

l'infertilità
maschile
oggi

male
infertility
today

editor: Giovanni M. Colpi

3/2002



*In memory of my friend
Alpay Kelâmi (1936-1992)
Master of Andrology*

INDICE

AGGIORNAMENTI SULL'ESAME DEL LIQUIDO SEMINALE

Rocio Nuñez Calonge & Pedro Caballero Peregrin

5

EPIDIDYMITIS AND ORCHITIS: ANDROLOGICAL IMPLICATIONS

Gerhard Haidl & Wolfgang Weidner

43

SEASONAL CHANGES IN MEAN VALUES OF SEMINAL PARAMETERS AND HORMONE LEVELS IN ANDROLOGICAL PATIENTS

Amrey Krause & Walter Krause

55

LO SCREENING GENETICO NELLE COPPIE INFERTILI

Aldo E. Calogero

69

AGGIORNAMENTI SULL'ESAME DEL LIQUIDO SEMINALE

Rocio Núñez Calonge & Pedro Caballero Peregrin

Clinica Tambre, Madrid

INDICE

I INTRODUZIONE

II ELEMENTI DI VALUTAZIONE NELL'ESAME DEL LIQUIDO SEMINALE

III COMPONENTI DELL' EJACULATO

IV CONDIZIONI INIZIALI PER LO STUDIO

1. ESAME MACROSCOPICO

- 1.1 Liquefazione
- 1.2 Aspetto
- 1.3 Viscosità
- 1.4 Volume
- 1.5 ph

2. ESAME MICROSCOPICO

- 2.1 Preparazione routinaria del campione seminale
- 2.2 Conta degli spermatozoi
- 2.3 Altri elementi cellulari
- 2.4 Agglutinazione
- 2.5 Motilità spermatozoaria
- 2.6 Vitalità spermatica
- 2.7 Morfologia spermatica
- 2.8 Altre cellule dell'ejaculato

3. TEST OPZIONALI

- 3.1 Biochimica seminale
- 3.2 Coltura del seme
- 3.3 Microscopia elettronica
- 3.4 Test di permeabilità di membrana (HOS TEST)
- 3.5 Test immunologici

V INTERPRETAZIONE DELLO SPERMIOGRAMMA

VI TESTS FUNZIONALI: DETERMINAZIONE DELLA CAPACITÀ FECONDANTE DELLO SPERMATOZOO

1. INTRODUZIONE

2. STUDIO FUNZIONALE DELLA MOTILITÀ DELLO SPERMATOZOO

2.1 Aspetti fisiologici

2.2 Motilità qualitativa

2.2.1 Studio computerizzato della motilità

2.2.2 Motilità dello spermatozoo nel terreno di cultura: capacitazione "in vitro"

2.2.3 Motilità spermatica nella riproduzione assistita

2.2.4 Alterazione della motilità dello spermatozoo

3. REAZIONE ACROSOMIALE

3.1 Reazione acrosomiale nella riproduzione assistita

4. MATURAZIONE NUCLEARE

5. INTEGRITÀ DELLA MEMBRANA PLASMATICA

6. MORFOLOGIA DELLO SPERMATOZOO

7. SOPRAVVIVENZA DELLO SPERMATOZOO

8. TEST BIOCHIMICI

8.1 Prodotti di reazione dell'ossigeno

8.2 Altri marcatori biochimici

VII TEST FUNZIONALI E ATTUALITÀ: RELAZIONE CON LA MICROINIEZIONE SPERMATICA

1. NUOVI CONCETTI DI FUNZIONE SPERMATICA

2. CONCETTI RIMASTI INVARIATI

VIII CONCLUSIONI

I - INTRODUZIONE

L'indagine biologica della fertilità maschile ebbe inizio più di 300 anni fa (1677), con la scoperta di Antonio Van Leeuwenhoek che, studiando il liquido seminale di un uomo affetto da gonorrea, osservò “una moltitudine di animaletti vivi che progredivano con movimento serpentiforme della coda, similmente al movimento natatorio di una anguilla”.

La scoperta di Leeuwenhoek comportò una divisione delle esistenti teorie preformiste in due gruppi: quello degli ovisti e quello degli spermatisti, a seconda che si considerasse più importante l'uovo o gli spermatozoi.

Quest'ultimo orientamento, predominante, rappresentava una svolta rispetto alle teorie di Esquilo. Non per niente, l'attuale termine “spermatozoo” deriva dal greco “Esperien” che significa seminare, a conferma della rilevanza di tali teorie.

Ciononostante le conoscenze e gli studi sul liquido seminale umano si sono sviluppate a partire dal 1779, anno in cui Spallanzani ha dimostrato la necessità del liquido seminale per la fecondazione, mentre nel 1856 Pringsteim ha osservato la penetrazione dello spermatozoo nel gamete femminile.

Infine l'applicazione nella metà del secolo delle metodologie epidemiologiche, associata all'espansione in campo biologico della recente tecnologia, ha permesso un sostan-

ziale progresso nella esplorazione della fertilità maschile, tanto che lo studio strutturale e funzionale dello spermatozoo è diventato una vera e propria disciplina: la seminologia.

Nel 1929 Macomber e Sanders (1) hanno verificato l'utilità della concentrazione degli spermatozoi nella differenziazione degli uomini infertili da quelli fertili. Da allora i ricercatori hanno tentato di stabilire dei valori di riferimento sui campioni seminali per distinguere i fertili dagli infertili. Sfortunatamente, l'identificazione di valori ottimali rimane ancor oggi motivo di discussione. Per esempio, nel 1951 MacLeod e Gold (2) proposero il valore di 20 milioni di spermatozoi per millilitro di eiaculato come limite per separare il paziente fertile dall'infertile, mentre nel 1977 Smith e Steinberger proposero un valore di 10 milioni di spermatozoi. Oggi manteniamo il primo valore segnalato come limite tra normalità e bassa concentrazione spermatozoaria, ma sappiamo che per valori inferiori a 20 milioni di spermatozoi sono possibili gravidanze senza grandi difficoltà.

Per una valutazione sulle capacità riproduttive nella diagnostica della coppia infertile, l'analisi del liquido seminale è un test basilare. Lo studio basale dell'eiaculato consiste nella valutazione del numero degli spermatozoi, della motilità e della morfologia che sono parametri fondamentali per stabilire se la causa dell'infertilità è attribuibile a fattori maschili. Questa indagine di base, per essere esaustiva, deve essere eseguita in maniera accurata da personale specializzato in grado di interpretare esattamente tutti i dati.

Traduzione a cura di Alessandro Pizzocaro e Patrizia Sagone. Revisione a cura di Gianfranco Contalbi, Federica Perazzoli e Paolo Martini

In questo capitolo verranno considerati dapprima i parametri fondamentali che devono essere valutati nello studio basale del liquido seminale, quindi la loro interpretazione ed, infine, si esamineranno i test di funzionalità spermatica e la loro attuale applicazione.

II - ELEMENTI DI VALUTAZIONE NELL'ESAME DEL LIQUIDO SEMINALE

Per lo studio del liquido seminale si possono utilizzare diverse metodologie tra cui quelle citologiche, biochimiche o immunologiche.

Ciascun test si basa sull'analisi di differenti parametri implicati nella potenziale capacità fertilizzante del maschio. Per esempio, la misurazione del volume seminale valuta la capacità delle ghiandole sessuali accessorie di produrre una sufficiente quantità di liquido seminale, mentre la conta spermatica quantifica la capacità del testicolo di produrre spermatozoi. Ciononostante il riscontro di valori normali in un singolo test non implica necessariamente una fertilità regolare, ma esclude che l'infertilità sia correlabile a quel fattore. Allo stesso modo è possibile che in pazienti con tutti i parametri seminali apparentemente regolari siano presenti disfunzioni non evidenziate con i test eseguiti.

Pertanto l'obiettivo dell'analisi seminale convenzionale è da una parte quello di ottenere una risposta rapida sulle possibilità maschili di procreare, dall'altra di offrire una diagnosi eziologica accurata per inquadrare l'infertilità nell'ambito di una patologia uroandrogica ben definita, e quindi per instaurare l'approccio terapeutico più idoneo nel singolo caso.

Per l'applicazione di qualsiasi test di laboratorio, i ricercatori ed i clinici devono stabilire i

criteri che permettano la distinzione tra patologico e normalità. Questi criteri sono conosciuti come test di **sensibilità** e di **specificità**.

Nel contesto dell'infertilità maschile, la **sensibilità** è espressa dalla percentuale di pazienti identificati come infertili, in una popolazione di uomini che si sa essere infertile.

La **specificità** è espressa dalla percentuale di maschi identificati come fertili su una popolazione di maschi che si conosce essere fertile. Sempre con riferimento all'infertilità, un test sensibile al 100% identificherà correttamente tutti i pazienti infertili, sebbene alcuni maschi fertili possano essere etichettati impropriamente come infertili. Al contrario, un test specifico al 100% identificherà correttamente tutti i maschi fertili ma alcuni infertili potrebbero non essere identificati.

Idealmente un test dovrebbe essere sensibile al 100% e specifico al 100%, ma questo può accadere solo quando i test si effettuano su una popolazione di maschi fertili non sovrapposta a quella di infertili. Ovviamente nella pratica ciò accade raramente. Per questo si generano vari problemi nel tentativo di stabilire la sensibilità e la specificità dei test nell'esame del liquido seminale:

1° - Spesso l'infertilità non può essere attribuita completamente ad uno dei due partner. Il potenziale di fertilità di ciascuno contribuisce alla fertilità della coppia.

2° - Il potenziale di fertilità dell'uomo e della donna non rimane costante ma subisce delle oscillazioni temporali.

3° - L'infertilità maschile è una problematica complessa, in quanto l'esito della fecondazione dipende da un gran numero di fattori fisiologici. L'inadeguatezza di un unico fattore, come ad esempio la spermatogenesi o la penetrazione dello spermatozoo nell'ovocita, non implica una alterazione degli altri fattori, ma è sufficiente per indurre infertilità.

Inoltre, è di fondamentale importanza considerare la standardizzazione dei criteri. Ogni laboratorio utilizza una propria metodologia, ma è necessario attenersi ai valori di riferimento per poter confermare i risultati.

III - COMPONENTI DELL'EIACULATO

L'eiaculato è la risultante di componenti distinte, provenienti dal testicolo, dalle vie seminali e dalle ghiandole annesse. Funzionalmente le diverse componenti costituiscono un insieme il cui significato biologico è quello di rendere lo spermatozoo capace di fecondazione.

L'eiaculato normalmente viene emesso in quattro frazioni differenti:

1 - La frazione pre-eiaculatoria, prodotta dalle ghiandole di Cowper e Littrè, è di consistenza mucosa e non presenta spermatozoi.

2 - La frazione iniziale, completamente fluida, è di produzione prostatica, anch'essa non presenta spermatozoi. Rappresenta il 13-33% del volume dell'eiaculato, possiede un pH acido e si caratterizza per l'elevata concentrazione di fosfatasi acida e di acido citrico.

3 - La frazione principale, in parte liquida ed in parte gelatinosa, è la più ricca di spermatozoi e proviene dall'epididimo, dal deferente e dall'ampolla deferenziale.

4 - La frazione terminale, gelatinosa, è la più abbondante, rappresentando il 50-80% dell'eiaculato. È prodotta dalle vescicole seminali, perciò è ricca in fruttosio. Ha reazione alcalina e vi sono spermatozoi sebbene prevalentemente immobili.

IV - CONDIZIONI INIZIALI PER LO STUDIO

Il campione seminale deve essere raccolto, preferibilmente per masturbazione, dopo un periodo di astinenza sessuale di minimo

48 ore e massimo 8 giorni*. Il coito interrotto non è una modalità di raccolta idonea in quanto si può verificare la perdita di una parte dell'eiaculato e può comportare una contaminazione del liquido seminale con secrezioni vaginali che, in funzione del pH acido, possono interferire irreversibilmente sulla motilità degli spermatozoi. Anche l'uso del profilattico (preservativo) convenzionale non è consigliabile per la usuale presenza di sostanze spermicide che possono alterare la qualità del liquido seminale. Esistono in commercio a tal uopo preservativi privi di sostanze spermicide, da utilizzare in situazioni peculiari (credenze religiose, etc.) che rappresentino un impedimento alla raccolta mediante masturbazione.

** Nota dell'Editor:* Presso il nostro Centro usiamo consigliare al paziente, subito dopo la raccolta dell'eiaculato mediante masturbazione, di attendere il tempo necessario affinché il pene torni pressoché completamente flaccido e di eseguire allora una spremitura digitale dell'uretra dal perineo al meato favorendo la fuoriuscita dell'ultima frazione del liquido seminale che va completare il campione per esame appena raccolto. L'uretra maschile infatti, in erezione, contiene in media circa 1 ml, e per campioni di eiaculato non abbondanti questa aliquota altrimenti persa può modificare sensibilmente soprattutto il dato della concentrazione nemaspermica per ml. Il rispetto sistematico di questa norma di raccolta, accompagnata da un periodo prefissato di astinenza preliminare di 4 o 5 giorni (salvo che in casi particolari identificati dallo specialista) ha fortemente ridotto nella nostra esperienza le ben note importanti fluttuazioni di taluni parametri seminali da un campione dell'altro, rendendo pertanto più facile il confronto qualitativo dei campioni seminali prima e dopo provvedimenti terapeutici.

È importante evitare temperature estreme (meno di 20°C e più di 40°C) per il trasporto del campione in laboratorio.

Alla consegna del campione, è necessario annotare il nome del paziente, il periodo

di astinenza, la data, l'ora di raccolta e l'intervallo di tempo tra l'eiaculazione e l'inizio della valutazione, che non deve superare i 45 minuti. Dato che, come abbiamo visto precedentemente, la parte iniziale (la frazione iniziale e la frazione principale) costituisce la componente più ricca in spermatozoi, è di fondamentale importanza ottenere dal paziente informazioni relative alla eventuale perdita di qualche frazione dell'eiaculato poiché può causare alterazioni del volume e della concentrazione spermatica.

Per una valutazione iniziale è raccomandabile analizzare due differenti campioni seminali. L'intervallo di raccolta tra i due campioni dipende da circostanze diverse da caso a caso, ma deve essere compreso tra 7 e 90 giorni. Se i risultati di queste due analisi differiscono considerevolmente, bisognerà esaminare necessariamente altri campioni visto che la produzione di liquido seminale frequentemente presenta una variabilità interindividuale.

1. ESAME MACROSCOPICO

1.1 Liquefazione

Subito dopo l'eiaculazione, il liquido seminale coagula e successivamente liquefa entro 5-40 minuti a temperatura ambiente. Bisognerà annotare il tempo necessario per la liquefazione completa, qualora non si verifichi in questo intervallo di tempo.

Alcuni campioni seminali, anche normali, contengono corpi gelatinosi dal significato ancora ignoto che non vanno mai incontro a liquefazione completa e la loro presenza ostacola la valutazione della concentrazione.

Occasionalmente i campioni potrebbero non liquefare a seguito di una terapia medica somministrata al paziente che può alterare la composizione biochimica del plasma seminale.

L'enzima responsabile della liquefazione è

di origine prostatica, mentre quello della coagulazione è di origine vescicolare. L'assenza di liquefazione o di coagulazione può dipendere da una alterazione di queste due ghiandole.

Prima di effettuare una qualsiasi valutazione l'eiaculato deve essere accuratamente miscelato in quanto i residui cellulari tendono a depositarsi sul fondo della provetta.

1.2 Aspetto

Il campione seminale deve essere esaminato immediatamente dopo la liquefazione o comunque entro un'ora dall'eiaculazione, a temperatura ambiente. Un eiaculato normale presenta un aspetto omogeneo, grigio-opalescente. Il colore può modificarsi da quasi trasparente, se non contiene spermatozoi, a giallastro se sono presenti molti leucociti o a causa di alcune terapie mediche, fino al rosso-bruno in caso di emospermia (presenza di emazie indotta da sanguinamento in qualche punto del tratto genitale).

1.3 Viscosità

Dopo la liquefazione il liquido seminale si presenta viscoso. La iperviscosità può essere responsabile di alterazioni della motilità spermatozoaria.

1.4 Volume

La ipospermia e la iperspermia sono termini che qualificano rispettivamente volumi seminali inferiori a 1,5 ml e superiori a 5,5 ml. Si definisce aspermia la percezione della sensazione orgasmica senza emissione di liquido seminale.

Il volume del liquido seminale varia da 2 a 5,5 ml. L'astinenza sessuale prolungata può determinare un aumento del volume semina-

le. La componente prostatica e quella epididimaria generalmente non supera 1 ml. Di conseguenza, il volume seminale è fondamentalmente funzione dell'attività secretoria delle vescicole seminali. I processi infiammatori soprattutto a carico delle vescicole seminali e in misura minore della prostata possono determinare quadri di iperspermia con conseguente diluizione della componente cellulare. La riduzione del volume seminale può essere la conseguenza di un deficit androgenico, di una ostruzione prossimale dei dotti eiaculatori o, più semplicemente, può dipendere da un'eiaculazione incompleta o dalla perdita di una parte dell'eiaculato durante la raccolta.

1.5 pH

Il pH deve essere misurato entro un'ora dall'eiaculazione; i valori normali sono compresi tra 7,2 e 8,0. Un valore di pH inferiore a 7,0 con assenza di coagulazione, ridotto volume ed azoospermia, potrebbe associarsi ad un quadro di agenesia delle vescicole o di ostruzione dei deferenti. Le flogosi croniche talora possono essere responsabili di valori di pH inferiore a 7,0.

Un pH superiore a 8,0 potrebbe suggerire una flogosi acuta delle vescicole seminali oppure potrebbe dipendere da una valutazione ritardata (il plasma seminale infatti libera continuamente anidride carbonica (CO₂) con conseguente incremento dei valori di pH).

2. ESAME MICROSCOPICO

Durante l'osservazione microscopica iniziale si valutano: la concentrazione e la motilità degli spermatozoi, la presenza di zone di spermioagglutinazione, la presenza di componente cellulare non nemaspermica.

Inoltre va segnalata la presenza di cellule immature e di leucociti.

2.1 Preparazione routinaria del campione seminale

Dopo aver omogeneizzato accuratamente il campione seminale, è consigliabile disporre, con l'ausilio di una micropipetta, un volume fisso di liquido seminale su un vetrino portaoggetti pulito. È importante che il volume da esaminare e le dimensioni del vetrino coprioggetto siano sempre le stesse affinché la profondità del campione sia fissa e standard e non alteri i risultati (generalmente si utilizza un volume pari a 10 microlitri e un vetrino coprioggetto di 22 mm X 22 mm).

Il preparato si esamina a fresco al microscopio ottico a 400X e 500X. Il peso del coprioggetto dilata la goccia e per una valutazione ottimale conviene lasciar stabilizzare il preparato approssimativamente per un minuto. Poiché la motilità degli spermatozoi e la velocità sono funzione della temperatura, la loro valutazione deve essere eseguita a 37°C.

Un'ampia variabilità del numero di spermatozoi per campo indica che il campione non si è omogeneizzato (campioni seminali ad alta filanza). In tal caso, il campione va miscelato di nuovo. La mancanza di omogeneizzazione potrebbe dipendere, oltre che dalla viscosità del campione, da una liquefazione incompleta o dalla presenza di agglutinazioni.

2.2 Conta degli spermatozoi

Un campione seminale in cui non si riscontrano spermatozoi si definisce azoospermico. I termini di oligozoospermia, normozoospermia e polizoospermia si riferiscono a campioni di seme che presentano rispettivamente concentrazioni di spermatozoi inferiori alla norma (< 20 milioni di spermatozoi/ml), nella norma (tra 20 e 250 milioni di spermatozoi/ml), e superiori alla norma (> 250 milioni di spermatozoi/ml).

Macomber e Sanders nel 1929 (1) per primi pubblicarono uno studio in cui si realizzava un confronto tra pazienti infertili e pazienti fertili. La concentrazione media nel gruppo dei pazienti fertili era di 100 milioni/ml.

I dati attuali mostrano che negli uomini fertili si riscontra una riduzione del valore medio della concentrazione degli spermatozoi. Nessuno studio pubblicato dopo il 1974 ha mostrato valori della conta media superiori a 100 milioni/ml.

Osservando i valori di conta degli spermatozoi nei pazienti fertili (che avevano concepito nel periodo precedente l'esame seminale), o in pazienti con almeno due figli in attesa di sottoporsi a vasectomia, oppure in donatori di liquido seminale, si riscontrano concentrazioni di spermatozoi talvolta anche inferiore a 0,5 milioni/ml (3) (Homonnai, 1980).

Altri studi epidemiologici (4) (Carlsen, 1992) riportano decrementi della concentrazione spermatozoaria di circa il 40% negli ultimi 50 anni.

Quando ci si riferisce al parametro "conta spermatica" si deve tenere in considerazione la fisiologica variabilità di concentrazione degli spermatozoi ed i fattori esogeni che possono ridurla temporaneamente.

Qualsiasi parametro di valutazione del liquido seminale è da riferirsi esclusivamente al momento in cui si esegue l'analisi stessa. Le prognosi basate su queste analisi possiedono un elevato valore statistico e sono significative per stabilire indici di probabilità. Tuttavia nessun parametro ha valore definitivo.

La concentrazione degli spermatozoi può essere determinata utilizzando un emocitometro (camera di Bürker, camera di Neubauer), una camera di Makler o mediante metodi elettronici (autoanalizzatori, apparec-

chi CASA). Il metodo più appropriato è l'emocitometro. Prima della conta degli spermatozoi il campione deve risultare completamente liquefatto, mescolato accuratamente e diluito in un liquido immobilizzante. Il grado di diluizione viene scelto in rapporto alla concentrazione spermatozoaria, e può essere per esempio di 1:20 se la concentrazione è elevata, di 1:10 per concentrazioni più basse. Secondo il manuale dell'OMS del 1999, per concentrazioni molto basse non si eseguono diluizioni (5).

2.3 Altri elementi cellulari

L'eiaculato contiene altri elementi cellulari oltre che spermatozoi (complessivamente denominate cellule rotonde) che sono: cellule epiteliali provenienti dal tratto riproduttivo, cellule spermatogenetiche e leucociti. La concentrazione di questi elementi può essere valutata utilizzando un emocitometro.

I leucociti si riscontrano in quasi tutti gli eiaculati (6) (Aitken, 1991), e il tipo più comune è il granulocita neutrofilo. L'elevata concentrazione di leucociti, nota come leucospermia, indica la presenza di una infezione del tratto riproduttivo, che può essere trattata con terapia antibiotica. Peraltro la leucospermia può associarsi a riduzione del volume dell'eiaculato, a riduzione della concentrazione e della motilità degli spermatozoi, e ad alterazioni della funzione nemaspermica conseguenti allo stress ossidativo (7) (Aitken, 1990) e/o alla azione citotossica delle citochine (8) (Alvarez, 1992).

Un eiaculato in condizioni normali non deve contenere più di 5 milioni di cellule rotonde per millilitro, mentre il numero dei leucociti non deve superare il milione per millilitro.

La correlazione tra il numero di leucoci-

ti e la presenza di infezioni genitali è controversa. Quando il seme contiene un numero di leucociti elevato, occorre eseguire esami microbiologici di controllo. Tali esami prevedono l'analisi colturale della prima e della seconda minzione, l'esame del fluido prostatico e dell'urina dopo massaggio prostatico (9) (Meares, 1974). Si eseguono inoltre analisi biochimiche del plasma seminale: la funzione secretoria delle ghiandole sessuali accessorie può risultare alterata per una flogosi. Malgrado ciò, l'assenza di leucociti non esclude la possibilità di un'infezione.

Le cellule che non si identificano come leucociti possono essere spermatidi, spermatoцитi e spermatogoni. Solamente gli spermatozoi (cellule germinali morfologicamente mature, dotate di flagello) sono considerati nella conta spermatica: la valutazione della concentrazione della componente cellulare non nemaspermica viene espressa in percentuale relativamente al numero degli spermatozoi.

Nell'eiaculato si può riscontrare la presenza di cristalli. Questi sono costituiti da fosfato di spermina e sono di origine prostatica. Il loro riscontro è normale e la loro concentrazione può aumentare nel tempo in seguito a processi ossidativi che avvengono a temperatura ambiente (Figura 1).

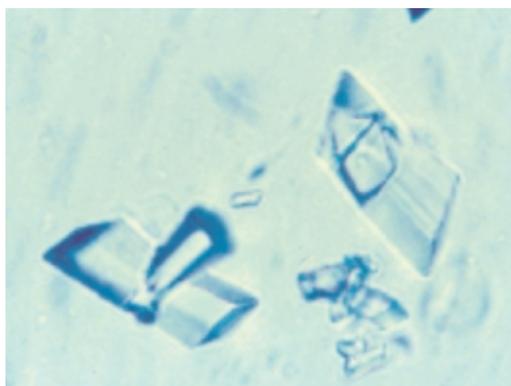


Fig. 1 Formazione di cristalli in un campione di seme (40X)

2.4 Agglutinazione

Per agglutinazione si intende l'adesione testa-testa, coda-coda, segmento intermedio-segmento intermedio o forme miste tra spermatozoi mobili; l'adesione di qualunque spermatozoo mobile ad uno immobile o ad un'altra cellula o componente dell'eiaculato non è una agglutinazione sebbene anch'essa vada segnalata.

Senza il supporto di test immunologici specifici la sola presenza di agglutinazione suggerisce ma non identifica certamente una causa immunologica di infertilità.

2.5 Motilità spermatozoaria

La motilità dello spermatozoo costituisce uno dei parametri qualitativi fondamentali dell'esame del liquido seminale. Dipende sia da fattori intrinseci allo spermatozoo (struttura del flagello, attività enzimatica della dineina), sia da fattori estrinseci (composizione biochimica del mezzo extracellulare in cui si trova lo spermatozoo: plasma seminale, muco cervicale, etc.).

Con il termine di "motilità" si indicano fondamentalmente due concetti differenti: "la motilità lineare progressiva" e la percentuale generale di spermatozoi dotati di movimento. La valutazione della motilità viene espressa come percentuale totale di spermatozoi mobili (aspetto quantitativo) e come percentuale delle diverse categorie cinetiche (aspetto qualitativo inteso come tipo di velocità e direzione degli spermatozoi mobili).

La valutazione della motilità spermatica attraverso l'osservazione diretta con il microscopio ottico necessita di un presupposto basilare per la corretta realizzazione dell'esame: l'obiettività. È evidente che calcolare la percentuale della motilità degli spermatozoi in una preparazione microscopica non è facile.

Gli spermatozoi attraversano il campo ottico con differenti tipi di motilità. La soggettività dell'osservazione da parte dell'operatore potrebbe condizionare il risultato dell'analisi.

Negli ultimi anni sono state applicate delle nuove tecniche per valutare la motilità spermatica in modo oggettivo, considerando la tipologia del movimento. Nonostante il limite soggettivo della valutazione e la necessità di un osservatore esperto e abile, l'osservazione microscopica diretta continua ad essere il metodo più utilizzato. Infatti, risulta sensibile e di basso costo economico: è sufficiente un microscopio ottico. Per effettuare la valutazione si pone una goccia di liquido seminale dopo liquefazione tra un vetrino coprioggetto ed un vetrino portaoggetto asciutto e sgrassato; con un obiettivo 400X si osserva il tipo di motilità di ciascuno spermatozoo classificandolo in gradi da tre ad uno mediante crocette (+++, ++, +) o con le categorie dalla "a" alla "d". Quest'ultima classificazione è quella raccomandata dall'OMS. La camera di Makler viene utilizzata anche per l'osservazione della motilità spermatozoaria: una goccia di seme post-liquefazione si colloca nella camera e si esegue l'osservazione microscopica con obiettivo 200X. La griglia della camera contemporaneamente suddivide il campo ottico e facilita la classificazione degli spermatozoi mobili in categorie.

- Motilità attiva di grado 3 (+++) o categoria a: Il movimento d'avanzamento dello spermatozoo è rapido, rettilineo e quantitativamente più importante rispetto allo spostamento laterale della testa.

- Motilità attiva di grado 2 (++) o categoria b: Il movimento d'avanzamento dello spermatozoo è progressivo però quantitativamente inferiore rispetto a quello della motilità progressiva di grado 3 e frequentemente non rettilineo.

- Motilità attiva di grado 1 (+) o categoria c: Il movimento d'avanzamento spermatozoario è minimo o addirittura assente, con un'ampiezza simile allo spostamento laterale della testa e della coda.

- Motilità attiva di grado 0 o categoria d: Spermatozoi immobili.

L'OMS definisce un campione seminale "normale" quando almeno il 50% degli spermatozoi è dotato di motilità progressiva (grado 3 + grado 2) o si rileva un 25% di grado 3.

Si definisce astenozoospermico un campione di seme che presenta una motilità inferiore a quella suindicata.

2.6 Vitalità spermatica

La vitalità spermatica esprime la percentuale di spermatozoi vivi.

Se la percentuale degli spermatozoi immobili è superiore al 50%, la percentuale di spermatozoi vivi deve essere determinata utilizzando tecniche di colorazione sopravvitali, basate sul principio che le cellule morte, con membrana danneggiata, hanno la capacità di lasciar passare alcuni coloranti.

Vengono contati almeno 100 spermatozoi differenziando quelli vitali (privi di colore) da quelli non vitali (colorati). In tal modo sarà possibile differenziare gli spermatozoi immobili vitali da quelli immobili non vitali. Ovviamente la percentuale degli spermatozoi non vitali non dovrà superare quella degli immobili. La presenza di un elevato numero di elementi immobili vitali può essere indicativa di difetti strutturali del flagello.

