



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI
DIPARTIMENTO DI MEDICINA VETERINARIA
CORSO DI LAUREA IN BIOTECNOLOGIE MEDICHE SANITARIE E VETERINARIE

**APPLICAZIONE DI TECNOLOGIE DI
RIPRODUZIONE MEDICALMENTE ASSISTITA**

**RELATORE:
PROF. SERGIO LEDDA**

**TESI DI LAUREA DI:
MANGIA PASQUALINA**

ANNO ACCADEMICO 2017-2018

*Ai miei genitori,
per la fiducia riposta in me,
per la possibilità che mi hanno offerto
nel realizzare il mio sogno, e...
per il sostegno costante,
mostratomi durante tutto il percorso.*

*A mia sorella, e
mio fratello
per essere stati
sempre presenti
per il loro supporto in
questi
cinque lunghi anni.*

Indice generale

Introduzione	1
INFERTILITÀ E STERILITÀ.....	1
Cause di infertilità e sterilità.....	1
INFERTILITÀ FEMMINILE.....	4
Cause e fisiopatologia dell'infertilità femminile	4
Valutazione dell'infertilità femminile	7
INFERTILITÀ MASCHILE	8
Cause e fisiopatologia dell'infertilità maschile	9
Valutazione dell'infertilità maschile.....	12
TECNICHE DI PROCREAZIONE MEDICALMENTE ASSISTITA	15
Stimolazione della crescita follicolare	17
Prelievo degli ovociti.....	18
Fecondazione in vitro	19
FIVET.....	19
ICSI.....	20
Scopo dello studio	24
Materiali e metodi	25
SPERMIOGRAMMA.....	25
Esame macroscopico	26
Esame microscopico	26
TEST DI CAPACITAZIONE.....	27
Swim up da pellet.....	30
TECNICHE DI FECONDAZIONE IN VITRO	31
Metodica di microiniezione (ICSI)	31
Metodica Fivet	32
Controllo della fertilizzazione	33

Risultati	34
Discussione	38
Conclusioni.....	42
Bibliografia	44

Introduzione

INFERTILITÀ E STERILITÀ

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

L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) e l'American Fertility Society sottolineano la distinzione tra infertilità e sterilità.

Una coppia è da considerarsi infertile quando non è in grado di concepire e di avere un bambino dopo un anno o più di rapporti sessuali regolari volutamente fecondi; viceversa, è da considerarsi sterile quella coppia nella quale uno o entrambi i coniugi sono affetti da una condizione fisica permanente che rappresenta un ostacolo alla fecondazione, la cui conseguenza è un'assoluta mancanza della capacità riproduttiva.

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

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

Cause di infertilità e sterilità

A differenza di altre condizioni patologiche in cui è noto l'agente eziologico, l'infertilità è espressione di fattori maschili e/o femminili diversi, spesso

asintomatici da un punto di vista clinico. L'infertilità viene distinta in primaria, se nell'ambito di una coppia non si è mai verificato un concepimento; e secondaria se l'incapacità di procreare consegue ad un periodo di fertilità documentato da uno o più gravidanze.

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

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

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

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

(Dunson, 2002; Schmid et al., 2007; Taylor, 2003).

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

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

Le *scelte sociali, culturali, economiche*. In particolare nei Paesi occidentali l'emancipazione della donna ha portato alla ricerca della gravidanza ad un'età materna più avanzata, portando ad un minore *out-come* riproduttivo delle coppie (Taylor, 2003). Valutare quale sia l'impatto dei diversi fattori di infertilità è molto difficile. Una stima affidabile, benché relativa solo ad una parte della popolazione, proviene dai dati raccolti dal Registro Nazionale sulla PMA.

Le cause di infertilità possono essere così distribuite:

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

INFERTILITÀ FEMMINILE

L'infertilità femminile si presenta all'interno della coppia in una percentuale di casi sovrapponibile a quella delle cause maschili.

Il fattore femminile è dunque responsabile di circa il 35% dell'infertilità e contribuisce all'infertilità di coppia in altri 13% dei casi.

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

Cause e fisiopatologia dell'infertilità femminile

L'infertilità femminile può essere dovuta ad impossibilità ad avere rapporti sessuali, e in tal caso l'origine può essere psicogena o derivante da malformazioni dell'apparato genitale, oppure è dovuta ad impossibilità a concepire. In quest'ultimo caso l'infertilità può dipendere da cause sia genitali che extragenitali che hanno danneggiato la funzione riproduttiva. Si considera in tal senso il fattore endocrino, tubarico, uterino, endometriale, cervicale, vaginale ed immunologico.

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

FATTORE TUBARICO: il 33% circa dei casi di infertilità femminile è dovuto ad alterazioni congenite o acquisite a carico delle tube di Falloppio. Alterazioni a questo livello disturbano la normale funzione di trasporto degli ovociti, degli spermatozoi o degli embrioni lungo le tube. Le alterazioni anatomiche tubariche di natura congenita sono rare. Nella maggioranza dei casi la sterilità tubarica è una conseguenza di fenomeni infiammatori e/o infettivi degli annessi e del peritoneo circostante che portano a delle modificazioni anatomiche a livello tubarico, fino a provocare la chiusura parziale o completa delle tube in un

punto qualsiasi del percorso. Anche le interruzioni volontarie di gravidanza o la presenza di dispositivi intra-uterini anticoncezionali possono essere causa di infezioni tubariche.

