuuri T, Moilanen J, Kaukoranta S, Makinen S, Kotola S, Hovatta O.**

Testicular biopsy gun needle biopsy in collecting spermatozoa for intracytoplasmic sperm injection, cryopreservation and histology.

Hum Reprod 14: 1274-1278, 1998.

■ **Verheyen G, Nagy Z, Joris H, De Croo I, Tournaye H, Van Steirteghem AC.**

Quality of frozen-thawed testicular sperm and its preclinical use for intracytoplasmic sperm injection into in vitro-matured germinal-vesicle stage oocytes.

Fertil Steril 67: 74-80, 1997.

■ **Yavetz H, Hauser R, Botchan A, Azem F, Yovel I, Lessing JB, Amit A, Yogev L.**

Pregnancy resulting from frozen-thawed embryos achieved by intracytoplasmic injection of cryopreserved sperm cells extracted from an orchidectomized, seminoma-bearing testis, causing obstructive azoospermia.

Hum Reprod 12: 2836-2838, 1997.

IL RUOLO DELL'EPIDIDIMO NELL'INFERTILITÀ

Robert Schoysman

Schoysman Infertility Management Foundation - Bruxelles

Introduzione

La formazione di spermatozoi con adeguata capacità fecondante è il risultato di una lunga cascata di eventi alla quale contribuiscono tutti gli organi dell'apparato genitale maschile. A partire dai tubuli seminiferi fino all'uretra, dove entrano in contatto con le secrezioni delle ghiandole seminali accessorie, gli spermatozoi subiscono una serie di modificazioni morfofunzionali indotte da fattori endocrini, biochimici e genetici. Tuttavia, anche in condizioni fisiologiche favorevoli, solo una minoranza degli spermatozoi emessi con l'eiaculazione è in grado di fertilizzare in-vivo e dare quindi inizio ad una gravidanza evolutiva.

Agli albori dell'Andrologia moderna gli studi sulla fertilità maschile si sono orientati principalmente sulla qualità della cellula spermatozoo, sottovalutando il contributo di tutta la via seminale (dai duttoli efferenti all'uretra). A tale riguardo il testicolo e l'epididimo giocano ovviamente un ruolo preminente nello sviluppo e nella acquisizione della capacità fecondante dello spermatozoo. Le ghiandole accessorie svolgono un ruolo che potremmo definire minore, essendo deputate alla produzione di plasma seminale che contribuisce alla loro sopravvivenza in vagina.

L'importanza dell'epididimo nella maturazione dello spermatozoo è nota fin dagli anni '60. Prima di allora tale ruolo era stato solo ipotizzato. Dopo decenni di ricerca sulla fisiologia

e sulla patologia epididimaria si è oggi giunti alla conclusione che tale organo gioca un ruolo di importanza pari solo a quello del testicolo. Le funzioni dell'epididimo sulla maturazione dello spermatozoo sono molteplici e sebbene alcuni processi debbano essere chiariti e non sia ancora stata stilata una precisa mappa della secrezione epididimaria, è ormai chiaro che i diversi segmenti di quest'organo secernono specifiche sostanze necessarie allo spermatozoo per acquisire la capacità motoria e la competenza a fertilizzare l'ocita.

Quando l'epididimo viene coinvolto da patologie congenite od acquisite le ripercussioni sulla fertilità spontanea possono diventare drammatiche. Le disfunzioni che ne conseguono risultano eterogenee, potendo interferire sulla qualità degli spermatozoi, ma anche sulla canalizzazione dell'organo, con ovvie ripercussioni sulla concentrazione e sulla conta totale degli spermatozoi eiaculati. Possiamo pertanto distinguere infertilità maschili epididimarie caratterizzate da:

- Inadeguata attività secretoria
- Oligozoospermia
- Azoospermia.

Inadeguata attività secretoria dell'epididimo

Questa situazione può in prima istanza essere sospettata quando la motilità degli spermatozoi nell'eiaculato è assente o molto bassa, o quando essa risulta non rettilinea. Recenti

Versione italiana a cura di M. Mancini & G. Piediferro

ricerche hanno dimostrato la predominante importanza della secrezione di alcuni tratti dell'epididimo. Un tipico esempio è la FMP (forward moving protein) secreta nella porzione prossimale del caput epididymis. Un deficit di questa proteina provoca una totale immobilità degli spermatozoi ejaculati oppure la mancanza di motilità progressiva. Non conoscendone la causa (genetica? acquisita?), non esiste neppure una terapia specifica che possa migliorare la motilità degli spermatozoi.

Un deficit secretorio può comportare immobilità spermatozoaria, o talvolta spermatozoi mobili ma infertili. Nel 2% dei maschi infertili ma apparentemente normozoospermici, gli spermatozoi non sono in grado di penetrare gli oociti in corso di IVF classica. In questi pazienti l'unica soluzione disponibile al momento è la iniezione di spermatozoi nel citoplasma ovocitario (ICSI).

Oligozoospermia epididimaria

Nonostante la rilevante mole di ricerche sulla oligoastenozoospermia, questo problema rimane uno degli argomenti più dibattuti in andrologia. Ovviamente l'oligo-asteno-teratozoospermia (OAT) non è di per sé stessa una patologia, ma l'effetto di differenti patologie, alcune delle quali note, altre ancora da individuare. Il 50% circa delle OAT viene classificato come idiopatico. Non essendo disponibile per queste ultime una cura efficace, il poter scoprire una precisa etiologia permetterebbe di aumentare le chance di trattamento. Per studiare le anomalie della meiosi spermatozoaria in soggetti affetti da OAT abbiamo in passato praticato un gran numero di biopsie testicolari in collaborazione con i nostri genetisti. Questa ricerca ha messo in luce che il 17% dei maschi affetti da OAT severa risulta portatore di una anomalia cromosomica a carico delle cellule della spermatogenesi, non necessariamente evidenziabile sul sangue periferico. Nell'ambito

della stessa ricerca abbiamo isolato un gruppo di pazienti nei quali l'oligozoospermia era di natura epididimaria. In questi soggetti infatti la meiosi e la spermatogenesi risultavano assolutamente normali, in contrasto con un quadro di severa oligospermia in ripetuti spermogrammi. Questa discrepanza ci ha portato ad esaminare attentamente l'epididimo. In sede intraoperatoria si sono evidenziati epididimi di volume normale ma con aree discromiche alternate a tubuli dilatati ed a sclerosi. Palpatoriamente tali anomalie corrispondevano a indurimenti ed a nodularità al caput e al corpus epididymis. La maggior parte di questi casi era legato a sequele di infezioni (evidentemente asintomatiche), che avevano provocato una subostruzione dei tubuli epididimari con difficoltà di transito spermatozoario.

L'anamnesi di soggetti gravemente oligozoospermici o azoospermici rivela occasionalmente un trauma in regione scrotale o una infezione, usualmente descritta dai pazienti come "orchite". Le indagini routinarie rivelano di norma un quadro ormonale normale. L'esame obiettivo documenta testicoli di consistenza normale ed un epididimo che può essere in alcuni casi discretamente dilatato, ed in altri assolutamente normale. In questi casi il sospetto di una sub-ostruzione epididimaria può essere risolto solo mediante un'esplorazione scrotale. Quest'ultima può documentare la presenza di aderenze tra tunica albuginea e tunica vaginale che provocano uno strangolamento dell'epididimo (usualmente a livello del corpo epididimario). Quando la compressione esercitata dalla sinechia non risulta molto serrata, la canalizzazione del tubulo epididimario può essere parzialmente conservata (oligozoospermia). Quando la compressione è molto serrata essa può provocare una ostruzione completa dell'organo. In tali circostanze l'epididimo appare dilatato a monte della zona di compressione, mentre a valle risulta ipotrofico. In tali casi si suggerisce di praticare una epidid-

dimolisi e liberare il corpo epididimario al fine di permettere un miglioramento del transito degli spermatozoi. Tuttavia quando gli strangolamenti risultano molto serrati, la elevata pressione nel tubulo epididimario a monte può avere nel frattempo provocato la rottura del tubulo stesso in più punti e, con un meccanismo a cascata, flogosi e fibrosi epididimaria con totale sovvertimento della sua canalizzazione. In questi casi pertanto la lisi delle sinechie non dovrebbe apportare alcun miglioramento sul quadro seminale. Questa situazione non può comunque essere prevista durante l'esplorazione chirurgica, poiché il ripristino del normale passaggio degli spermatozoi può essere valutato solo mediante lo spermioγραμμα a distanza di settimane o mesi. In una nostra esperienza su 9 pazienti trattati, la ricanalizzazione è stata ottenuta in cinque, rimanendo quattro pazienti immodificati (tre azoospermici, ed uno oligospermico severo). Quest'ultimo dato documenta che, in aggiunta alla lesione epididimaria esterna, c'era anche una ostruzione tubulare conseguenza o di una compressione di lunga data o già presente al momento del trauma o della infezione.

Un'altra causa responsabile di oligo-asteno-azoospermia è la inversione verticale dell'epididimo (Fig. 1). Si tratta di una anomalia anatomica congenita, dove il polo superiore del testicolo e quindi il caput epididimario basculano in avanti e inferiormente. La coda dell'epididimo, che contiene la maggior parte degli spermatozoi disponibili al momento dell'eiaculazione, viene quindi a trovarsi alla radice dello scroto, ad una temperatura più elevata. Questi maschi possono essere affetti da OAT, pur con una spermatogenesi eccellente. Esperimenti condotti su roditori a cui era stata creata chirurgicamente una analoga situazione anatomica di malposizione epididimaria hanno dimostrato una importante riduzione della motilità e della capacità fertilizzante degli spermatozoi.

Se ne conclude che tale anomalia anatomica

porta frequentemente ad oligo-astenospermia.

Per concludere possiamo dire che buona parte delle OAT sono causate da un danno della spermatogenesi, ma vi sono numerose evidenze che spostano l'attenzione verso una responsabilità epididimaria che nella nostra esperienza ammonta al 40% dei casi.

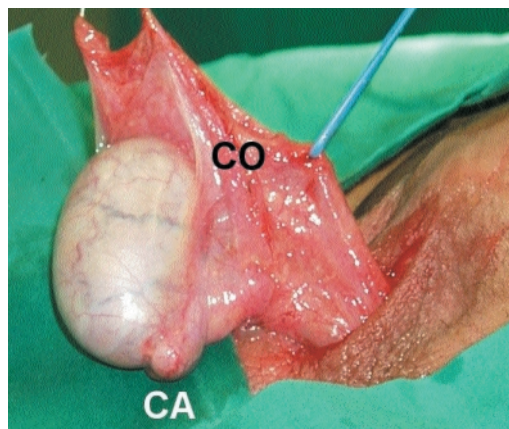


Fig. 1: Inversione verticale del testicolo: reperto intraoperatorio. Il caput epididymis (CA) è posizionato caudalmente mentre dalla coda (CO), posta cranialmente, prende origine il dotto deferente (sospeso da una fettuccia).

Azoospermia epididimaria

L'ostruzione completa di entrambi gli epididimi provoca azoospermia. Le cause di ostruzione sono in parte le stesse descritte per le forme di oligozoospermia epididimaria. Un ruolo preminente spetta alle forme infettive, generalmente da chlamydia o da gonococco. Tra le forme congenite prevale la agenesia dei dotti deferenti e di una parte più o meno consistente del corpus e della cauda degli epididimi.

Per quanto concerne il trattamento ricostruttivo dell'epididimo si rimanda al capitolo "Ricanalizzazione microchirurgica della via seminale prossimale" pubblicato su "L'Infertilità Maschile Oggi", Vol. 1/2001. Nei casi dove non sia possibile ricostruire la via seminale ostruita si ricorre alla riproduzione assistita (ICSI) utilizzando spermatozoi prelevati dall'epididimo o dal testicolo (si veda in det-

taglio il capitolo "Recupero chirurgico degli spermatozoi: che metodo utilizzare?" pubblicato sempre nel suddetto volume).

Conclusioni

I successi della ICSI con spermatozoi prelevati chirurgicamente dall'epididimo o dal testicolo ha spinto alcuni Autori ad affermare che la ricerca sulla fisiologia epididimaria risulta ormai di scarso interesse, riducendo

pertanto l'epididimo ad un organo tubulare di scarsa importanza. Questo approccio scientifico è ovviamente sbagliato. Se è vero che la ICSI ha bypassato con successo la funzione epididimaria nella riproduzione in-vitro, è altresì vero che l'epididimo rimane un organo di capitale importanza nella riproduzione naturale (in-vivo). Rimuovere artificiosamente il ruolo dell'epididimo attraverso l'uso della ICSI (sottraendo risorse alla ricerca) non significa negare l'utilità di questo organo.

BIBLIOGRAFIA

■ Bedford JM.

Effects of elevated temperature in the epididymis and testis: experimental studies.

In: Temperature and Environmental Effects in the Testis.

AW Zorgniotti (ed), New York, Plenum Press, 1991.

■ Bedford JM.

The status and the state of the human epididymis. Hum Reprod Update 9: 2187, 1994.

■ **Blaquier J.A, Cameo MS, Cuasnicu PS, Gonzales Echeverria MF, Pineiro L, Tezon SG, Vazquez MH.**

On the role of epididymal factors in sperm fertility. Reprod Nutr Develop 28: 1209, 1988.

■ Courot M.

Transport and maturation of spermatozoa.

Progress Reprod Biol 8: 67, 1981.

■ Fournier Delpech S & Thibault Ch.

Maturation epididymaire, glandes annexes et capacitation.

In: La reproduction chez les Mammiferes et l'Homme. INRA, 1991.

■ Glover TD.

Spermatozoa from the isolated cauda epididymis of rabbits and some effects of artificial cryptorchidism.

J Reprod Fertil 1: 121.

■ Koulischer L & Schoysman R.

Chromosomes and human infertility. Mitotic and

meiotic chromosome studies in 202 male infertile patients.

Clinical Genetics 5: 116, 1974.

■ Koulischer L & Schoysman R.

Etude des chromosomes mitotiques et meiotiques chez les hommes infertiles.

C.R.3ième Journées Européennes de Conseil Génétique. (Médecine et Hygiène, Genève 1975, 58).

■ Orgebin-Crist MC & Fournier Delpech S.

Sperm-egg interaction. Evidence for maturational changes during epididymal transit.

J Androl 3: 429, 1982.

■ Schoysman R.

Epididymal causes of male infertility.

Int Congress Fertility, Miami, 1975.

■ Schoysman R.

Epididymal causes of male infertility: pathogenesis and management.

Int J Androl (Suppl. 5): 120, 1982.

■ Schoysman R.

L'oligospermie epididymaire.

Reprod Nutr Develop 28: 1339, 1988.

■ Silber SJ & Rodriguez-Rigau LS.

Quantitative analysis of testicle biopsy: determination of partial obstruction and prediction of sperm count after surgery for obstruction.

Fertil Steril 26: 480, 1981.

■ Van de Casseye M & Schoysman R.

Pathologie de l'epididyme et repercussion sur la fonction testiculaire.

Reprod Nutr Develop 28: 1347, 1988.

THE EPIDIDYMIS AS A TARGET FOR MALE CONTRACEPTION

Trevor G. Cooper

Institute of Reproductive Medicine of the University, Münster, Germany

1. Introduction

The advantage of post-testicular contraception lies in its rapid onset of infertility, its reversible nature and the fast return of fertility once therapy is withdrawn. As such, it has much to offer over the hormonal approaches that aim to block testicular sperm production which take months for sperm numbers to be reduced sufficiently for effective contraception. Seeking ways to bring about "functional sterility" by an epididymal approach is no idle concept, since natural infertility stemming from epididymal dysfunction is observed in several domestic species and some transgenic mice (see *Cooper, 1992; Yeung et al., 1998*).

Although epididymal malfunction has been suggested to account for 20% of cases of human necrozoospermia (*Nduwayo et al., 1995*), it is difficult to prove and there are few cases of male infertility unequivocally caused by epididymal dysfunction (*De Kretser et al., 1998*). There is however, increasing evidence that human spermatozoa within the epididymal canal undergo similar maturational processes as do sperm from other species, so that the reports on post-testicular contraceptives describing animal experiments are based on physiological principals of sperm transport, maturation and storage that are applicable to man.