Le colorazioni più comunemente utilizzate sono quelle con eosina-negrosina, che colorano di rosso gli spermatozoi non vitali, e per la quale si utilizza il microscopio ottico. Si definisce necrozoospermico un campione con una percentuale di cellule morte maggiori del 50%.

Ultimamente questa tecnica sta venendo rimpiazzata dal bromuro di etidio e l'arancio di acridina; quest'ultima colorazione, sebbene richieda un microscopio a fluorescenza per la valutazione, risulta più affidabile e precisa perchè determina la percentuale di spermatozoi morti in rapporto al grado di denaturazione del DNA nucleare. Gli spermatozoi non vitali appariranno colorati di arancio brillante, mentre quelli vivi appariranno di colore verde. Con questa tecnica si considera normale un eiaculato che presenti un numero di spermatozoi vitali maggiore del 75% (Figura 2).

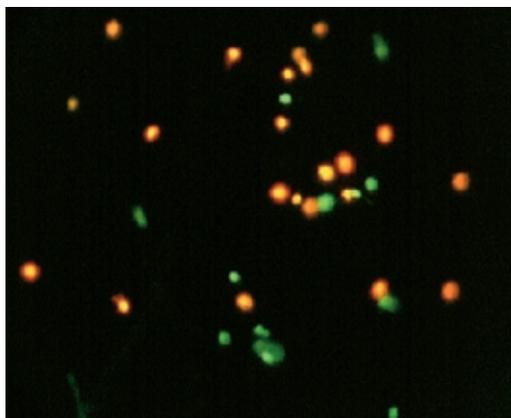


Fig. 2. Spermatozoi colorati con arancio di acridina: spermatozoi non vitali di colore arancio, vitali di colore verde.

I nuclei degli spermatozoi immaturi possono essere evidenziati attraverso differenti metodi. La colorazione col blu di anilina è una delle più comuni (10) (Tarquem, 1983). Poiché le teste degli spermatozoi immaturi contengono istoni ricchi di lisina, il blu di anilina, un colorante acido, le colora con una colorazione blu intensa. Si pensa che la persistenza di proteine nucleari ricche in lisina potrebbe essere implicata in difetti di condensazione nucleare (11) (Dadoune, 1988). In un recente lavoro del gruppo di Hamma-deh (12), si è dimostrato che la condensazione della cromatina visualizzabile con la colorazione al blu di anilina, in associazione alla morfologia, costituisce un valido elemento

predittivo della capacità fertilizzante in vitro.

La colorazione vitale con arancio di acridina è inoltre utilizzata per differenziare gli spermatozoi con cromatina nucleare normale da quella anomala (13) (Tejada, 1987). L'arancio di acridina mostra una fluorescenza verde quando si lega ad una doppia elica normale del DNA (acido desossiribonucleico), arancio quando si lega a una catena singola di DNA denaturato. Esiste una buona correlazione tra questo test e quello al blu di anilina.

2.7 Morfologia spermatica

È necessario applicare criteri il più possibile ristretti quando si valuta la morfologia degli spermatozoi. In osservazioni realizzate nel processo di fertilizzazione in vitro (IVF), la percentuale di spermatozoi morfologicamente normali è una delle variabili che meglio si correla con l'esito della fecondazione degli oociti. Si definiscono "criteri di Kruger" e si considera normale nella IVF un campione con una percentuale di spermatozoi normali maggiore del 14%. Casi con percentuali inferiori al 14% indicano un deterioramento progressivo della morfologia e della funzionalità spermatozoaria. Nel gruppo delle forme anomale sono stati individuati due sottogruppi: forme a prognosi buona (gruppo G) per pazienti con un 5-14% di cellule normali, e forme a cattiva prognosi (gruppo P) con valori uguali o inferiori al 4% e che mostrano risultati più deludenti nelle IVF (14) (Kruger, 1988).

La testa di uno spermatozoo normale deve presentare una forma ovale. La lunghezza è compresa tra i 4 e 5,5 μm e la larghezza tra i 2,5 e i 3,5 μm . La stessa deve possedere una regione acrosomiale ben definita che occupi un'area tra il 40 e il 70% della testa. Non devono evidenziarsi difetti del collo, del segmento intermedio o del flagello. Questo schema classificativo considera come anomali gli spermatozoi borderline (Manuale OMS, 1999) (5).

Poiché la valutazione morfologica raccomandata prende in considerazione le regioni funzionali degli spermatozoi, è necessario fare una distinzione tra variazioni di dimensione o di forma della testa oppure tra i differenti difetti del segmento o del flagello. Comunque, se nella maggior parte delle cellule si rileva un difetto in una regione definita dello spermatozoo, lo si dovrebbe riportare nella risposta.

Si possono considerare le seguenti categorie malformative:

Forma e/o dimensioni della testa: grande, piccola, allargata, piriforme, amorfa, vacuolizzata, a punta, doppie teste o qualsiasi combinazione di queste.

Difetti del collo o del tratto intermedio: includono l'assenza del flagello (denominata testa "persa" o "libera"), collo angolato, ingrossato o qualsiasi combinazione di queste.

Difetti del flagello: includono flagelli corti, multipli, mozzi, angolati, regolari e arrotondati (Fig. 3).

Droplets citoplasmatici: maggiori di 1/3 della dimensione della testa. Si localizzano generalmente nella regione del tratto intermedio, anche se spermatozoi immaturi possono presentare droplets citoplasmatici in altri siti distanti dal flagello.



Fig. 3 Spermatozoo con anomalia del flagello (flagello doppio). Colorazione di Papanicolaou (40X)

2.8 Altre cellule dell'eiaculato:

a) Spermatoconi: cellule immature di grandi dimensioni nelle quali si visualizzano citoplasma e nucleo compatto con un diametro di 6-7 μm .

b) Spermatoцитi primari: la cellula presenta un nucleo sferico grande di colore violetto scuro in un citoplasma grigio. Il nucleo di solito è omogeneo e talvolta si osservano filamenti di cromatina.

c) Spermatoцитi secondari: la cellula presenta diametro inferiore rispetto allo spermatoцитa primario; il nucleo è sferico, con un diametro approssimativamente di 7 μm .

d) Spermatoidi: cellule con un nucleo sferico di piccole dimensioni. Alcuni spermatoidi possono presentare un citoplasma comune, perciò sono definiti polinucleati; a differenza dei leucociti polinucleati il citoplasma degli spermatoidi non presenta granuli (Fig. 4).

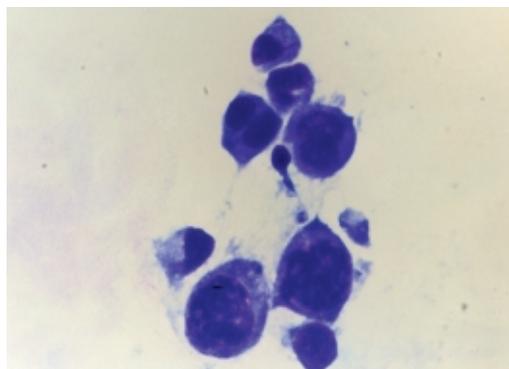


Fig. 4 Spermatoidi e spermatoцитi secondari recuperati dopo biopsia testicolare colorati con Blu di Metilene (400 X).

Per valutare con accuratezza la percentuale di spermatozoi anomali si devono contare un minimo di cento spermatozoi, ma è preferibile valutarne almeno duecento.

È definito teratozoospermico un campione seminale che presenti una percentuale di spermatozoi morfologicamente normale inferiore al 30% oppure, secondo il ristretto cri-

terio di Kruger, una percentuale di spermatozoi con anomalie superiore al 14% (OMS, 1999) (5).

Per analizzare le anomalie morfologiche si utilizzano colorazioni specifiche. Quelle maggiormente utilizzate sono: Papanicolau, Giemsa e Bryan-Leishman.

3. TEST OPZIONALI

3.1 Biochimica seminale

Una bassa funzione secretoria può riflettersi in un valore altrettanto basso del marcatore specifico utilizzato, che è espressione della funzione ghiandolare stessa.

Un quadro flogistico può causare una riduzione considerevole della funzione secretoria, ma la quantità totale dei markers presenti può rimanere nel range di normalità.

a) Funzione secretoria della prostata

Il contenuto di zinco, acido citrico e fosfatasi acida seminale fornisce una valutazione della funzione secretoria della prostata. Esiste una buona correlazione tra le relative concentrazioni e l'alterazione della funzione prostatica. I valori normali sono: $\geq 2,4$ mol di zinco per eiaculato; ≥ 52 mol di acido citrico e ≥ 200 U di fosfatasi acida per eiaculato.

b) Funzione secretoria delle vescicole seminali.

L'indice della funzione secretoria delle vescicole seminali è il fruttosio; il suo valore normale è >13 mol per eiaculato. In casi di azoospermia da assenza congenita dei vasi deferenti, la ridotta concentrazione di fruttosio può indicare un'agenesia associata delle vescicole seminali. La determinazione del fruttosio è peraltro utile nei rari casi di ostruzione dei dotti eiaculatori. Il liquido seminale di pazienti con ostruzione dei dotti eiaculatori o agenesia dei vasi deferenti e delle vescico-

le seminali si caratterizza per il ridotto volume, un basso pH, l'assenza di coagulazione ed infine l'assenza del caratteristico odore.

c) Funzione secretoria dell'epididimo

Da poco tempo si utilizza la L-carnitina come marcatore epididimario. Studi recenti dimostrano una maggiore specificità e sensibilità dell'alfa-glucosidasi rispetto alla L-carnitina e alla glicerilfosforilcolina. Inoltre il suo utilizzo è più semplice ed economico rispetto a quello degli altri markers. Si considerano normali valori >20 UI/ml (15) (Alsina et al., 1997).

3.2 Coltura del seme

La spermicoltura e l'urinocoltura, come già accennato, devono essere effettuati in caso di sospetta infezione delle vie seminali, che spesso si manifesta con un incremento del numero dei leucociti nell'eiaculato. Perché una coltura sia microbiologicamente valida, si deve ottenere una coltura frazionata di urina e del seme, istruendo il paziente affinché raccolga la frazione iniziale ed intermedia dell'urina e successivamente il liquido seminale. La spermicoltura deve includere la ricerca di micoplasmi e clamidie, che, se presenti, sono in grado di alterare la capacità fecondante degli spermatozoi.

3.3 Microscopia elettronica

L'utilizzo della Microscopia Elettronica permette un'analisi dettagliata degli spermatozoi per lo studio di specifiche alterazioni. È il caso, per esempio, della sindrome delle ciglia immobili, in cui la presenza di astenoospermia totale è in rapporto ad un'alterazione delle ciglia che costituiscono il flagello dello spermatozoo, per assenza dei ponti di dineina.

3.4 Test di permeabilità di membrana (HOS TEST)

Si tratta di un test di valutazione dell'integrità funzionale della membrana spermatozoaria. Si basa sulla premessa che quando lo spermatozoo viene incubato in un medium iposmotico, se la membrana è integra, l'acqua entrerà nella cellula per ristabilire l'equilibrio osmotico tra l'ambiente intra- e quello extracellulare. L'ingresso di acqua determinerà il rigonfiamento della cellula e, proporzionalmente all'elasticità della membrana, il conseguente, repentino, aumento del volume cellulare dimostrato dall'arrotolamento del flagello (16) (Jeyendran, 1994).

L'arrotolamento flagellare è perciò indice di integrità della membrana e del mantenimento delle proprietà viscoelastiche dello spermatozoo (Fig. 5)

Lo stato funzionale della membrana plasmatica può essere un buon indice della capacità fecondante dello spermatozoo. Il risultato di questo test viene espresso in termini di percentuale di spermatozoi rigonfi (swollen). Il valore normale è $\geq 60\%$ degli spermatozoi rigonfi. Sono patologici valori $< 50\%$.

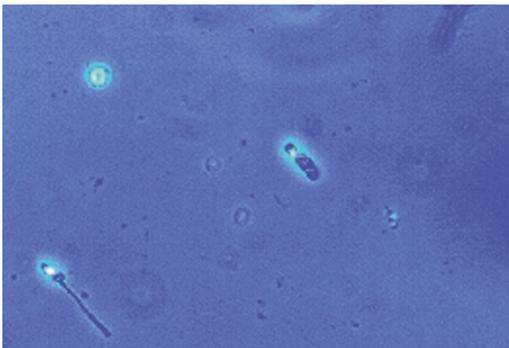


Fig. 5 Spermatozoi col flagello arrotolato a causa dello shock iposmotico (HOS test o test di endoosmosi) (40X)

3.5 Test immunologici

La presenza di anticorpi diretti contro gli spermatozoi (ASA) può provocare una riduzione della fertilità di coppia. Quando gli anti-

corpi immobilizzano più del 10% della popolazione totale degli spermatozoi il loro significato clinico diventa rilevante; ciò si evidenzia con la presenza di agglutinazioni spontanee nel liquido seminale. La presenza di anticorpi nell'eiaculato o nel muco cervicale induce uno "scodinzolamento" degli spermatozoi denominato "shaking". In particolare la presenza di ASA nel muco cervicale può provocare una difficoltà di avanzamento degli spermatozoi con conseguente compromissione dell'interazione tra spermatozoo e ovocita, e quindi riduzione della fertilità.

I fattori che inducono la comparsa di ASA nell'uomo sono gli stessi capaci di causare un'alterazione della barriera emato-testicolare: infezioni, ostruzioni, traumi chimici, fisici e chirurgici (vasectomia).

La localizzazione degli ASA nelle differenti secrezioni è strettamente correlata con la classe di immunoglobulina prodotta. Nel plasma seminale si riscontrano principalmente immunoglobuline di classe A, che hanno un significato clinico rilevante per la fertilità. Ciononostante nella maggior parte dei casi gli anticorpi di classe IgA si associano alla presenza nel siero di IgG. Gli anticorpi della classe IgG sono espressione della stimolazione diretta del sistema immunitario e si riscontrano con elevata frequenza sulla membrana degli spermatozoi, insieme alle IgA.

Le metodiche maggiormente utilizzate per lo studio degli ASA si basano sulla agglutinazione o sulla immobilizzazione nemaspermica anche se si stanno sviluppando altre tecniche come l'immunofluorescenza e gli immunobeads. L'immunobeads ed il MAR test sono quelle attualmente più utilizzate. La tecnica con immunobeads utilizza come antigene gli spermatozoi mobili e permette l'individuazione della classe delle immunoglobuline. Le beads sono particelle di poliacrilammide coniugate con anti-immunoglobuline umane (IgG, IgA e

IgM) estratte dal coniglio. Il test può essere effettuato direttamente sullo spermatozoo (metodo diretto) oppure, in caso di positività, sul siero (metodo indiretto).

Il test si considera positivo quando si osserva una percentuale di agglutinazioni (spermatozoi-beads) superiore al 10%; lo stesso valore è valido per la metodica del MAR test.

V - INTERPRETAZIONE DELLO SPERMIOGRAMMA

L'analisi del liquido seminale ci fornisce dati di base sul numero, la motilità e la morfologia degli spermatozoi, parametri che sono insufficienti, trattandosi di informazioni meramente descrittive.

Come è stato commentato in precedenza, l'esame di base dell'eiaculato ci fornisce infor-

mazioni solo sulla presenza di un determinato fattore che può alterare la qualità del seme. Come detto, il nostro obiettivo è un accertamento che ci indirizzi sull'esistenza di una patologia uro-andrologica, orientandoci verso l'alterazione che potrebbe interferire con la fertilità.

Così, tanto l'esame basale del liquido seminale, che può riflettere una cattiva raccolta dello stesso, come pure l'analisi macroscopica e microscopica possono portare alla interpretazione clinica di:

- Presenza di infezione
- Alterazione della spermatogenesi
- Disfunzione di una componente del tratto riproduttivo: epididimo, vie seminali, ghiandole (prostata, vescicole)
- Presenza di un fattore immunologico (anticorpi antispermatozoo)

TABELLA 1: Fattori riproduttivi che alterano la fertilità maschile

| Fattori | Fisiologia | Anatomia | Esami |
|----------------------|--|---|--|
| Endocrini | Spermatogenesi | Testicolo | Livelli ormonali; Concentrazione e morfologia degli spermatozoi |
| | Maturazione spermatica | Epididimo | Motilità degli spermatozoi |
| | Produzione dello sperma | Prostata e Vescicole | Volume dell'eiaculato, pH, liquefazione |
| Infezioni | Alterazioni dello sperma | Testicolo, Deferenti, Prostata, Epididimo e Vescicole | Esami colturali |
| Vascolari | Erezione, Spermatogenesi | Drenaggio arterioso e venoso | Varicocele |
| Tossici e ambientali | Funzione spermatica | Prevalentemente Testicolo | Concentrazione e motilità spermatica |
| Anatomici | Ostruzione fisica | Epididimo, Dotti | Biochimica seminale |
| Immunologici | Motilità spermatozoaria | Vie seminali | Test immunologici |
| Ambiente femminile | Capacitazione spermatozoaria, Reazione acrosomiale, Fecondazione | Vie genitali femminili | Post-Coital |

Nella tabella 1 sono riassunti i possibili fattori che possono interessare la fertilità maschile, indicando le funzioni fisiologiche, i distretti anatomici interessati, le indagini di laboratorio più idonee per identificarli.

È importante sottolineare che, per una buona interpretazione, l'analisi del liquido seminale deve essere valutata tenendo conto dei tests singolarmente menzionati. Solo l'interrelazione tra questi distinti risultati, unitamente all'esame obiettivo e diagnostico del paziente, potrà così orientare il clinico nella diagnosi e nella prescrizione della terapia più adeguata.

Analizzando quello che abbiamo finora descritto, si possono ottenere due conclusioni fondamentali dall'analisi seminale:

- a) Diagnosi di chiara infertilità (come per esempio azoospermia, oligozoospermia severa, singole alterazioni morfologiche cellulari come l'assenza dell'acrosoma, la testa a punta, etc.) che rende impossibile una spontanea fecondazione.
- b) Diagnosi di ipofertilità di origine maschile e orientamento verso esami complementari o test funzionali.

VI - TEST FUNZIONALI: DETERMINAZIONE DELLA CAPACITÀ FECONDANTE DELLO SPERMATOZOO

1. INTRODUZIONE

L'esame standard del liquido seminale non offre informazioni diagnostiche sulla funzionalità spermatozoaria e risulta di limitato valore prognostico negli studi prospettici (6) (Aitken et al., 1991).

Uno spermioγραμμα patologico, nelle pur differenti alterazioni (oligo-, asteno- e/o teratozoospermia, o anche nei casi di azoo-

spermia), non fornisce informazioni sulla eziologia dell'infertilità. Peraltro esistono gravidanze ottenute da uomini con parametri seminali ai limiti o addirittura più bassi della norma. Si potrebbe pensare, pertanto, che attualmente lo spermioγραμμα abbia uno scarso valore, ma l'Organizzazione Mondiale della Sanità ha pubblicato nel 1999 l'ultimo manuale per la valutazione del liquido seminale e lo studio del muco cervicale: l'analisi di base dell'eiaculato è un test di primo livello per l'inquadramento iniziale dell'infertilità maschile, poiché permette da solo di individuare la chiara infertilità.

Il problema si pone quando ci si trova di fronte ad un eiaculato con tutti i parametri nella norma; evidentemente esso maschera alterazioni funzionali.

Quando si studia un eiaculato è importante conoscere in primo luogo cosa si intende per seme fertile e, in secondo luogo, i metodi per valutare la capacità fecondante dello spermatozoo. Attualmente ciò che possiamo valutare è l'origine della incapacità di fecondazione degli spermatozoi, ma non è possibile farlo in una popolazione di spermatozoi con parametri seminali basali apparentemente normali, salvo che non comproviamo la capacità di fecondare un ovocita "in vitro" o induciamo una gestazione.

Questi limiti hanno favorito lo sviluppo di test aggiuntivi per rendere sempre più completo l'esame seminale di base. L'importanza di questi studi è fondamentale per comprendere la fisiologia dello spermatozoo, tenendo conto della sua finalità ultima: fecondare un ovocita.

Tale fisiologia varia in funzione delle condizioni in cui lo spermatozoo si trova: l'ambiente testicolare, il tratto riproduttivo maschile, il terreno di coltura in "vitro" (quest'ultimo ci permette di simulare, in laboratorio, il comportamento fisiologico dello sper-

matozoo) ed infine le vie genitali femminili sino alle immediate vicinanze dell'ovocita.

La situazione è diventata più complessa con l'avvento delle nuove tecniche di Riproduzione Assistita. Con l'introduzione della ICSI si è pensato che tutti i problemi di infertilità maschile si sarebbero risolti, ed esistono molti studi che dimostrano la scarsa importanza che riveste la motilità o la morfologia dello spermatozoo sui risultati di questa tecnica di fecondazione. Tuttavia con l'approfondimento degli studi sullo spermatozoo si è rivalutata l'importanza del gamete maschile come vettore di materiale genetico. È indubbio, ormai, che la sua anomalia è spesso responsabile del fallimento della fecondazione.

2. STUDIO FUNZIONALE DELLA MOTILITÀ DELLO SPERMATOZOO

2.1 Aspetti fisiologici

Una delle proprietà intrinseche degli spermatozoi è la loro capacità di movimento. Essi sono in grado di esibire movimenti di tipo diverso, che si adattano alle diverse esigenze funzionali. Così gli spermatozoi eiaculati, nel plasma seminale, mostrano una traiettoria lineare che corrisponde a quella presente durante la penetrazione nel muco cervicale. Una volta che lo spermatozoo abbandona il plasma seminale e inizia la sua risalita lungo le vie genitali femminili, le caratteristiche di motilità cambiano. Quando avviene la capacitazione o poco prima, l'ampiezza del movimento del flagello aumenta e lo spermatozoo inizia una traiettoria con uno spostamento laterale della testa più pronunciato. Questa condizione dello spermatozoo corrisponde a quello che viene definito stato "transizionale" (17) (Robertson, 1988). Quando ha realmente inizio la capacitazione, l'ampiezza dell'onda flagellare diventa asimmetrica, dando luogo ad un movimento non più progressivo ma vigoroso, noto come iperattivazione. Questa

forma di motilità è tipica degli spermatozoi totalmente capacitati, e si pensa che fornisca allo spermatozoo la forza necessaria per attraversare la zona pellucida (18) (Burkman, 1991). Un lavoro pubblicato da Murray & Smith (19) ha dimostrato che il contatto delle cellule apicali della tuba con gli spermatozoi offre un prolungamento della durata della motilità, con incremento della velocità progressiva e ritardo della capacitazione.

2.2 Motilità qualitativa

I cambiamenti della motilità spermatica nei vari distretti necessari prima di raggiungere il luogo in cui avverrà la fecondazione risultano essere di estrema importanza. Tuttavia sino a poco tempo fa la motilità spermatica veniva considerata solo dal punto di vista quantitativo, analizzando la percentuale globale degli spermatozoi con mobilità progressiva. Si è visto come la motilità nel plasma seminale di per sé fornisce indicazioni limitate dal momento che gli spermatozoi devono muoversi nel muco cervicale. Da ciò deriva l'importanza dell'analisi seminale con spermatozoi selezionati e non con l'intero eiaculato. Perché abbia valore diagnostico, lo studio della motilità deve essere effettuato pertanto su spermatozoi selezionati, attraverso un test di capacitazione spermatica (recupero di spermatozoi mobili).

2.2.1 Studio computerizzato della motilità

L'impiego della motilità nemaspermica come strumento diagnostico ha consentito lo sviluppo di sistemi computerizzati di analisi delle immagini (sistema CASA), che offrano informazioni veritiere e rapide sulla cinetica nemaspermica. Per essere certi che i dati osservati riflettano la situazione reale, l'utilizzo dei parametri di riferimento deve avvenire con accuratezza. Tutti i fattori, quali la con-

centrazione nemaspermica, devono rientrare nel range di variabilità dello strumento; le caratteristiche della camera entro cui gli spermatozoi vengono analizzati non dovrebbero impedire l'ampio movimento del battito del flagello, per consentire l'osservazione del fenomeno della iperattivazione nemaspermica; la temperatura deve mantenersi costante per tutto il tempo di osservazione. Tenendo presenti tali considerazioni, una recente revisione della letteratura ha permesso di sottolineare come i sistemi CASA forniscano informazioni rilevanti sulla capacità di fecondazione degli spermatozoi (18, 20) (Burkman, 1990; Joshi, 1996).

Esistono diversi sistemi di analisi computerizzata delle immagini, tutti ugualmente affidabili sia per quanto riguarda la ricerca e la diagnosi, sia per la loro validità prognostica. Il più ampiamente utilizzato è stato l'Hamilton Thorn, che è quello maggiormente citato nella bibliografia (21, 22) (Mortimer, 1990; Olds-Clarck, 1990). Tuttavia i dati elaborati dal sistema computerizzato devono rientrare nei criteri standard adottati da ogni laboratorio. Utilizzando diversi sistemi di analisi CASA si possono ottenere altrettanti diversi risultati relativi ad un unico campione seminale. Ognuno di essi può ricostruire differenti traiettorie dello spermatozoo o utilizzare differenti metodi per localizzazione degli spermatozoi; anche l'utilizzazione di diversi algoritmi per la ricostruzione delle caratteristiche del movimento porta ad esiti differenti. Per tale motivo non viene stabilito alcun valore di riferimento per i singoli parametri cinetici che risultano da tali sistemi, lasciando a ciascun gruppo di lavoro la possibilità di elaborare standard personalizzati.

Il sistema ottico di acquisizione delle immagini è costituito da una fonte di luce infrarossa e da una videocamera. Il sistema di illuminazione è su campo oscuro (a contrasto di fase, NdT), in modo che gli sperma-

tozoi possano apparire nel monitor come elementi rifrangenti in un campo oscuro. La luce emessa sul campione viene raccolta attraverso un sistema di lenti e convogliata ad un rilevatore di immagini (video). L'immagine elettronica viene digitalizzata e analizzata. Il sistema inizia con l'acquisizione di una serie di immagini successive durante l'esposizione ad un tempo costante. I segnali analogici prodotti dalla videocamera vengono trasmessi all'elaboratore di immagini, dove vengono digitalizzati e memorizzati dal computer per una successiva analisi. Il passo seguente consiste nell'eliminare tutti gli artefatti dell'immagine che deve essere analizzata, localizzando e separando immagini mobili dalle immobili in modo automatico.

I sistemi CASA sono in grado di analizzare il movimento del flagello e quello della testa. Nel primo caso si studiano l'ampiezza dell'onda flagellare, la velocità di propagazione e la frequenza del battito del flagello; poiché questi dati hanno validità soprattutto nella ricerca, più che nella clinica, non vengono approfonditi ulteriormente. L'analisi del movimento riferito alla testa dello spermatozoo considera invece i seguenti parametri:

- Velocità: per la descrizione della motilità si utilizzano tre valori: velocità curvilinea (VCL), velocità rettilinea (VSL) e velocità media (VAP). Ciascuna delle tre descrive un aspetto differente della progressione nemaspermica.

La VCL è la distanza che compie lo spermatozoo lungo la sua traiettoria, e viene calcolata come la somma delle distanze nel corso del tempo.

La VSL viene determinata calcolando la distanza in linea retta tra il primo e l'ultimo punto nel percorso dello spermatozoo.

La VAP indica la longitudine di una traiettoria nemaspermica.

- Linearità: esprime la relazione tra la proiezione bidimensionale della traiettoria di uno spermatozoo e lo spazio guadagnato, calcolato come $VSL/VCL \times 100$. Una traiettoria circolare, per esempio, avrà una ridotta linearità, dato che la traiettoria curvilinea (la circonferenza) è maggiore dello spazio netto guadagnato (la distanza tra il primo e l'ultimo punto della traiettoria).

- Rettilinearità: fornisce l'indicazione della relazione tra lo spazio netto guadagnato e la traiettoria generale dello spermatozoo, calcolato come $VSL/VAP \times 100$.

- Ampiezza dei movimenti laterali della testa (ALH): viene calcolata come un'approssimazione del battito del flagello, anche se non si tratta di una reale ampiezza, dal momento che non misura la distanza perpendicolare tra il picco dell'onda e il punto di inflessione della curva.

- Frequenza del battito (BCF): dal momento che ogni avanzamento presuppone un ulteriore battito flagellare, la BCF definisce il numero dei battiti del flagello dello spermatozoo, supponendo una rotazione come inizio del battito.

Questi parametri, insieme alle percentuali di spermatozoi mobili per millilitro [spermatozoi rapidi ($VL > 30 \mu\text{m}/\text{secondo}$), moderati ($30 > VL > 10 \mu\text{m}/\text{secondo}$) e lenti ($VL < 10 \mu\text{m}/\text{secondo}$)], così come il totale nell'eiaculato, definiscono con precisione le caratteristiche della motilità nemaspermica.

Al momento i valori di normalità stabiliti dall'OMS, utilizzando l'autoanalizzatore Hamilton Thorn a 37°C , sono rappresentati nella tabella 2.

Per poter definire i limiti di normalità dei parametri cinetici spermatici in relazione ai risultati di fecondazione, è necessario ricordare che il tipo di movimento espresso è diverso a seconda dell'ambiente e del mezzo in cui gli spermatozoi si trovano; per esempio una motilità ottimale nel plasma seminale, necessaria per attraversare il muco cervicale e raggiungere l'ovocita (in funzione di una gravidanza spontanea), non è più tale se parliamo di inseminazione intrauterina o fecondazione in vitro. L'applicazione di una tecnica di riproduzione assistita implica l'utilizzo di spermatozoi lavati ed incubati in un medium. La sola diminuzione della viscosità del medium determina già una modificazione della motilità degli spermatozoi e quindi una modificazione delle altre caratteristiche cinetiche.

Per dimostrare l'utilità del test di capacitazione nemaspermica, utilizzando i parametri della cinetica come misura comparativa, il nostro gruppo ha elaborato un lavoro in cui sono state confrontate le variazioni e le differenze tra i parametri cinetici rilevati in una popolazione di donatori con comprovata fertilità e quelli rilevati in pazienti in studio per problematiche di fertilità (23, 24) (Núñez, 1993, 1995). Sono stati studiati la velocità rettilinea (VR), la velocità lineare (VL), l'indice di linearità (% IL) ed il movimento laterale della testa (DCL) nell'eiaculato dei donatori e

Tabella 2: Analisi oggettiva della motilità nemaspermica con l'analizzatore di immagini HTMA.

| | |
|--|-------------------------------------|
| Spermatozoi rapidi ($VL > 30 \mu\text{m}/\text{s}$) | >30% |
| Spermatozoi moderati ($30 > VL > 10 \mu\text{m}/\text{s}$) | >20% |
| Motilità (spermatozoi con $VL > 10 \mu\text{m}/\text{s}$) | >50% |
| Velocità lineare media (VL) | >35 $\mu\text{m}/\text{s}$ |
| Velocità rettilinea media (VR) | >30 $\mu\text{m}/\text{s}$ |
| Media dell'indice di linearità (IL) | >80% |
| Media dell'ampiezza dei movimenti laterali della testa | >2 μm e <4 μm |

dei pazienti pre e post-capacitazione. I risultati ottenuti hanno dimostrato che non vi sono differenze statisticamente significative tra i parametri cinetici del campione dei donatori e quelli dei pazienti in fase di pre-capacitazione, al contrario di ciò che si verifica per tutti i parametri post-capacitazione.

Grafico I - Parametri cinetici pre-condizione di capacitazione

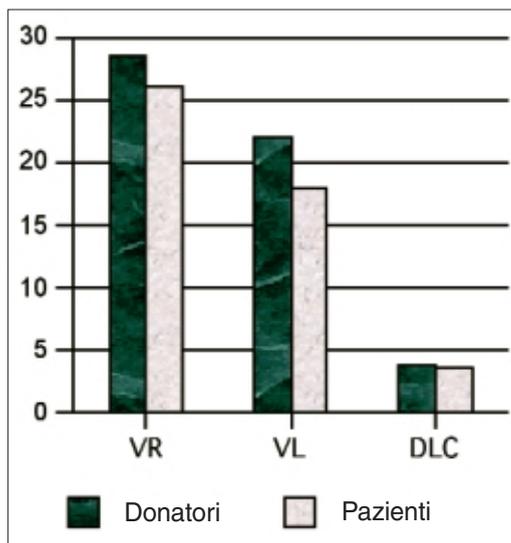
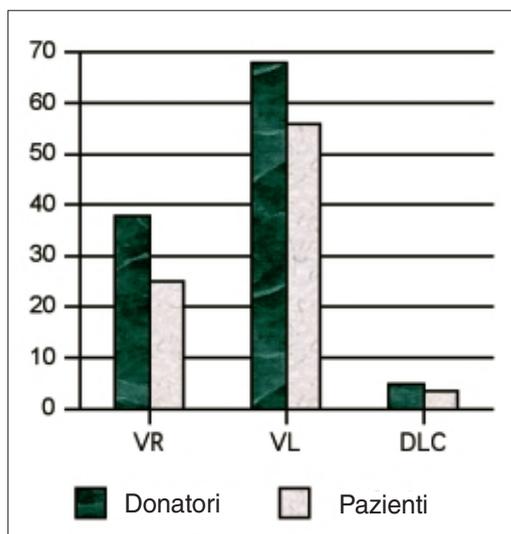


Grafico II - Parametri cinetici post swim-up dopo 3 ore di incubazione



Le potenzialità del sistema CASA per l'utilizzo clinico sono elevate. Sono stati elaborati numerosi studi che hanno mostrato l'esistenza di relazioni tra motilità nemaspermica, penetrazione nel muco cervicale (21) (Mortimer, 1990), fecondazione in vitro (25) (Suckcharoen, 1996) e in vivo (26) (MacLeod & Irvine, 1995)

In uno studio condotto dal nostro gruppo (27) (Núñez et al., 1996), si evidenzia la relazione esistente tra tassi di gravidanza e parametri cinetici in una popolazione di uomini in programma per inseminazione intrauterina. Abbiamo confrontato i parametri cinetici (VCL, VSL, LIN e AHL) tra i campioni seminali di uomini che avevano ottenuto il concepimento e non, nel giorno dell'inseminazione. Non abbiamo rilevato differenze significative in nessuno dei parametri cinetici ad eccezione dello spostamento laterale della testa ($p < 0.5$), che aumenta nei campioni dei maschi che hanno ottenuto la gravidanza della partner. Sulla base di questi risultati, è stato realizzato uno studio in cui abbiamo osservato un'aliquota di sperma capacitato durante 6 ore, e abbiamo confrontato ugualmente l'AHL nei casi in cui non è stata ottenuta gravidanza. Vi è la dimostrazione che esiste un picco di iperattivazione medio alla terza ora di incubazione e un picco maggiore di AHL nei casi in cui si otteneva la gravidanza. Nonostante l'IVF possa servire come metodo ideale di conferma della capacità fecondante di un campione di liquido seminale, esistono alcuni lavori che dimostrano l'importanza dei parametri cinetici nello studio della capacità fertilizzante del campione stesso. È stata associata più precisamente la diminuzione dei valori di VCL, VSL e AHL con il fallimento della fecondazione (28) (Liu, 1992). Più recentemente Joshi (20) (1996) ha correlato la capacità fertilizzante, la velocità curvilinea, e il VAP al parametro della morfologia (79% di correlazione).

Secondo altri Autori, l'unico fattore cinetico correlabile all'esito della fecondazione in vitro è l'iperattivazione (25) (Sukcharoen, 1996), in accordo con i risultati ottenuti dal nostro gruppo sull'inseminazione intrauterina.

Tuttavia, l'entusiasmo iniziale per tale sistema è andato progressivamente diminuendo, in relazione alle difficoltà esistenti per ottimizzare i criteri, senza ottenere una serie di parametri che offrano informazioni valide sulla capacità fertilizzante nemaspermica, tanto in vivo quanto in IVF. Ciò parte dal punto di vista, poco realistico, che un test di funzionalità isolato possa predire la capacità fertilizzante di un campione di sperma. Non esiste un test "perfetto" che ci dia tali informazioni, così gli esami computerizzati della cinetica nemaspermica (come altri test di funzionalità) devono essere comunque associati ad altri test complementari.

Bisogna aggiungere inoltre che le informazioni che vengono fornite da una serie di prove funzionali seminali possono essere considerate superflue nel caso di microiniezione spermatica, evitando la "perdita" di tempo e i costi aggiuntivi nello studio dell'infertilità maschile. La recente revisione della letteratura, sotto un'ottica meramente clinica, non conforta i pochi lavori pubblicati in merito che si riferiscono alla capacità di fertilizzazione spermatica ed ai tests funzionali.

2.2.2 Motilità dello spermatozoo nel terreno di coltura: capacitazione "in vitro"

Affinchè gli spermatozoi siano funzionali devono allontanarsi il prima possibile dal plasma seminale. L'esposizione prolungata ai fluidi seminali ne danneggia la motilità e la vitalità (29) (Mortimer, 1984). Bisogna considerare che ciò che valutiamo è il comportamento dello spermatozoo "in vitro", e quindi

in un ambiente diverso da quello che è il suo habitat fisiologico. Il lavaggio dell'eiaculato per eliminare il plasma seminale rapidamente è essenziale sia per un test di laboratorio che valuti la capacità fertilizzante degli spermatozoi, sia per l'Inseminazione Intrauterina che per la Fecondazione in Vitro (21) (Mortimer, 1990). Frequentemente si utilizza il termine di "spermatozoi capacitati" per definire gli spermatozoi lavati e incubati in un medium di coltura idoneo, simulando la condizione di capacitazione "in vivo". Sarebbe più corretto parlare di selezione spermatica o recupero di spermatozoi mobili (R.S.M.), in quanto la capacitazione è un complesso processo in cui si verificano una serie di modificazioni substrutturali dello spermatozoo, non sempre distinguibili. Le condizioni impiegate "in vitro" tentano di simulare le condizioni fisiologiche con l'allontanamento del plasma seminale e la risospensione degli spermatozoi in terreni che permettano la sopravvivenza e la capacitazione, ma realmente non possiamo assicurare che la popolazione di spermatozoi selezionata sia completamente capacitata ed in grado di fertilizzare un ovocita.

Esistono attualmente numerose tecniche di recupero degli spermatozoi. Il lavaggio degli spermatozoi mediante centrifugazione-sedimentazione e successivamente sospensione-incubazione in mezzo di coltura è probabilmente il metodo più rapido ed efficace. Attualmente quelli più ampiamente usati sono lo "swim-up" e la separazione per gradienti discontinui (gradienti di Percoll).

Dopo un'ora di incubazione del campione risospeso nel medium di coltura a 37°C, i limiti normali di recupero spermatico non sono ben definiti. Il "range di normalità" oscilla tra i 3 e i 6 milioni di spermatozoi mobili per millilitro di "recuperato" in base ai diversi laboratori considerati.

Preparazione seminale e condizioni di analisi

È importante stabilire subito il metodo da utilizzare per separare gli spermatozoi ed analizzare la motilità con i sistemi CASA in quanto la produzione di prodotti ossidativi (radicali liberi) nel plasma seminale può danneggiare irreversibilmente gli spermatozoi e causare la perossidazione lipidica della membrana plasmatica (30, 31) (Aitken & Clarkson, 1988; Mortimer, 1991). Attualmente i metodi più utilizzati per ridurre il rischio di produzione di radicali liberi sono la centrifugazione del seme su gradiente di densità, o lo swim-up (32) (Mortimer, 1994). È noto che la forza di centrifugazione provoca un danno agli spermatozoi, come abbiamo già pubblicato precedentemente in un lavoro in cui si proponeva un nuovo metodo senza centrifugazione: il destrano (8) (Alvarez, 1992). Tuttavia il recupero degli spermatozoi dal campione di seme con alterazioni nella motilità e/o nel numero non assicura una concentrazione sufficiente di spermatozoi. Si deve anche tenere in considerazione che, studiando e confrontando le diverse popolazioni di spermatozoi osservate, la selezione dei gameti attraverso questi metodi può realizzarsi in diversi modi. Ci sono lavori che riferiscono il prelievo di aliquote dello strato superiore dopo swim-up (17) (Robertson, 1988); altri suggeriscono la risospensione di tutto il sedimento senza operare una selezione degli spermatozoi mobili (33) (Centola, 1995). In altri studi, dopo un periodo di incubazione, si dispone il sovrnatante in una provetta diversa, in modo tale da poter mescolare ed analizzare una popolazione di spermatozoi realmente rappresentativa (29, 34) (Mortimer, 1984; Mbizvo, 1990). Questo sarebbe il metodo preferibile, in quanto permette di evitare l'influenza esercitata dagli spermatozoi immobili presenti nel sedimento, così come da tutti i residui cellulari ivi depositati.

Qualsiasi medium utilizzato allo scopo di capacitare gli spermatozoi può essere ritenuto valido per la Fecondazione in Vitro. I medium usati attualmente comprendono il BWW, l'Ham's F10, il Menezo B2 e più recentemente l'IVF (Medi-Cult, Scandinavian). Per quanto concerne lo studio dell'iperattivazione, dato che tutti questi medium includono bicarbonato, calcio e glucosio, i requisiti di base risultano ugualmente validi. Tuttavia sono stati pubblicati lavori che indicano la presenza di HEPES nel medium come fattore di riduzione dell'incidenza di iperattivazione (35) (Anderson, 1989); altri riferiscono che l'uso dell'Ham's F10 potrebbe essere dannoso per gli spermatozoi, in quanto contiene maggiori concentrazioni di ferro che favorirebbe la produzione di radicali liberi, rispetto ad altri medium (36) (Gomez & Aitken, 1996).

Altro fattore determinante nella valutazione della motilità spermatica è la temperatura. La maggior parte degli studi considera come temperatura ottimale per l'interpretazione dei parametri cinetici il valore di 37°C, e tutti dimostrano come piccole variazioni della temperatura comportino significativi cambiamenti della motilità. In un lavoro di Chan et al. (1998) (37) è riportato che il trattamento degli spermatozoi a 40°C produce un maggior numero di gameti iperattivati ed incide comunque favorevolmente sulle caratteristiche di motilità in generale.

Quindi dopo aver trattato il seme con una delle tecniche sopracitate, ci troviamo di fronte ad una concentrazione determinata di spermatozoi altamente mobili in condizioni di capacitazione in vitro: abbiamo cercato di recuperare il maggior numero possibile di spermatozoi mobili, senza tenere in considerazione alcuni elementi quali ad esempio il tipo di motilità, di cui abbiamo già commentato precedentemente l'importanza nella cinetica post-recupero.

Gli spermatozoi selezionati in vitro in stato di capacitazione potrebbero evidenziare segni del loro stato fisiologico. I cambiamenti nella motilità e l'acquisizione della capacità di andare incontro alla reazione acrosomiale sono aspetti critici della capacitazione.

Osservando la motilità in distinti momenti della incubazione si vede che esistono diversi tipi di movimento per alcuni degli spermatozoi non apprezzabili nell'eiaculato, nel plasma seminale, e che questi variano nel tempo.

Gli spermatozoi "in vitro" potrebbero subire un cambiamento della motilità flagellare che si esprime in un movimento lineare e progressivo oppure con minore linearità e con maggiore spostamento laterale della testa, oppure con motilità iperattivata (HA).

Attualmente si realizzano determinazioni dello stato di iperattivazione negli spermatozoi umani con l'utilizzo di autoanalizzatori come l'HAMILTON-THORN (18) (Burkman, 1990), considerando come parametri:

- Velocità lineare : $>90 \mu\text{m}/\text{sec}$
- Linearità $< 40\%$
- Spostamento laterale della testa $>4 \mu\text{m}$

È stato verificato che l'iperattivazione è un avvenimento non sincronizzato nella popolazione nemaspermica. Ciò ha contribuito al ritardo del suo riconoscimento quale parte integrante del liquido seminale umano (18) (Burkman, 1990). Questa asincronia potrebbe dipendere dalla variabilità esistente all'interno del campione di sperma in risposta al picco di iperattivazione o alla eterogeneità nella durata della stessa. Una volta che la reazione acrosomiale si è completata, lo spermatozoo rimane condizionato irreversibilmente e non può più ritornare allo stato iniziale.

Tuttavia il periodo di motilità iperattivata viene preceduto e seguito da una fase di movimento flagellare moderato: il momento di osservazione è dunque critico.

2.2.3 Motilità spermatica nella Riproduzione Assistita.

Abbiamo già visto che il parametro motilità, sia dal punto di vista qualitativo che quantitativo, è un requisito fondamentale affinché uno spermatozoo sia in grado di fecondare un ovocita. Tuttavia, nella Riproduzione Assistita il concetto di motilità spermatica varia in rapporto alla Tecnica applicata. Affinché ciò sia valido ci si deve riferire a spermatozoi capacitati, oppure a spermatozoi mobili (RSM) recuperati dopo l'esecuzione di una tecnica di separazione. Si potrebbero trovare eiaculati normali con un numero di spermatozoi recuperati molto basso e viceversa. Nell'Inseminazione Artificiale Intrauterina, il numero minimo standardizzato che si richiede è di 5-6 milioni di spermatozoi mobili (con motilità a+b) per ml. Per valori inferiori la percentuale di gravidanza si abbassa considerevolmente.

Nel caso della Fecondazione in Vitro, il numero di spermatozoi mobili necessario si abbassa ancora, seppure non di molto, variando tra i 2-3 milioni di spermatozoi mobili per millilitro. Abbiamo anche visto la relazione che esiste, secondo i lavori pubblicati in letteratura, tra i parametri cinetici ed i risultati nella FIV. Invece, nel caso della ICSI, la motilità non è più necessaria; il parametro che in questo caso diventa fondamentale è la vitalità dello spermatozoo. Sebbene la motilità sia una conferma della vitalità dello spermatozoo selezionato, è stato pubblicato un articolo di Van den Bergh et al. (38) in cui si analizzava la velocità rettilinea degli spermatozoi microiniettati riscontrando una maggior percentuale di fertilizzazione (84% vs 68%)

negli spermatozoi con aumentata VSL. Questo è il primo lavoro in cui si dimostra una chiara relazione tra la motilità dello spermatozoo microiniettato ed il tasso di fertilizzazione. Nuovamente, la motilità risulta uno dei principali parametri correlati alla capacità di fertilizzazione spermatica, e la perdita di motilità o soltanto l'alterazione della motilità stessa è associata in molti casi ad altri tipi di alterazioni quali ad esempio quelle del DNA (39) (Kao, 1995).

2.2.4 Alterazioni della motilità dello spermatozoo

La motilità spermatica, essendo uno dei parametri più facili da studiare nella valutazione funzionale dell'eiaculato, è anche quella che maggiormente risente dell'influenza di fattori esterni. Per questo motivo è importante chiedere al paziente informazioni precise relative alla modalità di raccolta ed al tempo impiegato per il trasporto, dato che le condizioni ambientali possono alterare la qualità seminale. Così circostanze come la raccolta del campione mediante coito interrotto, le temperature estreme o la perdita di una parte del campione durante la sua produzione, potrebbero essere responsabili di astenozoospermia più o meno severa.

Altre cause di alterazione della motilità sono le infezioni. La letteratura è ricca di lavori riguardanti la relazione esistente tra la presenza di determinati microrganismi e l'alterazione della motilità spermatica. In quanto al tipo di microrganismi, esiste una grande varietà di patogeni che frequentemente si riscontrano nel tratto genitale maschile in maniera asintomatica alterando unicamente il parametro della motilità.

Uno degli organismi motivo di interesse specifico è l'*Ureaplasma urealyticum*. Il nostro gruppo ha pubblicato un lavoro in cui si rileva una correlazione tra la diminuzione fino alla

perdita di motilità spermatica e la concentrazione di ureoplasma (40) (Núñez et al., 1998) (Figura 6).

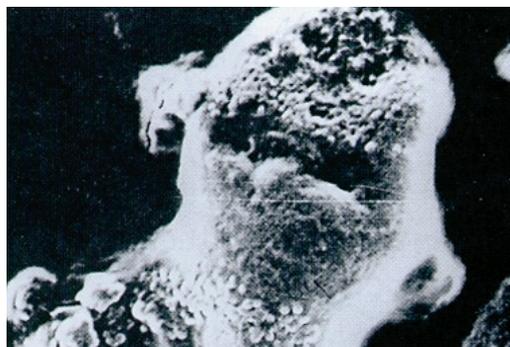


Fig. 6 Spermatozoo incubato con *Ureaplasma urealyticum* per 24 ore: colonie unite al flagello e alla testa dello spermatozoo (Microscopia elettronica a scansione: 6000X)

3. REAZIONE ACROSOMIALE

La reazione acrosomiale (RA) è un requisito indispensabile per la fecondazione nei mammiferi; essa consiste nella fusione tra la membrana plasmatica e la membrana acrosomiale esterna, superiormente alla porzione anteriore della testa dello spermatozoo. Avviene sulla superficie della zona pellucida, dopo legame specifico da parte dello spermatozoo con una glicoproteina specifica, la ZP3 (41) (Wassarman, 1995). Completata la RA, lo spermatozoo è in grado di penetrare la zona pellucida.

Fino ad alcuni anni fa si pensava che la frequenza di RA nella popolazione di spermatozoi capacitati si correlasse con il potenziale di fertilità; oggi risulta che la RA va valutata nel tempo ("picco di RA") per conoscerne il suo reale potenziale (42) (Tesarik, 1989). Una RA prematura conduce alla perdita dei siti di riconoscimento della zona pellucida localizzati sulla superficie dello spermatozoo e quindi può compromettere la fusione dei gameti (43) (Liu & Baker, 1994). Al contrario, l'incapacità di attivazione dello

spermatozoo, responsabile dell'innesco della RA, impedisce la penetrazione. La RA comporta cambiamenti molto più complessi di un semplice processo di esocitosi, peraltro non evidenziabili mediante le metodiche routinarie di valutazione della reazione acrosomiale (anche lo studio dell'acrosoma degli spermatozoi umani è impossibile mediante il solo microscopio ottico).

La scoperta che la RA debba essere valutata in riferimento al tempo, ha portato alla messa a punto di nuovi test che permettono una visione più reale della fisiologia dello spermatozoo. Peraltro la semplice misurazione della RA spontanea negli spermatozoi dell'eiaculato non offre nessuna informazione di funzione. Uno dei test che meglio risponde a tale esigenza è l'ARIC Test ("acrosome reaction inophore challenge"), studiato da Cummins nel 1991 (44). Con l'applicazione di questo test sono state definite due classi di patologie: insufficienza di RA e RA prematura. La prima descrive casi in cui la differenza di frequenza di RA tra spermatozoi trattati con ionoforo del calcio e quelli non trattati in una popolazione di spermatozoi capacitati è <15%. La prematurità della RA si osserva nei casi in cui la frequenza della RA spontanea è >20%. Una RA insufficiente potrebbe riflettere anomalie connesse all'influsso di calcio durante la cascata di segnali responsabili dell'induzione della RA.

Si può concludere, quindi, che lo studio della RA spontanea non è un test di funzione, ma è più corretto definirlo un test di disfunzione (ciò si verifica, per esempio, in pazienti che mostrano in un breve tempo un'elevata percentuale di RA, a causa di un'instabilità acrosomiale). La condizione normale si ha quando gli spermatozoi non perdono l'acrosoma spontaneamente durante la capacitazione, in un tempo stabilito (tra 3 e 6 ore), sebbene questo vari da individuo

a individuo e tra diversi eiaculati dello stesso individuo. La percentuale degli spermatozoi reagiti non deve superare normalmente il 10-15%.

3.1 Reazione acrosomiale nella riproduzione assistita

Tesarik ha pubblicato che, nella sua esperienza, circa il 5% dei pazienti infertili presenta problemi di RA. Di questi, la metà fallisce la risposta con lo ionoforo (RA insufficiente), la restante metà mostra livelli molto elevati di RA spontanea (RA prematura). Una ridotta risposta all'ARIC test si considera come un buon indicatore prognostico di scarsa fecondazione nella FIV anche se un ARIC test positivo non necessariamente implica il contrario. Non esclude neppure l'assenza di problematiche correlate alla RA. I pazienti che non rispondono al calcio ionoforo possono rispondere ad uno stimolo aggiungendo la pentoxifillina nel terreno di lavaggio.

Sia una RA insufficiente che una RA prematura possono essere trattate con iniezione intracitoplasmatica (ICSI). Tuttavia, se non vi siano ulteriori indicazioni, ricorrere alla metodica ICSI in questi casi potrebbe essere eccessivo, se si dimostra risolto il problema degli spermatozoi affetti da RA insufficiente incubandoli con pentoxifillina. Di contro, nei casi di una RA prematura, il campione può essere trattato incubandolo con tuorlo d'uovo (45) (Tesarik & Mendoza, 1995). I due metodi possono essere combinati quando si presentano ambedue le tipologie di patologia acrosomiale.

La conclusione generale del Workshop dell'ESRHE che ha ipotizzato l'impiego dell'ARIC test come test di studio della infertilità, è che si deve valutare la situazione individuale di ciascun paziente prima di considerare il test come pratica di routine, sebbene possa essere molto utile come test diagnostico della capacità fecondante.

4. MATURITÀ NUCLEARE

La condensazione della cromatina durante la spermiogenesi e la sua decondensazione al momento della fecondazione sono essenziali per l'esito della fecondazione stessa. La condensazione e la stabilizzazione regolare della cromatina sono fondamentali per la trasmissione del genoma maschile; la decondensazione dopo penetrazione da parte dello spermatozoo nell'ovocita permette l'interazione con il DNA di quest'ultimo a formare il genoma. Lo scopo della condensazione è ridurre la massa di cromatina e facilitare la degradazione enzimatica nucleare.

Durante la maturazione epididimaria lo spermatozoo umano, come quello di altri mammiferi, subisce una serie di cambiamenti strutturali e biochimici che sono pre-requisiti per una capacità fecondante ottimale. Uno dei cambiamenti maturativi è la formazione di ponti disolfuro tra le protamine nucleari che assicurano un incremento della stabilità nella testa dello spermatozoo. Questo incremento coincide con una diminuzione dei gruppi tiolici liberi nel nucleo (46) (Bedford, 1973). Dopo l'eiaculazione lo zinco presente nel fluido prostatico entra nella cromatina e si lega ai gruppi tiolici liberi stabilizzando la struttura quaternaria e assicurando l'equilibrio tra i ponti disolfuro e i gruppi tiolici liberi. Un'esposizione prolungata al plasma seminale potrebbe determinare un'iperstabilità della cromatina spermatica. D'altra parte, nel genere umano, il tempo di transito degli spermatozoi nell'epididimo varia tra individui, di conseguenza gli spermatozoi nell'eiaculato presentano diversi gradi di stabilità nucleare. L'analisi della percentuale degli spermatozoi con nucleo immaturo nell'eiaculato potrebbe essere utilizzata come test di maturità nucleare e quindi come indice della capacità fecondante.

L'applicazione della ICSI come tecnica di riproduzione assistita in casi di infertilità maschile severa ha permesso di ottenere gravidanze da spermatozoi recuperati dall'epididimo, dal testicolo e persino a partire da spermatidi rotondi microiniettati nell'ovocita (45) (Tesarik & Mendoza, 1995). L'esito della fecondazione dopo la microiniezione di uno spermatide aploide (1n), suggerisce che il pattern paterno si ritrova nello spermatide rotondo, prima che il nucleo completi la propria maturazione e modifichi l'assetto degli istoni nel sistema nucleo-protamine. Questo indica che né il processo di transizione istoni-protamine, né la maturità nucleare acquisita durante il transito degli spermatozoi nell'epididimo, sono requisiti necessari affinché si verifichi la fecondazione e lo sviluppo embrionale normale (47) (Auger, 1993) (Figura 7).

Per un esito favorevole della fecondazione è indispensabile quindi, come è stato già discusso precedentemente, che la cromatina nucleare dello spermatozoo resti intatta. In un recente lavoro del nostro gruppo (48) è stata dimostrata la correlazione esistente tra il tasso di fecondazione nella ICSI e la percentuale di spermatozoi vivi con la tecnica dell'arancio di acridina, e questo evidenzia l'importanza di un'adeguata condensazione cromatinica per l'esito della fecondazione.



Fig. 7 Spermatozoi recuperati da biopsia testicolare (Contrasto di fase Nomarski, 400X)

5. INTEGRITÀ DELLA MEMBRANA PLASMATICA

L'integrità e l'attività funzionale della membrana plasmatica sono requisiti cruciali per la motilità e per i cambiamenti fisiologici che avvengono sulla superficie dello spermatozoo durante il processo di fecondazione, inclusi la capacitazione, la reazione acrosomiale, il legame alla zona pellucida e infine la fusione con l'oolemma. Per questo motivo la valutazione dello stato funzionale della membrana plasmatica può essere utilizzata come test predittivo di fertilità.

Jeyendran et al. (16) hanno messo a punto un metodo semplice definito test ipoosmotico (HOS test). Spermatozoi vitali con integrità funzionale della membrana plasmatica posti in una soluzione ipoosmotica (150 mOsm/L), si rigonfiano in corrispondenza delle code, che appaiono arrotolate, come conseguenza dell'ingresso di acqua nella cellula. Questo test si correla con la concentrazione di spermatozoi, con la motilità, la morfologia e in particolar modo con la vitalità valutata con il test all'eosina. Jeyendran ha inoltre osservato che questo test si correla ($r=0,9$) con l'Hamster test (penetrazione dell'ovocita di criceto) confermandone l'utilità come test di funzione spermatica.

Liu et al. (28) (1992) nonostante trovasse correlazione dell'HOS test con altri parametri (concentrazione, morfologia, vitalità e motilità), non osservarono alcuna correlazione statistica con i risultati della FIV; pertanto si ritiene che questo test, sebbene possa essere utile per conoscere alcuni aspetti della fisiologia dello spermatozoo, non lo sia altrettanto per predire la capacità fecondante di un eiaculato.

Con l'applicazione della ICSI, il test ipoosmotico è stato rivalutato: nel giugno 1997, Verheyen et al. (49) confrontarono diverse soluzioni ipoosmotiche per selezionare sper-

matozoi immobili per la ICSI, nella convinzione che gli spermatozoi vivi presentassero una normale membrana plasmatica e tendessero a "rigonfiarsi". Sulla stessa linea comparivano, poco dopo, gli articoli di Ahmadi e Ng (50) (1997) (che utilizzarono una soluzione con acqua distillata) e Liu et al. (51) (1997) (che utilizzarono cloruro di sodio e acqua distillata 150mOsm/kg) riportando una elevata percentuale di fecondazione. Nel complesso questi lavori mostrano una correlazione tra endoosmosi positiva (rigonfiamento del flagello) e vitalità spermatozoaria. In conclusione la vitalità si valuta sia con il test ipoosmotico che con il test all'eosina, basandosi anche questo sullo stato funzionale di membrana. La correlazione tra l'HOS test e l'integrità del DNA nucleare non è stata invece valutata.

Sulla base di queste premesse abbiamo realizzato un lavoro (Cortés et al., 1998) (52), cercando di dimostrare la correlazione esistente tra test ipoosmotico ottenuto utilizzando diverse concentrazioni (100 e 150 mOsm/kg) e integrità del DNA nucleare valutata con il test AO (arancio di acridina). I risultati ottenuti dimostrano che esiste una elevata correlazione tra il risultato del test ipoosmotico (preferibilmente con soluzioni a bassa pressione osmotica) e l'integrità del DNA nucleare; ciò dimostra la validità di tale tecnica per selezionare spermatozoi vitali da utilizzare per la microiniezione.