2. Epididymal involvement in human sperm maturation and storage

To achieve fertilisation, spermatozoa sequentially have to be able to penetrate

cervical mucus, survive in the uterus, negotiate the utero-tubal junction, interact with oviductal epithelial cells, migrate towards the ovum, penetrate the cumulus oophorus, bind to the zona pellucida, undergo the acrosome reaction on the zona, fuse with the vitellus, activate the egg, condense its chromatin, organise the mitotic spindle and support normal embryo development. All these processes are acquired within the human epididymal canal (*Cooper, 2000*). Whereas flagellar motility development appears epididymis independent, coordinated flagellation requires the epididymal environment. Many secreted epididymal glycoproteins have been identified that bind to particular sperm membrane domains are involved in facilitating sperm-ovum interaction. For example, P34H and SOB3 (sperm-oocyte binding protein 3) are involved in primary and secondary binding to the zona pellucida; HE1 (a sterol-binding protein) may be involved in modifying the membranes so that the acrosome reaction can occur; SOB1, SOB2 and CD52 are involved in sperm-oocyte binding/fusion.

As the post-testicular maturation of sperm involves their generally slow transport of through the epididymal canal (4-12 days) during which they take up specific secretions, studies attempting to induce infertility in animals can be categorised as those that interrupt sperm transport, modifying luminal fluid composition or attacking spermatozoa themselves.

3. Compounds that alter the epididymal transport of spermatozoa

The aim here is to speed up or arrest sperm transport. The former should reduce the time that sperm spend in contact with epididymal secretions and lead to the ejaculation of immature, potentially non-fertilising spermatozoa; it may also deplete the caudal sperm reserve so that suboptimal numbers of sperm are ejaculated. The opposite approach of slowing down sperm transport should prevent seminal emission from the cauda epididymidis and produce azoospermia.

(a) *Drugs that act on sympathetic innervation*

This approach is based on knowledge of peritubular muscle contraction in the rat, in which there is little classical innervation proximally and dense adrenergic innervation distally. As contraction of the cauda is accompanied by that of the ductus deferens and ampulla at the time of ejaculation, adrenergic and cholinergic agonists or antagonists can bring about changes in epididymal contractility and influence fertility. They include **(i) sympathomimetics** (e.g. methoxamine) that induces rapid infertility, as a consequence of reduced ejaculated sperm numbers, when implanted close to the epididymis in silastic capsules (*Ratnasooriya et al., 1980*); **(ii) parasympatholytic agents** (e.g. oxyphenonium) cause a temporary reduction in fertility owing to reduced ejaculated sperm numbers, when placed adjacent to the epididymis (*Ratnasooriya, 1982*); **(iii) sympathoplegic agents** that interfere with seminal emission, cause sperm retention in the tail of the epididymis and decrease vaginal sperm numbers (e.g. α -receptor blockers). One of the first α -blockers tested as a contraceptive was phenoxybenzamine which causes

infertility as a result of anejaculation (*Paz et al., 1984*). Subcutaneous injections of the α_1 -blockers prazosin (*Ratnasooriya & Wadsworth, 1990*) and tamsulosin (*Ratnasooriya & Wadsworth, 1994*) induce rapid infertility by the same mechanism and prazosin decreases vaginal sperm numbers when placed adjacent to the epididymis (*Ratnasooriya & Wadsworth, 1984*). Fertility is incomplete and preimplantation losses are observed with both prazosin and tamsulosin (*Ratnasooriya & Wadsworth, 1994*). **(iv) sympatholytic agents and sympathetic ganglionectomy** deplete noradrenaline from neurones. Guanethidine induces irreversible infertility at high doses, and rapid but temporary infertility at lower doses, by reducing ejaculated sperm numbers (*Ratnasooriya & Manatunga, 1981*). The sperm themselves, however, are viable, motile, display normal chromatin condensation and can fertilise eggs by uterine insemination (*Kempinas et al., 1998a,b*). Surgical removal of the inferior mesenteric plexus and proximal hypogastric nerves also results in infertility characterised by azoospermic ejaculates due to sperm retention in the cauda. Here the percentage of motile caudal sperm is decreased and sperm velocities are reduced, but not a result of storage, since sperm aged for the same length of time by vas ligation display increased motility *in vitro*.

(b) *Drugs that act on peptidergic receptors*

The male tract hosts peritubular receptors for endothelin (*Peri et al., 1997; Harnett et al., 1997*), angiotensin (*Grove & Speth, 1989; Sum & Cheung, 1995*) and oxytocin (*Hib, 1976; Maggi et al., 1987; Nicholson et al., 1999*) which imply an involvement of paracrine and endocrine factors in epididymal motion. Vasopressin, oxytocin, endothelin and angiotensin do increase epididymal con-

traction, but the fertility of treated males has not been examined. Liberation of angiotensin requires angiotensin converting enzyme (present in the epididymis), but studies of transgenic mice indicate that males lacking the epididymal (somatic) enzyme are fertile (Hagaman *et al.*, 1998).

(c) Drugs that act on purinergic receptors

The importance of purinergic receptors in the ejaculatory process is highlighted in the P2X₁ knockout mouse, which is sterile owing to an inability of the vas to contract at ejaculation, despite normal adrenergic input (Mulryan *et al.*, 2000). P2_a purinergic receptors are present in the epididymis (Ventura & Pennefather, 1991) and a rapid and reversible impairment of fertility of male rats follows intra-epididymal administration of the P2_a-receptor desensitising agent α , β -methylene ATP (Ratnasooriya, 1993).

(d) Other antifertility agents

Other agents that increase the sperm transport rate in rats and mice include lowered serum testosterone (Sujarit & Pholpramool, 1985), raised serum estrogen (Meistrich *et al.*, 1975), oxytocin (Frayne *et al.*, 1996), the anti-androgen, hydroxyflutamide (Klinefelter & Suarez, 1997) and sulphapyridine (Chaturapanich *et al.*, 1999). The hormonal effects are not purely epididymal, for infertility caused by oestrogen administration can be due to effects in the testis and testosterone depletion/blockade can be explained by reduced epididymal secretions (see below); oxytocin is usually considered more of a pro-fertility drug than as a contraceptive. Another antifertility agent whose action is compatible with enhanced sperm transport is chloroethyl-methanesulphonate (Klinefelter *et al.*, 1994a). This is effective in the presence of normal androgen levels but also alters proteins in sperm (Klinefelter *et*

al., 1997) and the epididymis that may contribute to the infertility (see below).

(e) Summary

For drugs that aim to reduce sperm transit time, failure to reduce sperm numbers below those required for fertilisation may produce pregnancies or induce preimplantation losses that are characteristic of immature spermatozoa (Mieusset, 1995). Retarded embryo development may also occur should a block to seminal emission be incomplete, since this is observed after uterine insemination by aged sperm taken from the denervated cauda (Ricker *et al.*, 1997). For drugs intended to block seminal emission, disadvantages of persistent paralysis of the genitourinary tract include immotility, decapitation of stored sperm and eventual rupture in the distal cauda epididymidis with the attendant inflammation, antibody generation and irreversible infertility (Evans *et al.*, 1972). These problems could be avoided by permitting intermittent sexual activity to relieve epididymal pressure, which is the aim of most post-epididymal, vasal-acting, contraceptive procedures.

(f) Clinical application

The use of α -adrenergic blockers for human contraception was suggested from clinical observations that men receiving sympatholytic agents present with ejaculatory failure (Kedia & Markland, 1975). Phenoxybenzamine was the first α_1 -blocker studied intentionally as an oral contraceptive (Homonnai *et al.*, 1984); it reduces semen volume, sperm concentration and eventually causes aspermia (anejaculation). Intermittent administration was recommended and normal ejaculate volumes were produced at the end of treatment. Treatment from 7 days before to 5 days after ovulation was suggested, with treatment withheld during menstruation to per-

mit unprotected intercourse. Unlike the rat, the α_1 -adrenoceptor antagonist prazosin was ineffective in bringing about infertility in man (*Kjærgaard et al., 1988*). Peptidergic agonists are present in the peritubular musculature of the human epididymis (*Tainio, 1994*) and endothelin is a potent stimulator of epididymal contractility *in vitro* (*Peri et al., 1997*). Such agonists or antagonists may affect sperm transport through the human epididymis so that paralysis of the vas deferens solely at ejaculation by purinergic receptor antagonists seems a feasible way of providing rapid, post-epididymal contraception.

4. Compounds that modify the composition of epididymal fluid

As luminal fluid in the epididymis is important for the maintenance of the sperm and specific aspects of their maturation and storage, any alteration in its composition should then have repercussions on sperm function. If a hostile luminal environment could be achieved then the acquisition of sperm functions could be prevented or the death of sperm could be induced. Few attempts to modify fluid composition *per se* have been made but as components are either transported from blood by, or synthesised within, the epithelial cells, and secreted into the lumen (*Cooper, 1998a*), any agent that modifies the epithelium or its functions could be a potential contraceptive.

(a) *Compromising epithelial structure*

The transgenic inactivated carnitine receptor mouse (a model of primary carnitine deficiency “juvenile visceral steatosis”) has revealed a new aspect of carnitine action in the epididymis (*Toshimori et al., 1999*) for the males are infertile. Azoospermia follows

thinning of the epithelium, rupture of the proximal duct and appearance of granulomata. Another transgenic model presenting a squamous epithelium, rather than the normal pseudostratification, lacks the retinoic acid receptor- α (*Costa et al., 1997*). Here the distal epididymal and vasal epithelia cannot resorb water; inspissated fluid accumulates and azoospermia results from ductal blockage. Both conditions indicate the importance of normal epithelial function but lead to irreversible infertility with the possibility of anti-sperm antibody formation that is not desired in a male contraceptive.

(b) *Interference with transepithelial transport*

This could be achieved by **(i) reducing low molecular weight organic solutes**, but too little is currently known of the carnitine or inositol transporters for them to be targeted for contraceptive purposes. Epididymal carnitine can be lowered by reducing its blood levels by adding pivalate to the drinking water but neither male rats or hamsters become infertile (*Lewin et al., 1996; Cooper et al., 1997*). **(ii) interfering with the supply of energy substrates:** sperm have access in the epididymis to blood glucose and such transport is reduced by the anti-fertility agents α -chlorohydrin and 6-chloro-6-deoxyglucose (*Hinton et al., 1983*). However, these agents are thought to be contraceptives because they inhibit sperm glycolysis (see below). **(iii) modifying ion and fluid balance:** ion transport underlies epididymal fluid resorption (following Na^+ coupled to pro-luminal movement of K^+) and secretion (following apical secretion of Cl^- and HCO_3^-). This is affected by some anti-fertility agents, e.g. α -chlorohydrin (*Wong & Yeung, 1977*) and 6-chloro-6-deoxyglucose (*Wong et al., 1980*) (which inhibit fluid resorption) but changes in fluid composition have not been demonstrated. **(iv) enhancing**

fluid secretion: adrenaline (through α -receptors), endothelin, vasopressin, angiotensin, pituitary adenyl cyclase-activating polypeptide, purinergic agonists and prostaglandins have all been shown *in vitro* to enhance epididymal cell fluid secretion. Inhibiting these actions should increase luminal fluid viscosity but inhibition of prostaglandin production by the cyclo-oxygenase-1 inhibitor indomethacin does not alter fluid secretion, sperm motility or male fertility (Gong *et al.*, 2000). Epididymal fluid secretion is inhibited by reserpine and both sperm concentration and fluid viscosity are increased but sperm motility is unaffected (Wen & Wong, 1988). **(v) raising epididymal pH:** luminal acidification is thought to maintain sperm in a quiescent state (Carr *et al.*, 1985) and raising pH has been proposed as a contraceptive (Breton *et al.*, 1996). Epithelial apical, narrow and clear cells are responsible for luminal acidification as they contain a cytoplasmic carbonic anhydrase and a vacuolar-type proton pumping (H^+)-ATPase (V-ATPase) on the apical membrane (Breton *et al.*, 1996). However, the carbonic anhydrase inhibitor acetazolamide has no effect on the pH of epididymal fluid *in situ* (Cafilisch & DuBose, 1990). Inhibiting V-ATPase may have contraceptive potential but no inhibitors have been tested.

(c) Inhibition of epithelial synthesis and secretion

This could be achieved theoretically by **(i) inhibiting secretory processes:** secretion into the epididymal lumen is mediated by both merocrine and apocrine secretion but as neither process is epididymal specific, interference solely with epididymal function is not possible. **(ii) blocking the transcription/translation of specific epididymal proteins:** the use of antisense oligonucleotides is a theoretical approach to male contraception that has not yet been attempted

and would require the development of methods of targeting specific epithelial cells in designated regions of the duct for selective inhibition of epididymal secretions. **(iii) blockade of the epididymal androgen receptor:** differential androgen thresholds of the accessory organs suggested that selective androgen deprivation of the epididymis would lead to functional sterility before other androgen-dependent organs became atrophic (Prasad *et al.*, 1970) but this could not be confirmed (Rastogi *et al.*, 1979). The epididymal androgen receptor differs from that in other male organs by remaining in the nucleus after castration (Paris *et al.*, 1994), a difference that may provide an opportunity for its selective targeting. This should also modify the ionic composition of epididymal fluid (Pholpramool & Sormpaisarn, 1980; Jenkins *et al.*, 1983) and speed up sperm transport (see above), reducing the time for contact of sperm with epididymal secretions.

(d) Interfering with specific epididymal proteins

This can be achieved by **(i) blocking secreted epithelial protein functions:** only one study has examined fertility after abolishing the activity of an epididymal enzyme (α -glucosidase by castanospermine) and inhibition was not tissue specific and the animals remained fertile (Yeung & Cooper, 1994). The inhibition of other luminal lytic enzymes that may affect spermatozoa has not been examined. **(ii) functional removal of secreted proteins by antibodies:** the blood-epididymal barrier acts to impede rather than exclude the luminal entry of macromolecules. Immunoglobulins gain access to the epididymal lumen in sufficient numbers to reduce fertility *in vitro* or *in vivo* after passive immunisation with mouse sperm-specific antibodies (Lee *et al.*, 1987) and active immunisation against the

rat epididymal proteins PES or D/E (see Cooper & Yeung, 1999a). Intrasplenic immunisation with hamster sperm-derived epididymal P26h is particularly effective in preventing fertilisation *in vivo* (Berubé & Sullivan, 1994).

(e) *Inducing a hostile epididymal environment*

Future contraceptives may be based on (i) **changing osmotic pressure:** epididymal fluid has a higher osmolality than blood which is maintained when gross changes in fluid composition are induced (Jones & Glover, 1975). Lowering the osmotic pressure would produce hypotonic swelling and flagellar bending of sperm cells within the epididymal lumen. This would lead to infertility since sperm with such deformed tails are unable to pass the uterotubal junction (Yeung *et al.*, 2000) and is the cause of infertility in domestic animals (see Cooper, 1992). (ii) **inducing oxidative death of spermatozoa:** upon release from the epididymis, spermatozoa generate superoxide anions (Fisher & Aitken, 1997) which are potentially damaging unless removed by epididymal superoxide dismutase (SOD) and by indoleamine 2,3-dioxygenase (Yoshida *et al.*, 1980). The product of SOD activity, hydrogen peroxide, also damages membranes by inducing phospholipid hydroperoxide formation and releasing fatty acyl hydroperoxides, and is removed by epididymal catalase and a range of peroxidases (see Aitken & Vernet, 1998; Drevet, 2000). The susceptibility of sperm towards peroxidative damage could be accentuated in contraceptives designed to inhibit the natural defence mechanisms of the epididymis. They could stimulate enzymes producing oxygen radical production or inhibit enzymes removing them and thus should target the epididymis-specific, extracellular isoenzymes of GPX (GPX5) and SOD present in epididy-

mal fluid (Vernet *et al.*, 1997; Williams *et al.*, 1998).