Vermes et al. nel 1995 (53) dimostrarono che quando la membrana degli spermatozoi subisce alterazioni, i fosfolipidi fosfatidilserina (PS) migrano dalla porzione interna a quella esterna della membrana plasmatica; questo è uno dei primi segnali di apoptosi e può essere monitorato mediante un test con annexina. Glander e Schaller pubblicarono nel 1999 (54) un lavoro in cui dimostrarono i cambiamenti che possono avvenire nella membrana plasmatica, in modo da differen-

ziare spermatozoi vitali, non vitali e con la membrana integra ma alterata. Questo studio, associato ad altri test funzionali, apre nuove prospettive nell'analisi dei fenomeni apoptotici nella cellula nemaspermica, in combinazione con altri test di funzionalità.

6. MORFOLOGIA DELLO SPERMATOZOO

Benchè nella realtà non si possa considerare lo studio citomorfologico come un test di funzione vero e proprio, lo si utilizza come test discriminante nella scelta del tipo di Tecnica di Riproduzione Assistita più adeguata, vista la sua importanza nella fertilizzazione.

Il ruolo della morfologia spermatozoaria nello studio del fattore maschile, è sempre stato motivo di controversie: alcuni ricercatori considerano la morfologia come parametro principale per predire il potenziale di fertilità (55) (Oehninger, 1995), altri invece non hanno riscontrato alcuna correlazione (56) (Seracchioli, 1995)

Tuttavia studi effettuati su numerosi cicli di FIV suggeriscono che la morfologia, in accordo al criterio stretto di Kruger, fornisce un'informazione prognostica importante per il tasso di fecondazione (57) (Grow, 1994). Inoltre è stata confermata una correlazione positiva tra la morfologia spermatica, valutata con il criterio stretto, e altri test di funzione quali la condensazione della cromatina (58) (Claessens, 1992); ciò permette di legittimare la morfologia come test funzionale.

Numerosi lavori scientifici dimostrano che non esiste alcuna relazione tra la morfologia degli spermatozoi e i risultati ottenuti da ICSI (tassi di fecondazione, divisione, qualità degli embrioni e gravidanza (59) (Nagy et al., 1998); sono stati riportati dati relativi a gravidanze ottenute da spermatozoi globozoospermici (60) (Trokoudes et al., 1995). In altri lavori si evidenzia un decremento del tasso di

gravidanza e di impianto quando è presente il 100% di teratozoospermia (61) (Tasdemir, 1997), in altri ancora si ipotizza l'eventualità che gli spermatozoi anomali possano essere responsabili del mancato sviluppo embrionale o addirittura di un anomalo impianto embrionale (62) (Svalander, 1998).

In ogni caso, sebbene la ICSI risolva il problema teratozoospermia esistente con le altre tecniche di Riproduzione Assistita, non bisogna sottovalutare la possibile influenza negativa che questa anomalia implica nell'ottenimento di una gravidanza.

7. SOPRAVVIVENZA DELLO SPERMATOZOO

Se la motilità dello spermatozoo è uno dei principali parametri coinvolti nella capacità fecondante, si può pensare che il suo perdurare nel tempo sia un'ulteriore caratteristica implicata nella fecondazione. Il Michelle Plachot è stato uno dei principali gruppi di Riproduzione che ha studiato la sopravvivenza dello spermatozoo correlandola alla fertilità; nel 1987 pubblicò un lavoro (63) in cui tale test veniva eseguito sistematicamente in tutte le coppie in FIV con patologia maschile nel quale si osservò una correlazione con i risultati della fecondazione.

Il nostro gruppo ha realizzato un lavoro (27) (Núñez et al., 1996) in cui si analizza la sopravvivenza spermatica, dopo 24 ore di incubazione, di tutti i campioni di seme trattati per l'Inseminazione Artificiale Intrauterina. Sono stati selezionati 45 cicli di inseminazione nei quali si era ottenuta gravidanza ed è stato dimostrato che gli spermatozoi conservano la motilità dopo 24 ore. Questi risultati sono stati confrontati con quelli ottenuti dai cicli in cui non è stata raggiunta gravidanza e nei quali non è stata riscontrata alcuna patologia femminile. I risultati dimostrano che, dopo 24 ore, nell'82,2% dei cicli con gravi-

danza si osserva sopravvivenza, rispetto a 17,7 % dei casi negativi. Tuttavia, nei cicli senza gravidanza, nel 50% dei casi si evidenzia sopravvivenza degli spermatozoi dopo 24 ore. Per questo motivo consideriamo il test di sopravvivenza spermatica un indice prognostico negativo di gravidanza nei casi in cui lo stesso risulti negativo.

Nell'anno seguente (1997), Coccia et al. (64) pubblicarono un lavoro in cui si confrontava il tasso di fecondazione in FIV con il test di sopravvivenza spermatica, dimostrando così una correlazione diretta: il 90% dei cicli con scarso tasso di fecondazione presentava il test di sopravvivenza negativo (87% di sensibilità e 65% di specificità).

8. TEST BIOCHIMICI

L'applicazione dei tests per quantificare i componenti essenziali coinvolti nella funzione dello spermatozoo umano ha permesso l'analisi dei meccanismi cellulari che la controllano. Sono state così comprese sia le basi molecolari della normale funzione spermatica che la natura biochimica delle disfunzioni.

8.1 Prodotti di reazione dell'ossigeno

Lo spermatozoo umano è capace di generare prodotti di reazione dell'ossigeno (ROS), quali l'anione superossido e il perossido d'idrogeno (31) (Aitken, 1987).

L'aumento della produzione di ROS danneggia la funzionalità degli spermatozoi agendo a livello degli acidi grassi insaturi di membrana. La membrana plasmatica dello spermatozoo contiene una grande quantità di acidi grassi insaturi, che le conferiscono la fluidità necessaria per la reazione acrosomiale e per la fusione con le membrane dell'ovocita. Tuttavia, la presenza di acidi grassi insaturi rende la membrana particolarmente sensi-

bile al danno ossidativo. Come conseguenza della perdita di fluidità della membrana, gli spermatozoi che generano alti livelli di ROS non sono in grado di avviare alcun processo che implichi la fusione delle membrane.

Lo stress ossidativo al quale gli spermatozoi umani sono esposti non comporta soltanto produzione di ROS per loro stessi. Vi sono altre cellule nell'eiaculato, in particolar modo i neutrofilii, che possono essere potenziali produttori di ROS. L'influenza sulla funzione degli spermatozoi umani dei prodotti di reazione ossidativa generati dai leucociti è di particolare importanza nella fecondazione in vitro poiché esiste una correlazione significativa tra le percentuali di FIV e l'elevata presenza di leucociti nel liquido seminale (65) (Krausz, 1994).

La nostra équipe, per valutarne l'effetto sulla vitalità spermatica, ha realizzato un lavoro (66) (Nuñez et al., 1998) in cui sono stati contaminati sperimentalmente eiaculati normali con leucociti. Si è dimostrato che gli effetti potevano essere apprezzati a partire da 6 ore dopo l'incubazione e riguardavano soprattutto la motilità e la vitalità spermatica.

Riteniamo che, non essendo possibile in tutti i laboratori lo studio ruotinario dei sistemi enzimatici coinvolti nel danno ossidativo ed essendo chiaro il coinvolgimento dei leucociti in queste alterazioni, si dovrebbero applicare alcuni accorgimenti per evitare o ridurre al minimo l'effetto negativo sulla funzione spermatica. A tal fine vengono proposti:

- 1) Raccolta dell'eiaculato dopo minzione e rigorosa igiene dei genitali;
- 2) Studio microbiologico del maschio soprattutto prima di un ciclo di riproduzione assistita ed eventuale trattamento antibiotico;
- 3) In caso di riscontro di leucociti nell'eiaculato senza evidenza di infezione, trattamento del campione su gradienti di Percoll.

8.2 Altri marcatori biochimici

Creatinin-kinasi

Come indicatori della funzione spermatica sono stati proposti numerosi test. Un enzima molto studiato è stato la Creatinin-Kinasi (CK), responsabile della trasformazione di energia dai gruppi fosfato dei mitocondri dal tratto intermedio fino all'assonema (67) (Tombes & Shapiro, 1985). La CK esiste in due isoforme: la B che è caratteristica delle cellule immature e dei tessuti, la M tipica delle cellule mature e differenziate. Huszar et al. (68) (1990) hanno dimostrato una chiara relazione tra il rapporto delle due isoforme B:M e infertilità; è stata dimostrata anche una relazione inversamente proporzionale tra la CK e la concentrazione degli spermatozoi. L'incremento dell'attività dell'enzima nei campioni oligozoospermici è stata messa in relazione con una maggiore concentrazione cellulare di CK in conseguenza della ritenzione di un eccesso di residui citoplasmatici durante la differenziazione delle cellule alterate.

Successivamente, Huszar et al. (69) (1992) realizzarono uno studio in cui analizzarono il valore predittivo delle diverse forme della CK in un programma di Fecondazione in Vitro, giungendo alla conclusione che la isoforma M è capace di predire il potenziale di fecondazione, indipendentemente dalla concentrazione spermatica.

1-4 glucosidasi (maltasi)

Esistono due isoenzimi della maltasi nel plasma seminale: la forma neutra, di origine epididimaria che costituisce la frazione principale, e la forma acida, frazione minore di origine prostatica.

La maltasi neutra si è dimostrata il marcatore più specifico e sensibile dell'epididimo in confronto a carnitina e glicerofosforilcolina, precedentemente utilizzate.

È stata dimostrata la drastica riduzione dell'attività della 1-4 glucosidasi nei casi di azoospermia ostruttiva, mentre nell'azoospermia secretoria il suo valore si mantiene entro il range di normalità; per tale motivo il dosaggio della 1-4 glucosidasi rappresenta un parametro utile nella diagnostica differenziale delle azoospermie.

Con l'obiettivo di semplificare lo studio di tali marcatori biochimici, il nostro gruppo ha messo a punto una tecnica per la determinazione quantitativa della 1-4 glucosidasi nel liquido seminale; ciò avviene con l'impiego del maltosio come substrato naturale e con la determinazione successiva della quantità di glucosio risultante dalla scissione del maltosio, utilizzando il metodo della glucosio ossidasi (15) (Alsina et al, 1995).

VII - TEST FUNZIONALI E ATTUALITÀ: RELAZIONE CON LA MICROINIEZIONE SPERMATICA

È stato ripetutamente detto che l'applicazione della microiniezione spermatica come tecnica di riproduzione assistita per i casi d'infertilità maschile severa ha rivoluzionato in molti aspetti il concetto di fisiologia spermatica. Il concetto di funzionalità spermatica ne risulta coinvolto, in quanto ciò che si va a valutare è la capacità fecondante di un singolo spermatozoo.

Quando si microinietta uno spermatozoo nel citoplasma dell'ovocita, l'obiettivo finale è la fusione del nucleo spermatico con il nucleo attivato dell'ovocita. Affinché ciò avvenga dovranno verificarsi determinate condizioni quali l'incorporazione dello spermatozoo nel citoplasma dell'ovocita, il completamento della divisione meiotica con l'espulsione del secondo globulo polare, l'attivazione metabolica dell'ovocita inizialmente quiescente, la decondensazione del nucleo

spermatico e dei cromosomi sia nel pronucleo maschile che in quello femminile, infine la migrazione citoplasmatica del pronucleo. Il centrosoma dello spermatozoo, una volta all'interno dell'ovocita, sarà responsabile della formazione dei microtubuli che caratterizzeranno l'aster (tappa essenziale nella fecondazione). Inoltre lo spermatozoo stesso libera nell'ovocita un fattore di attivazione come proposto nel modello ideato da Dozortsev (Dozortsev, 1997) (70).

Un qualsiasi errore che si verifica in uno di questi passaggi, avrà come conseguenza un errore di fecondazione. Tuttavia non sono più necessarie determinate condizioni (fondamentali affinché lo spermatozoo possa legarsi e fecondare l'ovocita) quali la maturazione epididimaria, l'acquisizione della motilità, la capacitazione e infine la reazione acrosomiale.

Vengono trattati i concetti che sono cambiati utilizzando la ICSI (riguardo al potenziale fecondante) e quelli che si sono confermati importanti:

1. NUOVI CONCETTI DI FUNZIONE SPERMATICA

Il concetto principale che è cambiato con l'applicazione della ICSI è la possibilità di ottenere fecondazione, sviluppo embrionario e gravidanza a partire da spermatozoi epididimari o testicolari.

In un lavoro di Ghazzawi et al. (71) (1998) si è dimostrato che il tasso di fecondazione non varia utilizzando spermatozoi testicolari, epididimari o eiaculati. Quindi, la maturazione spermatica e la capacitazione prima della fecondazione si dimostrano ininfluenti.

Non è inoltre necessario che gli spermatozoi subiscano una reazione acrosomiale per essere in grado di fecondare, né che siano sottoposti a trattamenti particolari (43)

(Liu, 1994). Neanche la morfologia riveste un ruolo importante in ICSI, al contrario di ciò che si verifica nella fecondazione in vitro; si ottengono tassi di fecondazione sovrapponibili indipendentemente dalla morfologia spermatica (62) (Svalander, 1996). D'altra parte non sembra neanche che l'infertilità maschile severa comprometta l'impianto o la gravidanza (56) (Oehninger, 1998).

2. CONCETTI RIMASTI INVARIATI

Rimane scontato che affinché uno spermatozoo conservi la propria capacità fecondante debba possedere determinate caratteristiche: la principale è la vitalità, che si può dimostrare con la motilità. Quindi la sola motilità si richiede negli spermatozoi che si vanno a selezionare come vivi, come descritto in un lavoro (38) (Van den Bergh et al., 1998) dove è stata misurata la velocità rettilinea degli spermatozoi che venivano microiniettati ed è stata dimostrata una maggiore percentuale di fecondazione (84% vs 68%) negli spermatozoi con più alto VSL. Questo è il primo lavoro in cui si dimostra una chiara relazione tra la motilità dello spermatozoo microiniettato e il tasso di fecondazione. Ancora una volta la motilità spermatica si rivela uno dei principali parametri connessi alla capacità fecondante dello spermatozoo. La diminuzione o la perdita della motilità, in molti casi, si associano ad altre alterazioni quali, ad esempio, quelle del DNA (39) (Kao, 1995).

Lo spermatozoo che si microinietta deve possedere una cromatina in grado di decondensarsi nel momento in cui entra in contatto con il nucleo dell'ovocita. È stato dimostrato recentemente che i cambiamenti strutturali della cromatina possono verificarsi a distanza di tempo dalla coltura e entro un tempo di 2 ore nel caso di sperma congelato e scongelato (72) (Goud et al., 1998).

Sebbene non risulti necessaria la maturazione epididimaria per lo spermatozoo affinché si completi la maturazione nucleare (47) (Auger, 1993), numerosi gruppi hanno dimostrato che pazienti con infertilità di origine maschile presentano anomalie occulte nel nucleo spermatico, che si traducono in un maggior livello di condensazione della cromatina e in un maggior danno del DNA (73, 74) (Foresta 1992; Sailer, 1995). A conferma di ciò, in un altro recente lavoro (López et al., 1998) (75) gli autori suggeriscono che i campioni di seme di scarsa qualità impiegati nella ICSI presentino spermatozoi con una maggiore possibilità di contenere DNA frammentato malgrado la loro apparente normalità morfologica. Questi autori riferiscono che non sono noti gli effetti di tali osservazioni nella fecondazione degli ovociti con ICSI, né tanto meno nello sviluppo embrionario. Esistono lavori precedenti che mettono in relazione l'insuccesso della fecondazione mediante ICSI con alterazioni nella condensazione cromatinica (76) (Bedford, 1993). In altri studi è stata dimostrata l'esistenza di un fattore di attivazione (SOAF: sperm borne oocyte activatin factor) che compare durante la differenziazione dello spermatozoo e che viene a rafforzare l'idea che componenti perinucleari dello spermatozoo esercitino non soltanto un ruolo strutturale, ma anche una funzione nell'attivazione dell'ovocita (77) (Kimura et al., 1998).

Nonostante sia stata confermata l'inutilità della reazione acrosomiale nell'esito della fecondazione con ICSI, è stato dimostrato che la induzione della RA negli spermatozoi accelera il tempo di formazione dei pronuclei negli ovociti di criceti iniettati (78) (Lee et al., 1997).

Infine, si stanno realizzando studi che evidenziano l'importanza del centrosoma per l'esito della fecondazione, dimostrando che

alcuni fallimenti nella fecondazione possono essere associati a sue anomalie: errori nell'allungamento dei microtubuli dopo la formazione dell'aster, o la separazione del centrosoma dalla testa dello spermatozoo (79) (Heewitson et al., 1997).

CONCLUSIONI

Forse si dovrebbe distinguere il concetto di funzione spermatica nella fecondazione "naturale" (includendo come tale le Tecniche di Riproduzione Assistita: Inseminazione artificiale intrauterina e fecondazione in vitro) e nella fecondazione mediante microiniezione spermatica (ICSI). Nel primo caso le scarse pubblicazioni apparse negli ultimi anni riguardo i test di funzione e la capacità fecondante dello spermatozoo in generale ci dimostrano che non si è ottenuto un grande avanzamento nel campo. Potremmo così riassumere le conclusioni finali:

1 - L'analisi del liquido seminale di base (concentrazione, motilità e morfologia) è di fondamentale importanza nello studio iniziale del maschio infertile, al fine di valutare evidenti disfunzioni.

2 - Nel caso delle azoospermie, il dosaggio della maltasi nel seme può orientare verso una diagnosi di azoospermia secretoria o ostruttiva.

3 - È necessario standardizzare i criteri nei laboratori di Riproduzione Assistita, sia per quanto riguarda il metodo che per le valutazioni diagnostiche.

4 - Effettuare i test di funzione negli spermatozoi selezionati (in condizione di capacitazione).

5 - Includere come test di base per lo studio della funzione spermatica: motilità oggettiva, test iposmotico, integrità nucleare del DNA, e opzionalmente la reazione acroso-

miale e i test biochimici, tenendo conto della VALUTAZIONE COMPLESSIVA dei test per selezionare la tecnica più adatta di Riproduzione Assistita.

6 - Nel caso in cui la tecnica selezionata sia la ICSI, bisogna tenere in considerazione che, sebbene le alterazioni spermatiche non siano strettamente legate ai risultati ottenuti, potrebbero comunque influire sui risultati stessi.

Riguardo il concetto di funzione spermatica nella fecondazione mediante microiniezione spermatica (ICSI), la rivoluzione della ICSI non riguarda solo la fisiologia spermatica ma anche il punto di vista clinico. Infatti la tendenza attuale rispetto allo studio del maschio infertile è la diminuzione della richiesta delle prove funzionali che caratterizzano un corretto iter diagnostico di disfunzio-

ne. Tuttavia, questo è un errore, come disse Irvine nelle conclusioni generali del Workshop dell'ESRHE: ... "Quello che il laboratorio di andrologia deve offrire è la capacità di selezionare la forma più idonea di trattamento per ciascuna coppia, specialmente quelle con infertilità di origine maschile, che spesso rimane nascosta. Le tre basi principali di un trattamento corretto in medicina sono: diagnosi, diagnosi e diagnosi. È estremamente difficile adeguare un trattamento corretto ad un paziente in cui la diagnosi rimane oscura. Di conseguenza, i test diagnostici più sofisticati non solo devono predire al paziente la probabilità dell'esito di un determinato trattamento, ma dovranno definire quale potrebbe essere il trattamento che non otterrà successo" (80) (Mortimer & Fraser, 1996).

BIBLIOGRAFIA

■ 1. Macomber D & Sanders MB.

Spermatozoa count, its value in the diagnosis, prognosis and treatment of sterility. *New Engl J Med* 2000, 981, 1929.

■ 2. MacLeod J & Gold RZ.

The male factor in fertility and infertility: and analysis of motile activity in the spermatozoa of 1000 fertile men and 1000 men in infertile marriage. *Fertil Steril* 2: 187, 1951.

■ 3. Homonnai ZT, Paz G, Weiss JN, Dabid MP.

Quality of semen obtained from 627 fertile men. *Int J Androl* 3: 217, 1980.

■ 4. Carlsen F, Giwercman A, Keiding N, Skakkeback NE.

Evidence for the decreasing quality of semen during the past 50 years. *Brit Med J* 305: 12, 1992.

■ 5. WHO

WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. Cambridge University Press, New York, 1992. 4Th edition.

■ 6. Aitken RJ, Irvine DS, Wu FC.

Prospective analysis of sperm-oocyte fusion and reactive oxygen species generation criteria for the diagnosis of infertility. *Am J Obstet Gynecol* 164: 542-551, 1991.

■ 7. Aitken RJ.

Evaluation of human sperm function. *British Medical Bulletin* 46: 654-74. 1990.

■ 8. Alvarez JG & Storey BT.

Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethal damage to human sperm during cryopreservation. *J Androl* 13: 232- 241, 1992.

■ **9. Meares EM.**

Prostatitis: A Review.

Urol Clin North Am 1: 46-70, 1975.

■ **10. Terquem A & Dadoune JP.**

Aniline blue staining of human spermatozoa chromatin: evaluation of nuclear maturation. In: The sperm cell. Andre J (ed), London: Martinus Nijhoff Publ., pp. 240-252, 1983.

■ **11. Dadoune JP.**

Correlation between defects in chromatin condensation of human spermatozoa stained by aniline blue and semen characteristics. Andrologia 20: 211-217, 1988.

■ **12. Hammadeh ME, Stieber M, Haidl G, Schmidt W.**

Association between sperm cell chromatin condensation, morphology based on strict criteria, and fertilization, cleavage and pregnancy in a IVF program.

Andrologia 30/1: 29-35, 1998.

■ **13. Tejada RI & Mitchell JC.**

A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence.

Fertil Steril 42: 87-91, 1984.

■ **14. Kruger T, Haque D, Acosta A.**

Correlation between sperm morphology, acrosin and fertilization in an IVF program.

Arch Androl 20: 237-241, 1988.

■ **15. Alsina J, Cortés S, Vázquez I, Caballero P, Núñez Calonge R.**

Alfa 1-4 glucosidase (maltasa) epididimaria: determinación por colorimetría de punto final y su utilidad en la investigación de la infertilidad masculina.

Rev Ib Fertil 4: 34-45, 1995.

■ **16. Jeyendran RS, Van der Ven HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld JLD.**

Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics.

J Reprod Fertil 70: 219-228, 1984.

■ **17. Robertson L, Eolf D, Tash JS.**

Temporal changes in motility parameters related to acrosomal status: identification and characterization of populations of hyperactivated human sperm.

Biol Reprod 39: 797-805, 1988.

■ **18. Burkman LJ.**

Hyperactivated motility of human spermatozoa during in vitro capacitation and implications for fertility. In: Controls of Sperm Motility: Biological and Clinical Aspects. Claude Gagnon (Ed.), CRC Press, Boca Raton, FL, 1990.

■ **19. Murray SC & Smith TT.**

Sperm interaction with fallopian tube apical membrane enhances sperm motility and delays capacitation.

Fertil Steril 68: 2, 351-356, 1997.

■ **20. Joshi N.**

The importance of computer assisted semen analysis and sperm function testing in an IVF program.

Int J Fertil Menopausal Stud 41: 1, 46-52, 1997.

■ **21. Mortimer D.**

Objective analysis of sperm motility and kinematics. In: Handbook of the Laboratory Diagnosis and Treatment of Infertility, Keek BA and Webster BW (Eds.), CRC Press, Boca Raton, FL, 1990.

■ **22. Olds-Clark P, Baer HM, Gerber WL.**

Human sperm motion analysis by automated (Hamilton-Thorn Motility Analyser) and manual (Image-80) digitization systems.

J Androl 11: 52-58, 1990.

■ **23. Núñez R, Vázquez I, Luengos A, Alsina J, Caballero P.**

Comportamiento cinético espermático pre y post condiciones de capacitación.

VI Congreso Nacional de Andrología, Vigo, 1993.

■ **24. Núñez R & Caballero P.**

Interpretación del Análisis de Movilidad espermática y estudio de las infertilidades idiopáticas.

Libro de Ponencias del VII Congreso Nacional de Andrología, Bilbao, 1-4 Octubre 1995.

■ **25. Sukcharoen N, Keith J, Irvine DS, Aitken RJ.**

Prediction of the in vitro fertilization (IVF) potential of human spermatozoa using sperm function tests: the effect of the delay between testing and IVF.

Human Reprod 11: 1030-1034, 1996.

■ **26. MacLeod IC & Irvine DS.**

The predictive value of computer-assisted semen analysis in the context of a donor insemination programme.

Human Reprod 1995.

■ **27. Núñez R, Vázquez I, Alsina J, Cortés S, Caballero P.**

Test de supervivencia espermática a las 24 horas de incubación, en muestras de IAC.

XXI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Fertilidad, Tenerife, 1996.

■ **28. Liu D & Baker G.**

Tests of human sperm function and fertilization in vitro. Fertil Steril 58:3, 465-470, 1992.

■ **29. Mortimer D, Courtot A M, Giovangrandi Y, Jeulin C, David G.**

Human sperm motility after migration into and incubation in, synthetic media.

Gamete Res, 9: 131, 1984.

■ **30. Aitken RJ & Clarkson JS.**

Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa.

J Reprod Fertil 81; 459-469,1987.

■ **31. Mortimer S.**

A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals.

Human Reproduction Update 3: 5, 403-439,1997.

■ **32. Mortimer ST, Swan MA, Mortimer D.**

Quantitative observations of flagellar motility of capacitating human spermatozoa.

Hum Reprod 12: 1006-1012, 1994.

■ **33. Centola GM.**

Differential responses of human sperm to varying concentrations of pentoxifyline with demonstration of toxicity.

J Androl 16: 136-142, 1995.

■ **34. Mbizvo MT Thomas S, Flugham DL, Alexander NJ.**

Human follicular fluid stimulates hyperactivated motility in human sperm.

Fertil Steril 54: 708-712, 1995.

■ **35. Anderson SH, Robertson L, Mortimer D.**

Investigation of the regulation of hyperactivated motility in human spermatozoa. In: Serio M (ed) Serono Symposia review, Supplement I. IV International Congress of Andrology, Miniposters, Ares-Serono Symposia, Rome, p. 117,1989.

■ **36. Gomez E & Aitken J.**

Impact of in vitro fertilization culture media on peroxidative damage to human spermatozoa, Fertil Steril 65: 880-882, 1996.

■ **37. Chan PJ.**

Enhanced fertility after heat-induced hyperactivation.

Fertil Steril 69:1, 118-121, 1998.

■ **38. Van den Bergh M, Emiliani S, Biramane J, Vannin A, Englert Y.**

A first prospective estudy of the individual straight line velocity of the spermatozoon and its influences on the fertilization rate after intracytoplasmic sperm injection.

Human Reprod 13:11, 3103-3107,1996.

■ **39. Kao S, Chao H, Wei H.**

Mitochondrial deoxyribonucleic acid 4977-bp deletion is associated with diminished fertility and motility of human sperm.

Biol Reprod 52: 729-736, 1995.

■ **40. Núñez-Calonge R, Caballero P, Redondo C, Baquero F, Martínez Ferrer M, Meseguer M.**

Ureaplasma urealyticum reduces motility and induces membrane alterations in human spermatozoa.

Human Reprod 13:10, 2756-2761, 1998.

■ **41. Wassarman PM.**

Sperm egg recognition mechanisms in mammals.

Curr Top Dev Biol 30: 1-19,1995.

■ **42. Tesarik J & Mendoza C.**

Appropriate timing of the acrosome reaction is a major requirement for the fertilizing spermatozoa.

Human Reprod 4: 957-961, 1989.

■ **43. Liu D & Baker G.**

Tests for sperm zona pellucida binding and penetration. In: Tesarik J (ed) Male Factor in Human Infertility, Frontiers in Endocrinology, vol. 8 Ares Serono Symposia. Rome, pp, 169-185, 1994.

■ **44. Cummins JM, Pember SM, Jequier AM, Yovich JL, Hartmann PE.**

A test of the human sperm acrosome reaction following ionophore challenge. Relationship to fertility and other seminal parameters. *J Androl* 12, 98-103, 1991.

■ **45. Tesarik J & Mendoza C.**

Alleviation of acrosome reaction prematurity by sperm treatment with egg yolk. *Fertil Steril* 63: 153-157, 1995.

■ **46. Bedford JM, Calvin H, Cooper GW.**

The maturation of spermatozoa in the human epididymis. *J Reprod Fertil* 18 (Suppl): 199-213, 1973.

■ **47. Auger J & Dadoune JP.**

Nuclear status of human sperm cells by transmission electron microscopy and image cytometry: changes in nuclear shape and chromatin texture during spermiogenesis and epididymal transit. *Biol Reprod* 49: 166-175, 1993.

■ **48. Cortés S, Núñez R, Cisneros GS, Caballero P.**

Correlación entre integridad nuclear del ADN, recuperación espermática y tasa de fecundación en ICSI. X Congreso Nacional de Andrología, Alicante. España, 2001.

■ **49. Verheyen.**

Comparaison of different hypoosmotic swelling solutions to select viable inmotile spermatozoa for potential use in intracytoplasmic sperm injection. *Human Reprod Update* 3,3: 195-200, 1997.

■ **50. Ahmadi JH & Ng.**

The single sperm curling test, a modified hypoosmotic swelling test, a potential technique for the selection of viable sperm for intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 68/2: 346-348, 1997.