(f) *Summary*

Interfering specifically with epididymal epithelial structure is undesirable and interfering with secretions for infertility has been unsuccessful but immunocontraception against secreted epididymal proteins seems a possibility. Both modifying the composition of epididymal fluid and exaggerating the oxidative insult to sperm remain theoretically satisfying but lack background information for them currently to be plausible.

(g) *Clinical application*

The transcytosis of IgG from the interstitium to the lumen of the human epididymis (Yeung *et al.*, 1989) provides one route of entry of antibodies against sperm or epididymal secretions. A protein currently considered as target for a human immunocontraceptive is P34H, synthesised in the corpus epididymidis (Legare *et al.*, 1999) and present on sperm over the acrosome (Boué *et al.*, 1996). It is promising since some infertile men display reduced binding to the zona pellucida in association with low P34H (Boué & Sullivan, 1996) and antibodies to the homologous hamster protein reduce human sperm-zona binding (Boué *et al.*, 1994)

5. Compounds that attack epididymal spermatozoa

(a) *Displacing sperm proteins*

There are changes in proteins present in of sperm taken from rats made infertile by chloro-compounds and sulphonamide antifertility agents (Tsang *et al.*, 1981; Bunnag *et al.*, 1992) and some of these have been characterised. One protein that appears in epididymal fluid of infertile rats treated with ornida-

zole or α -chlorohydrin is “contraception associated protein 1” (CAP1) and originates from spermatozoa (Wagenfeld *et al.*, 1998a). The protein is present on the whole sperm head of normal sperm but is missing from a distinct distal equatorial region of sperm from ornidazole-fed rats (Wagenfeld *et al.*, 2000). CAP1 has been cloned (Wagenfeld *et al.*, 1998b) and is identical to the protein SP22 which is located on the anterior equatorial region in unfixed rat sperm (Welch *et al.*, 1998). SP22 is decreased in sperm from males administered reproductive toxicants (e.g. ethanedimethanesulphonate) and the antiandrogen hydroxyflutamide and a dose-dependent loss of sperm SP22 is predictive of fertilisation after uterine insemination (Klinefelter *et al.*, 1997).

(b) *Inhibiting sperm glycolysis*

This concept is to block sperm in an irreversible way so they remain inhibited after ejaculation. Reversible contraception requires that the testis be unaffected by the drug, with continual sperm production leading rapidly to fertility once the inhibited sperm have been cleared from the epididymis. The first compound inducing this “functional sterility”, α -chlorohydrin, is active in the male of many species, indicating a sperm-specific action (Jones, 1998). Examination of analogues demonstrated a stereochemical selectivity of action that indicated the inhibition of the sperm-specific isoenzymes of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and triose-phosphate isomerase (TPI). Several related compounds designed to inhibit individual sperm glycolytic enzymes were subsequently synthesised. The effectiveness of these compounds depends on their being a relationship between sperm velocity and fertility.

(i) Relationship between sperm motion and fertility. Sperm obtained from rats exposed to epichlorohydrin (Slott *et al.*,

1990; Toth *et al.*, 1989, 1992) and ornidazole (Oberländer *et al.*, 1994) suffer reductions in velocities that parallel decreases in fertility assessed by natural mating (Toth *et al.*, 1991). A similar relationship between kinematics and fertility of hamsters assessed by artificial insemination indicates that sperm velocity is predictive of fertility (α -chlorohydrin: Slott *et al.*, 1995, 1997). In rats *in vitro* fertilisation success is related to the straight line velocity of sperm (Moore & Akhondi, 1996) but sperm from ornidazole-fed infertile males do not fertilise eggs *in vitro*, despite their motility being maintained by lactate (Bone *et al.*, 2000a). However, the normal changes in sperm kinematics upon capacitation (hyperactivated motility), do not occur in the infertile males which highlights the importance of the glycolytic production of ATP for hyperactivation which is targeted by these antifertility agents.

(ii) Mechanism of action of chlorinated antifertility compounds. Chlorinated antifertility agents are converted *in vitro* or *in vivo* into metabolites that inhibit sperm glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and/or triosephosphate isomerase. Three classes of such inhibitory compounds are known: (1) three-carbon chloro-compounds such as 3-chloropropan-1,2-diol (α -chlorohydrin, ACH) and 1-chloro-3-hydroxy-propanone (CHOP) and their diketals or esters. These act only after conversion by glycerol dehydrogenase (ACH) or triosephosphate isomerase (CHOP); (2) aminochloro-compounds such as 3-amino-1-chloro-propan-2-ol (ACP) and 1-(3-chloro-2-hydroxypropyl)-2-methyl-5-nitroimidazole (ornidazole, ORN). These act after conversion by monoamine oxidase (ACP, ORN?) and (3) chloro-sugars such as 6-chloro-6-deoxyglucose and 1,6-dichloro-1,6-dideoxy-D-fructose, which are converted by glycolytic enzymes (Cooper & Yeung, 1999b). These are all eventually converted to (S)-3-chlorolactal-

dehyde which inhibits GAPDH owing to its identical stereochemical configuration to the normal substrate for the enzyme (R)-3-phosphoglyceraldehyde (see *Cooper & Yeung, 1999a*). 3-chlorolactaldehyde inhibits glycolysis and GAPDH of boar sperm rapidly *in vitro*, without the lag period required for inhibition by α -chlorohydrin and 1-chloro-3-hydroxypropanone (*Cooney & Jones, 1988*). It most likely binds to the enzyme but can not be converted by it, as it has no transferable phosphate, and thus prevents access and metabolism of the natural substrate.

(iii) Tissue specificity of action. 3-Chlorolactaldehyde is without *in vitro* effect on GAPDH from erythrocytes from 7 species, bacteria, yeasts and commercial preparations of GAPDH from yeast or muscle (*Stevenson et al., 1984*). The heightened sensitivity of sperm GAPDH to inhibition explains why a high single dose of α -chlorohydrin does not reduce respiration of liver, kidney and sperm-free epididymal tubules (*Brown-Woodman & White, 1979*) and why continuous antifertility doses of 6-chloro-6-deoxyglucose for 14 days does not reduce GAPDH activity of liver, brain, testis or muscle (*Ford & Waites, 1981*), although marked inhibition of the sperm enzyme is observed.

This different cellular response reflects the GAPDH isoenzymes present. Sperm GAPDH is not cytosolic, as in somatic cells, but pelleted with the insoluble sperm components. It is a testis-specific isoenzyme (*Welch et al., 1992*) with a larger molecular weight than that of somatic cells, encoding a proline-rich tail that may be responsible for its covalent linkage to the fibrous sheath (*Westhoff & Kamp, 1997*). Several other glycolytic enzymes have larger, sperm-specific isoforms (see *Welch et al., 2000*) that probably are also attached to the flagellum (*Jones & Piccolo, 1999*). Such a situation may make them more prone than cytosolic isoenzymes to inhibition by chlorinated compounds. Changes occur to GAPDH

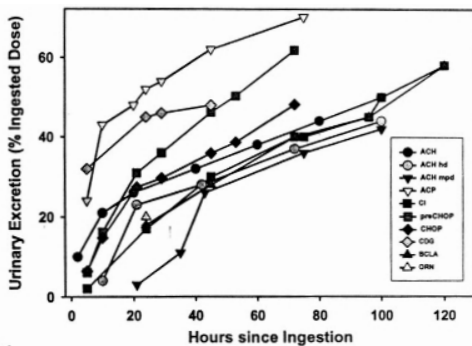
as sperm migrate through the epididymis; total activity may increase or decrease but the sensitivity to inhibition by administered α -chlorohydrin or 6-chloro-6-deoxyglucose is greater in cauda than caput sperm (*Ford & Harrison, 1983*). This enhanced sensitivity of mature epididymal sperm explains the decreased kinematics of sperm only from the distal epididymis of rats fed ornidazole (*Oberländer et al., 1994*).

(iv) Side effects at high doses. Male rats are healthy after continuous daily feeding of antifertility doses of purified (R,S)- α -chlorohydrin for 60 weeks (*Jones & Cooper, 1999*) or ornidazole for 2 years (*von Richle et al., 1978*). The lack of systemic effects is explained by the behaviour of the sperm-specific isoenzyme (see above). At higher doses (required for toxicological testing), serious side-effects have been reported, although questions have been raised about the purity of the compounds used in early studies (*Jones & Cooper, 1999*). Renal damage caused by (R)- α -chlorohydrin can be limited by avoiding the (R)-enantiomer or using compounds that generate solely the (S)-enantiomer (such as CHOP). A valid concern in the further development of these compounds as contraceptives is the induction of neural defects in mice and monkeys, and spermatocoele formation, by high doses of 6-chloro-6-deoxyglucose and (S)- α -chlorohydrin, i.e. by compounds generating the component active at inhibiting the sperm enzymes. Recent studies have suggested that the inhibition of somatic cell GAPDH at high doses could be the cause of these side effects. To avoid them, inhibitors are required that are targeted on the sperm in the epididymis.

(v) Metabolism and dechlorination. Post-testicular contraceptives must be present in high enough concentrations for long enough to penetrate into the epididymal tubule and reach the spermatozoa. The mouse and rabbit stand out as species resistant to α -chloro-

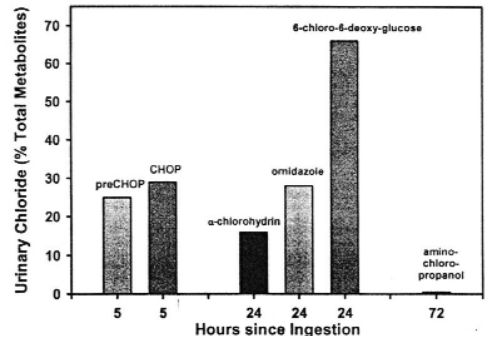
rohydrin-induced infertility. This is explained in the rabbit by the low sperm glycerol dehydrogenase activity, but mouse sperm GAPDH is inhibited *in vitro* by α -chlorohydrin (Ford & Harrison, 1983; Bone *et al.*, 2000b) and poor penetration into the epididymis has been proposed to explain its lack of action (Crabo & Appelgren, 1972). Other important considerations for maintaining blood and tissue levels of injected or ingested compounds are the rates of elimination or dechlorination. Most chlorinated antifertility compounds in the rat are excreted into urine with a similar time course, with up to 30% of the ingested dose being excreted over the first day, rising to 60% over the next 2 days (Fig. 1).

Figure 1. Time-course of appearance of radioactivity in urine after a single dose of ^{36}Cl -labelled compounds: ACH, α -chlorohydrin; ACH hd, ACH hexyldioxolane; ACH mpd, ACH methyl-pentyl-dioxolane (Jones & O'Brien, 1980); ACP, aminochloropropanol (Jones *et al.*, 1979); Cl, chloride (Jones *et al.*, 1979; Dobbie *et al.*, 1988); preCHOP, chlorohydroxypropanone dimethylketal; CHOP, chlorohydroxypropanone (Cooper & Jones, 2000); BCLA, 3-chlorolactic acid (Dobbie *et al.*, 1988); ORN, ornidazole (Jones & Cooper, 1996) and ^{14}C -labelled chlorodeoxyglucose, CDG (Jones & Dobbie, 1991).



The most effective antifertility compound, aminochloropropanol is eliminated quickly, but it has a low rate of dechlorination (Fig. 2), compared with extensive dechlorination of 6-chloro-6-deoxyglucose (Fig. 2). Potential contraceptive agents of this kind should be only slowly excreted or little dechlorinated after ingestion.

Figure 2. Rates of dechlorination in the male rat after ingestion of chlorinated preCHOP, chlorohydroxypropanone dimethyl ketal, and CHOP, chlorohydroxypropanone (Cooper & Jones, 2000), α -chlorohydrin (Jones & Murcott, 1976), ornidazole (Jones & Cooper, 1996), 6-chloro-6-deoxyglucose (Ford & Waites, 1978) and aminochloropropanol (Jones *et al.*, 1979).



(c) Summary

Some of the compounds that displace sperm proteins with deleterious effects on fertility have other effects on male rats *in vivo* (via Leydig cells, epididymal clear cells) and as such are not organ- or cell-specific. Inducing the loss of sperm proteins, could perhaps be developed into a contraceptive strategy once more is known of sperm-protein interactions. The link between the inhibition of glycolytic enzyme activity and kinematic parameters necessary for fertilisation events (hyperactivation, zona binding) maintains this approach in

the forefront of current possibilities, but ways to minimise side effects by targeting the epididymis need to be developed.

(d) Clinical application

The structure of CAP1 (Wagenfeld *et al.*, 1988b) and SP22 (Welch *et al.*, 1998) is identical to that of the human proto-oncogene DJ-1 (Nagakubo *et al.*, 1997) and the RS subunit of an RNA-binding protein (Hod *et al.*, 1999) which are ubiquitous. CAP1 is present in human ejaculated sperm (Wagenfeld *et al.*, 2000) but unlike the rat, RS is expressed only on the tail (Whyard *et al.*, 2000). An understanding of these discrepant reports on the location of this protein within and between species will facilitate attempts to utilise this as a contraceptive target. Human sperm contain a specific form of GAPDH (GAPD2), analogous to the murine Gapd-s (Welch *et al.*, 2000), which is bound to the fibrous sheath (Westhoff & Kamp cited in Cooper & Yeung, 1999a). It is clear that decreased motility, glycolysis and ATP content of human sperm are decreased upon incubation with 5 mM (R,S)- or 1-10 mM (S)- α -chlorohydrin (Ford *et al.*, 1979; Cooper *et al.*, 2000), 1,6-dichloro-1,6-dideoxy-D-fructose and CHOP (Cooper & Yeung, 1999b; Cooper *et al.*, 2000) which argue that human sperm are just as susceptible to the inhibitors that make animals infertile, but none of the latter compounds have yet been tested *in vivo*. An antifertility agent in the rat used in the clinic for treatment of genital tract infections is ornidazole. Although safe under the acute conditions of use, the doses employed therapeutically are 20-30 times lower than the antifertility dose for rats and its cleavage to the potentially active side chain in man is less exten-

sive than that in the rat (Cooper & Yeung, 1999a). Compounds of this sort that could be used as a human contraceptive are probably already known but will need to be modified to aid delivery to the spermatozoa.

6. Overall conclusion

This review has highlighted numerous exciting possibilities that post-testicular approaches offer to male contraception. Many of them under-researched. Of the three approaches reviewed, those involving arrest of muscular contraction at ejaculation could be quite close to clinical testing since autonomic drugs are known, tested and available, and only small developments are required on timing and modes of delivery. Intermittent administration before intended intercourse would clearly bring fewer side effects on other nervous pathways than more continuous administration. Modulating the composition of epididymal fluid for contraceptive purposes does not currently seem promising because of the lack of organ-specificity of synthetic, secretory and transport processes in the epididymis. On the other hand, depleting proteins by immunological methods is successful in animals and is being seriously considered for humans. Specific transporters in the epithelium need more characterisation before they can be utilised to upset normal epididymal function. Preferential inhibition of sperm glycolysis remains the most successful approach in animals and could be effective in man provided side effects can be overcome by directing the drugs to the epididymis, an area where research needs to be targeted.