■ **51. Liu D.**

High fertilization rate obtained after intracytoplasmic sperm injection with 100% non motile spermatozoa selected by using a simple modified hypoosmotic swelling test. *Fertil Steril* 68/2: 373-381, 1997.

■ **52. Cortés S, Caballero P, Alsina J, Núñez R.** Integridad nuclear en espermatozoides sometidos a soluciones hipoosmóticas para su utilización en ICSI.

XXII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Fertilidad, Madrid 1998.

■ **53. Vermes I & Haanen C.**

A novel assay for apoptosis: flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescence labeled annexin V. *J Immunol Methods* 180: 39-52, 1998.

■ **54. Glander HJ & Schaller J.**

Binding of annexin V to plasma membranes of human spermatozoa: a rapid assay for detection of membrane changes after cryostorage. *Molecular Human Reproduction* vol 5/2: 109-115, 1999.

■ **55. Oehninger S.**

Semen quality: is there a paternal effect on pregnancy outcome in in-vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection ? *Human Reprod* 13/8: 2161-2164, 1998.

■ **56. Seracchioli R, Porcu EE, Flamigni C.**

Sperm morphology is not the only criteria of male infertility. *Human Reprod* 10: 1039-1041, 1995.

■ **57. Grow DR, Oehninger S, Seltman HJ.**

Sperm morphology as diagnosed by strict criteria: probing the impact of teratozoospermia on fertilization rate and pregnancy outcome in a large in vitro fertilization population. *Fertil Steril* 62: 559-567, 1995.

■ **58. Claessens OE, Menkveld R, Franken DR.**

The acridine orange test: determining the relationship between sperm morphology and fertilization in vitro. *Human Reprod* 7: 242-247, 1992.

■ **59. Nagy ZP, Verheyen, Tournaye H, Van Steirteghem AC.**

Special applications of intracytoplasmic sperm injection: The influence of sperm count, motility, morphology, source and sperm antibody on the outcome of ICSI. (1998) *Human Reprod* 13, suppl 1:143-154, 1998.

■ **60. Troloudes DM.**

Pregnancy with spermatozoa from a globozoospermic man after intracytoplasmic sperm injection treatment.

Human Reprod 10/4: 880-882, 1995.

■ **61. Tasdemir I, Tasdemir M, Tavukcuoğlu S, Lahraman S, Biberöglü I.**

Effect of abnormal sperm head morphology on the outcome of intracytoplasmic sperm injection in humans.

Human Reprod 12 (6): 1214-7, 1997.

■ **62. Svalander P, Jakobsson A.**

The outcome of intracytoplasmic sperm injection is unrelated to strict criteria sperm morphology.

Human Reprod 11: 1019-1022, 199.

■ **63. Plachot M.**

In vitro fertilization in case of male infertility. National survey.

Contracept Fertil Sex, 15/7-8: 699-700, 1987.

■ **64. Coccia ME, Becattini C.**

A sperm survival test and in vitro fertilization outcome in the presence of male factor infertility.

Human Reprod, 12/9: 1969-1963, 1997.

■ **65. Krausz C, West K, Buckingham D, Aitken RJ.**

Stimulation of oxidant generation by human sperm suspensions using phorbol esters and formyl peptides: relationship with motility and fertilization in vitro.

Fertil Steril 1994.

■ **66. Núñez R, Cortés S, Alsina J, Vázquez I, Caballero P.**

Efecto de la contaminación de eyaculados con leucocitos sobre la viabilidad espermática. XXII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Fertilidad, Madrid, 1998.

■ **67. Tombes RM & Shapiro BM.**

Metabolite channelling. A phosphorilcreatine shuttle to mediate high energy phosphate transport between sperm mitochondrion and tail.

Cell 41: 325-334, 1985.

■ **68. Huszar G, Vigue L, Corrales M.**

Sperm creatine kinase activity in fertile and infertile oligospermic men.

J Androl 11 (1): 40-6, 1990.

■ **69. Huszar G, Vigue L, Morshedi M.**

Sperm creatine kinase phosphokinase M-isof orm ratios and fertilization potential of men: a blinded study of 84 couples treated with in vitro fertilization.

Fertil Steril 57(4): 882-8 1992.

■ **70. Dozortsev D & Qian C.**

Sperm associated oocyte activating factor is released from the spermatozoon within 30 min after injection as a result of the sperm-oocyte interaction.

Human Reprod 12: 2792-2796, 1997.

■ **71. Ghazzawi M.**

Comparison of the fertilizing capability of spermatozoa from ejaculates, epididymal aspirates and testicular biopsies using intracytoplasmic sperm injection.

Human Reprod 13/2 : 348-352, 1998.

■ **72. Goud PT, Goud AP, Rybouchkin AV, De Sutter P, Dhont M.**

Chromatin decondensation, pronucleus formation, metaphase entry and chromosome complements of human spermatozoa after intracytoplasmic sperm injection into hamster oocytes.

Human Reprod 13 (5): 1336-45, 1998.

■ **73. Foresta C.**

Sperm nuclear instability and staining with aniline blue: abnormal persistence of histones in spermatozoa in infertile men.

Int J Androl 15: 330-37, 1992.

■ **74. Sailer BL.**

Mammalian sperm DNA susceptibility to in situ denaturation, associated with the presence of DNA strand-breaks as measured by the terminal deoxynucleotidyl transferase assay.

J Androl 16: 80-87, 1995.

■ **75. Lopes S, Jurisicova A, Casper R.**

Gamete-specific DNA fragmentation in unfertilized human oocytes after intracytoplasmic sperm injection.

Human Reprod 13: 703-708, 1998.

■ **76. Bedford JH & Kim HH.**

Sperm/egg binding patterns and oocyte cytology in retrospective analysis of fertilization failure in vitro.

Human Reprod 8: 453-463, 1993.

■ **77. Kimura Y & Yanagimachi R.**

Analysis of mouse oocyte activation suggests the involvements of sperm perinuclear material. Biol Reprod 58/6: 1407-1415, 1998.

■ **78. Lee DR, Lee JE, Yoon HS, Roh S.**

Induction of acrosome reaction in human spermatozoa accelerates the time of pronucleus formation of hamster oocytes after intracytoplasmic sperm injection.

Fertil Steril 67/2: 315-320, 1997.

■ **79. Hewitson L, Simerly C, Schatten G.**

Inheritance defects of the sperm centrosome in humans and its possible role in male infertility. Int J Androl Suppl 20/3: 35-43, 1997.

■ **80. Mortimer D & Fraser L.**

Consensus Workshop in Advanced Andrology (Excerpts on Human Reproduction), n°3, 1996.

EPIDIDYMITIS AND ORCHITIS ANDROLOGICAL IMPLICATIONS

Gerhard Haidl & Wolfgang Weidner¹

Klinik und Poliklinik für Dermatologie, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, 53105 Bonn
¹Urologische Klinik, Justus-Liebig-Universität Gießen, 35385 Gießen (Germany)

Acute epididymitis and orchitis are painful conditions accompanied by fever and further discomforting symptoms and do normally not occur in the fertility clinic.

However, sequelae of such disorders – if not treated appropriately – can severely impair fertility (*Wilton et al., 1988*).

Compared to the acute forms of inflammation, chronic inflammatory processes in the testis and epididymis provide much bigger diagnostic and, consequently, therapeutic problems.

Chronic nonspecific genital infections and sequelae of acute, recurrent, and chronic genital infections are frequently observed in infertile patients. The diagnosis is obviously difficult because in most cases these infections are „silent“, which means that the patients are not impaired in their general health and seldom do they feel local discomfort (*Haidl & van der Ven, 1997*). Either the epididymis is affected alone

by such inflammations or the testicular tissue is involved as well.

Therefore, it can be distinguished between

- Epididymitis
- Epididymo-orchitis
- Several forms of orchitis

(*Weidner, 1998a; Weidner, 1998b*)

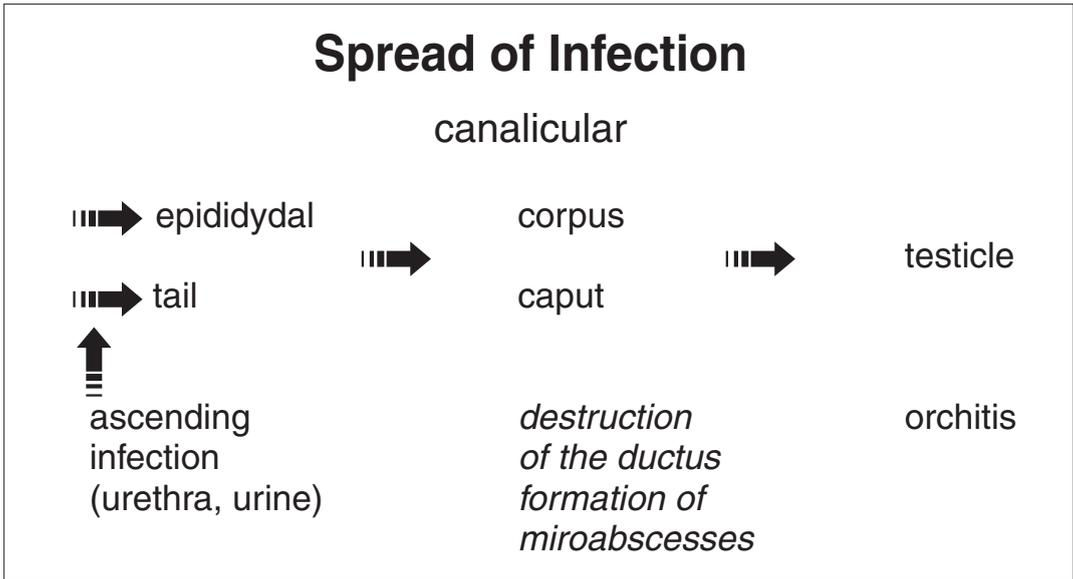
Epididymitis Acute epididymitis

The classification of epididymitis and orchitis depends on etiology (*Weidner and Krause, 1999*) (Table 1). Acute epididymo-orchitis of the adult is the most common type. It is reported that acute epididymo-orchitis in young males is associated with sexual activity and infection of the consort (Clinical Effectiveness Group, 1999). The disease caused by sexually transmitted organisms, *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis*, mainly occurs in males under the

Table 1 Classification of Acute Epididymitis and Orchitis (according to Weidner and Krause, 1999)

| <i>Nonspecific</i> | <i>Specific</i> | <i>Viral</i> |
|--|---|-------------------------------|
| Acute bacterial epididymo-orchitis: N. gonorrhoeae C. trachomatis E. coli (and other Enterobacteriaceae) | Specific granulomatous Tuberculosis Lues Brucellosis | Mumps orchitis Coxsackie-B |
| Nonspecific chronic epididymo-orchitis Granulomatous (idiopathic) orchitis Orchitis of the child Pneumococci Salmonella Klebsiella Hemophilus influenzae | | |

Fig. 1: Spread of infection in acute epididymits (*Nistal and Paniagua, Testicular and Epididymal Pathology, 1984*)



age of 35 years. The majority of cases are due to common urinary pathogens, e.g., *Escherichia coli*. Bladder outlet obstruction caused by benign prostate hyperplasia or urogenital malformations are risk factors for this type of infection. The spread of microorganism is canalicular from the urethra via the spermatic pathways (*Nistal & Paniagua, 1984*) (Figure 1).

Search for microorganisms in acute epididymitis depends upon the medical history, age and the evidence of urethritis and/or uri-

nary tract infection (*Berger 1984; Clinical Effectiveness Group, 1999; Weidner, 2001*) (Table 2). Evidence of *C. trachomatis* or *N. gonorrhoeae* in the urethral compartment or gramnegative bacteria or enterococci in the midstream urine means the evidence of the etiological microorganism (*Weidner, 2001*).

Initial antibiotic therapy with modern fluoroquinolones is the therapy of choice, if the microbiologic origin is not known. The efficacy of such a therapy is between 80 -

Table 2: Search for Microorganisms in Acute Epididymitis

| | | | |
|----------------------------------|--|------------------------|-------------------------------------|
| younger, urethritis, STD-history | <i>C. trachomatis</i> <i>N. gonorrhoeae</i> | leukocytes PCR, LCR | gram-stain leukocytes culture |
| older, UTI cbp | gramnegative B. enterococci | leukocytes culture | |

Table 3: Acute Epididymitis: Fluoroquinolones as Initial Therapy

| Author | Substance | n | Bacteriological cure [%] |
|---|---------------|----|--------------------------|
| Weidner et al. Drugs 34, 111 (1987) | ofloxacin | 20 | 80 |
| Weidner et al. Urologe A 29, 272 (1990) | ofloxacin | 70 | 91 |
| Saito et al. Drugs 45, 379 (1993) | levofloxacin | 23 | 100 |
| Eickhoff et al. BJU 84, 827 (1999) | ciprofloxacin | 76 | 80 |

100 percent (*Weidner et al., 1987; Weidner et al. 1990; Saito et al., 1993; Eickhoff et al., 1999*) (Table 3). Guidelines of the German STD-Society (*Weidner, 2001*) cover all further aspects of different therapeutic schedules according to the culture proven etiology (Table 4). One severe complication in these cases may be the development of abscess formation, we observed such a complication

in 6 of 70 men with initially treated epididymitis, all of these patients underwent surgical therapy (*Weidner et al., 1990*). Torsion of the spermatic cord is the main differential diagnosis especially in per-acute epididymitis with affection of the testis (epididymo-orchitis). It should be excluded by Doppler- or Duplex-sonographic verification of an intact testicular perfusion (*Weidner, 2001*).

Table 4: Therapy of Epididymitis (Guidelines of the German STD - Society)

| | | | |
|-----------------------|---------------------------------|--------|-------------------------|
| N. gonorrhoeae | Ceftriaxon | i.m. | 250 mg / 1x |
| | or Ciprofloxacin | per os | 500 mg / 1x |
| | + Doxycyclin | per os | 100 mg / 2x for 14 days |
| C. trachomatis | Doxycyclin | per os | 100 mg / 2x for 14 days |
| Gramnegative bacteria | Ofloxacin | per os | 200 mg / 2x for 14 days |
| | (Levofloxacin) Ciprofloxacin | per os | 500 mg / 2x for 14 days |

Normally, a surgical intervention, proposed in the era before a rationale antibiotic therapy (Vordermark et al., 1990), is not the therapeutic standard of today. A very rare, but not forgotten entity is the infarction of the testis, requiring orchiectomy in these cases (Kirk et al., 1982). The most frequently indicated surgical intervention is the suprapubic catheterization in all cases with clinical suspicion for a “significant” bladder outlet obstruction, e.g. in cases with BPH, residual volume or hints for a neurogenic bladder (Philipp et al., 1997; Weidner, 2001). Further andrological complications are detailed in the consecutive chapters, but intermittent OAT-syndrome, testicular azoospermia and obstructive azoospermia occur especially after bilateral epididymitis (Weidner et al., 1999; Diemer & Desjardins, 1999).

Chronic Epididymitis

As pointed out above, there are rarely any clinical symptoms in chronic epididymitis. Sometimes, a slight pain may be felt by the patient, in some cases thickening and induration of the epididymis may be found on palpation. Thus, diagnostic clues with regard to semen analysis in these chronic inflamma-

tory conditions are more conclusive and will be discussed in the following.

There is general agreement that common sperm parameters – count, motility and morphology (which is mostly confined to assessment of normal forms) – do not allow reliable fertility prognosis and introduction of rational therapy. Specification of andrological disturbances according to sperm parameters permits „diagnoses“ such as the OAT-syndrome, but correlation to basic causes and, therefore, establishment of a nosology is not possible.

However, it is very important to classify fertility disorders according to causes, origin, and severity in order to undertake appropriate steps. Apart from the essential clinical examination, a possible approach is the exact analysis of sperm morphology. Counting merely the percentage of normal-shaped spermatozoa, which is suggested in most classifications of sperm morphology, will only give some information on the present fertility potential of a semen sample, but does not allow any conclusions about the kind, severity and possible treatment of a disturbance. These considerations are paid due respect in the Düsseldorf classification of sperm morphology (Table 5).

Table 5: Düsseldorf classification of sperm morphology

Normal forms

Alterations of the sperm head

Hyperelongation of the postacrosomal region (I-III°)

Acrosome defects (I-II°)

Combined acrosome-defective and hyperelongated forms (I-II°)

(Amorphous heads, megalo- and microforms, twin- and multiheaded spermatozoa)

Midpiece and tail disturbances

Ia° Atypical staining behaviour

Ib° Structural shaft disturbance

II° Breaking and coiling

III° Rudiments (Hofmann, 1988) (Fig. II-IV)

Fig. II – IV: Examples of the Düsseldorf classification of sperm morphology



Figure II: Normal sperm on the left, followed by increasing degrees of hyperelongations I – III from left to the right. Semen smear, Shorr-staining, x 1000

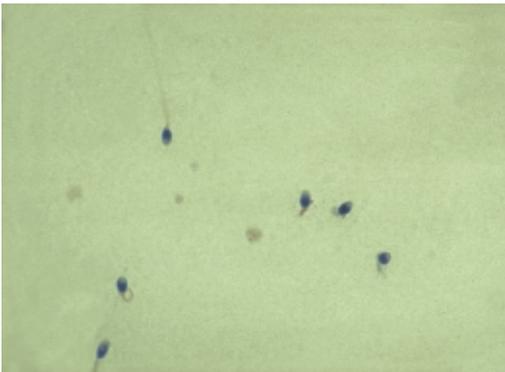


Figure III: Acrosome defect heads and tail disturbances III° (rudiments)

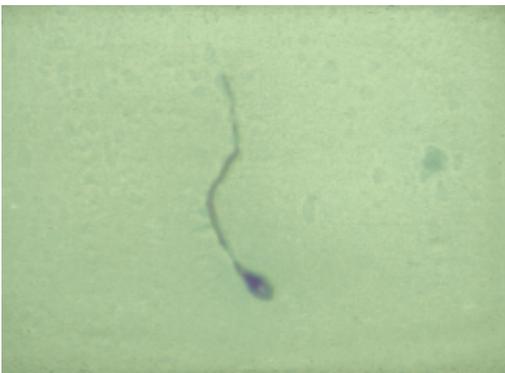


Figure IV: Hyperelongated head, structural tail defect (Ib°)

For example, it has been demonstrated that hyperelongated forms can be referred to functional disturbances of the Sertoli-cells and can, therefore, be considered as less severely disturbed compared to acrosome defect spermatozoa, caused by disturbances of the Leydig cells and basal spermatogonia (Hofmann & Haider, 1985). Such cells can't even be used for ICSI-treatment. Moreover, the Ia° tail disturbance has been shown to be of epididymal origin (Haidl *et al.*, 1993).

Therefore, in the following, changes of sperm morphology in epididymitis and orchitis will be described according to the Düsseldorf classification.

Whereas acute epididymitis represents a clinical diagnosis and semen analysis is not possible in this condition, chronic inflammatory processes of the seminal tract are a.o. diagnosed by examination of the ejaculate.

The patients' fertility is normally not impaired by a prostatic infection alone (Weidner *et al.*, 1991); however, it may be severely disturbed in case of epididymal involvement. In order to interpret changes of semen parameters correctly, one has to reflect the physiological functions of the epididymis:

- Development of sperm motility
- Further changes of the sperm membrane for achievement of complete fertilizing capacity
- Sperm storage (Haidl *et al.*, 1993)

Consequently, there may be alterations of sperm count and motility as well as of several sperm functions caused by inflammatory influences in the epididymis. On the other hand, sperm morphology should not be affected, apart from severe epididymal dysfunction with necrozoospermia where complete disintegration of sperm structures was described (Wilton *et al.*, 1988).

Conventional sperm parameters

Decreased sperm count and motility *per se* are quite uncharacteristic symptoms that may also occur due to testicular failure. How can they be assigned to epididymal disturbances?

Abnormal staining of the sperm tails

As pointed out above, we have reported earlier that low motility caused by epididymal dysfunction is associated with an atypical staining behaviour of sperm tails during the Shorr staining technique. In this procedure, human sperm tails usually stain red; however, in case of disturbed epididymal maturation flagella appear bluish without exhibiting further defects (Fig. V). Such spermatozoa were shown to be immotile. The motility disturbance was related to epididymal dysfunction by histological examination of tissues from the testis, rete testis and different epididymal sections as well as by smears of epididymal fluid from the caput epididymidis.

It was demonstrated that the process of normal staining, which indicates progressive motility, occurs in the distal caput or at the transition from caput to corpus epididy-



Figure V: Abnormal staining behaviour of sperm tails (arrow-heads) vs. normally stained flagella in the Shorr-staining technique

midis. Moreover, we could show that immature and immotile spermatozoa from the caput epididymidis developed a good progressive motility after in-vitro stimulation with phosphatidylcholine, which was accompanied by a decrease of abnormally stained tails (*Haidl et al., 1993*).

In further studies an increase of the concentration of phosphatidylcholine during epididymal transit was reported as well as a change of the pattern of fatty acids and a decrease in the cholesterol/phospholipid molar ratio, which causes an improved membrane fluidity (*Haidl & Opper, 1997*). These changes of membrane lipids during epididymal maturation fit well into the concept of the abnormal staining behaviour, because the red dye in the Shorr staining solution, Biebrich scarlet, is a lipid dye. Epididymal spermatozoa with a lower content of phospholipids do obviously not integrate this dye leading to the bluish appearance of the sperm tails.

Therefore, consideration of the staining abnormality can be helpful to refer the symptom „asthenozoospermia“ to epididymal dysfunction, in particular in case of chronic epididymal inflammation.

Sequential ejaculates

Alterations of the sperm count may be due to impairment of spermatogenesis or – amongst further causes – due to disturbed epididymal outlet. In such cases examination of sequential ejaculates has been shown to be useful. *Tur Caspa et al. (1990)* reported on oligozoospermic patients yielding much better results in the second ejaculate, however, without referring this observation to epididymal dysfunction. *Cooper et al. (1993)* suggested repeated ejaculations after initial depletion of extra-

gonadal reserves and a subsequent time of sexual abstinence of 10 days. Using such a protocol they could observe a significant increase of sperm count, number of normal and number of motile spermatozoa in healthy donors as well as in oligozoospermic patients. We share a similar experience, especially in patients also revealing the above mentioned phenomenon of abnormally stained sperm tails, so that assessment of sequential ejaculates seems an additional useful tool for diagnosing epididymal dysfunction (Haidl et al., 1994).

Inflammatory cells

In addition to changes of sperm count and motility diagnosis of chronic epididymitis requires inflammatory signs in the ejaculate (Wolff et al., 1990). However, as only 10% of the seminal fluid originates from the epididymis, it must be assumed that in torpid chronic infections of the epididymis the number of inflammatory cells in the ejaculate may be rather low. Therefore, a concentration of leukocytes below 1 mio/ml – as it has been proposed by WHO to indicate inflammations of the male genital tract (WHO, 1999) – does not necessarily exclude an epididymal inflammation. We have pointed out earlier that the occurrence of

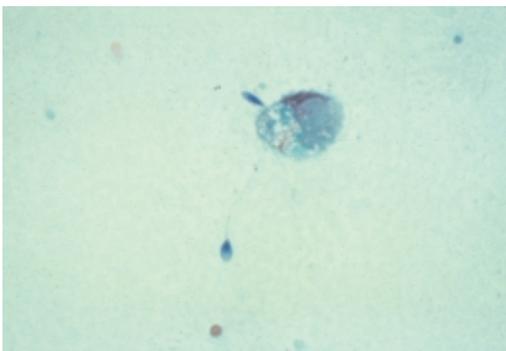


Figure VI: Macrophage phagocytizing a spermatozoon

macrophages, which have been shown to be the main immunocompetent cells in murine epididymis (Nashan et al., 1989), should be considered for establishment of the diagnosis of chronic epididymitis (Haidl, 1990) (Fig. VI).

Biochemical markers

A further useful tool for the diagnosis of chronic inflammations of the male genital tract is the determination of granulocyte elastase or interleukins, in particular interleukin 6. High correlations with the number of leukocytes, macrophages as well as the percentage of atypically stained flagella and sperm motility have been observed (Reinhardt et al., 1997).

Determination of α -glucosidase seems to be useful as well. Although the clearest results are obtained in the differential diagnosis of obstructive vs. non-obstructive azoospermia, it has also been shown by various authors that in case of chronic epididymitis the concentration of α -glucosidase may be subnormal (Cooper et al., 1990; Mahmoud et al., 1998).

If the possibility of determination of reactive oxygen species (ROS) exists, such an examination may be helpful to detect inflammatory processes. It is well known that by far the biggest portion of ROS in the seminal plasma is produced by leukocytes (Aitken et al., 1992).

The seminal plasma possesses a high antioxidative capacity, which may be overloaded by activation of leucocytes or by increased numbers of leucocytes. ROS cause an increased lipid peroxidation which finally results in impairment of important sperm functions like motility or acrosome reaction (Ochsendorf, 1998).

The occurrence of antisperm antibodies in cases of inflammatory conditions in the epididymis and testis due to disturbed blood-testis and blood-epididymis barrier is well imaginable, but has – so far- not yet been convincingly demonstrated (*Weidner, 1998b*).

Microbiological investigations

The significance of bacteria in chronic epididymal affections is not fully understood. Obviously there are bacterial and non-bacterial forms of inflammation. Bacteria may give rise to an epididymal inflammation; however, whether these processes are maintained by bacteria or continued by non-bacterial immunologic phenomena has not yet been clarified (*Wolff et al., 1991*). In experimentally induced epididymitis in rats with *E. coli*, inflammation proceeded without positive cultural findings after some days (*Weidner et al., 1989*). Consequently, microbiological investigations of the ejaculate should be carried out in patients to look for germs like *Chlamydia*, ureaplasma, mycoplasma and *E. coli*. However, as just carried out, negative bacteriological results do not exclude an epididymal infection (*Land et al., 1998*).

In summary, the diagnosis of chronic epididymitis comprehends low sperm motility in association with functional sperm tail disturbances characterized by an abnormal staining phenomenon in the Shorr technique, more or less increased numbers of inflammatory cells, in particular macrophages, elevated levels of marker substances such as granulocyte elastase or interleukin 6 and potentially a low sperm count, whereas the role of bacteria in these cases has still to be worked out .

Orchitis

An isolated inflammation of the testis, an orchitis, is a rare event. Most frequently it occurs in association with an epididymitis, as a so-called epididymo-orchitis. The spread of infection in orchitis is not always clear, the hematogenic and lymphogenic way occurs probably more frequently compared to the canalicular one via the epididymal duct. In contrast, epididymo-orchitis is always developing by ascending infection. Orchitis can be subdivided into specific-granulomatous forms in tuberculosis, syphilis, typhus or brucellosis, in viral forms, e.g. mumps orchitis as well as in non-specific-granulomatous orchitis of the adult and in epididymo-orchitis caused by *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* or by enterobacteria. Less known are inflammatory influences on the testes by severe influenza, hepatitis or infectious mononucleosis. Autoimmune-orchitis is known as an experimental model, where an orchitis is induced by active immunization with testis homogenate or bacteria (*Weidner 1998a*). As already pointed out, acute inflammations of the testes are normally not seen in the infertility clinic. With regard to chronic inflammatory conditions of the testes non-infectious orchitis, also called low-grade-autoimmune-orchitis, has been described (*Hofmann & Kuwert, 1979*). Leading symptom of acute orchitis is the painful testicular swelling, frequently accompanied by fever. Sonography reveals mostly a decreased however homogeneous echogenicity. In severe cases partial testicular infarctions can be observed by colour-Doppler sonography. For diagnosis of chronic testicular inflammations scrotal sonography is not very helpful (*Weidner, 1998a*). A slight pain, mostly intermittently, is the only clinical

symptom. However, palpation of the testis is distinctly painful. Delicate physical findings like slight decrease of the consistency of the testicles and a thickened periorchium may be present

Determination of virus serology should be carried out as well.

Histologically, giant cell infiltrates are observed in granulomatous forms of orchitis, viral and non-infectious forms are characterized by perivascular and peritubular round cell infiltrates. Some cases of orchitis remain restricted to some areas only, others show a diffuse spread, not seldom with the presence of mast cells. Finally, such inflammations may result in conditions known as „mixed atrophy“, others proceed to Sertoli-cell only syndromes. (Hofmann, 1988; Weidner, 1998a)

In patients with chronic torpid infections of the testis – the so-called low grade autoimmune-orchitis-, comparative histological examinations and semen analyses

have revealed a gap between the sperm count and the number of mature spermatids in the testis with much lower sperm counts than expected by the histological observation. This points to a disturbed testicular outlet of spermatozoa. Moreover, sperm motility is very low whereas sperm morphology remains unaffected, and the number of spermatids is not increased (Hofmann & Kuwert, 1979).

The other, different forms of orchitis caused by virus-infection (for example mumps) or epididymo-orchitis show impairment of sperm count, motility and morphology with high percentages of acrosome-defect spermatozoa and structural tail-defects (Hofmann, 1988).

Depending on the severity of the viral infection, sperm quality may be affected only temporarily and recover without treatment (for example in cases of influenza) (Weidner, 1998a).

The potential significance of antisperm-antibodies has already been mentioned above.

Table 6 Dosage regimen for drugs in the treatment of chronic epididymitis and orchitis

| Drug | Dosage | Duration of administration |
|------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| Antibiotics | | |
| Tetracyclines | 1.5-2g/day | 3-4 weeks |
| Doxycycline | 200mg/day | |
| Erythromycine | 1.5-2g/day | |
| Gyrase-inhibitors | 0.5-1g/day | |
| Antiphlogistics | | |
| Diclofenac | 2x50mg/day | 4-6 weeks |
| Indomethacine | 75-150mg/day | |
| Ketoprofen | 100-150mg/day | |
| Corticosteroids | | |
| (Methyl)prednisolone | 40-60mg/day (weekly reduction) | 4-6 weeks |

Treatment

There exist specific recommendations for treatment of acute epididymitis with antibiotics or of acute mumps-orchitis with interferone α or γ (Vieler *et al.*, 1993; Weidner, 1998a).