REFERENCES

- **Aitken RJ & Vernet P.**
Maturation of redox regulatory mechanisms in the epididymis.
J Reprod Fertil (Suppl) 53: 109, 1998.
- **Berubè B & Sullivan R.**
Inhibition of *in vivo* fertilization by active immunization of male hamsters against a 26-kDa sperm glycoprotein.
Biol Reprod 51: 1255, 1994.
- **Bone W, Jones NG, Kamp G, Yeung CH, Cooper TG.**
The antifertility effect of ornidazole in male rats: inhibition of a glycolysis-related motility pattern and zona binding required for fertilization *in vitro*.
J Reprod Fertil 118: 127, 2000a.
- **Bone W & Cooper TG.**
In vitro inhibition of rat cauda epididymal sperm glycolytic enzymes by ornidazole, α -chlorohydrin and 1-chloro-3-hydroxypropanone.
Int J Androl 23: 243, 2000b.
- **Bouè F & Sullivan R.**
Cases of human infertility are associated with the absence of P34H, an epididymal sperm antigen.
Biol Reprod 54: 1018, 1996.
- **Bouè F, Blais J, Sullivan R.**
Surface localization of P34H, an epididymal protein, during maturation, capacitation, and acrosome reaction of human spermatozoa.
Biol Reprod 54: 1009, 1996.
- **Bouè F, Berube B, De Lamirande E, Gagnon C, Sullivan R.**
Human sperm-zona pellucida interaction is inhibited by an antiserum against a hamster sperm protein.
Biol Reprod 51: 577, 1994.
- **Breton S, Smith PJS, Lui B, Brown D.**
Acidification of the male reproductive tract by a proton pumping, H^+ -ATPase.
Nature Med 2: 470, 1996.
- **Brown-Woodman PDC & White IG.**
Effect of α -chlorohydrin on cauda epididymis and spermatozoa of the rat and general physiological status.
Contraception 11: 69, 1975.
- **Bunnag D, Chaturapanich G, Lewin LM, Pholpraamol C.**
Alterations of epididymal sperm surface proteins by some antifertility agents in the rats.
Thai Physiol Sci 5: 27, 1992.
- **Cafilisch CR & DuBose TD.**
Effect of α -chlorohydrin on *in situ* pH in rat testis and epididymis.
Contraception 41: 207, 1990.
- **Carr DW, Usselman MC, Acott TS.**
Effects of pH, lactate, and viscoelastic drag on sperm motility: a species comparison.
Biol Reprod 33: 588, 1985.
- **Chaturapanich G, Sujarit K, Pholpramool C.**
Effects of sulphapyridine on sperm transport through the rat epididymis and contractility of the epididymal duct.
J Reprod Fertil 117: 199, 1999.
- **Cooney SJ & Jones AR.**
Inhibitory effects of S-3-chlorolactaldehyde on the metabolic activity of boar spermatozoa *in vitro*.
J Reprod Fertil 82: 309, 1988.
- **Cooper TG.**
Die Reifung humaner Spermien im Nebenhoden.
Reproduktionsmedizin 16: 299, 2000.
- **Cooper TG.**
The epididymis as a site of contraceptive attack.
In: Spermatogenesis, Fertilization, Contraception. Molecular, Cellular and Endocrine Events in Male Reproduction. E Nieschlag & UF Habenicht (eds), Schering Foundation Workshop, Springer Verlag, 1992.
- **Cooper TG.**
Epididymis.
In: Encyclopedia of Reproduction 2.
JD Neill & E Knobil (eds), Academic Press, San Diego, 1998.
- **Cooper TG & Jones AR.**
The metabolism of the putative antifertility agents 3-³⁶chloro-1-hydroxypropanone and its dimethyl ketal in the male rat.
Int J Androl 23: 243, 2000.

■ **Cooper TG & Yeung CH.**

Recent biochemical approaches to post-testicular, epididymal contraception.

Human Reprod Update 5: 141, 1999a.

■ **Cooper TG & Yeung CH.**

Recent chemical approaches to post-testicular contraception.

Asian J Androl 1: 29, 1999b.

■ **Cooper TG, Bone W, Jones AR, Morin C, Nieschlag E.**

In vitro inhibition of human sperm glycolysis and kinematics by chloro-compounds.

Poster, 1st European Congress of Andrology. L'Aquila, Italy, March 2000.

■ **Cooper TG, Wang XS, Yeung CH, Lewin LM.**

Successful lowering of epididymal carnitine by administration of pivalate to rats.

Int J Androl 20: 180, 1997.

■ **Costa SL, Boekelheide K, Vanderhyden BC, Seth R, McBurney MW.**

Male infertility caused by epididymal dysfunction in transgenic mice expressing a dominant negative mutation of retinoic acid receptor α .

Biol Reprod 56: 985, 1997.

■ **Crabo B & Appelgren LE.**

Distribution of [¹⁴C] α -chlorohydrin in mice and rats.

J Reprod Fertil 30: 161, 1972.

■ **De Kretser DM, Huidobro C, Southwick GJ, Temple-Smith PD.**

The role of the epididymis in human infertility.

J Reprod Fertil (Suppl) 53: 271, 1998.

■ **Dobbie MS, Porter KE, Jones AR.**

Is the nephrotoxicity of (R)-3-chloro-lactate in the rat caused by 3-chloropyruvate?

Xenobiotica 18: 1389, 1988.

■ **Drevet JR.**

Glutathione peroxidases expression in the mammalian epididymis and vas deferens.

In: Andrology 2000, S Francavilla & G Forti (eds), Litografia Brandolini, Chieti, Italy, 2000.

■ **Evans B, Gannon BJ, Heath JW, Burnstock G.**

Long-lasting damage to the internal male genital organs and their adrenergic innervation in rats following chronic treatment with the antihypertensive drug guanethidine.

Fertil Steril 23: 657, 1972.

■ **Fisher HM & Aitken RJ.**

Comparative analysis of the ability of precursor germ cells and epididymal spermatozoa to generate reactive oxygen metabolites.

J Exp Zool 277: 390, 1997.

■ **Ford WCL & Harrison A.**

The activity of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase in spermatozoa from different regions of the epididymis in laboratory rodents treated with α -chlorohydrin or 6-chloro-deoxyglucose.

J Reprod Fertil 69: 147, 1983.

■ **Ford WCL & Waites GMH.**

The effect of high doses of 6-chloro-6-deoxyglucose on the rat.

Contraception 24: 577, 1981.

■ **Ford WCL & Waites GMH.**

Chlorinated sugars: a biochemical approach to the control of male fertility.

Int J Androl (Suppl.) 2: 541, 1978.

■ **Ford WCL, Harrison A, Takkar GL, Waites GMH.**

Inhibition of glucose catabolism in rat, hamster, rhesus monkey and human spermatozoa by α -chlorohydrin.

Int J Androl 2: 275, 1979.

■ **Frayne J, Townsend D, Nicholson HD.**

Effects of oxytocin on sperm transport in the pubertal rat.

J Reprod Fertil, 106: 299, 1996.

■ **Gong XD, Leung GPH, Cheuk BLY, Wong PYD.**

Interference with the formation of the epididymal microenvironment – a new strategy for male contraception.

Asian J Androl 2: 39, 2000.

■ **Grove KL & Speth RC.**

Rat epididymis contains functional angiotensin II receptors.

Endocrinology 125: 223, 1989.

■ **Hagaman JR, Moyer JS, Bachman ES, Sibony M, Magyar PL, Weich JE, Smithies O, Krege JH, O'Brian DA.**

Angiotensin-converting enzyme and male infertility. *Proc Nat Acad Sci US* 95: 2552, 1998.

■ **Harneit S, Paust HJ, Mukhopadhyay AK, Ergun S.**

Localization of endothelin-1 and endothelin-receptor A and B in human epididymis. *Mol Human Reprod* 3: 579, 1997.

■ **Hib J.**

The "in vivo" effects of oxytocin and vasopressin on spontaneous contractility of the rat epididymis. *Int J Fertil* 22: 63, 1976.

■ **Hinton BT, Hernandez H, Howards SS.**

The antifertility agents α -chlorohydrin, 5-thio-D-glucose, and 6-chloro-6deoxy-D-glucose interfere with sugar transport across the epithelium of the rat caput epididymis. *J Androl* 4: 216, 1983.

■ **Hod Y, Pentylala SN, Whyard TC, El-Maghrabi M.**

Identification and characterization of a novel protein that regulates RNA-protein interaction. *J Cell Biochem* 72: 435, 1999.

■ **Homonnai ZT, Shilon M, Paz GF.**

Phenoxybenzamine – an effective male contraceptive pill. *Contraception* 29 : 479, 1984.

■ **Jenkins AD, Lechene CP, Howards SS.**

The effects of cyproterone acetate on the elements in the intraluminal fluids of the testis and epididymis of the rat. *Arch Androl* 11: 151, 1983.

■ **Jones AR.**

Chemical interference with sperm metabolic pathways. *J Reprod Fertil (Suppl.)* 53: 227, 1998.

■ **Jones AR & Cooper TG.**

A re-appraisal of the post-testicular antifertility action and toxicity of chlorinated antifertility compounds. *Int J Androl* 22: 130, 1999.

■ **Jones AR & Cooper TG.**

Metabolism of ^{36}Cl -ornidazole after oral application to the male rat in relation to its antifertility activity. *Xenobiotica* 27: 711, 1996.

■ **Jones AR & Dobbie MS.**

The male antifertility activity of 6-chloro-6-deoxy-glucose. *Contraception* 44: 649, 1991.

■ **Jones AR & Glover T.**

Interrelationships between spermatozoa, the epididymis and epididymal plasma. In: *Biology of the Male Gamete*. JG Duckett & PM Racey (eds), Academic Press, London, 1975.

■ **Jones AR & Murcott C.**

The oxidative metabolism of α -chlorohydrin and the chemical induction of spermatocoeles. *Experientia* 32: 1135, 1976.

■ **Jones AR & O'Brien RW.**

Metabolism of three active analogues of the male antifertility agent α -chlorohydrin in the rat. *Xenobiotica* 10: 365, 1980.

■ **Jones AR & Piccolo F.**

Glycolytic enzyme activity in hypotonically treated boar spermatozoa. *Reprod Fertil Develop* 11: 409, 1999.

■ **Jones AR, Mashford M, Murcott PM.**

The metabolism of 3-amino-1-chloropropan-2-ol in relation to its antifertility activity in male rats. *Xenobiotica* 9: 253, 1979.

■ **Kedia K & Markland C.**

The effect of pharmacological agents in ejaculation. *J Urol* 114: 569, 1975.

■ **Kempinas WDG, Soares JD, Roberts NL, Strader L, Ferrell J, Goldman JM, Klinefelter GR.**

Rat epididymal sperm quantity, quality and transit time after guanethidine-induced sympathectomy. *Biol Reprod* 59: 890, 1998a.

■ **Kempinas WDG, Soares JD, Roberts NL, Strader L, Ferrell J, Goldman JM, Klinefelter GR, Narotsky MG, Perreault SD, Evenson DP, Ricker DD, Klinefelter Gr.**

Fertility of rat epididymal sperm after chemically and surgically induced sympathectomy. *Biol Reprod* 59: 897, 1998b.

■ **Kjaergaard N, Kjaergaard B, Lauriken JG.**
Prazosin, an adrenergic blocking agent inadequate as male contraceptive pill.
Contraception 37: 621, 1988.

■ **Klinefelter GR & Suarez JD.**
Toxicant-induced acceleration of epididymal sperm transit: androgen-dependent proteins may be involved.
Reprod Toxicol 11: 511, 1997.

■ **Klinefelter GR, Laskey JW, Ferrell J, Suarez JD, Roberts NL.**
Discriminant analysis indicates a single sperm protein, SP22, is predictive of fertility following exposure to epididymal toxicants.
J Androl 18: 139, 1997.

■ **Lee CY, Zhang JH, Wong E, Chow SN, Sun P, Yang YZ, Leung WY.**
Sex difference of antifertility effect by passively immunized monoclonal sperm antibodies.
Am J Reprod Immunol Microbiol 13: 9, 1987.

■ **Legare C, Gaudreault C, St-Jacques S, Sullivan R.**
P34H sperm protein is preferentially expressed by the human corpus epididymidis.
Endocrinology 140: 3318, 1999.

■ **Lewin LM, Fournier-Delpech S, Weissenberg R, Golan R, Cooper TG, Pholpramool C, Shochat L.**
Effects of pivalic acid and sodium pivalate on L-carnitine concentrations in the cauda epididymidis and on male fertility in the hamster.
Reprod Fertil Develop 9: 427, 1997.

■ **Maggi M, Malozowski S, Kassis S, Guardabasso V, Rodbard D.**
Identification and characterization of two classes of receptors for oxytocin and vasopressin in porcine tunica albuginea, epididymis, and vas deferens.
Endocrinology 120: 986, 1987.

■ **Meistrich ML, Hughes TJ, Bruce WRT.**
Alteration of epididymal sperm transport and maturation in mice by oestrogen and testosterone.
Nature 258: 145, 1975.

■ **Mieusset R.**
Spermatozoa and embryo development.
In: *Frontiers in Endocrinology. Epididymis: Role*

and Importance in Male Infertility Treatment. S Hamamah, R Mieusset, JL Dacheux (eds) Ares Serono Symposia, Rome, 1995.

■ **Moore HDM & Akhondi MA.**
Fertilizing capacity of rat spermatozoa is correlated with decline in straight-line velocity measured by continuous computer-aided sperm analysis: epididymal rat spermatozoa from the proximal cauda have a greater fertilizing capacity in vitro than those from the distal cauda or vas deferens.
J Androl 17: 50, 1996.

■ **Mulryan K, Gitterman DP, Lewis C, Vial C, Leckie BJ, Cobb AL, Brown JE, Conley EC, Buell G, Pritchard CA, Evans RJ.**
Reduced vas deferens contraction and male infertility in mice lacking P2X₁ receptors.
Nature 403: 86, 2000.

■ **Nagakubo D, Taira T, Kitaura H, Ikeda M, Tamai K, Iguchi-Ariga SM, Ariga H.**
DJ-1, a novel oncogene which transforms mouse NIH3T3 cells in cooperation with *ras*.
Biochem Biophys Res Commun 231: 509, 1997.

■ **Nduwayo L, Berthélémy C, Lansac J, Tharranne MJ, Lecomte P.**
Conduite à tenir devant une nécrozoospermie.
Contr Fertil Sexual 23: 682, 1995.

■ **Nicholson HD, Parkinson TJ, Lapwood KR.**
Effects of oxytocin and vasopressin on sperm transport from the cauda epididymis in sheep.
J Reprod Fertil 117: 299, 1999.

■ **Oberländer G, Yeung CH, Cooper TG.**
Induction of reversible infertility in male rats by oral ornidazole and its effects on sperm motility and epididymal secretions.
J Reprod Fertil 100: 551, 1994.

■ **Paris F, Weinbauer GF, Bluem V, Nieschlag E.**
The effect of androgens and antiandrogens on the immunohistochemical localization of the androgen receptor in accessory reproductive organs of male rats.
J Steroid Biochem Molec Biol 48: 129, 1994.

■ **Paz GF, Shilon M, Homonnai ZT.**
The possible use of phenoxybenzamine as a male contraceptive drug: studies on male rats. *Contraception* 29: 189, 1984.

■ **Peri A, Fantoni G, Granchi S, Vannelli GG, Barni T, Amerini S, Ouilli C, Barbagli G, Forti G, Serio M, Maggi M.**
Gene expression of endothelin-1, endothelin-converting enzyme-1, and endothelin receptors in human epididymis. *J Clin Endocr Metab* 82: 3797, 1997.

■ **Pholpramool C & Sornpaisarn L.**
Fertility and electrolyte composition of the rat cauda epididymal plasma and spermatozoa before and after castration. *Contraception* 22: 673, 1980

■ **Prasad MRN, Singh SP, Rajalakshmi M.**
Fertility control in male rats by continuous release of microquantities of cyproterone acetate from subcutaneous silastic capsules. *Contraception* 2: 165, 1970.

■ **Rastogi RK.**
A critical appraisal of the effects of the antiandrogen, cyproterone acetate, on the epididymis in connection with fertility control in the mouse. *J Steroid Biochem* 11: 101, 1979.

■ **Ratnasooriya WD.**
Intra-epididymal administration of α, β -methylene ATP impairs fertility of male rats. *Med Sci Res* 2: 417, 1993.

■ **Ratnasooriya WD.**
Effect of local application of oxyphenonium to epididymis on fertility in rats. *Ind J Exp Biol* 20: 555, 1982.

■ **Ratnasooriya WD & Wadsworth RM.**
Tamsulosin, a selective α_1 -adrenoceptor antagonist, inhibits fertility of male rats. *Andrologia* 26: 107, 1994.

■ **Ratnasooriya WD & Wadsworth RM.**
Impairment of fertility of male rats with prazosin. *Contraception* 41: 441, 1990.

■ **Ratnasooriya WD & Wadsworth RM.**
Effects of Prazosin on fertility of male rats.

J Reprod Fertil 71: 643, 1984.

■ **Ratnasooriya WD & Manatunga AMVR.**
Effect of local application of guanethidine to epididymis on fertility in rats. *Indian J Exp Biol* 19: 867, 1981.

■ **Ratnasooriya WD, Gilmore DP, Wadsworth RM.**
Effect of local application of sympathomimetic drugs to the epididymis on fertility in rats. *J Reprod Fertil* 58: 19, 1980

■ **Ricker DD, Crone JF, Chanmess SI, Klinefelter GR, Chang TSK.**
Partial sympathetic denervation of the rat epididymis permits fertilization but inhibits embryo development. *J Androl* 18: 131, 1997.

■ **Slott VL, Jeffay SC, Dyer CJ, Barbee PSD.**
Sperm motion predicts fertility in male hamsters treated with α -chlorohydrin. *J Androl* 18: 708, 1997.

■ **Slott VL, Jeffay SC, Suarez JD, Barbee RR, Perreault SD.**
Synchronous assessment of sperm mobility and fertilizing ability in the hamster following treatment with α -chlorohydrin. *J Androl* 16: 523, 1995.

■ **Slott VL, Suarez JD, Simmonds JE, Perreault SD.**
Acute inhalation exposure to epichlorohydrin transiently decreases rat sperm velocity. *Fund Appl Toxicol* 15: 597, 1990.

■ **Stevenson D, Ford SA, Du Toit JI, Jones AR.**
Spermatozoal glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. *Proc Austr Biochem Soc* 16: 51, 1984.

■ **Sujarit S & Pholpramool C.**
Enhancement of sperm transport through the rat epididymis after castration. *J Reprod Fertil* 74: 497, 1985.

■ **Sum CS & Cheung WT.**
Characterization of contractile response to angiotensin in epididymal rat vas deferens. *Pharmacology* 51: 105, 1995.

■ **Tainio H.**

Peptidergic innervation of the human testis and epididymis.

Acta Histochem 96: 415, 1995.

■ **Toshimori K, Kuwajima M, Yoshinaga K, Wakayama T, Shima K.**

Dysfunction of the epididymis as a result of primary carnitine deficiency in juvenile visceral steatosis mice.

FEBS Lett 446: 323, 1999.

■ **Toth GP, Wang SR, McCarthy H, Tocco DR, Smith MK.**

Effects of three male reproductive toxicants on rat cauda epididymal sperm motion.

Reprod Toxicol 6: 507, 1992.

■ **Toth GP, Stober JA, Zenick H, Reads EJ, Christ SA, Smith MK.**

Correlation of sperm motion parameters with fertility in rats treated subchronically with epichlorhydrin.

J Androl 12: 54, 1991.

■ **Toth GP, Stober JA, Read EJ, Zenick H, Smith MK.**

The automated analysis of rat sperm motility following subchronic epichlorohydrin administration: methodologic and statistical considerations.

J Androl 10: 401, 1989.

■ **Tsang AYF, Lee WM, Wong PYD.**

Effects of antifertility drugs on epididymal protein secretion, acquisition of sperm surface proteins and fertility in male rats.

Int J Androl 4: 703, 1981.

■ **Ventura S & Pennefather JM.**

Sympathetic co-transmission to the cauda epididymis of the rat: characterization of postjunctional adrenoceptors.

Br J Pharmacol 102: 540, 1991.

■ **Vernet P, Faure J, Dufaure JP, Drevet JR.**

Tissue and developmental distribution, dependence upon testicular factors and attachment to spermatozoa of GPX5, a murine epididymis-specific glutathione peroxidase.

Mol Reprod Dev 47: 87, 1997.

■ **von Richle R, Scholer HJ, Angehrm P, Fernex M, Hummler H, Jeunet F, Schärer K, Schüpbach M, Schwartz DE.**

Grundlagen der Chemotherapie von Trichomoniasis und Amoebiasis mit Ornidazol.

Arzneim Forsch 28: 612, 1978.

■ **Wagenfeld A, Yeung CH, Shivaji S, Sundareswaran VR, Aragi H, Cooper TG.**

Expression and cellular localization of contraception associated protein 1.

J Androl 21: 954, 2000.

■ **Wagenfeld A, Yeung CH, Strupat K, Cooper TG.**

Shedding of a protein from rat epididymal sperm associated with infertility induced by ornidazole and α -chlorohydrin.

Biol Reprod 58: 1257, 1998a.

■ **Wagenfeld A, Gromoll J, Cooper TG.**

Molecular cloning and expression of rat contraception associated protein 1, CAP 1, a protein putatively involved in fertilization.

Biochem Biophys Res Commun 251: 545, 1998b.

■ **Welch JE, Brown PL, O'Brien DA, Magyar PL, Bunch DO, Mori C, Eddy EM.**

Human glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-2 gene is expressed specifically in spermatogenic cells.

J Androl 21: 628, 2000.

■ **Welch JE, Barbee RR, Roberts NL, Suarez JD, Klinefelter GR.**

SP22: a novel fertility protein from a highly conserved gene family.

J Androl 19: 385, 1998.

■ **Welch JE, Schatte EC, O'Brien DA, Eddy EM.**

Expression of a glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene specific to mouse spermatogenic cells.

Biol Reprod 46: 869, 1992.

■ **Wen RQ & Wong PYD.**

Reserpine treatment increases viscosity of fluid in the epididymis of rats.

Biol Reprod 38: 969, 1988.

■ **Westhoff D & Kamp G.**

Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase is bound to the fibrous sheath of mammalian spermatozoa.

J Cell Sci 110: 1821, 1997.

■ **Whyard TC, Cheung W, Sheynkin Y, Waltzer WC, Hod Y.**

Identification of *RS* as a flagellar and head sperm protein.

Mol Reprod Develop 55: 189, 2000.

■ **Williams K, Frayne J, Hall L.**

Expression of extracellular glutathione peroxidase type 5, GPX5, in the rat male reproductive tract.

Mol Human Reprod 4: 841, 1998.

■ **Wong PYD & Yeung CH.**

Effect of α -chlorohydrin on transport processes in perfused rat cauda epididymidis.

Contraception 16: 637, 1977.

■ **Wong PYD, Au CL, Ngai HK.**

Effects of 6 chloro-6-deoxyglucose on electrolyte and water transport in the epididymis and fertility of male rats.

Int J Androl 3: 82, 1980.

■ **Yeung CH & Cooper TG.**

Study of the role of epididymal α -glucosidase in the fertility of male rats by administration of the enzyme inhibitor castanospermine.

J Reprod Fertil 102: 401, 1994.

■ **Yeung CH, Wagenfeld A, Nieschlag E, Cooper TG.**

The cause of infertility of *c-ros* tyrosine kinase knockout male mice.

Biol Reprod 63: 612, 2000.

■ **Yeung CH, Sonnenberg-Riethmacher E, Cooper TG.**

Receptor tyrosine kinase *c-ros* knockout mice as a model for the study of epididymal regulation of sperm function.

J Reprod Fertil (Suppl) 53: 137, 1998.

■ **Yeung CH, Cooper TG, Weinbauer GF, Bergmann M, Kleinhans G, Schulze H, Nieschlag E.**

Fluid-phase transcytosis in the primate epididymis in vitro and in vivo.

Int J Androl 12: 384, 1989.

■ **Yoshida R, Nukiwa T, Watanabe Y, Fujiwara M, Hirata F, Hayashy O.**

Regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase activity in small intestine and epididymis of mice.

Arch Biochem Biophys 203: 343, 1980.

SEMEN ANALYSIS AND ESTIMATING OF FERTILITY POTENTIAL

Hans-Jürgen Glander

Department of Dermatology/Andrology Unit, University of Leipzig, Leipzig, Germany

Traditionally, semen analysis is used for evaluating fertility potential of andrological patients, but the interpretation of the results is rather difficult. There are semen samples with normal spermogram parameters failing a conception on the one hand and samples classified as abnormal compared to the WHO-standards of normality that proved to be fertile on the other hand. Patients with severe defects in their semen analysis could achieve pregnancy rates of up to 30% over a 24-months period (*Baker & Burger, 1986*). Therefore, the wrong conclusion may probably suggest that semen analysis are not useful for the estimation of male fertility potential. However, there is no doubt that the determination of spermogram parameters is one of the most significant examinations estimating male fertility.

In cohort studies significant correlation between the outcome of pregnancies and results of semen analysis as well as cut-off spermogram parameters between fertile and non-fertile men were calculated. The problem is that the fertility potential of an individual patient can not be estimated for sure, because of two main reasons. First, several functions of spermatozoa are not tested in the routine spermogram, e.g. sperm egg interactions, penetration of cervical mucus and others. Second, compensation mechanisms of females are not taken into account. The clinician has to interpret the results of semen analysis in context with specific questions:

1. What probability of fertility can be estimated?
2. Has the fertility potential to be estimated for

physiological intercourse or for assisted reproduction techniques, e.g. intrauterine insemination (IUI), in vitro fertilisation (IVF), or intracytoplasmatic sperm injection (ICSI) into oocytes?

3. Are there any further examinations of semen indicated?
4. What kind of treatment should follow?
5. Which conclusions should be drawn from the semen analysis for the management of females?

The first two questions are most important for physicians, therefore, the review shall restrict to these problem.

Routine spermogram parameters and fertility potential

Four facts are generally accepted:

An absolute infertility is excluded if intact motile spermatozoa with normal morphology can be seen in the semen sample.

A decrease in semen sample quality is associated with a rising trend of infertility.

The WHO-recommended lower limit of normal spermogram parameters (Table 1) is not the cut-off point between fertile and infertile men.

The number and degree of deviations from normal standard values discriminate between fertile and suspected infertile males.

There are numerous studies in the literature that address this problem. In a 20-year follow-up period *Bostofte et al. (1984)* described a

Table 1. Reference values of semen parameters (WHO-recommendations, 1999)

Volume	2.0 ml or more
pH	7.2 or more
Sperm concentration	20 x 10 ⁶ spermatozoa/ml or more
Total sperm number	40 x 10 ⁶ spermatozoa per ejaculate or more
Motility	50% or more motile (grades a + b) or 25% or more with grade a within 60 minutes of ejaculation
Vitality	75% or more live, i.e. excluding dye
White blood cells	fewer than 1 x 10 ⁶ /ml

strong decrease in fertility if sperm concentration was lower than 5 x 10⁶/ml, the percentage of immotile spermatozoa was more than 80% and morphologically abnormal sperm exceeded 60-80%. Beyond these border lines alterations of spermiogram parameters were only associated with slight alterations of number of live birth. In total the authors reported a 56% birth rate in 785 couples. These results were confirmed in another study 10 years later (*Engel et al., 1994*). A distinct decline of the birth rate was found if sperm concentration was below 5 x 10⁶/ml, the total motile sperm were less than 20% or less than 20% of sperm with normal morphology. The results based on spermiogram data of 685 patients, who responded to a questionnaire 6-12 years after their andrological examinations. The birth rate was especially diminished, if 4-5 parameters deviated from normal standard values.

Using a univariate life table analysis *Wichmann et al. (1994)* calculated a significant

association between pregnancy rate and the percentage of motile spermatozoa as well as the quality of motility in 907 couples. The conception rate registered 3 years after the first semen analysis was 60%, on average, if the percentage of motile spermatozoa exceeded 30%. The conception rate decreased strongly at motility rates of less than 30%.

Chia et al. (1998) determined the semen parameters in 243 fertile men, whose wives were currently pregnant (Table 2). Unfortunately, the combination of the abnormal parameters in individual patients was not described. Provided that all described lower limits are from the same patient 16000 motile spermatozoa or 6400 spermatozoa with normal morphology (strict criteria) per ejaculate resulting from 0.2 ml volume, 1.6 x 10⁶ sperm/ml, 5% motile spermatozoa and 2% with normal morphology would be the lowest limit of fertility.

Table 2. Routine spermiogram parameters of fertile men, n = 243 (*Chia et al., 1998*)

Parameter	Means	Minimum	Percentiles	
			25	75
Volume (ml)	2.4	0.2	1.3	3.0
Sperm concentration (x10 ⁶ /ml)	44.7	1.6	23	105
Motile spermatozoa (%)	54.8	5	46	65
Spermatozoa with normal morphology (%)	20.0	2	12	28

The sperm morphology was realised to be the factor discriminating the best between fertile and infertile groups in a study dealing with the influence of the male factor on fertility of couples (Ombelet *et al.*, 1997). A cut-off value at the 10th percentile for the fertile population (n = 144) showed to lower results than the WHO-standards of normality

(WHO, 1999) (Table 3). The differences between the fertile and subfertile group were significant ($p < 0.05$). These data are in agreement with an investigation done on another population group of 1055 males showing significantly different spermiogram parameters between fertile and infertile men (Ayala *et al.*, 1996; Table 4).

Table 3. Tenth percentiles of fertile population and cut-off values between fertile and subfertile group (Ombelet *et al.*, 1997)

Parameters	10th percentile	Cut-off value
Sperm concentration ($\times 10^6/\text{ml}$)	14.3	34
Total sperm count ($\times 10^6$)	29.6	80
Total motile spermatozoa ($\times 10^6$)	8.2	36.4
Total morphologically normal spermatozoa, strict criteria ($\times 10^6$)	1.8	5.64
Total motile spermatozoa with normal morphology ($\times 10^6$)	0.52	3.24

Table 4. Spermiogram parameters in 1055 couples, median-values, differences significant, $p = 0.0001$ (Ayala *et al.*, 1996)

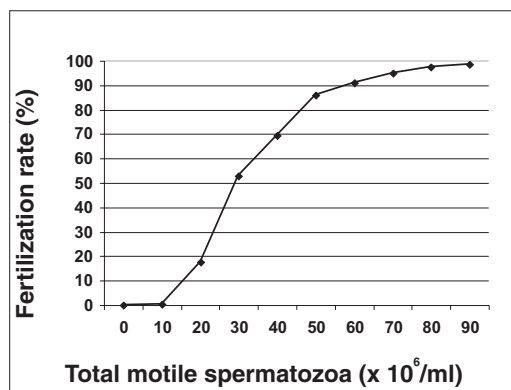
Parameters	Population with conception	Population without conception
Sperm concentration ($\times 10^6/\text{ml}$)	65.0	25.0
Total sperm count ($\times 10^6$ per ejaculate)	195.0	35.0
Motile spermatozoa ($\times 10^6/\text{ml}$)	45.5	8.8
Motile spermatozoa ($\times 10^6$ per ejaculate)	136.5	13.1

Semen donors in TID (therapeutic insemination by donor) programme are not regarded as good indicators of proven fertility (Chia *et al.*, 1998) since not all donors have established their fertility, and cryopreserved semen samples were used for this aim. The TID programme in our department resulted in 542 pre-

gnancies over 12 years (Glander *et al.*, 1998). The pregnancy rate was 15.6% per insemination cycle, and 61.2% per treated patient after intensive pre-treatment. The minimal motile sperm concentration in the cryostored semen samples after thawing were $10^7/\text{ml}$ in the 542 conception cycles. The cumulative conception

rates in the conceiving cycle group (= 100%) in dependence on the total motile sperm concentration in the cryostored semen samples were about 20% till $20 \times 10^6/\text{ml}$, 50% till $30 \times 10^6/\text{ml}$, and 90% till $55 \times 10^6/\text{ml}$ motile spermatozoa/ml (Figure 1). The cryopreserved semen samples of 104 donors resulting in pregnancies showed a concentration of motile spermatozoa after thawing (Table 5) corresponding to the parameters of fertile fresh semen samples (Chia *et al.*, 1998; Ombalet *et al.*, 1997; Ayala *et al.*, 1996).

Figure 1. Cumulative pregnancy rates in dependence on the total sperm motility concentration in 542 conception cycles (=100%) after therapeutic insemination by donor using cryopreserved semen samples (Glander *et al.*, 1998).