Apart from this there is no general agreement on the treatment of chronic inflammatory conditions of the male genital tract. No controlled studies on this subject are available so far.

There is some evidence that combined antiphlogistic and antibiotic treatment leads to improved semen quality in cases of chronic epididymitis, and epididymoorchitis. Moreover, treatment with nonsteroidal antiphlogistics has been recommended for inflammatory conditions of the testis as well,

in case of low-grade autoimmune-orchitis good experience has been reported by treatment with corticosteroids (Table 6) (Haidl & Schill, 1994; Martin Du Pan *et al.*, 1997; Montag *et al.*, 1998)

An interesting treatment-modality for orchitis and epididymoorchitis has been suggested by Vicari and Mongioi. Compared to conventional antiinflammatory treatment they obtained better results by additional treatment with a long-acting gonadotrophin-releasing hormone agonist. As mode of action they discuss an increased bloodflow in the testis and, therefore, a better local availability of the antiinflammatory drugs. For confirmation of this promising observation more studies are needed (Vicari & Mongioi, 1995).

References

■ **Aitken RJ, Buckingham D, West K, Wu FC, Zikopoulos K, Richardson DW.**

Differential contribution of leukocytes and spermatozoa to the generation of reactive oxygen species in the ejaculates of oligozoospermic patients and fertile donors. *J Reprod Fert* 94: 451-462, 1992.

■ **Berger RE**

Epididymitis. In: Holmes RK *et al.* (eds) *Sexually transmitted diseases*. McGraw-Hill, New York, pp 650-662, 1984.

■ **Clinical Effectiveness Group:**

National guideline for the management of epididymo-orchitis. *Sex Transm Inf* 75 (Suppl 1) 51-53, 1999.

■ **Cooper TG, Weidner W, Nieschlag E.**

The influence of inflammation of the human male genital tract on secretion of the seminal markers alpha-glucosidase, glycerophosphocholine, carnitine, fructose, and citric acid. *Int J Androl* 13: 329-336, 1990.

■ **Cooper TG, Keck C, Oberdieck U, Nieschlag E.**

Effects of multiple ejaculations after extended periods of sexual abstinence on total, motile and normal sperm numbers, as well as accessory gland secretions, from healthy normal and oligozoospermic men. *Hum Reprod* 8: 1251-1258, 1993.

■ **Diemer Th & Desjardins C**

Disorders of spermatogenesis. In: Knobil E, Neill JD (eds) *Encyclopedia of Reproduction Vol 4* Academic Press San Diego, pp 546-556, 1999.

■ **Eickhoff JH & Frimodt-Møller C:**

A double-blind, randomized, controlled multicenter study to compare the efficacy of ciprofloxacin with pivampicillin as oral therapy for epididymitis in men over 40 years of age. *BJU International* 84: 827-834, 1999.

■ **Haidl G.**

Macrophages in semen are indicative of chronic epididymal infection. *Arch Androl* 25: 5-11, 1990.

■ **Haidl G & Schill W-B.**

Nonhormonal treatment of male infertility. In: Treating male infertility. GM Colpi & M Balerna (eds.), Basel, Karger, pp. 29-37, 1994.

■ **Haidl G & Oppert C.**

Changes in lipids and membrane anisotropy in human spermatozoa during epididymal maturation. Hum Reprod 12: 2720-2723, 1997.

■ **Haidl G & van der Ven H.**

Chronic genital inflammation in the male – an easily missed diagnosis. Hum Reprod 12: 2082, 1997.

■ **Haidl G, Rommel JD, Schill W-B.**

Sperma-Pooling als Möglichkeit zur Erhöhung der Zahl befruchtungsfähiger Spermatozoen. Z Hautkr 69: 95-96, 1994.

■ **Haidl G, Badura B, Hirsch KD, Ghyczy M, Gareiß J, Schill W-B.**

Disturbances of sperm flagella due to failure of epididymal maturation and their possible relationship to phospholipids. Hum Reprod 8: 1070-1073, 1993.

■ **Hofmann N.**

Wege zur Andrologie. Edition TAD, Cuxhaven, 1988.

■ **Hofmann N & Kuwert E.**

Die chronische, nicht erregerbedingte Orchitis. Z Hautkr 54: 173-180, 1979.

■ **Hofmann N & Haider SG.**

Neue Ergebnisse morphologischer Diagnostik der Spermatogenesestörungen. Gynäkologie 18: 70-80, 1985.

■ **Kirk D, Gingell JC, Feneley RC:**

Infarction of the testis: a complication of epididymitis. Brit J Urol 54: 311-31, 1982.

■ **Land AJ, Evers JHC, Goossens VJ.**

How to use Chlamydia antibody testing in subfertility patients. Hum Reprod 13: 1094-1098, 1998.

■ **Mahmoud AM, Geslevich J, Kint J, Depuydt C, Huysse L, Zalata A, Comhaire FH.** Seminal alpha-glucosidase activity and male infertility. Hum Reprod 13: 591-595, 1998.

■ **Martin Du Pan R, Bischof P, de Boccard G, Campana A.**

Is diclofenac helpful in the diagnosis of partial epididymal obstruction? Hum Reprod 12: 396-397, 1997.

■ **Montag M, van der Ven H, Haidl G.**

Recovery of ejaculated spermatozoa for intracytoplasmic sperm injection after anti-inflammatory treatment of an azoospermic patient with genital tract infection: a case report. Andrologia 31: 179-181, 1998.

■ **Nashan D, Malorny U, Sorg C, Cooper TG, Nieschlag E.**

Immunocompetent cells in the murine epididymis. Int J Androl 12: 85-94, 1989.

■ **Nistal M & Paniagua R:**

Testicular and epididymal pathology. Thieme Stuttgart, 1984.

■ **Ochsendorf FR**

Infection and reactive oxygen species. Andrologia 30 (Suppl 1): 81 - 86, 1998.

■ **Philipp C, Steinbach F, Allhoff EP:**

Indikation zur suprapubischen Harnableitung bei Epididymitis. Urologe B: 37: 475, 1997.

■ **Reinhardt A, Haidl G, Schill W-B.**

Granulocyte elastase indicates silent male genital tract inflammation and appropriate anti-inflammatory treatment: Andrologia 29: 187-192, 1997.

■ **Saito I, Suzuki A, Saiko Y, Yokozawa M, Ono K:**

Acute nongonococcal epididymitis. Aetiology and levofloxacin therapy. Drugs 45 (Suppl 3) 379, 1993.

■ **Tur-Kaspa I, Dudkiewicz A, Confino E, Gleicher N.**

Pooled sequential ejaculates: a way to increase the total number of motile sperm from oligozoospermic men. Fertil Steril 54: 906-909, 1990.

■ **Vieler E, Jantos C, Schmidts HL, Weidner W, Schiefer HG.**

Comparative efficacies of ofloxacin, cefotaxime, and doxycycline for treatment of experimental epididymitis due to E coli in rats. Antimicrob Agents Chemother 37: 846-850, 1993.

■ **Vicari E & Mongioi A.**

Effectiveness of long-acting gonadotrophin-releasing hormone agonist treatment in combination with conventional therapy on testicular outcome in human orchitis/epididymo-orchitis. *Hum Reprod* 10: 2072 – 2078, 1995.

■ **Vordermark JS, Deskon GE, Jones Th A:**

Role of surgery in management of acute bacterial epididymitis. *Urology* 25: 283-287, 1990

■ **Weidner W.**

Entzündungen (Orchitis) In: W Krause, W Weidner (Hrsg) *Andrologie*. W Krause & W Weidner (eds), Stuttgart, Enke, pp. 161-163, 1998a.

■ **Weidner W.**

Epididymitis In: *Andrologie*. W Krause & W Weidner (eds), Stuttgart, Enke, pp. 201-206, 1998b.

■ **Weidner W.**

Epididymitis In: *Diagnostik und Therapie sexuell übertragbarer Krankheiten. Leitlinien 2001 der Deutschen STD Gesellschaft*. Petzold D, Gross G (Hrsg.) Springer Berlin-Heidelberg-New York, pp 13-18, 2001.

■ **Weidner W & Krause W**

Orchitis. In: *Encyclopedia of Reproduction*. In: Knobil E. Neill JD (eds) Vol 3 Academic Press, San Diego, pp 92-95, 1999.

■ **Weidner W, Schiefer HG, Garbe Ch**

Acute nongonococcal epididymitis. *Drugs* 34 (Suppl 1) 111-117, 1987.

■ **Weidner W, Prudlo J, Schiefer HG, Jantos C, Altmannsberger M, Aumüller G.**

Escherichia coli-Epididymitis der Ratte: Ein tierexperimentelles Modell der akut-eitrigen und chronisch-obstruktiven Entzündung. *Fertilität* 5: 151-155, 1989.

■ **Weidner W, Garbe Ch, Weißbach L, Harbrecht J, Kleinschmidt K, Schiefer HG, Friedrich HJ**

Initiale Therapie der akuten einseitigen Epididymitis mit Ofloxacin. *Andrologische Befunde. Urologe A* 29: 277-280, 1990.

■ **Weidner W, Schiefer HG, Jantos C, Haidl G, Friedrich HJ**

Semen parameters in men with and without proven chronic prostatitis. *Arch Androl* 26: 173-183, 1991.

■ **Weidner W, Krause W, Ludwig M**

Relevance of male accessory gland infection for subsequent fertility with special focus on prostatitis. *Human Reproduction Update* 5: 421-432 , 1999.

■ **WHO.**

Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 4th edition, Cambridge University Press, 1999.

■ **Wilton LJ, Temple-Smith PD, Baker HWG, de Kretser DM.**

Human male infertility caused by degeneration and death of sperm in the epididymis. *Fertil Steril* 49: 1052-1058, 1988.

■ **Wolff H, Politch JA, Martinez A, Haimovici F, Hill JA, Anderson DJ.**

Leukocytospermia is associated with poor semen quality. *Fertil Steril* 53: 528-536, 1990.

■ **Wolff H, Neubert U, Zebhauser M, Bezold G, Korting HC, Meurer M.**

Chlamydia trachomatis induces an inflammatory response in the male genital tract and is associated with altered sperm quality. *Fertil Steril* 55: 1017-1019, 1991.

SEASONAL CHANGES IN MEAN VALUES OF SEMINAL PARAMETERS AND HORMONE LEVELS IN ANDROLOGICAL PATIENTS

Amrey Krause & Walter Krause¹

Department of Mathematics, University of Bielefeld, D-33501 Bielefeld

¹Department of Andrology, Phillips University, D-35033 Marburg (Germany)

Introduction

Seasonal Changes of the rates of conception and deliveries are well documented in the literature, as it was summarised in the publication of *Rojanskynet al. (1992)*. The authors quote a study from Finland, in which the conception rates show a distinct maximum in summer, which is more pronounced in multiple than in singleton pregnancies, while the rates have a trough in winter (fig.1).

Ronnenberg and Aschoff (1990) summarised in an extremely extensive investigation conception rates from all over the world. They could show that the minimal conception rates are found in summer or in autumn, they also found multiple peaks throughout a year. In some countries the changes were more pronounced than in others, in particular in those with hot climate when compared to moderate temperatures (fig. 2).

The authors discuss on the basis of these and other findings, whether the changes have predominantly sociological or biological causes. The results published by *Ossenbuhn (1998)* support the influence of biological factors. The author investigated the data of the Women's Hospital of Darmstadt and could show, that the conceptions following IVF show an identical rhythm as the conception rates in spontaneous pregnancies (fig. 3). This is a strong argument against the assumption that the conception rates are

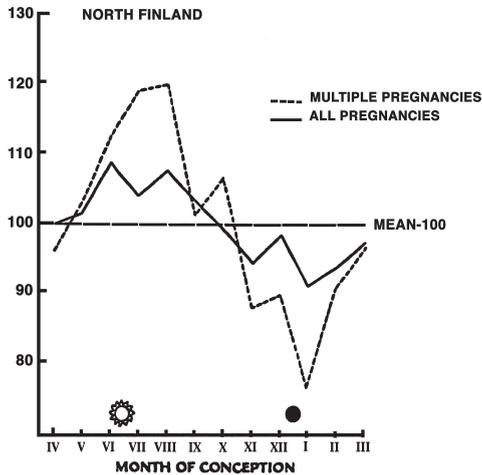
connected to the frequency of coitus, which would be a sociological factor.

It was suggested that changes in the semen variables might be one of the possible causes of the changes in conception rates. *Levine*, who is the best known expert in this field, *in 1999* performed a meta-analysis on 25 studies dealing with seasonal changes of sperm parameters (fig. 4). He demonstrated that the mean sperm count has a peak in winter and a trough in summer, the peak-to-trough ration was 17% on average. All the studies evaluated were performed in the northern hemisphere.

Based on these investigations, we evaluated the values of semen variables and hormone parameters of patients of our infertility retrospectively with respect to possible seasonal changes. The values of 2454 patients attending our clinic between 1990 and the end of 1997 were included in the study. The values were included without transformation. Groups were formed either (1) according to the age of patients (20-29 years, 30-39 years, 40-49 years), or (2) according to the year of birth (1950-54, 1955-59, 1960-64, 1965-69).

Semen analyses were performed according to the recommendations of the W.H.O. manual. Prior to each analysis three days of abstinence were kept. Values of seminal volume, sperm count, motility and morpho-

Fig. 1: Seasonal changes of the rates of conception in Finland (Rojansky et al., 1992), showing a distinct maximum in summer, which is more pronounced in multiple than in singleton pregnancies, while the rates have a trough in winter.



Monthly variation in the number of conceptions of single

Fig. 2: Conception rates from all over the world (Ronneberg and Aschoff, 1990). Minimal conception rates are found in summer or in autumn. In some countries the changes were more pronounced than in others.

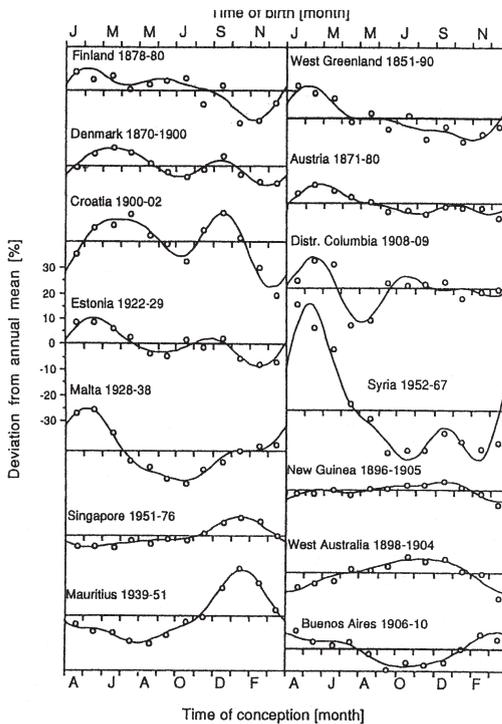


Fig. 3: Data of the Women's Hospital of Darmstadt (Ossenbuhn, 1998) showing that the conception following IVF form an identical rhythm as the conception rates in spontaneous pregnancies.

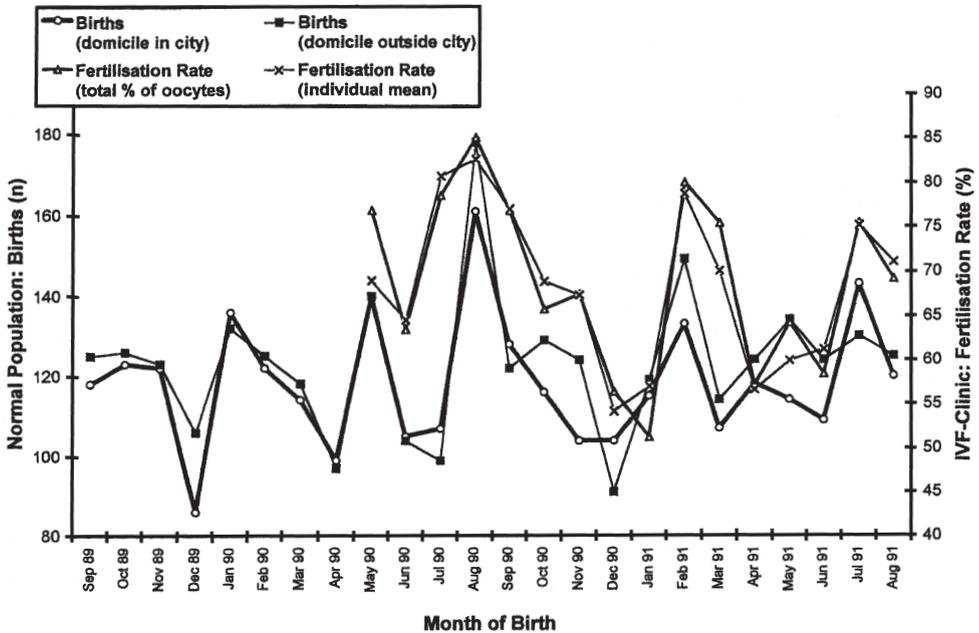


Fig. 4: Meta-analysis of several studies dealing with seasonal changes of sperm parameters (Levine, 1999).

Retrospective analysis of studies on seasonal variation in human semen quality

| Reference | Location | Specimen (N) | Donor type | Minimum |
|-------------------------|-------------|--------------|--------------|-----------|
| Hotchkiss, 1941 | New York | 642 | Volunteers | not given |
| McLeod, 1945 | New York | 591 | Volunteers | August |
| Tjia et al., 1982 | Houston | 4435 | Prevasect. | September |
| Mortimer et al., 1983 | Edinburgh | 1566 | Infertile | August |
| Spira, 1984 | New York | 1067 | Volunteers | September |
| Levine et al., 1988 | New Orleans | 1155 | Infertile | June |
| Saint Pol et al., 1989 | Lille | 4169 | Sperm donors | October |
| Poitoff et al., 1989 | Basel | 2677 | Infertile | September |
| Levine et al., 1990 | Calgary | 3601 | Infertile | August |
| Campaniello et al. 1990 | Bologna | 2405 | Infertile | August |
| Fisch et al., 1997 | Minnesota | 1972 | Prevasect. | September |

logy were included in the study. Hormone analyses were performed using semi-automatic analysers. The serum levels of FSH, LH, and testosterone were included in the study. As a secondary parameter, the quotient of FSH and sperm count was calculated, because both the variables are biologically correlated to each other.

The analysis of the circannual trends were performed according to the method of *Edwards (1961)*. Figure 5 illustrates this method schematically. The upper part of the figure depicts fictive values obtained in twelve

months of the year, whereby the mean values were equal in all twelve months. On the left, the values are depicted as polar co-ordinates, so that the circle is divided in 12 sectors of equal size.

The lower part of the figure depicts a simple harmonic trend, in the presentation in polar co-ordinates the centre of gravity is shifted from the centre of the circle. The distance a of the centre of gravity from the origin may be estimated from the sum of polar co-ordinates. $(\text{mean} + a)$ indicates the maximum and $(\text{mean} - a)$ the minimum of

Fig. 5: Schematic illustration of the method of Edwards (1961) for the analysis of harmonic trends. The upper part of the figure depicts fictive values obtained in twelve months of the year, whereby the mean values were equal in all the twelve months. On the left, the values are depicted as polar co-ordinates, so that the circle is divided in 12 sectors of equal size. The lower part of the figure depicts a simple harmonic trend, in the presentation in polar co-ordinates the centre of gravity is shifted from the centre of the circle. The distance a of the centre of gravity from the origin may be estimated from the sum of polar co-ordinates. The variable $1/2na^2$ (N = number of observations in this cycle) is distributed as a χ^2 with two degrees of freedom. The position of the maximum of the cycle at an angle θ of the circle is determined by the weight of the sectors.

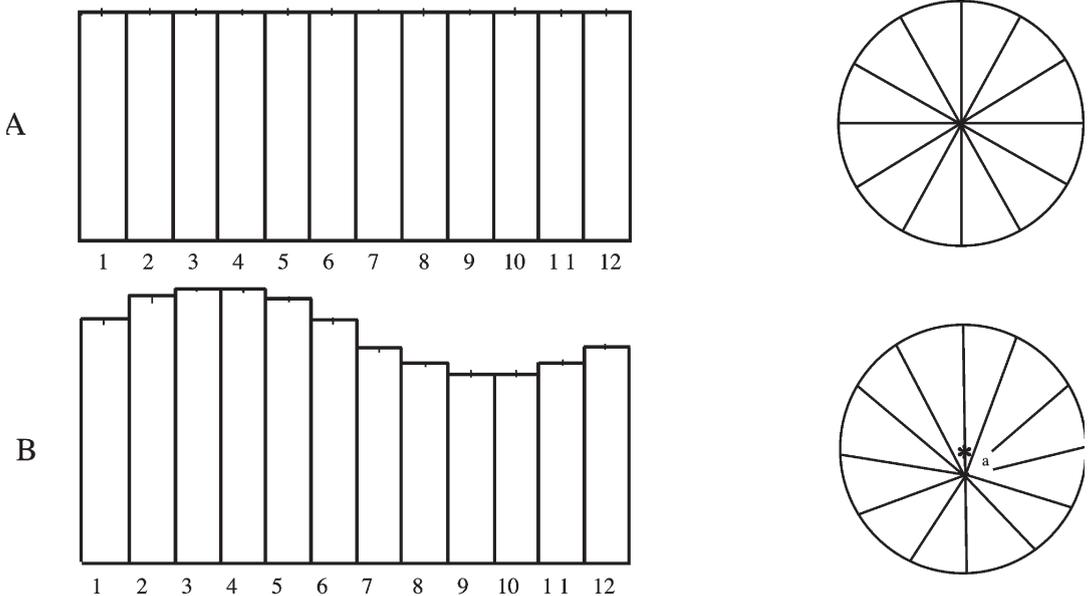


Fig. 6: Mean values of sperm count in twelve months of four group according to the year of birth. The statistical data are given in table 1a. The total group did not show a significant circannual variation. A significant trend occurs in the group of patients born in 1950 to1954, 1955 to 1959 and 1965 to 1969. The position of the maximum was different in the three groups (November, October and August).

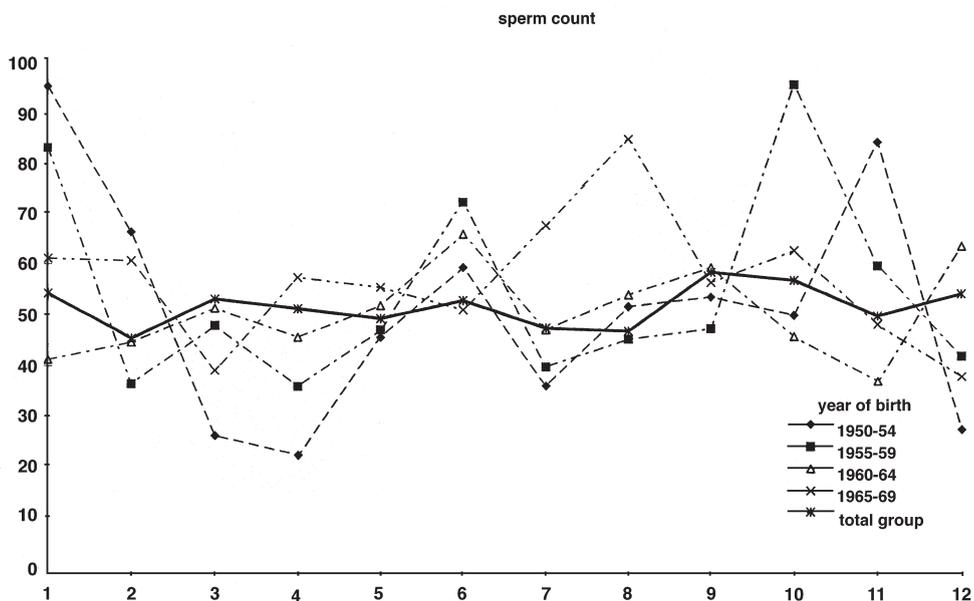


Table 1a: Statistical data of mean sperm count per month in four groups according to the years of birth.

$1/2na^2$, the position of the maximum, the maximum value and minimum value are explained in the description of statistical methods. These values are given only when a significant cyclic trend was found ($1/2na^2$ exceeded a certain level of χ^2). The asterisks indicate the level of significance (* = 0.05, ** = 0.01, *** = 0.001).

| | Total group n= 2454 | 1950-54 n= 197 | 1955-59 n= 527 | 1960-64 n= 950 | 1965-1969 n =566 |
|----------------------------|------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|---------------------|
| $1/2na^2$ | 3.07 | 6.66* | 9.34** | 4.11 | 7.35* |
| position of maximum (days) | | 313 | 298 | | 218 |
| maximum | | 65.5 | 65.3 | | 66.5 |
| mean | 52.2 | 52.0 | 54.9 | 51.1 | 57.3 |
| minimum | | 38.5 | 44.5 | | 48.1 |

the values. The ratio of peak-to-trough occurrence is a measure of the intensity of the seasonal pattern. The variable $1/2 na^2$ (n = number of observations in this cycle) is distributed as a χ^2 with two degrees of freedom. The position of the maximum of the cycle at an angle θ of the circle is, in terms of figure, determined by the weight of the sectors. In the case of an annual rhythm, the angle θ indicating the position of the maximum, is equivalent the day of the year.

The calculation presented in the original publication of *Edwards (1961)* was carried out with tables and using calculations in writing. For this study, we developed a computer program based on Turbo-Pascal for calculation of the values a , $1/2 na^2$, and θ . This computer program is available on interest from the first authors (A.K.).

It has to be considered that the analysis of data according to the method of Edwards requires the fixing of the length of any cycle. It does not result in an estimate of the number of cycles within a given time. When calculating the cycling trends of mean values for the twelve months of different parameters, it became evident that only the mean values of sperm count, acrosin and the quotient of FSH and sperm count showed significant circannual trends. The following figures depict the mean values of only these parameters. No significant trends were detected in the values of semen volume, sperm motility and morphology as well as in basic FSH, LH and testosterone levels.

Figure 6 summarises the mean values of sperm count in the twelve months of four groups according to the year of birth (1950-54, 1955-59, 1960-64, 1965-69). The statistical data are given in table 1a. The total group did not show a significant circannual variation. A significant trend occurs in the group of patients born 1950 to 1954, 1955 to

1959 and 1965 to 1969. The position of the maximum was different in the three groups (November, October and August). From this lack of a significant trend in the total group becomes understandable.

Figure 7 summarises the mean values of sperm count in the twelve months of three different age cohorts (20-29 years, 30-39 years, 40-49 years) in comparison to the mean sperm count of the total group of patients. The statistical data, given in table 1b, indicated no significant circannual trend.

Two causes for the seasonal variations of sperm count were taken in account in the literature: the temperature and the photoperiod. Although the literature does not leave any room for doubt that these two mechanism "may drive the seasonality of human reproduction", it is difficult to quantitatively describe the relationship of given values of sperm parameters (*Levine, 1994*).

An increased temperature of the testis inhibits sperm production, as it is observed in varicocele and cryptorchidism and in some experiments (*Robinson & Rock, 1967*).

However, this does not seem to play a role in healthy men exposed to a higher environmental temperature. *Levine (1999)* described a thorough study of sperm count in volunteers, which controlled the results for the fact, whether the volunteers were indoor or outdoor workers. Both groups expressed the minimum in summer, irrespective of the temperature at the workplace. In another study, the same author investigated the possible influence of laboratory temperature on the results of semen analysis, and again they found no explanation of the circannual variation. *Levine (1999)* concluded, also considering animal experiments "that the seasonal changes may be driven by an inherent circannual biological clock reset annually by seasonal changes in the length of daylight".

The effect of the photo-period, i.e. the variation of the length of daylight appears to be modulated by melatonin (Wurtman & Waldhauser, 1986). Melatonin levels are low during the daylight hours and the nighttime levels decrease during puberty. In adult men with hypogonadism, abnormally high levels of melatonin were reported. Likewise, in men with oligo- and azoosper-

mia, elevated nocturnal melatonin levels were found.

Figure 8 depicts the mean values of acrosin activities throughout the months of semen analysis in the total group and in different birth cohorts. As the statistical data show (table 2a), a significant circannual trend occurred in the total group with a maxi-

Fig. 7: Mean values of sperm count in the twelve months of three different age cohorts. The statistical data, given in table 1b, indicated no significant circannual trend.

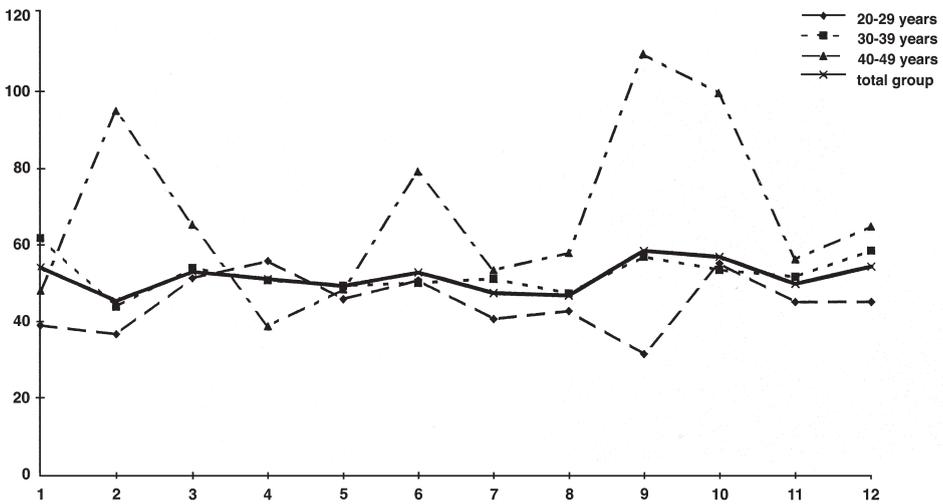


Table 1b: Statistical data of mean sperm count per month in three groups according to the age.