Several variables deviated in combination and proportion allow very likely maximum discrimination between fertile and infertile males (Glezerman & Bartoov, 1986). The male fertility is a multifactorial phenomenon with each semen property contributing to fertility poten-

tial in a different manner. Therefore, a semen analysis index (SAI) based on semen volume, total sperm count, percentage motility and forms was created resulting in a high accuracy of classification (Bartoov *et al.*, 1993). Only 3% false negative and 10% false positive classification were stated using cut-off indices of ≥ 0.6 and ≤ 1.0 for defining fertile and infertile zones, respectively. The SAI is calculable by the formula shown in table 6.

The significance of an abnormal volume for the semen sample quality was controversially debated. However, there is no hint yet, that abnormal semen volume ($\leq 1 \text{ ml}$ and $\geq 6 \text{ ml}$) influences neither the spermogram parameters nor correlates with them (Dickerman *et al.*, 1989).

Computer-assisted sperm motion analysis (CASA)

Accurate and detailed measurements of sperm motility parameters by computer-assisted sperm analysis (CASA) is increasingly performed in andrology. The CASA has led to the determination of a range of new motility parameters, e.g. velocity straight line (VSL), velocity curvilinear (VCL), linearity of sperm movement and others. Disturbances of motility as well as therapeutic effects could exactly be determined with the new technology (Irvine, 1995). Results of different working groups are difficult to compare due to a lack of standardisation (Yeung *et al.*, 1997). We apply the Cell-Motion-Analysis-System of Stroemberg-Mika

Table 5. Quality of cryopreserved semen samples in 104 semen donors with proven fertility, sperm motile efficiency was determined according to Ishii *et al.* (1977)

Parameter	Mean \pm SD
Motile spermatozoa ($\times 10^6/\text{ml}$)	36.3 \pm 18.7
Progressively motile spermatozoa ($\times 10^6/\text{ml}$)	28.4 \pm 15.9
Sperm motile efficiency (%/min)	19.2 \pm 14.4

(CMA-SM) with standard settings (Paasch & Glander, 1998; Table 7). An image processor

performed the conversion of a photo sequence of 50 individual pictures into a digital for-

Table 6. Semen analysis index.

$$\begin{aligned} \text{SAI} = & 0.002 \text{ total sperm count (x } 10^6) + \\ & + 0.016 \text{ motile sperm (\%)} + \\ & + 0.045 \text{ sperm with normal morphology (\%)} \\ & - 0.35 \text{ volume (ml)} \\ & - 1.03 \end{aligned}$$

(Bartoov et al., 1993)

Fertility potential	mean ± standard deviation (range)	cut-off index
Fertile	0.77 ± 1.0 (- 0.2 to 4.0)	≥ 0.6
Infertile	- 0.71 ± 1.0 (- 3.5 to 1.5)	≤ - 1.0

Table 7. Standard settings of CASA in Leipzig (Paasch & Glander, 1998)

fields	5	linearity threshold	90 %
temperature	36°C	maximum radius for circle	100 µm
immotile threshold (IMO)	≤5 µm/s	dilution	no
locally motile threshold(LOC)	≤15 µm/s	depth of chamber	10 µm
AREAMIN	40 Pixel	FRMAX maximum of frames	32
AREAMAX	200 Pixel	FRMIN minimum of frames	16
grey threshold	210		

Table 8. Sperm motility characteristics determined by computer-assisted sperm motion analysis (Paasch & Glander, 1998) in 1605 semen samples with normal spermogram parameters (WHO, 1992)

Motility parameters	Mean ± standard error
Motile spermatozoa (VAP > 15 µm/s)	45.8 ± 0.5 %
Locally motile spermatozoa (VAP ≤15 µm/s)	35.3 ± 0.4 %
Immotile spermatozoa (VAP ≤ 5 µm/s)	19.1 ± 0.5 %
Motile spermatozoa, VSL	24.8 ± 0.2 µm/s
Motile spermatozoa, VAP	36.1 ± 0.2 µm/s
Motile spermatozoa, VCL	49.4 ± 0.4 µm/s
Non-linear motile spermatozoa, VSL	23.8 ± 0.2 µm/s
Non-linear motile spermatozoa, VAP	37.9 ± 0.2 µm/s
Non-linear motile spermatozoa, VCL	54.9 ± 0.4 µm/s
Linearly motile spermatozoa, VSL	37.2 ± 0.3 µm/s
Linearly motile spermatozoa, VAP	38.9 ± 0.3 µm/s
Linearly motile spermatozoa, VCL	49.0 ± 0.4 µm/s

mat. The 8 bit image processor operated with 15 MHz and 3 Mbytes memory and supplied a digital image of 768 x 576 pixels. Thirty two images were processed in 0.64s (50 Hz). These images were analysed by processing algorithms, which determined the properties of the sperm motion. For each assessment the SM-counting chamber was charged with a constant volume of 5 µl. During the investigation the heated stage of the microscope provided a constant temperature of 37°C. Each sample was measured five times at random chosen positions within the counting chamber.

Semen samples (n=1605) with normal spermogram parameters according to the WHO-guidelines (1992) showed CASA characteristics as follows (mean ± standard error): motile spermatozoa (defined by velocity average path, VAP >15µm/s) amounted to 45.8 ± 0.5% and showed a VSL of 24.8 ± 0.2 µm/s, a VAP of 36.1 ± 0.2 µm/s and 49.4 ± 0.4 µm/s VCL. From the motile spermatozoa 29.0 ± 0.5% were classified as linearly motile spermatozoa with a VSL of 37.2 ± 0.3 µm/s, a VAP of 38.9 ± 0.3 µm/s and a VCL of 48.9 ± 0.4 µm/s (Paasch & Glander, 1998; Table 8).

Pitfalls in the semen analysis

The interpretation of the results of semen analyses may be misleading, if various aspects are neglected:

dependent on the patients and their sexual behaviour

- intraindividual variation of semen qualities
- time interval between ejaculations
- frequency of ejaculations

dependent on the method of semen sample analysis (quality control)

- sample collected for the examination is not a complete one
- stirring of sample is not sufficient enough

- deviated temperature
- determination of motility is not performed at all levels of the counting chamber. The dead spermatozoa settle to the bottom of the chamber and the motile ones are in the supernatant
- delay of analysis after collecting the sample

The semen sample quality should only be estimated after two analyses in an interval of at least 2 weeks to get insight into the intraindividual variation. The ideal abstinence interval between ejaculations is from 7 to 10 days (Check *et al.*, 1991). The count of total live spermatozoa per ejaculate was three times higher following 7 days of abstinence vs. 3 days (Check *et al.*, 1991) and twice from 1 to 4 days abstinence (Matilsky *et al.*, 1993).

Effects of micro organisms on the fertility

The role of pathogenic bacteria in seminal plasma has been controversially discussed up to the present day. The male urethra is colonised by a variety of micro organisms contaminating the semen sample after ejaculation. Pathogenic bacteria in seminal plasma should only be paid attention if the germs can also be found in a second culture with an identical sensitivity against antibiotics a few days later. The incidence of *Trichomonas vaginalis* (Bornman *et al.*, 1992), of bacterial, Chlamydia, and Mycoplasma infection, number of leukocytes did not differ significantly between fertile and subfertile populations (Ombelet *et al.*, 1997). However a high incidence (almost 40%) of Chlamydia infection was found in azoospermic patients (Ombelet *et al.*, 1997). Possibly, the chronic Chlamydia infection of the male reproductive tract may cause an obstructive azoospermia.

Azoospermia

An azoospermia should be differentiated

Table 9. Johnsen scores of testicular biopsies and serum FSH-concentration in obstructive (n=16) and non-obstructive (n=125) azoospermia, p<0.01 (Glander et al., 2000)

Parameter	obstructive azoospermia	non-obstructive azoospermia
Johnsen score	7.4 ± 1.9	4.8 ± 2.7
FSH (U/l)	5.2 ± 3.4	13.5 ± 11.8

into an obstructive or non-obstructive one and distinguished from “pseudo-azoospermia” which shows motile or non-motile spermatozoa in sperm pellet analysis after centrifuging the semen (Jaffe et al., 1998). One laboratory test, the FSH-level in serum and the score of testicular histology allows to discriminate between both groups of azoospermia quite well. In our 141 patients attempting testicular sperm extraction (TESE) both parameters differed significantly (p<0.01) between patients with obstructive azoospermia and those with non-obstructive azoospermia. The sample volume, concentration of fructose and neutral alpha glucosidase are further helpful parameters of classification.

Structure of sperm nucleus

Besides routine spermogram (WHO, 1992, 1999) increasingly markers like analysis of sperm nucleus, such as determination of intact double stranded DNA, maturation of nuclear proteins and nuclear chromatin decondensation (NCD) are performed. During the spermatogenesis the somatic histones are replaced by protamines in male germ cells. The disulphide-rich protamines are associated with DNA and make DNA resistant to denaturation and stabilise the double stranded structure. The histones are rich in lysine stainable by acidic aniline blue, whereas the protamines contain arginine and cysteine (Meistrich et al., 1978; Loir & Lanneau, 1978). Spermatozoa stainable with aci-

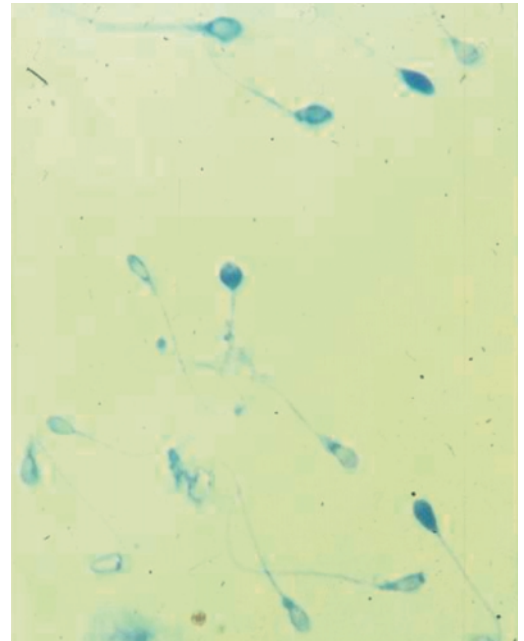


Figure 2. Aniline blue staining of spermatozoa. Immature sperm nuclei are stained dark blue.

dic aniline blue contain lysine-rich proteins related to a disturbed maturation of sperm nucleoproteins (Table 10; Figure 2). Double stranded DNA may be monitored by the fluorochrome acridine orange, which intercalates into double stranded DNA as a monomer and binds to single stranded DNA as an aggregate. The monomeric acridine orange fluoresces green and the aggregates red (Ichimura et al., 1971). Figure 3 shows an example. Furthermore, the nuclear chromatin decondensation (NCD) of spermatozoa is essential for fertilisation of oocytes. In vivo NCD leads to separation of chromosomal fibres, DNA duplication and later the arran-

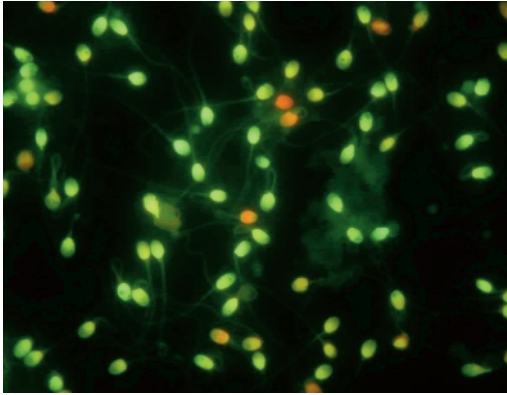


Figure 3. Acridine orange staining of spermatozoa; green fluorescence of intact double stranded DNA, yellow fluorescence of partially degenerated double stranded DNA, and red fluorescence of single stranded DNA.

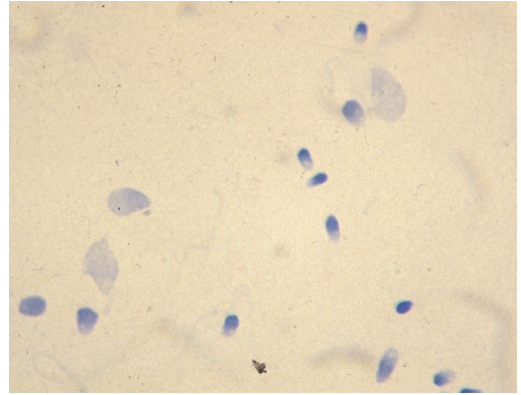


Figure 4. Swollen (decondensed) and non-decondensed spermatozoa after nuclear chromatin decondensation in vitro, stained by aniline blue, which allows a better evaluation than phase contrast microscopy (x 1000)

Table 10. Reference values of sperm nucleus qualities

Attribute	Test	Reference value	Authors
Intact double-stranded DNA	Acridine orange staining	>50% spermatozoa with green fluorescence	Hoshi et al., 1996 Haustein & Glander, 1999
Mature nuclear proteins	Aniline blue staining	>70% of spermatozoa unstained	Auger et al., 1999 Haidl et al., 1999
Nuclear chromatin decondensation, NDC	NCD by sodium dodecyl sulphate	>70% of spermatozoa decondensed after 60 min	Gopalkrishnan et al., 1991

gement of DNA in the equatorial plane. In vitro the potential of spermatozoa for NCD can be induced by sodium dodecyl sulphate, SDS and ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA (Gopalkrishnan et al., 1991) (Table 10; Figure 4).

Acrosomal status and acrosomal reaction

In fertile semen samples an ionophore-induced acrosome reaction in more than 40% of spermatozoa is a characteristic for fertilisation potential. The percentage of

spermatozoa with an intact acrosome did not significantly correlate with the fertilisation rates (Liu et al., 1998). We monitor the acrosome status by the binding of FITC-conjugated *Pisum sativum* agglutinin (Cross et al., 1986) in a modification according to Tesarik et al. (1993) (Figure 5). The rate of spermatozoa with intact acrosome exceeded the rate of morphologically normal spermatozoa in 94% of 1462 samples examined. Therefore, the conclusion is suggested that the acrosomal status without the induction procedure barely provides additional information to the morphology.

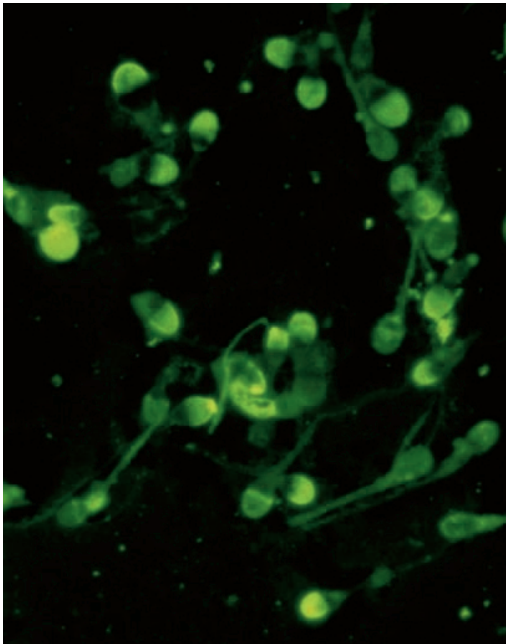


Figure 5. Acrosome staining. Three fluorescence staining patterns were distinguished: selective staining of the entire acrosome region, spermatozoa unstained in the acrosomal region and staining in the post acrosomal region, which were regarded as acrosome-intact, acrosome-reacted and dead spermatozoa, respectively.

Sperm surface antibodies

The significance of the mixed antiglobulin reaction test (MAR-test) for spermatozoa with surface bound antibodies in order to exclude immunological infertility has been extensively debated in the past, especially the limit for these diagnosis. The test result is regarded as positive, if 50% or more of the motile spermatozoa have adherent particles (*Barratt et al., 1992*) resulting in a decrease of conception rate to 35% from 55% in patients with negative MAR-test (*Abshagen et al., 1998*). If more than 90% of the motile spermatozoa were positive in the MAR-test, the sperm showed impaired motility and the conception rate declined to 13% (*Abshagen et al., 1998*).

Semen sample quality for assisted reproduction techniques

Semen analysis has also been used to estimate the outcome of assisted reproduction techniques, such as intrauterine insemination (IUI), in vitro fertilisation (IVF), or intracytoplasmic sperm injection (ICSI) into oocytes. For ICSI one vital spermatozoon after the preparation procedure is sufficient. The intrauterine insemination is an effective therapy for male factor infertility, when the total motile sperm count is more than 5×10^6 . This sperm quality led to a conception rate of 8.2% per cycle in more than 4000 cycles of IUI (*Dickey et al., 1999*). No pregnancies occurred if the initial total motile sperm count was less than 1.6×10^6 . In IVF-programmes the oocytes should be inseminated with 100000 sperm or more / oocyte (*Schlegel & Girardi, 1997*), i.e. with respect of recovery rate of spermatozoa after preparation technique including swim up at least 1×10^6 initial total motile sperm count have to be present in the semen sample. The fertilisation rates strongly depended on the total number of spermatozoa recovered by swim up-technique with a cut off in the range of 2×10^6 spermatozoa between high and low fertilisation rates (*Stovall et al., 1994*).

In summary it can be stated:

1. Spermogram parameters of fertile men can be classified into large cohort groups.
2. For an individual patient the probability of his fertility potential can only be estimated.
3. A borderline of subfertility has to be assumed at a sperm concentration of 5×10^6 /ml, 20% motile spermatozoa and 30% morphologically normal sperm determined according to conventional criteria.
4. The fertilising potential decreases dramatically below 1×10^6 total motile spermatozoa with normal morphology.
5. A concentration of less than 30000 motile spermatozoa with normal morphology / ml is almost associated with an absolute infertility.

REFERENCES

- **Abshagen K, Behre HM, Cooper TG, Nieschlag E.**
Influence of sperm surface antibodies on spontaneous pregnancy rates.
Fertil Steril 70: 355-356, 1998.
- **Auger J, Mesbah M, Huber C, Dadoune JP.**
Aniline blue staining as a marker of sperm chromatin defects associated with different semen characteristics discriminates between proven fertile and suspected infertile men.
Int J Androl 13: 452-462, 1990.
- **Ayala C, Steinberger E, Smith DP.**
The influence of semen analysis parameters on the fertility potential of infertile couples.
J Androl 17: 718-725, 1996.
- **Baker HWG & Burger HG.**
Male infertility.
In: *Reproductive Medicine*. E Steinberger, G Fraiese, A Steinberger (eds), pp. 187-197, Raven Press, New York, 1986.
- **Barrat CLR, Dunphy BC, McLeod I, Cooke ID.**
The poor prognostic value of low to moderate levels of sperm surface bound antibodies.
Hum Reprod 7: 95-98, 1992.
- **Bornman MS, Grobler L, Boomker D, Mahomed MF, Schulenburg GW, Reif S, Crewe-Brown HH.**
Is *Trichomonas vaginalis* a cause of male infertility?
In: *Diagnosing Male Infertility*. GM Colpi & D Pozza (eds), *Progr. Reprod. Biol. Med.*, Basel, Karger, 15: 94-97, 1992.
- **Bostoffe E, Serup J, Rebke H.**
Interactions among the characteristics of human semen and a new system for classification of male infertility.
Fertil Steril 41: 95-102, 1984.
- **Check JH, Epstein R, Long R.**
Effect of time interval between ejaculations on semen parameters.
Arch Androl 27: 93-95, 1991.
- **Chia S-E, Tay SK, Lim ST.**
What constitutes a normal semen analysis? Semen parameters of 243 fertile men.
Hum Reprod 13: 3394-3398, 1998.
- **Cross NL, Morales P, Overstreet JW, Hanson FW.**
Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm.
Gamete Res 15: 213-226, 1986.
- **Dickerman Z, Sagiv M, Savion M, Allalouf D, Levinsky H, Singer R.**
Andrological parameters in human semen of high (≥ 6 ml) and low (≤ 1 ml) volume.
Andrologia 21: 353-362, 1989.
- **Dickey RP, Pyrzak R, Lu PY, Taylor SN, Rye PH.**
Comparison of the sperm quality necessary for successful intrauterine insemination with World Health Organization threshold values for normal sperm.
Fertil Steril 71: 684-689, 1999.
- **Engel S, Grafe A, Petzold R.**
The benefit of conventional spermogram parameters for prognosis of male fertility.
Fertilität 10: 10-15, 1994.
- **Glander H-J, Bock H, Winiecki P.**
Sperm motile efficiency (SME) of fresh spermatozoa, in a hypotonic medium correlates with their survival in fertile men and infertility patients.
Andrologia 21: 363-36, 1989.
- **Glander HJ, Horn, LC, Dorschner W, Paasch U, Kratzsch J.**
Probability to retrieve testicular spermatozoa in azoospermic patients.
Asian J Androl 2: 199-205, 2000.
- **Glander, H-J, Seikowski, K, Haake, K-W.**
Twelve years therapeutic insemination by donor using cryostored semen.
Hung Androl 3: 67-75, 1998.

■ **Glezerman M & Bartoov, B.**

Semen analysis.

In: Infertility: Male and Female. V Insler & B Lunenfeld (eds), Edinburgh-London-Melbourne-New York, Churchill Livingstone, pp. 243-271, 1986.

■ **Gopalkrishnan K, Hinduja IN, Anand Kumar TC.**

In vitro decondensation of nuclear chromatin of human spermatozoa: assessing fertilizing potential.

Arch Androl 27: 43-50, 1991.

■ **Haidl G & Schill W-B.**

Assessment of sperm chromatin condensation: an important test for prediction of IVF outcome.

Arch Androl 32: 263-266, 1994.

■ **Haustein B & Glander H-J.**

The routine spermiogram parameters do not correlate with sperm chromatin integrity.

Z Hautkrh H+G 74: 471-475, 1999.

■ **Hoshi K, Katayose H, Yanagida K, Kimura Y, Sato A.**

The relationship between acridine orange fluorescence of sperm nuclei and the fertilizing ability of human sperm.

Fertil Steril 66: 634-639, 1996.

■ **Ichimura S, Zama M, Fujita H.**

Quantitative determination of single-stranded sections in DNA using the fluorescent probe acridine orange.

Biochem Biophys Acta 240: 485-495, 1971.

■ **Irvine DS**

Computer assisted semen analysis systems: sperm motility assessment.

Hum Reprod 10: 53-59, 1995.

■ **Ishii N, Mitsukawa S, Shirai M.**

Sperm motile efficiency.

Andrologia 9: 55-62, 1977.

■ **Jaffe TM, Kim ED, Hoekstra TH, Lipshultz LI.**

Sperm pellet analysis: A technique to detect the presence of sperm in men considered to have azoospermia by routine semen analysis.

J Urol 159: 1548-1550, 1998.

■ **Liu de Y & Baker HWG.**

Calcium ionophore-induced acrosome reaction correlates with fertilization rats in vitro in patients with teratozoospermic semen

Hum Reprod 13: 905-910, 1998.

■ **Loir M & Lanneau M.**

Partial characterization of rain spermatid basic nuclear proteins

Biochem Biophys Res Comm 80: 975-982, 1978.

■ **Matilsky M, Battino S, Ben-Ami M, Geslevich Y, Eyali V, Shaler E.**

The effect of ejaculatory frequency on semen characteristics of normozoospermic and oligozoospermic men from an infertile population.

Hum Reprod 8: 71-73, 1993.

■ **Meistrich ML, Brock VA, Grimes SR, Platz RD, Hnilica LS.**

Nuclear protein transition during spermatogenesis.

Fed Proc 37: 2522-2525, 1978.

■ **Ombelet W, Bosmans E, Janssen M, Cox A, Vlasselaer J, Gyselaers W, Vandeput H, Gielen J, Pollet H, Maes M, Steeno O, Kruger T.**

Semen parameters in a fertile versus subfertile population: a need for change in the interpretation of semen testing.

Hum Reprod 12: 987-993, 1997.

■ **Paasch U & Glander H-J.**

Conventional and standardized computer assisted sperm motion analysis (CASA) in 3731 semen samples.

Adv Reprod 1: 57-68, 1998.

■ **Schlegel PN & Girardi SK.**

In vitro fertilization for male factor infertility.

J Clin Endocrinol Metab 82: 709-716, 1997.

■ **Stovall DW, Guzick DS, Berga SL, Krasnow JS, Zeleznik AJ.**

Sperm recovery and survival: two tests that predict in vitro fertilization outcome.

Fertil Steril 62: 1244-1249, 1994.

■ **Tesarik J, Mendoza C, Carreras A.**

Fast acrosome reaction measure: a highly sensitive method for evaluating stimulus-induced acrosome reaction.

Fertil Steril 59: 424-430, 1993.

■ **WHO**

Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction.

Cambridge, University Press, Cambridge. 3rd and 4th ed, 1992; 1999.

■ **Wichmann L, Isola J, Tuohimaa P.**

Prognostic variables in predicting pregnancy. A prospective follow up study of 907 couples with an infertility problem.

Hum Reprod 9: 1102-1108, 1994.

■ **Yeung CH, Cooper TG, Nieschlag E.**

A technique for standardization and quality control of subjective sperm motility assessments in semen analysis.

Fertil Steril 67: 1156-1158, 1997.

APPENDICE

POST COITAL TEST E TESTS DI PENETRAZIONE IN VITRO

Patrizia Sagone e Daniela Giacchetta

Servizio di Andrologia, Ospedale San Paolo - Polo Universitario, Milano

Introduzione

Gli spermatozoi, per raggiungere la sede ove feconderanno l'ovocita, devono attraversare il canale cervicale nuotando nel muco cervicale, che rappresenta il loro primo ostacolo da superare.

La penetrazione dell'interfacie muco-sperma e la capacità di migrazione nel muco dipendono primariamente dalla qualità del muco cervicale e dalla motilità progressiva dello spermatozoo.

Nella diagnostica della infertilità di coppia è di grande importanza studiare l'interazione sperma-muco, al fine di valutare una ipotetica ostilità da parte del muco o una difficoltà penetrativa da parte dello spermatozoo ogni qualvolta ci si trovi di fronte ad una infertilità non adeguatamente spiegata, con uno sperma normale o non troppo scadente.

Ciò è possibile mediante un test in vivo (il Post Coital test) o i tests in vitro. I tests in vitro comprendono: lo Slide test, lo Sperm Cervical Mucus Contact test (SCMC) e il Capillary Tube test (Test di Kremer). Il Capillary Tube test può essere diretto (sperma del marito e muco della moglie) o crociato (sperma del paziente con muco della moglie e muco di donatrice, e sperma di donatore con muco della moglie e muco di donatrice).

Per ottenere informazioni corrette sia da un punto di vista clinico che da un punto di vista fisiologico, questi tests devono essere eseguiti utilizzando un muco cervicale periovulatorio che presenti uno score secondo

Insler >10 (da 10 a 15) e un pH \geq 7. Lo score di Insler (1972) è un metodo quantitativo per valutare la qualità del muco: a ciascuno dei parametri caratteristici del muco, e cioè il volume, la consistenza, la cristallizzazione (ferning), la filanza (spinnbarkeit) e la cellularità viene assegnato un punteggio da 0 a 3. Questi punteggi, sommati insieme, danno un valore massimo di 15: un punteggio > 12 indica un buon muco ovulatorio, un punteggio da 10 a 11 indica un muco ovulatorio ancora adeguato per l'esecuzione dei test, un punteggio < 10 indica muco scadente.

Devono essere osservati dalla coppia in esame 3-5 giorni di astinenza sessuale per potersi avere non solo un seme con caratteristiche ottimali, ma anche un muco non "contaminato" da precedenti e recenti contatti col seme. Per il Post-Coital test è necessario monitorizzare preventivamente il muco cervicale con prelievi quotidiani nei giorni precedenti la presunta ovulazione, prelievi sui quali verrà determinato lo score di Insler. Allorché si avrà la conferma che lo score è ottimale, si provvederà ad istruire la coppia per il Post-Coital test. Se lo score resta scadente nel periodo ovulatorio, ciò può

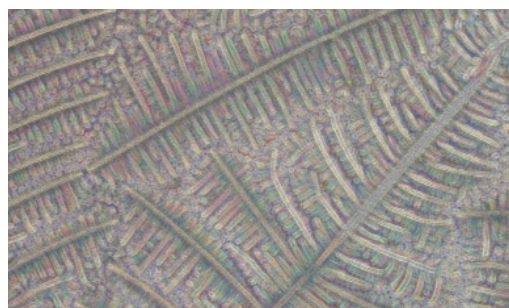


Fig.1: Muco ovulatorio, con ferning punteggio 2.

essere già diagnostico di una infertilità di coppia da fattore cervicale.

Per i tests in vitro si provvede analogamente verificando la qualità del muco, finché si arriva ad avere un muco con caratteristiche ottimali per i tests.

Nei tests in vitro è opportuno eseguire preventivamente anche un'analisi completa del liquido seminale da utilizzare: requisito infatti perché abbia senso eseguire i tests di interazione sperma-muco è che lo sperma abbia una motilità intrinseca tale, secondo i parametri del W.H.O (1992), da poter pensare che esso riesca comunque a penetrare in una qualche misura un muco ovulatorio.

Come tutti i test di funzionalità spermatica, anche i test di interazione sperma-muco in vitro devono essere eseguiti a 37°C e dopo l'avvenuta liquefazione dello sperma, pertanto 30 minuti circa dopo l'eiaculazione.

POST COITAL TEST

Il Post-coital test (PCT) studia in vivo l'interazione degli spermatozoi con il muco cervicale peri-ovulatorio, cioè nel periodo in cui il muco cervicale è più recettivo alla penetrazione degli spermatozoi.

Ideato da Sims nel 1866, fu introdotto nel 1913 da Huhner nella diagnostica routinaria della infertilità di coppia.

Il periodo ovulatorio per effettuare il PCT

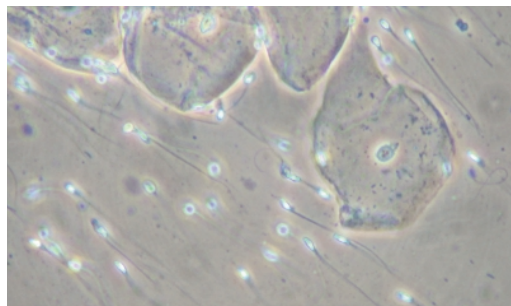


Fig.2: Post coital test.

viene determinato in base ai tradizionali criteri clinici (per esempio: giorni del ciclo, temperatura basale, dosaggio plasmatico o urinario degli estrogeni, monitoraggio ecografico dell'ovulazione). Nella pratica clinica spesso si ricorre a Tests di determinazione degli estrogeni urinari acquistabili dalla coppia in farmacia (Clearplan™, Clearblu™, Discrettest™, ecc.).

La coppia deve essere informata circa la necessità di astensione dai rapporti sessuali nei tre giorni che precedono l'effettuazione del test. Il PCT va valutato dopo 3-24 ore dal coito. Alcuni gruppi, come il nostro, ritengono ottimale l'esecuzione del test tre ore dopo il rapporto, nella presunzione che gli spermatozoi ben mobili all'interfacie sperma-muco penetrano il muco in tempi brevi e già dopo poche ore sono in pieno canale cervicale. Altri gruppi valutano il test più tardivamente (9-24 ore dopo il rapporto) ritenendo che lo scopo del test non sia solo quello di determinare il numero di spermatozoi progressivi nel muco, ma soprattutto quello di valutarne la sopravvivenza e il comportamento dopo molte ore dal coito: infatti il riscontro di alcuni spermatozoi con motilità rapidamente progressiva dopo 9-24 ore nell'endocervice deporrebbe per l'esclusione di un eventuale fattore cervicale come causa dell'infertilità (Oei *et al.*, 1995).

Si eseguono due prelievi di muco mediante due siringhe da insulina: il primo dal fornice vaginale posteriore e il secondo dal canale endocervicale.