Explanation of the terms used are given in Table 1a.

| | Total group n= 2454 | 20-29 years n= 602 | 30-39 years n= 1542 | 40-49 years n = 255 |
|-------------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|
| $1/2na^2$ | 3.07 | 1.07 | 3.38 | 5.10 |
| position of maximum (days) | | | | |
| maximum | | | | |
| mean | 52.2 | 45.5 | 52.9 | 68.6 |
| minimum | | | | |

Fig. 8: Mean values of acrosin activities throughout the months of semen analysis in the total group and in different birth cohorts. As the statistical data show (table 2a), a significant circannual trend occurred in the total group with a maximum in the middle of March (day 76).

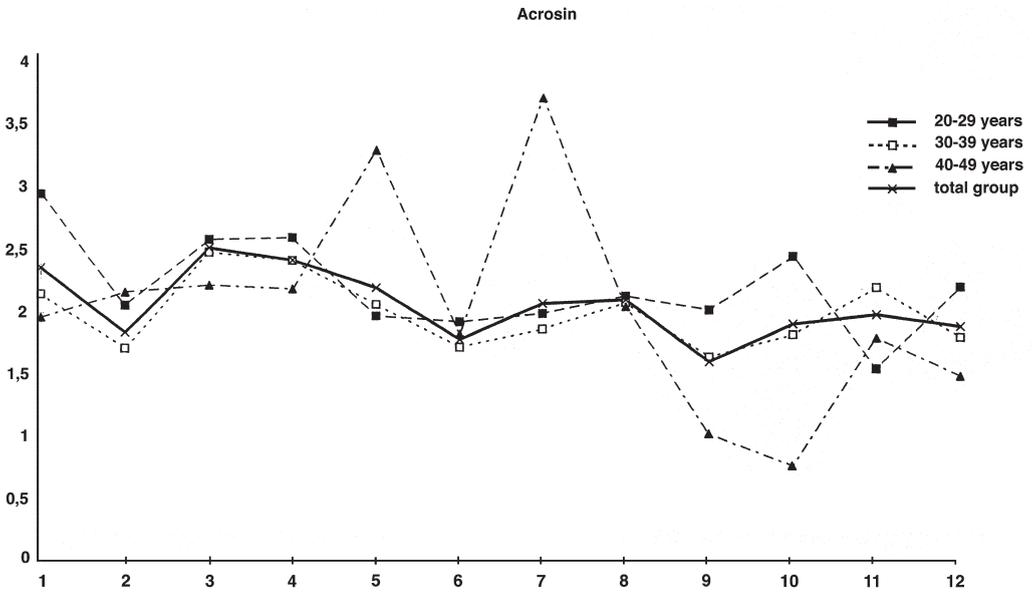


Table 2a: Statistical data of mean acrosin values per month in four groups according to the year of birth.

Explanation of the terms used are given in Table 1a.

| | Total group n= 2454 | 1950-54 n= 197 | 1955-59 n= 527 | 1960-64 n= 950 | 1965-1969 n =566 |
|-------------------------------|------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|---------------------|
| $1/2na^2$ | 7.47* | 3.22 | 2.88 | 11.10** | 3.25 |
| position of maximum (days) | 76 | | | | |
| maximum | 2.27 | | 2.4 | | |
| | | | 2 | | |
| | 2.1 | 2.1 | 2.1 | 2.1 | 2.0 |
| minimum | 1.93 | | | 1.78 | |

Fig. 9: Mean values of acrosin activities grouped according to the age of patients. A significant circannual trend (table 2b) was found in the group of the oldest patients, showing a maximum in middle of August (day 232).

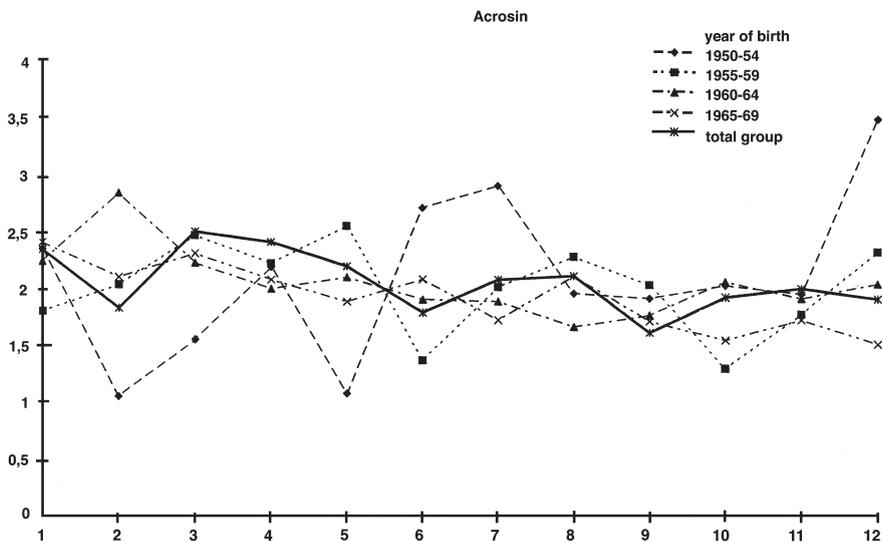


Table 2b: Statistical data of mean acrosin values per month in three groups according to the age

Explanation of the terms used are given in Table 1a.

| | Total group n= 2454 | 20-29 years n= 602 | 30-39 years n= 1542 | 40-49 years n = 255 |
|-------------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|
| $1/2na^2$ | 7.47* | 2.72 | 4.29 | 16.52*** |
| position of maximum (days) | 76 | | | 232 |
| maximum | 2.27 | | | 3.02 |
| mean | 2.1 | 2.1 | 2.0 | 2.2 |
| minimum | 1.93 | | | 1.63 |

imum in the middle of March (day 76). When divided in different birth cohorts, however, in only one of these (men born from 1960 to 1964) a significant cycling trend with a maximum in early February (day 40) was found.

In figure 9, the values were grouped according to the age of the patients, showing a maximum in middle of August (day 232).

No seasonal variation was described for acrosin up to now. A variation of its activity

Fig. 10: Mean values of the quotient of FSH and sperm count. Highly significant circannual trends, as calculated in table 3a, occurred in the different age cohorts.

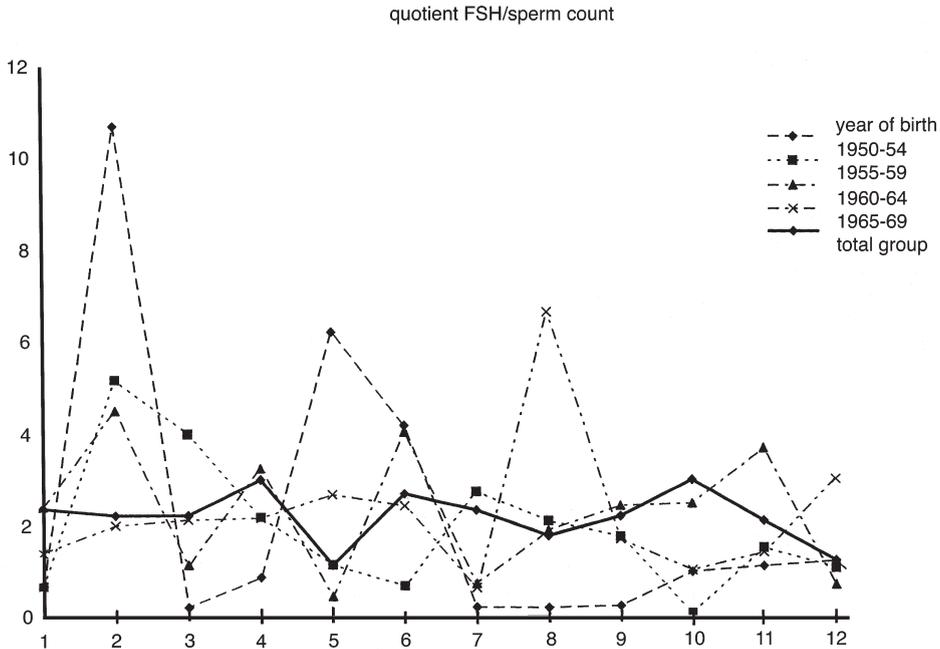


Table 3a: Statistical data of mean FSH/sperm count quotients per month in four groups according to the year of birth.

Explanation of the terms used are given in Table 1a.

| | Total group n= 2454 | 1950-54 n= 197 | 1955-59 n= 527 | 1960-64 n= 950 | 1965-1969 n =566 |
|-------------------------------|------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|---------------------|
| $1/2na^2$ | 0.89 | 52.49*** | 71.25*** | 15.39*** | 7.02* |
| position of maximum (days) | | 82 | 54 | 170 | 165 |
| maximum | | 3.81 | 2.89 | 2.71 | 2.67 |
| mean | 2.2 | 2.2 | 1.9 | 2.3 | 2.3 |
| minimum | | 0.59 | 1.52 | 1.89 | 1.93 |

might also contribute to a variation of fertility throughout the year, as it was discussed in relation to sperm count. A peak as calculated in March (day 76) for the total group would indicate a trough also in summer, thus possibly amplifying the effect of a low sperm

count on male infertility. The position of the peak is not associated with the environmental temperature, for in this case it should be found in summer. A higher temperature during enzyme analysis was also prevented by the air condition in our laboratory adju-

Fig. 11: Mean values of the quotient of FSH and sperm count. Also in the groups of different ages, highly significant circannual trends occurred, as calculated in table 3b.

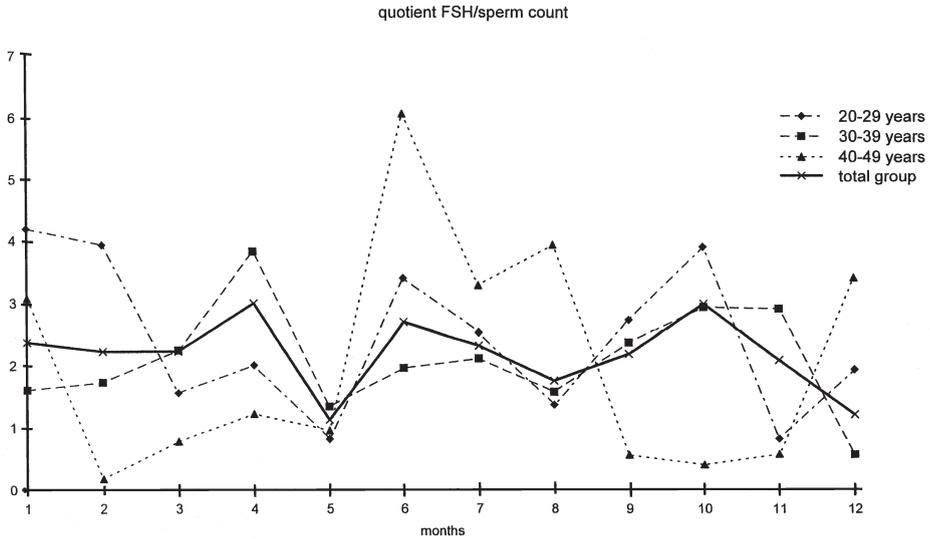


Table 3b: Statistical data of mean FSH/sperm count quotients per month in four groups according to the age

Explanation of the terms used are given in Table 1a.

| | Total group n= 2454 | 20-29 years n= 602 | 30-39 years n= 1542 | 40-49 years n = 255 |
|-------------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|
| $1/2na^2$ | 0.89 | 6.20* | 8.93* | 33.90*** |
| position of maximum (days) | | 350 | 190 | 6 |
| maximum | | 2.28 | 2.22 | 3.65 |
| mean | 2.2 | 2.0 | 2.1 | 2.4 |
| minimum | | 1.72 | 1.87 | 1.15 |

sting the room temperature to 20-24 °C. Thus the variation of acrosin activity may reflect inherent variations of the quality of spermatogenesis throughout the year parallel to those of sperm count.

The figures 10 and 11 demonstrate the mean values of the quotient of FSH and sperm count. The mean values are grouped in the same manner as in the other parameters. The mean values are grouped in the same manner as in the other parameters. Highly significant circannual trends, as calculated in table 3a and b, occurred in the different age cohorts as well as significant trends in the groups of different ages, while no significant trend was visible in the total group. This may be explained by the quite different position of the maxima in the different groups. The circannual variation of the quotient of FSH and sperm count is difficult to interpret. Normally, FSH serum levels and sperm count are inversely correlated. This reflects the biological association, for FSH stimulates the Sertoli cell function, which sustains spermatogenesis, and the Sertoli cells modulate FSH levels via their hormone inhibin. Unfortunately, the levels of inhibin B are not available in our study group, for the assay for its determination was described only in 1996 (*Illingworth et al., 1996*) and introduced in our laboratory in June 1997.

A variation of the quotient of the two values might reflect a variation in this feedback mechanism. In FSH levels increase, while the sperm count remains stable, an increase of the quotient would appear. In male animals with seasonal breeding usually a rise of FSH level precede the increase of sperm production at about three month. In our study, however, no rise of FSH levels was demonstrable, and also the maximum of the quotient did not precede the maximum of sperm count. Thus the rhythm does not appear to reflect a relative increase

of FSH levels as a cause of increase of spermatogenetic activity.

An unexpected result of our study is the occurrence of more pronounced circannual trends in different birth cohorts. In mean sperm count, the mean values of the total group did not show significant cyclic trend, but the groups arranged according to birth cohorts did so, while the arrangement of groups arranged according to age did not reveal these clear results (table 1a and b). In the quotient of FSH and sperm count, also the mean values of the total group did not show significant cyclic trends, but they became visible in the mean values of groups arranged according to birth cohorts as well as to the age (table 3a and b) with a clear difference in the position of the maximum. This effect was not visible in the mean acrosin values. The results indicate causes of the seasonality that were of different effectiveness in the years of birth. There is no information found in the literature, which mechanism might cause such effects. *Zheng et al. (1997)* described an association between birth year and sperm count. Their study focused on the possible effects of prenatal exposure on spermatogenesis. The authors speculated that findings are compatible with an environmental impact during prenatal life. Should we take the changing seasonality.

Conclusion

The data presented give evidence for circannual variation in sperm count, acrosin activity and the relation of FSH and sperm count, irrespective of some vagueness of the calculation. *Roenneberg & Aschoff (1990)*, using data of human birth rates throughout the world, discussed the causes of circannual rhythms, which they considered to be due to biological or sociological factors or a combination of both mecha-

nisms. If sperm count contributes to the circannual variations of birth rates, this factor probably does not underlie the influence of sociological mechanism. The expression of biological factors is clear seen than in the birth rate.

The knowledge on circannual variation of semen parameters and hormone values may be of value in diagnostic and therapeutic decisions in reproductive medicine. They have also to be considered for the definition of normal ranges of laboratory investigations.

References

■ **Edwards JH**

The recognition and estimation of cyclic trends. *Ann Hum Genet* 25: 83-87, 1961.

■ **Illingworth PJ, Groome NP, Byrd W et al.**
Inhibin-B: a likely candidate for the physiologically important form of inhibin in men. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 1321-25, 1996.

■ **Joffe M**

Disorders of spermatogenesis in Finland. Is this a period effect, and if so, why? *BMJ* 314: 1042-43, 1997.

■ **Levine 1988.**

cited from Levine, 1999.

■ **Levine RJ**

Male factors contributing to the seasonality of human reproduction. *Ann NY Acad Sci* 7099: 29-45, 1994.

■ **Levine RJ**

Seasonal variation of semen quality and fertility. *Scand J Work Environ Health* 25 Suppl 1: 34-37, 1999.

■ **Mortimer 1983.**

cited from Levine, 1999.

■ **Robinson D & Rock J**

Intrascrotal hyperthermia induced by scrotal insulation: effect on spermatogenesis. *Obstet Gynecol* 29: 217-223, 1967.

■ **Roennenberg T & Aschoff J**

Annual rhythm of human reproduction. I. Biology, sociology, or both? *Biol Rhythms* 5: 195-216, 1990.

■ **Rojansky N, Brzinski A, Schenker JG.**

Seasonality in human reproduction: an update. *Hum Reprod* 7: 735-45, 1992.

■ **Wurtman RJ & Waldhauser F**

Melatonin in human. *J Neural Trasm*, Springer Verlag, Vienna, 1986.

■ **Zheng Y, Bonde JP, Emst E, Mortensen JT, Egense J**

Is semen quality related to the year of birth among Danish infertility clients? *Int J Epidemiol* 26: 1289-997, 1986.

LO SCREENING GENETICO NELLE COPPIE INFERTILI

Aldo E. Calogero

Sezione di Endocrinologia, Andrologia e Medicina Interna,
Dipartimento Scienze Biomediche, Università di Catania, Catania

Introduzione

Nei paesi occidentali, circa il 15% delle coppie in età riproduttiva è infertile (de Kretser, 1997). In Italia si può stimare che circa sessantamila coppie l'anno siano affette da infertilità e una grande percentuale di queste si sottopone a tecniche di procreazione medicalmente assistita (PMA).

Il ricorso a queste tecniche se da un lato permette alla coppia di risolvere l'infertilità non trattabile con terapia specifica, dall'altro ha sollevato una certa apprensione negli specialisti del settore per il rischio di trasmissione di alterazioni genetiche al prodotto del concepimento (Lamb, 1999). Infatti, ricerche recenti hanno evidenziato che in una non irrilevante percentuale di pazienti l'infertilità è dovuta a cause genetiche. Nell'uomo, le alterazioni genetiche si riscontrano più frequentemente nei pazienti con spermatogenesi più gravemente compromessa e quindi candidati alla iniezione intracitoplasmatica dello spermatozoo (ICSI) quale tecnica di PMA. Uno

studio recente ha dimostrato che, limitando lo screening alle tre principali cause genetiche di oligo-azoospermia, ben il 24% dei partner maschili di coppie sottoposte ad ICSI aveva una causa genetica di infertilità (Dohle et al., 2002).

Le anomalie genetiche hanno una grande importanza clinica, non soltanto perché possono causare infertilità nella prole, ma anche e soprattutto perché capaci di causare malattie più gravi. Il ricorso alle tecniche di PMA potrebbe quindi contribuire alla trasmissione del danno genetico alle generazioni future in quanto queste tecniche consentono a pazienti con oligozoospermia severa o con azoospermia, previo ritrovamento di nematospermi dal testicolo o dall'epididimo, di procreare. A tal riguardo, alcuni studi sembrano indicare un aumento delle alterazioni cromosomiche nei feti e nei bambini nati in seguito alla ICSI. Uno di questi ha riportato un aumento di circa 3 volte nell'incidenza di alterazioni numeriche dei cromosomi ses-

Anomalie genetiche sono presenti in un'elevata percentuale di maschi (15%) e di donne (10%) infertili (Foresta et al., 2002).

Le anomalie genetiche sono più frequenti nei maschi nei quali la spermatogenesi è più gravemente compromessa e quindi nei pazienti candidati alla ICSI

La seguente frequenza di anomalie genetiche è stata recentemente riscontrata in 150 pazienti non selezionati sottoposti ad ICSI¹:

| Indagine genetica eseguita | Numero di pazienti | Percentuale |
|----------------------------------|--------------------|-------------|
| Alterazioni del cariotipo | 16 | 10,6% |
| Microdelezioni della regione AZF | 8 | 5,3% |
| Mutazioni del gene CFTR | 14 | 9,3% |

¹Dohle et al., 2002

Frequenza delle anomalie cromosomiche in bambini nati dopo ICSI¹

| Tipo di alterazione cromosomica | Bambini ICSI | Popolazione normale |
|--|--------------|---------------------|
| Aneuploidie dei cromosomi sessuali | 0,6% | 0,2% |
| Alterazioni strutturali degli autosomi | 0,4% | 0,07% |

¹Van Steirteghem et al., 2002

suali e di circa 6 volte nell'incidenza di alterazioni strutturali dei vari cromosomi su circa 1500 esami del cariotipo eseguiti (Van Steirteghem et al., 2002).

Queste premesse suggeriscono quindi che l'unico modo per ridurre la diffusione delle malattie genetiche che potrebbe verificarsi con l'utilizzo indiscriminato delle tecniche di PMA è lo scree-

ning genetico delle coppie infertili. Questo argomento è stato recentemente oggetto di una consensus conference (Foresta et al., 2002).

Cause genetiche di infertilità maschile

Le alterazioni genetiche che causano infertilità nell'uomo e nella donna. Esse pos-

CAUSE GENETICHE DI INFERTILITÀ MASCHILE

Anomalie cromosomiche

Autosomi: Traslocazioni robertsoniane e reciproche; inversioni; trisomia 21; duplicazioni e delezioni parziali

Eterocromosomi: 47,XXY; 47,XYY; 46,XX; 45,X0 e forme di mosaicismo

Anomalie geniche

X-linked: Sindrome di Kallmann; s. da insensibilità agli androgeni (AIS)

Y-linked: Microdelezioni dell'Yq11

Autosomiche:

- L'infertilità è una manifestazione maggiore: CFTR; mutazioni dei geni per la subunità β dell'LH e dell'FSH; mutazione dei recettori per l'LH e l'FSH
- L'infertilità è una manifestazione minore: distrofia miotonica; deficienza di 5α -reduttasi; deficienza degli enzimi della steroidogenesi; s. di Bardet-Biedl; s. di Noonan; s. di Prader-Willi; atassia cerebellare con ipogonadismo ipogonadotropo; anemia di Fanconi; s. di Prune-Belly; b-talassemia; emocromatosi

Anomalie cromosomiche confinare agli spermatozoi

CAUSE GENETICHE DI INFERTILITÀ FEMMINILE

Anomalie cromosomiche

Autosomi: Traslocazioni robertsoniane e reciproche; inversioni

Eterocromosomi: 45,X0; isocromosoma Xq; delezioni dell'Xp o dell'Xq

Anomalie geniche

X-linked: Sindrome di Kallmann; Sindrome dell'X fragile

Autosomiche:

- L'infertilità è una manifestazione maggiore: mutazioni dei geni per la subunità b dell'LH e dell'FSH; mutazione dei recettori per l'LH e l'FSH; mutazione del gene per il recettore del GnRH; s. BPES (blefarofimosi, ptosi ed epicanto inverso); s. Danys-Drash; s. di Freiser
- L'infertilità è una manifestazione minore: galattosemia; mucopolisaccaridosi; distrofia miotonica; deficit di 21a-idrossilasi, 17a-idrossilasi ed altri enzimi della steroidogenesi; deficit di aromatasi; b-talassemia; emocromatosi; mutazioni del gene DAX1

Anomalie cromosomiche confinare agli ovociti

sono essere classificate in alterazioni cromosomiche, mutazioni di singoli geni e danni strutturali del DNA confinate ai gameti.

Anomalie cromosomiche

Nell'uomo

I maschi infertili hanno una frequenza di anomalie cromosomiche superiore a quella dei soggetti normali e direttamente proporzionale al danno della spermatogenesi (Chandley, 1979). L'incidenza di aberrazioni cromosomiche è compresa tra 2 e 8% e questa percentuale aumenta fino al 15% nei pazienti con azoospermia (Chandley, 1979; Meschede et al., 1998; Peschka et al., 1999; Gekas et al., 2001). Le alterazioni numeriche dei cromosomi sessuali e in particolare la sindrome di Klinefelter (47,XXY) sono le alterazioni più frequentemente riscontrate nei pazienti con azoospermia. Alterazioni strutturali degli autosomi (traslocazioni Robertsoniane e reciproche, inversioni, duplicazioni e delezioni) possono invece essere presenti nei pazienti con alterazione meno severa della spermatogenesi.

Alterazioni cromosomiche sono molto frequenti nei partner maschili di coppie sottoposte ad ICSI (Peschka et al., 1999; Gekas et al., 2001). Gekas e collaboratori hanno riportato la presenza di aneuploidie dei cromosomi sessuali nel 3,7% dei casi ed anomalie degli autosomi nel 2,4%. Prendendo in considerazione solamente i pazienti con azoospermia sottoposti ad ICSI, la frequenza di anomalie dei cromosomi sessuali sale al 15,9%, mentre anomalie degli autosomi si riscontrano nel 2,8% dei casi. Gli autori hanno inoltre evidenziato che alterazioni cromosomiche si riscontrano nel 3% dei pazienti normozoospermici sottoposti ad ICSI (1,4% a carico dei cromosomi sessuali, soprattutto mosaicismi e 1,6% anomalie strutturali bilanciate degli autosomi) (Gekas et al., 2001).

Data l'elevata frequenza delle alterazioni numeriche e strutturali dei cromosomi nei maschi infertili ed in considerazione del fatto che le aneuploidie sono una causa di aborto, malformazioni e ritardo mentale, rappresentando perciò un importante fattore di rischio genetico nell'uomo, l'esame del cariotipo va eseguito in tutti i pazienti con azoospermia o oligozoospermia severa. Uno screening citogenetico è inoltre consigliabile anche ai pazienti con oligozoospermia moderata e nei soggetti con concentrazione nemaspermica normale, partner di donne senza disturbi della funzione riproduttiva, i quali, dopo un anno di rapporti mirati, ma senza successo, desiderano sottoporsi a tecniche di PMA.

Nella donna

Nella donna infertile, le alterazioni più frequenti del cariotipo sono le aneuploidie dei cromosomi sessuali e in modo particolare la sindrome di Turner (45,X0) e sue forme di mosaicismo. Si possono anche riscontrare diverse aberrazioni strutturali a carico degli autosomi. La frequenza delle anomalie cromosomiche nell'infertilità femminile, seppur con un certo grado di variazione tra i vari studi (Meschede et al., 1998; Badovinac et al., 2000), può essere stimata intorno al 5%. Il 2,8% delle partner femminili di coppie sottoposte ad ICSI presenta aneuploidie dei cromosomi sessuali, mentre il 2,1% ha anomalie strutturali degli autosomi (Gekas et al., 2001). Il fenotipo delle donne affette da aberrazioni dei cromosomi sessuali è molto variabile, ma una caratteristica comune a tutte queste alterazioni cromosomiche è rappresentata da una insufficienza ovarica primitiva con amenorrea (primaria o secondaria) o oligomenorrea. Aberrazioni strutturali degli autosomi possono essere causa di poliabortività (Goddijn & Leschot, 2000).

Su queste basi, l'esame del cariotipo dovrebbe essere eseguito nelle donne infertili con insufficienza ovarica primitiva o polia-

bortività. Come per il maschio, lo screening citogenetico va eseguito nelle donne, partner di maschi normali, che dopo un anno di rapporti mirati non rimangono gravide e intendono sottoporsi a tecniche di PMA.

Anomalie geniche legate al cromosoma X

Nell'uomo

Sindrome di Kallmann. I pazienti affetti da sindrome di Kallmann hanno ipogonadismo ipogonadotropo (causato dal deficit di secrezione di GnRH ipotalamico) e anosmia (dovuta all'agenesia dei lobi olfattori). La sindrome colpisce 1 maschio ogni 10000 e può essere ereditata come forma legata al cromosoma X o agli autosomi (dominante e recessiva). La forma legata al cromosoma X causa circa il 15% delle sindromi di Kallmann (Seminara et al., 2000; Oliveira et al., 2001). Il gene del cromosoma X si chiama KAL-1 e codifica la proteina anosmina che svolge un ruolo centrale nella migrazione dei neuroni GnRH secernenti all'ipotalamo. Lo studio delle mutazioni del gene KAL-1, sebbene non sempre facilmente eseguibile, va riservato ai pazienti con ipogonadismo ipogonadotropo ed anosmia indipendentemente dal fatto che essi intendano avvalersi di tecniche di PMA dato che un semplice trattamento ormonale è capace di ripristinare la fertilità naturale in questi pazienti con possibile trasmissione del difetto genico alla prole. I geni autosomici non sono ancora stati identificati.

Sindrome da insensibilità agli androgeni (AIS). L'AIS è una malattia recessiva causata da mutazioni del gene per il recettore degli androgeni, localizzato nel braccio lungo del cromosoma X (Xq11-12). I soggetti affetti possono presentare fenotipi che variano da un aspetto femminile completo al maschio infertile (Quigley et al., 1995). Sono state descritte più di 300 mutazioni del gene per il recettore degli androgeni.

I maschi infertili con mutazione del gene per questo recettore presentano azoospermia o oligozoospermia grave, sia come manifestazione isolata che associata ad altri sintomi di ridotta sensibilità agli androgeni (criptorchidismo, ipospadia, ginecomastia, scarsa virilizzazione). Questi soggetti hanno un profilo ormonale caratterizzato da livelli sierici di LH superiori alla norma e da livelli di testosterone aumentati o normali. Il prodotto LH-testosterone, chiamato indice di sensibilità agli androgeni (ASI), può essere utile nell'indicare i pazienti portatori di mutazioni del gene per il recettore agli androgeni. Infatti, più alto è l'ASI, maggiore è il rischio di trovare una mutazione del gene (Hiort et al., 2000). La frequenza di mutazioni del recettore degli androgeni nei pazienti con oligozoospermia o azoospermia sembra essere compresa tra il 2% e il 3% (Hiort et al., 2000).