I prelievi si esaminano osservando i rispettivi campioni su un vetrino portaoggetto a 400 X. Si conta il numero di spermatozoi per campo e si valuta la motilità di tipo a, b, c (WHO, 1992).

Il riscontro di 50 spermatozoi mobili (a+b) per HPF (cioè a 400X), che corrisponde ad una concentrazione pari a 2500 sp/mm³ (Moghissi, 1976; 1986), dopo il suddetto numero di ore dal rapporto conferma un quadro di normalità per

entrambi i partner. Comunque già con la presenza di 20 o più spermatozoi per HPF con motilità di tipo *a* è possibile considerare soddisfacente il PCT. Il riscontro di un numero di spermatozoi inferiore a 10 per HPF ($<500/\text{mm}^3$) è indicativo di una riduzione della capacità di penetrazione degli spermatozoi o di anomalità del muco cervicale (WHO, 1992).

In caso di PCT dubbio, cioè con <10 spermatozoi mobili per HPF, è opportuno ripetere il test il ciclo successivo prima di dedurre informazioni cliniche definitive circa il fattore cervicale di infertilità. In caso di riconferma di referto "dubbio" si dovranno eseguire i tests immunologici sullo sperma, sul muco e sul siero di entrambi i partners, qualora non siano già stati fatti preventivamente. Qualora questi ultimi siano negativi, si può parlare di penetrazione sperma - muco non regolare e dare indicazione ad Inseminazione Omologa Intrauterina. Anche il riscontro di un solo PCT negativo consiglia una ripetizione del test, e non autorizza a formulare una diagnosi certa di sterilità di coppia.

L'interpretazione del test deve, comunque, tener sempre in considerazione la qualità del muco e le caratteristiche del seme del partner, oltre all'adeguatezza del coito. Non bisogna inoltre dimenticare che sia la presenza di anticorpi anti-spermatozoo nel liquido seminale o nel muco cervicale, sia la presenza di problemi tecnici legati alla metodica o di problemi sessuali, quali ejaculazione ante portas, grave ipospadia, o vaginite severa, possono essere responsabili di un PCT dubbio o negativo.

Il significato clinico del PCT è tutt'oggi molto dibattuto, dal momento che studi di grande rilevanza scientifica hanno condotto a conclusioni diverse.

Alcuni autori hanno dimostrato la validità clinica e l'elevato valore prognostico del PCT (Hull, 1982; Griffith, 1990; Eggert-Kruse, 1989). Alcuni anni dopo lo stesso Hull (2000)

ha riconfermato il valore prognostico del PCT nelle coppie in cui il periodo di infertilità era inferiore ai tre anni. Altri ricercatori (Collins et al., 1984) non hanno riscontrato alcun valore predittivo del PCT per una gravidanza.

Nonostante queste risultanze, molti clinici considerano il PCT una parte importante, anche se non essenziale, nell'iter diagnostico di una coppia infertile, e di conseguenza un Centro di Infertilità deve includere il test nella sua pratica clinica.

TEST IN VITRO

SLIDE TEST (WHO 1999).

Lo Slide test, chiamato anche test di Kurzrok-Miller, permette di ottenere una valutazione qualitativa della interazione tra sperma e muco. Si effettua ponendo una goccia di muco cervicale su un vetrino portaoggetto e ricoprendolo con un vetrino coprioggetto (22 mm x 22 mm); ai lati di quest'ultimo viene posta una goccia di sperma in modo che il seme possa migrare per capillarità sotto il vetrino: in tal modo si ottiene una interfaccia muco-sperma (Fig. 3).

Il vetrino viene incubato a 37°C in camera umida (p.e. una capsula Petri provvista nel suo interno di garza umidificata) per 30 minuti.

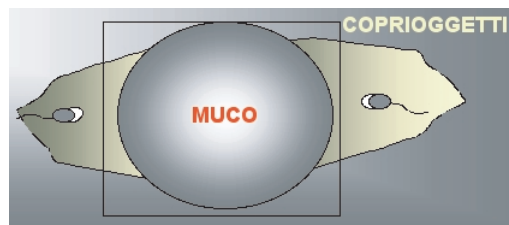


Fig. 3: Slide test: una goccia di muco cervicale è posta su un vetrino portaoggetto e ricoperto con un vetrino coprioggetto (22 mm x 22 mm), ai lati di quest'ultimo viene posta una goccia di sperma.

Trascorso il tempo, si osserverà la formazione di "falangi" (cioè proiezioni di gruppi di spermatozoi che penetrano nel muco) (Fig. 4-5).

Dalle falangi gli spermatozoi si staccano,

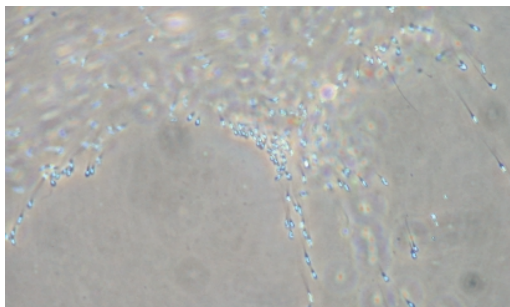


Fig.4: Slide Test: Formazione di "falangi" di penetrazione.

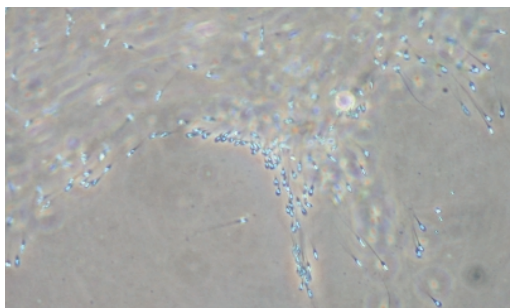


Fig.5: Slide Test. Stesso caso della Fig. 4, pochi minuti dopo si osserva il progressivo distacco degli spermatozoi dalla falange.

si disperdono ed iniziano a muoversi a caso nel muco. A causa dei grandi problemi di standardizzazione si raccomanda di usare il test soltanto per una valutazione qualitativa di interazione.

Lo Slide test viene giudicato normale quando il 90% degli spermatozoi esibisce una motilità progressiva nel muco. Viene altresì definito anormale quando non si osserva alcuna penetrazione nel muco, oppure quando gli spermatozoi penetrati si immobilizzano subito o presentano movimenti "shaking" (cioè scuotenti, caratteristica dovuta, nella maggior parte dei casi, alla presenza di anticorpi adesivi alla superficie degli spermatozoi e più raramente presenti nel muco cervicale).

SCMC TEST

Si utilizza per individuare la probabile presenza di anticorpi anti-spermatozoo adesivi agli spermatozoi e/o nel muco cervicale.

Su un vetrino portaoggetti si pone una goccia di muco mescolata con una goccia di liquido seminale, sull'altra estremità una goccia di sperma (controllo) (Fig. 6).

Il vetrino viene incubato per 30 minuti: poi si valuta la percentuale di spermatozoi con movimenti shaking e di quelli con movimenti progressivi.

Il test viene giudicato positivo per la presenza di anticorpi, e quindi patologico, se la percentuale di spermatozoi con movimenti shaking è maggiore del 50%, e negativo se la percentuale è compresa tra 0-25%.

Il risultato del test indica sino a che punto gli anticorpi possono inibire la migrazione degli spermatozoi nel muco.

CAPILLARY TUBE TEST

(*Kremer, 1965; 1980; Pandya, 1986*).

È stato originariamente descritto da Kremer nel 1965.

Il test valuta la capacità degli spermatozoi di penetrare in una colonna di muco cervicale posta in un capillare di vetro, piatto a sezione rettangolare, e lungo 5 cm con una sezione trasversale di 3 mm x 0,3 mm (Fig. 7).

Il muco cervicale va aspirato nel capillare, evitando la formazione di bolle d'aria. Il riempimento del capillare si ottiene usando un collettore (tubicino) applicato ad una siringa da insulina sprovvista di ago. Completato il riempimento, l'estremità aperta del capillare viene inserita per 0,5 cm nel nido, contenente sperma, della apposita camera; l'altra estremità viene chiusa mediante un apposito sigillante (p.e. "pongo"). La camera dispone di tre nidi per tre capillari, e consente di testare lo sperma ed il muco in esame versus sperma di donatore o muco di donatrice. La camera così allestita viene incubata a 37°C e trascorse 2 ore si valutano al microscopio a contrasto di

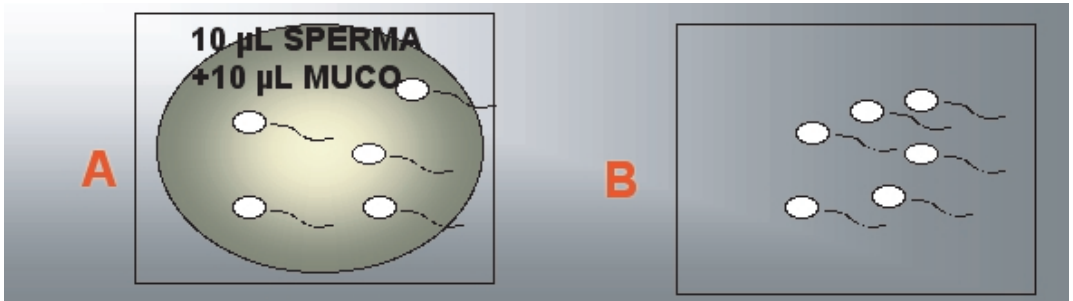


Fig. 6: SMC TEST: Il test permette di valutare la percentuale di spermatozoi che esibiscono movimenti "shaking".

fase (a 10x e 20x): la "distanza di migrazione", la "densità di penetrazione" e la "riduzione di migrazione" (cioè il decremento della densità di penetrazione, osservata a 1,0 cm e a 4,5 cm). Al numero di spermatozoi (densità di

penetrazione) osservato alla distanza di 1,0 cm e a quella di 4,5 cm, si attribuisce un punteggio da 0 a 7 (v. Tabella 1). Per ottenere il valore della "riduzione di migrazione" si sottrae al punteggio ottenuto alla distanza di 4,5 cm

Tabella 1. Punteggio relativo alla densità di penetrazione.

DENSITÀ= n° SPZOI	PUNTEGGIO
0	1
0-5	2
6-10	3
11-20	4
21-50	5
51-100	6
>100	7

Tabella 2. Classificazione sec. WHO 1999

Distanza di migrazione	1	< 3	4,5
Densità di penetrazione	0	<10	>50
Riduzione di migrazione	-	> 3	< 3
Durata della motilità (ore)	-	2	>24
Giudizio	Negativo	Scarso	Buono

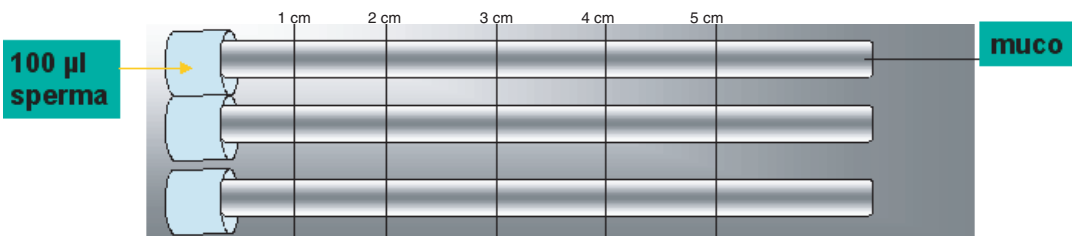


Fig. 7: Capillary Tube Test: la camera dispone di tre nidi per tre capillari di vetro, il test valuta la capacità degli spermatozoi di penetrare in una colonna di muco posta nel capillare.

quello corrispondente alla distanza di 1 cm.

Il giudizio è BUONO quando gli spermatozoi raggiungono dopo due ore la massima distanza di migrazione (4,5 cm), in corrispondenza della quale si osserva un numero di spermatozoi > 50 con buona motilità (v. Tabella 2). È stato segnalato da alcuni autori (*Marcus et al., 1994*) che il test di Kremer possiede un significativo valore prognostico per la fertilità in vivo, di gran lunga superiore a quello ottenuto dal Post Coital test. Inoltre il riscontro di alterazioni della interazione muco-sperma (preditti-

vo di fallimento della Fertilizzazione in vitro) è indicativo di un generale danneggiamento della funzione spermatica (*Marcus, 1996*).

Per i test di interazione muco-sperma in vitro, in alternativa al muco cervicale, sono stati creati e utilizzati gel di sintesi: ialuronato (*Wikland et al., 1987; Mortimer et al., 1990*), Poliaccrilamide (*Lorton et al., 1981*) e Muco Bovino. Tuttavia nessuno di questi riesce a replicare tutte le caratteristiche della interazione tra spermatozoi umani e muco cervicale umano.

BIBLIOGRAFIA

■ **Collins JA, SO Y, Wilson EH, Wrixon W, Casper RF.**

The postcoital test as a predictor of pregnancy among 355 infertile couples.
Fertil Steril 41: 703, 1984.

■ **Eggert-Kruse W, Leinhos G, Gerhard I, Tilgen W, Runnebaum B.**

Prognostic value of in vitro sperm-cervical mucus penetration test in infertility investigation.
Fertil Steril 51: 1032, 1989.

■ **Griffith CS & Grimes DA.**

The validity of the post-coital test.
Am J Obstet Gynaecol 162: 615, 1990.

■ **Hull MGR, Savage PE, Bromham DR.**

Prognostic value of the postcoital test: prospective study based on time-specific conception rates.
Br J Obstet Gynaecol 89: 299, 1981.

■ **Hull MG.**

The prognostic power of the postcoital for natural conception depends on duration of infertility.
Hum Reprod 15(9): 1953, 2000.

■ **Huhner J.**

Sterility in the male and female and its treatment.
New York, Rebman, 1913.

■ **Insler V, Melmed H, Eichenbrenner I, Serr DM, Lunnenfeld B.**

The cervical score. A simple semiquantitative method for monitoring of the menstrual cycle.
Int J Gynaecol Obstet 10: 223, 1972.

■ **Kremer J.**

A simple penetration test
Int J Androl 10: 209, 1965.

■ **Kroeks NI & Kremer J.**

The role of cervical factors in infertility
In: *The Infertile Couple*.
RJ Pepperel, B Hudson, C Wood (eds), Edinburgh, Churchill Livingstone p 112, 1980.

■ **Lorton SP, Kummerfeld HL, Foote RH.**

Polyacrilamide as substitute for cervical mucus in sperm migration test.
Fertil Steril 35: 222, 1981.

■ **Marcus SF & Edwards RG.**

High rates of pregnancy after long-term down-regulation of women with severe endometriosis.
Am J Obstet Gynecol 48: 81, 1994.

■ **Marcus SF & Brindsen PR.**

In vitro fertilization and embryo transfer in women aged 40 years and more.
Hum Reprod Update 2: 459, 1996.

■ **Moghissi KS.**

Post coital test: physiological basis, technique and interpretation.

Fertil Steril 27: 117, 1976.

■ **Moghissi KS.**

Evaluation and management of cervical hostility.

Semin Reprod Endocrinol 4: 343, 1986.

■ **Mortimer D, Mortimer ST, Shu MA.**

A simplified approach to sperm-cervical mucus interaction testing

Hum Reprod 5: 835, 1990.

■ **Oei SG, Helmerhorst FM, Keirse MJN.**

When is the post-coital test normal? A critical appraisal.

Hum Reprod 10: 1711, 1989.

■ **Pandya IJ, Mortimer D, Sawers RS.**

A standardized approach for evaluating the pene-

tration of human spermatozoa into cervical mucus in vitro.

Fertil Steril 45: 357, 1986.

■ **Sims JM.**

Uterine Surgery.

New York, Wn Woods Co., 1986.

■ **World Health Organization**

WHO Laboratory manual for the examination of human semen and sperm cervical mucus interaction.

3rd ed. Cambridge, Cambridge University Press, 1992.

■ **World Health Organization**

WHO Laboratory manual for the examination of human semen and sperm cervical mucus interaction.

4rd ed. Cambridge, Cambridge University Press, 1999.