Poiché la stessa mutazione può essere associata a fenotipi diversi, non si possono prevedere le conseguenze cliniche nei bambini nati mediante tecniche di PMA e la coppia deve essere informata circa il rischio di peggioramento delle manifestazioni cliniche nei figli che ereditano il difetto genico. Infatti, un'espansione della tripletta CAG nell'esone 1 (più di 40 ripetizioni) causa l'atrofia muscolare spino-bulbare o sindrome di Kennedy che è caratterizzata da una progressiva debolezza ed atrofia muscolare associata a scarsa virilizzazione, infertilità ed atrofia testicolare. Non è ancora chiaro se un numero minore di ripetizioni della tripletta CAG possa causare un difetto isolato della spermatogenesi (Patrizio & Leonard, 2001).

Lo screening delle mutazioni del recettore per gli androgeni va eseguito sui pazienti con ASI elevato ($>200 \text{ U x nmol/l}^2$) (Hiort et al., 2000).

Nella donna

Sindrome di Kallmann. E' rara nelle donne nella quali spesso si associa a malforma-

zioni uterine (Brandenberger et al., 1994).

La sindrome dell'X fragile. La sindrome dell'X fragile rappresenta la causa più comune di ritardo mentale nei maschi. E' causata da un'espansione della tripletta CGG nell'esone 1 del gene FMR1 localizzato sul braccio lungo del cromosoma X (Xq27.3) (Verkerk et al., 1991). Nella popolazione normale si riscontrano meno di 50 ripetizioni di questa tripletta, mentre più di 200 ripetizioni (mutazione completa) causano ritardo mentale. Un'espansione del numero di triplette compresa tra 50 e 200 è definita premutazione e si associa ad insufficienza ovarica precoce (POF) in donne per il resto normali (Davis et al., 2000). Infatti, il 15-25% delle donne con premutazione sono affette da POF ed il 6,5% delle donne con POF ha una premutazione del gene FMR1 (Sherman, 2000). E' importante inoltre notare che le donne con premutazione hanno un maggior rischio di un'ulteriore espansione del numero delle triplette nella linea germinale con conseguente maggiore rischio di generare figli maschi con ritardo mentale.

Lo studio dell'X fragile è riservato alle donne con oligomenorrea o amenorrea dovuta ad insufficienza ovarica primitiva e alle donne con scarsa risposta ovarica alla terapia stimolatrice per l'induzione multipla dell'ovulazione, dato che queste donne hanno un alto rischio di sviluppare un'insufficienza ovarica in breve tempo (Farhi et al., 1997).

Anomalie geniche legate al cromosoma Y

Microdelezioni del braccio lungo del cromosoma Y (Yq). Recenti ricerche hanno dimostrato che la microdelezione di un tratto del braccio lungo del cromosoma Y (Yq), definito "azoospermia factor" (AZF), sono una causa frequente di oligozoospermia e soprattutto di azoospermia (Foresta et al.,

2001). Le microdelezioni clusterizzano in 3 regioni che, in senso prossimo-distale, sono state denominate AZFa, AZFb ed AZFc. Diversi geni e famiglie geniche, che sembrano essere determinanti per il regolare progredire della spermatogenesi, sono state identificati in queste regioni. Tuttavia, il loro ruolo non è ancora del tutto chiarito.

Le microdelezioni della regione AZF determinano una testiculopatia primitiva grave con conseguente azoospermia o oligozoospermia grave e coinvolge più frequentemente la regione AZFc (circa 60%), rispetto all'AZFb (circa 15%) ed AZFa (circa 5%). Negli altri casi si trova una delezione più ampia che coinvolge più regioni contemporaneamente. In generale, la prevalenza delle microdelezioni dell'Yq si aggira intorno al 12% nei pazienti con azoospermia soprattutto se di natura idiopatica e al 3,5% nei pazienti con oligozoospermia severa (concentrazione spermatica $<5 \times 10^6/\text{ml}$) (Krausz & McElreavey, 2001). Microdelezioni dell'Yq sono state descritte anche in pazienti con altre cause di danno testicolare quali il criptorchidismo e il varicocele (Foresta et al., 1999; Moro et al., 2000).

I pazienti con microdelezioni dell'Yq, anche se azoospermici, sono candidati a tecniche di PMA in quanto nessun trattamento specifico è attualmente in grado di ripristinare la spermatogenesi. In questi casi, l'anomalia genetica viene trasmessa in maniera dominante al figlio maschio che quindi sarà infertile come il padre (Edwards & Bishop, 1997). Tuttavia le reali conseguenze di questa trasmissione non sono del tutto note. Sono stati infatti riportati due casi nei quali la microdelezione dell'Yq è diventata più grande nei figli generati con rapporto naturale in un'epoca nella quale la spermatogenesi del genitore non era ancora completamente compromessa (Stuppia et al., 1996; Calogero et al., 2002b). E' stato ipotizzato quindi che la microdelezione rende il cromosoma Y maggior-

mente suscettibile di ulteriore rottura ed eventualmente alla sua scomparsa con il rischio di generare bambine con patrimonio genetico 45,X0 (sindrome di Turner) (Siffroi et al., 2000).

La valutazione dell'integrità della regione AZF va pertanto eseguita in tutti i pazienti con azoospermia o oligozoospermia grave (concentrazione nemospermica $<5 \times 10^6/\text{ml}$) di natura idiopatica. Il test genetico va eseguito anche in pazienti con varicocele o storia di criptorchidismo, ma non quando sono presenti altre cause di danno testicolare (deficit ormonale, sindrome di Klinefelter, ecc.).

Anomalie geniche autosomiche

Numerose anomalie geniche autosomiche sono in grado di provocare infertilità sia nell'uomo che nella donna. Alcune di queste anomalie sono associate ad un corteo sintomatologico nel quale l'infertilità costituisce una manifestazione minore e pertanto raramente (se non mai) questi pazienti richiedono di procreare. Altre mutazioni geniche autosomiche determinano invece prevalentemente infertilità. Tra queste ricordiamo le mutazioni dei geni per le gonadotropine o per i loro recettori, patologie comunque molto rare che richiedono un approfondito studio genetico quando le condizioni cliniche indicano la presenza di questa rara mutazione genica.

Mutazioni del gene CFTR. Un discorso a parte meritano le mutazioni del gene CFTR, localizzato sul cromosoma 7q31.1-31.2, che, nella forma omozigote, causano la fibrosi cistica, una delle malattie autosomiche recessive più comuni e più gravi nella popolazione caucasica. Si stima infatti che un individuo su 2500 ne è affetto e che ben uno su 25 è portatore asintomatico di una mutazione. La presenza di mutazioni che non danneggiano completamente l'espressione del gene CFTR causano agenesia bilaterale congenita dei vasi deferenti

(CBAVD) nel maschio con conseguente azoospermia ostruttiva che pertanto rappresenta una forma lieve o incompleta di fibrosi cistica. Nella donna, le mutazioni del gene CFTR non sembrano influenzare significativamente lo stato di fertilità.

La CBAVD si riscontra nel 6% dei pazienti con azoospermia ostruttiva e in circa il 2% dei pazienti infertili (Lissens et al., 1996). Una sola mutazione del gene CFTR è identificabile nella metà dei pazienti con CBAVD, due mutazioni sono state riportate nel 20% (eterozigosi composta o omozigosi) e nessuna mutazione è identificabile nel rimanente 30% dei casi (Casal et al., 1995; Claustres et al., 2000). Una particolare mutazione particolarmente frequente nei pazienti con CBAVD è l'allele 5T. A livello dell'introne 8 del gene CFTR una sequenza di 7-9 molecole di timidina è sostituita da una sequenza di sole 5 timidine, ciò causa la mancata trascrizione dell'esone 9 e quindi bassi livelli di produzione della proteina CFTR (Chu et al., 1993). Lo screening genetico per le mutazioni del gene CFTR, condotto su 37 pazienti con CBAVD utilizzando un pannello di 11 mutazioni che comprendono circa il 75% delle mutazioni per fibrosi cistica nella nostra Regione, non è riuscito ad identificare la presenza di mutazioni nella metà dei pazienti studiati. L'allele 5T era presente nel 20% dei casi senza apparente mutazione (Attardo et al., 2001). Anche nella nostra esperienza quindi lo screening genetico dei pazienti con CBAVD non è in grado di svelare la presenza di una mutazione del gene in circa un terzo dei casi. Ciò è dovuto al fatto che lo screening non è in grado di esaminare l'elevato numero di mutazioni descritte per questo gene (circa 900). A questa difficoltà si aggiunge anche quella dovuta ad una diversa distribuzione delle mutazioni nelle varie etnie che rende praticamente irrealizzabile la messa a punto di un pannello di studio delle mutazioni valido per tutte le regioni d'Italia. Solo lo studio dell'intera sequenza del gene CFTR permetterebbe di

identificare la presenza di una mutazione. A tal proposito, Mak e collaboratori (1999) hanno paragonato i risultati dello screening classico delle mutazioni del gene CFTR con un pannello comprendente 31 mutazioni con lo studio dell'allele 5T e il sequenziamento dell'intero gene (compresa la regione promoter). I risultati dello studio hanno dimostrato che lo screening di routine non ha identificato:

- 33 delle 72 mutazioni (46%) nel gruppo di pazienti con CBAVD;
- 19 delle 24 mutazioni (79%) nel gruppo dei pazienti con ostruzione epididimaria di natura idiopatica;
- 2 delle 4 (50%) mutazioni (50%) nel gruppo dei pazienti con agenesia unilaterale dei dotti deferenti (CUAVD).

Questi dati suggeriscono quindi che il migliore approccio metodologico per lo screening genetico dei pazienti con CBAVD è lo studio dell'intera sequenza del gene CFTR. Ciò permette di identificare tutti i tipi di mutazioni presenti e quindi di ridurre il rischio di trasmissione di una mutazione che in omozigosi causa la fibrosi cistica. Dato che il sequenziamento del gene CFTR non è facilmente eseguibile in tutti i laboratori, i pazienti con CBAVD e CUAVD devono essere sottoposti allo studio delle mutazioni del gene CFTR utilizzando un pannello di mutazioni che includa le principali mutazioni presenti nella regione di origine e la valutazione dell'allele 5T. Lo screening genetico deve includere anche la partner femminile in quanto questi pazienti vanno spesso incontro a tecniche di PMA con ottimo successo.

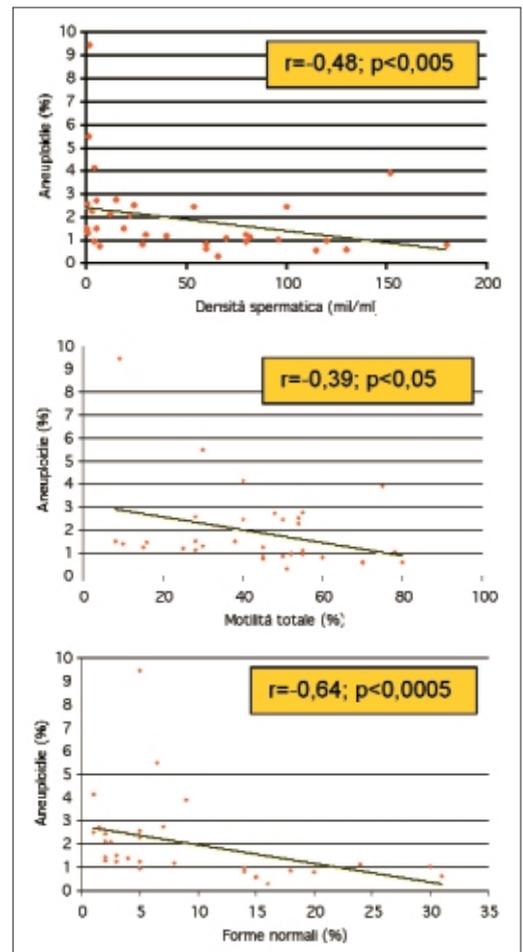
Anomalie cromosomiche confinate ai gameti

Nell'uomo

Ricerche recenti hanno dimostrato che i pazienti con testiculopatia primitiva producono un numero maggiore di spermatozoi con aneu-

ploidie rispetto ai soggetti con normali parametri del liquido seminale nonostante la presenza di un cariotipo normale (Bernardini et al., 2000; Vegetti et al., 2000; Calogero et al., 2001b). Noi abbiamo dimostrato la presenza di una relazione inversa tra i principali parametri spermatici (concentrazione, motilità e percentuale di forme normali) e frequenza di aneuploidie spermatiche ad indicare che più grave è la testiculopatia, più alto è il rischio di trovare spermatozoi con alterazioni cromosomiche (Figura 1).

Figura 1. Correlazioni tra tasso di aneuploidie spermatiche e principali parametri del liquido seminale (modificato da: Calogero et al., 2001b).



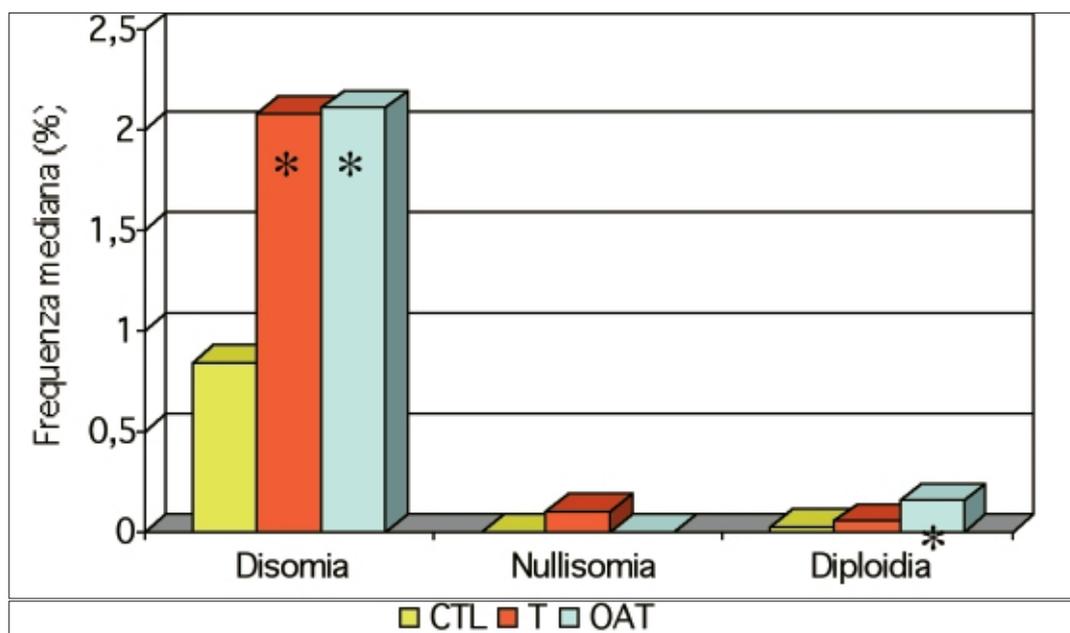
La correlazione inversa tra tasso di aneuploidie spermatiche e percentuale di spermatozoi con forma normale si è dimostrata particolarmente significativa ed in effetti la frequenza di aneuploidie in un gruppo di pazienti con oligo-asteno-teratozoospermia è risultata sovrapponibile a quella riscontrata in un gruppo di pazienti la cui unica anomalia seminale era la riduzione del numero di spermatozoi con morfologia normale (Figura 2). Ciò suggerisce che la teratozoospermia è il parametro che meglio si associa all'aneuploidia (Calogero et al., 2001b).

In considerazione del fatto che i pazienti con un'alterazione più grave dei parametri del liquido seminale sono costretti a ricorrere alle tecniche di PMA, noi abbiamo valutato il tasso di aneuploidie spermatiche in un gruppo di pazienti non selezionati che si sono sottoposti ad ICSI. I risultati hanno dimostrato che circa l'80% dei pazienti ha un tasso di aneuploidie spermatiche superiore al valore

massimo riscontrato in un gruppo di soggetti normozoospermici (Calogero et al., 2001a). Questo risultato indica che una grande percentuale di pazienti infertili che ricorre a tecniche di PMA non riuscirà ad avere una gravidanza, dato che le aneuploidie nell'embrione sono associate ad una riduzione del tasso di impianto e ad un aumento della percentuale di aborti. Nei casi più gravi, questi pazienti corrono il rischio di avere un nascituro portatore di un'aneuploidia compatibile con la vita.

Lo studio delle aneuploidie spermatiche rappresenta pertanto un valido complemento per la valutazione del rischio di trasmissione del danno genetico al prodotto del concepimento per i pazienti con oligo-asteno-teratozoospermia che intendono sottoporsi a tecniche di PMA. Esso inoltre sembra avere un valore prognostico. Infatti, noi abbiamo recentemente dimostrato che il tasso di gravidanza raggiunto dopo ICSI dai

Figura 2. Frequenza di disomia, nullisomia e diploidia in normozoospermici (CTL) e in pazienti con teratozoospermia (T) o oligo-asteno-teratozoospermia (OAT). I pazienti con T isolata hanno un tasso di disomia simile a quello riscontrato in pazienti con una più grave alterazione della spermatogenesi (modificato da: Calogero et al., 2001b).



pazienti con tasso di aneuploidie spermatiche sovrapponibile a quello dei soggetti con normozoospermia è significativamente più elevato rispetto al gruppo di pazienti con tasso di aneuploidie elevato (Calogero et al., 2002a). Lo studio delle aneuploidie spermatiche è inoltre raccomandato ai pazienti sottoposti a chemio- e/o radio-terapia per patologia oncologica che intendono avere figli sia con rapporto naturale che con tecniche di PMA, dato che il trattamento chemio-radioterapico può causare aneuploidie (De Palma et al., 2000).

Nella donna

Un aumento della frequenza di aneuploidie nell'ovocita si verifica con l'avanzare dell'età. Uno screening per la determinazione di queste anomalie non è tuttavia eseguibile.

CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

La diffusione delle tecniche di PMA ha dato notevole impulso allo studio delle cause genetiche dell'infertilità femminile e soprattutto maschile. Grazie a ciò, è oggi noto che l'infertilità riconosce una causa genetica (cro-

mosomica o genica) in un numero elevato di casi. Del tutto nuovo, nell'ambito dell'infertilità maschile, è lo studio dell'assetto cromosomico degli spermatozoi in pazienti con testicolopatia primitiva e cariotipo normale. Recenti ricerche hanno infatti indicato che un'alterazione del microambiente intra-testicolare, quale quello che si verifica nei pazienti con danno della spermatogenesi, influenza negativamente i meccanismi di segregazione cromosomica durante la meiosi con formazione di gameti aneuploidi. Pertanto, la presenza di un cariotipo normale non esclude che pazienti con oligo-asteno-teratozoospermia producano spermatozoi con alterazioni numeriche e strutturali dei cromosomi con conseguente aumentato rischio di generare figli con aneuploidie. L'alta frequenza di alterazioni genetiche nelle coppie infertili impone un appropriato inquadramento diagnostico di questi pazienti allo scopo di ridurre il rischio di trasmissione del danno genetico alla prole. Un'attenta valutazione clinica indicherà se e quale indagine genetica intraprendere per evitare un'inutile serie di esami da eseguire su tutte le coppie infertili.

BIBLIOGRAFIA

■ **Attardo T, Vicari E, Mollica F, Grazioso C, Burrello N, Garofalo MR, Lizzio MN, Garigali G, Cannizzaro M, Ruvolo G, D'Agata R, Calogero AE.**

Genetic, andrological and clinical characteristics of patients with congenital bilateral absence of the vas deferens.

Int J Andrology 24: 73-79, 2001.

■ **Badovinac R, Buretic-Tomljanovic A, Starcevic N, Kapovic M, Vlastelic I, Randic L.**

Chromosome studies in patients with defective reproductive success.

Am J Reprod Immunol 44: 279-283, 2000.

■ **Bernardini L, Gianaroli L, Fortini D, Conte N, Magli C, Cavani S, Gaggero G, Tindiglia C, Ragni N, Venturini PL.**

Frequency of hyper-, hypohaploidy and diploidy in ejaculate, epididymal and testicular germ cells of infertile patients.

Hum Reprod 15: 2165-2167, 2000.

■ **Brandenberger AW, Haengii W, Von Fischer B, Birkhaeuser MH.**

Kallmann syndrome and associated malformation of the uterus.

Fertil Steril 61: 395-397, 1994.

■ **Calogero AE, Burrello N, Grazioso C, De Palma A, Torrissi C, D'Agata R.**

Lower sperm aneuploidy rate is associated with a higher pregnancy rate in unselected patients undergoing intracytoplasmic sperm injection. In Proceedings of the 58th Annual Meeting of the American Society of Reproductive Medicine, Seattle, WA, USA, 12-16 Ottobre 2002a.

■ **Calogero AE, De Palma A, Grazioso C, Barone N, Burrello N, Palermo I, Gulisano A, Pafumi C, D'Agata R.**

High sperm aneuploidy rate in unselected infertile patients and its relationship with intracytoplasmic sperm injection outcome.

Hum Reprod 16: 1433-1439, 2001a.

■ **Calogero AE, De Palma A, Grazioso C, Barone N, Romeo R, Rappazzo G, D'Agata R.**

Aneuploidy rate in spermatozoa of selected men with abnormal semen parameters.

Hum Reprod 16: 1172-1179, 2001b.

■ **Calogero AE, Garofalo MR, Barone N, Longo GA, De Palma A, Fichera M, Rappazzo G, D'Agata R, Vicari E.**

Spontaneous transmission from a father to his son of a Y chromosome microdeletion involving the deleted in azoospermia (DAZ) gene.

J Endocrinol Invest 25: 631-634, 2002b.

■ **Casals T, Bassas L, Ruiz-Romero J, Chillon M, Gimenez J, Ramos MD, Tapia G, Narvaez H, Nunes V, Estivill X.**

Extensive analysis of 40 infertile patients with congenital absence of the vas deferens: in 50% of cases only one CFTR allele could be detected.

Hum Genet 95: 205-211, 1995.

■ **Chandley AC.**

The chromosomal basis of human infertility.

Br Med Bull 35: 181-186, 1979.

■ **Chu CS, Trapnell BC, Curristin S, Cutting GR, Crystal RG.**

Genetic basis of variable exon-9 skipping in cystic fibrosis transmembrane regulator messenger RNA. Nat Genet 3: 151-156, 1993.

■ **Claustres M, Guittard C, Bozon D, Chevalier F, Verlingue C, Ferec C, Girodon E, Caze-neuve C, Bienvenu T, Lalau G, Dumur V, Feldmann D, Bieth E, Blayau M, Clavel C, Creveaux**

I, Malinge MC, Monnier N, Malzac P, Mitre H, Chomel JC, Bonnefont JP, Iron A, Chery M, Georges MD.

Spectrum of CFTR mutations in cystic fibrosis and in congenital absence of the vas deferens in France.

Hum Mutat 16: 143-156, 2000.

■ **Davis CJ, Davison RM, Payne NN, Rodeck CH, Conway GS.**

Female sex preponderance for idiopathic familial premature ovarian failure suggests an X chromosome defect: opinion.

Hum Reprod 15: 2418-2422, 2000.

■ **De Kretser DM.**

Male infertility.

Lancet 349: 787-790, 1997.

■ **De Palma A, Vicari E, Palermo I, D'Agata R, Calogero AE.**

Effects of cancer and antineoplastic treatment on the human testicular function.

J Endocrinol Invest 23: 690-696, 2000.

■ **Dohle GR, Halley DJ, Van Hemel JO, van den Ouwel AM, Pieters MH, Weber RF, Govaerts LC.**

Genetic risk factors in infertile men with severe oligozoospermia and azoospermia.

Hum Reprod 17: 13-16, 2002.

■ **Edwards RG, Bishop CE.**

On the origin and frequency of Y chromosome deletions responsible for severe male infertility.

Mol Hum Reprod 3: 549-554, 1997.

■ **Farhi J, Homburg R, Ferber A, Orvieto R, Ben Rafael Z.**

Non-response to ovarian stimulation in normogonadotrophic, normogonadal women: a clinical sign of impending onset of ovarian failure pre-empting the rise of basal follicle stimulating hormone levels.

Hum Reprod 12: 241-243, 1997.

■ **Foresta C, Ferlin A, Gianaroli L, Dallapiccola B.**

Guidelines for the appropriate use of genetic tests in infertile couples.

Eur J Hum Genet 10: 303-312 2002.

■ **Foresta C, Moro E, Ferlin A.**

Y chromosome microdeletions and alterations of spermatogenesis.

Endocr Rev 22: 226-239, 2001.

■ **Foresta C, Moro E, Garolla A, Onisto M, Ferlin A.**

Y chromosome microdeletions in cryptorchidism and idiopathic infertility.

J Clin Endocrinol Metab 84: 3660-3665, 1999.

■ **Gekas J, Thepot F, Turleau C, Siffroi JP, Dadoune JP, Briault S, Rio M, Bourouillou G, Carre-Pigeon F, Wasels R, Benzacken B, Association des Cytogeneticiens de Langue Francaise.**

Chromosomal factors on infertility in candidate couples for ICSI: an equal risk of constitutional aberrations in women and men.

Hum Reprod 16: 82-90, 2001.

■ **Goddijn M, Leschot NJ.**

Genetic aspects of miscarriage.

Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol 14: 855-865, 2000.

■ **Hiort O, Holterhus PM, Hörter T, Schulze W, Kremke B, Bals-Pratsch M, Sinnecker GH, Kruse K.**

Significance of mutations in the androgen receptor gene in males with idiopathic infertility.

J Clin Endocrinol Metab 85: 2810-2815, 2000.

■ **Krausz C, McElreavey K.**

Y chromosome microdeletions in 'fertile' males.

Hum Reprod 16: 1306-1307, 2001.

■ **Lamb DJ.**

Debate: is ICSI a genetic time bomb? Yes.

J Androl 20: 23-33, 1999.

■ **Lissens W, Mercier B, Tournaye H, Bonduelle M, Ferec C, Seneca S, Devroey P, Silber S, Van Steirteghem A, Liebaers I.**

Cystic fibrosis and infertility caused by congenital bilateral absence of the vas deferens and related clinical entities.

Hum Reprod 11 Suppl 4: 55-80, 1996.

■ **Mak V, Zielenski J, Tsui L-C, Durie P, Zini A, Martin S, Longley TB, Jarvi KA.**

Proportion of cystic fibrosis gene mutations not detected by routine testing in men with obstructive azoospermia.

J Am Med Ass 281: 2217-2224, 1999.

■ **Meschede D, Lemcke B, Exeler JR, De Geyter C, Behre HM, Nieschlag E, Horst J.**

Chromosome abnormalities in 447 couples undergoing intracytoplasmic sperm injection-prevalence, types, sex distribution and reproductive relevance.

Hum Reprod 13: 576-582, 1998.

■ **Moro E, Marin P, Rossi A, Garolla A, Ferlin A.**

Y chromosome microdeletions in infertile men with varicocele.

Mol Cell Endocrinol 161: 67-71, 2000.

■ **Oliveira LM, Seminara SB, Beranova M, Hayes FJ, Valkenburgh SB, Schipani E, Costa EM, Latronico AC, Crowley WF Jr, Vallejo M.**

The importance of autosomal genes in Kallmann syndrome: genotype-phenotype correlations and neuroendocrine characteristics.

J Clin Endocrinol Metab 86: 1532-1538, 2001.

■ **Patrizio P, Leonard DG.**

Expansion of the CAG trinucleotide repeats in the androgen receptor gene and male infertility: a controversial association.

J Androl 22: 748-749, 2001.

■ **Peschka B, Leygraaf J, van der Ven K, Montag M, Schartmann B, Schubert R, van der Ven H, Schwanitz G.**

Type and frequency of chromosome aberrations in 781 couples undergoing intracytoplasmic sperm injection.

Hum Reprod 14: 2257-2263, 1999.

■ **Quigley CA, De Bellis A, Marschke KB, El-Awady MK, Wilson EM, French FS.**

Androgen receptor defects: historical, clinical, and molecular perspectives.

Endocr Rev 16: 271-321, 1995.

■ **Seminara SB, Oliveira LM, Beranova M, Hayes FJ, Crowley WF Jr.**

Genetics of hypogonadotropic hypogonadism.

J Endocrinol Invest 23: 560-565, 2000.

■ **Sherman SL.**

Premature ovarian failure in the fragile X syndrome.

Am J Med Genet 97: 189-194, 2000.

■ **Siffroi JP, Le Bourhis C, Krausz C, Barbaux S, Quintana-Murci L, Kanafani S, Rouba H, Bujan L, Bourrouillou G, Seifer I, Boucher D, Fellous M, McElreavey K, Dadoune JP.**

Sex chromosome mosaicism in males carrying Y chromosome long arm deletions.

Hum Reprod 15: 2559-2562, 2000.

■ **Stuppia L, Calabrese G, Guanciali Franchi PG, Mingarelli R, Gatta V, Palka G, Dallapiccola B.**

Widening of a Y-chromosome interval-6 deletion transmitted from a father to his infertile son accounts for an oligozoospermia critical region distal to RBM1 and DAZ genes.

Am J Hum Genet 59: 1393-1395, 1996.

■ **Van Steirteghem A, Bonduelle M, Devroey P, Liebaers I.**

Follow-up of children born after ICSI.

Hum Reprod Update 8: 111-116, 2002.

■ **Vegetti W, Van Assche E, Frias A, Verheyen G, Bianchi MM, Bonduelle M, Liebaers I, Van Steirteghem A.**

Correlation between semen parameters and sperm aneuploidy rates investigated by fluorescence in-situ hybridization in infertile men.

Hum Reprod 15: 351-365, 2000.

■ **Verkerk AJ, Pieretti M, Sutcliffe JS, Fu YH, Kuhl DP, Pizzuti A, Reiner O, Richards S, Victoria MF, Zhang FP.**

Identification of a gene (FMR1) containing a CGG repeat coinciding with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome.

Cell 65: 905-914, 1991.