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

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

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

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

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

ormonale ed ovulatorio: alcune sostanze chimiche, prodotte dal processo infiammatorio conseguente all'endometriosi, sembrano in grado di interferire con i livelli di alcuni ormoni ed in particolare con il progesterone e con l'ormone

luteinizzante. Il deficit di quest' ultimo, che ha un ruolo fondamentale nel fornire l'impulso ovulatorio, sembra correlato con una mancanza di ovulazione interferenza con la funzionalità spermatica: la presenza di endometriosi comporta la produzione di alcuni mediatori biochimici e l'attivazione di alcune cellule normalmente coinvolte nei processi di tipo infiammatorio quali i macrofagi. Questi elementi avrebbero un ruolo sia nel ridurre la funzionalità degli spermatozoi riducendone la motilità e la capacità di penetrare l'ovocita, che nel determinare la loro completa eliminazione.

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

CAUSE GENETICHE: Alterazioni cromosomiche (di numero o di struttura) a carico degli autosomi o cromosomi sessuali possono causare dei problemi nella funzione riproduttiva, in quanto spesso interferiscono con la normale formazione di gameti maschili e/o femminili; certe volte ciò non si accompagna con alterazioni evidenti di altre funzioni e/o strutture dell'individuo. Le alterazioni genetiche possono infatti insorgere proprio durante la formazione dei gameti, cioè nel corso della loro meiosi. I gameti femminili sono maggiormente esposti ad errori rispetto a quelli maschili, errori nella gametogenesi femminile comportano però solo una diminuzione numerica degli ovociti prodotti. Nella donna esiste la Sindrome di Turner (45, X0), dove invece di due cromosomi sessuali XX, ne è presente uno solo; queste ragazze sono di bassa statura e soffrono di amenorrea primaria, in quanto le loro ovaie sono assenti o piccolissime, pertanto non possono avere figli. Anche la menopausa precoce è dovuta a difetti a carico del cromosoma X che regola i complicati meccanismi ovarici. In questo caso si assiste ad un esaurimento precoce degli ovociti e spesso la madre, o altre parenti in linea materna, hanno raggiunto la menopausa in età piuttosto giovane.

Valutazione dell'infertilità femminile

La valutazione del fattore femminile d'infertilità prevede:

Esame obiettivo: deve comprendere un accurato esame ginecologico che deve fornire informazioni riguardo le dimensioni dell'utero e la sua mobilità, la presenza di masse pelviche o addominali, la presenza di alterazioni a carico della vagina o cervice o di secrezioni anomale.

Pap test ed esame senologico

Esami ormonali: dosaggio ematico di LH, FSH, estradiolo, progesterone, testosterone, DHEAS, androstenedione il 3° giorno del ciclo; dosaggio ematico di progesterone e di prolattina il 18° e 21° giorno del ciclo; devono essere inoltre esclusi eventuali segni di distiroidismo e di iperandrogenismo.

Valutazione dello stato ovulatorio che consiste nella:

- misurazione della temperatura corporea basale
- test del muco cervicale
- dosaggio del progesterone plasmatico in fase medio-luteinica
- monitoraggio ecografico in un ciclo spontaneo per confermare il dato ormonale di ovulatorietà
- biopsia endometriale

Valutazione infettivologica: tamponi uretro-cervico vaginali completi per individuare e trattare le infezioni che possono ostacolare il concepimento. Gli agenti patogeni più frequenti sono Miceti, Micoplasmi e *Chlamidia T*. Inoltre sono di facile riscontro l'*E. coli*, *Strept.agalactiae*, *Enterococco f.* ed altri.

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

Valutazione anatomico-funzionale: isterosalpingografia, isteroscopia, laparoscopia.

INFERTILITÀ MASCHILE

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

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

In generale:

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

microdelezione del cromosoma Y

- la prevalenza di anticorpi anti-spermatozoo (ASA) negli uomini infertili è superiore rispetto alla popolazione di uomini fertili, anche se il meccanismo con il quale gli ASA concorrono all'infertilità maschile non è ancora del tutto chiaro (Bhasin, 2007).

Cause e fisiopatologia dell'infertilità maschile

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

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

a) alterazioni primitive o genetiche:

- *anomalie cromosomiche*: 1 uomo su 20 pazienti infertili è portatore di anomalie cromosomiche che nell'80% dei casi coinvolgono i cromosomi sessuali e nel 20% gli autosomi. Il più frequente disordine cromosomico associato all'infertilità è la Sindrome di Klinefelter (cariotipo 47,XXY)
- *microdelezioni del cromosoma Y*: a livello del cromosoma Y sono localizzati dei geni che regolano il processo della spermatogenesi; la causa più frequente di azoospermia o severa oligospermia non ostruttiva sono le microdelezioni del cromosoma Y, ragione per cui tutti gli uomini infertili che si presentano con un quadro del genere devono effettuare lo screening genetico attraverso la PCR per la ricerca di queste ultime; la maggior parte di microdelezioni insorge "de novo", anche se sono stati documentati dei casi di trasmissione da padre a figlio attraverso l'ICSI

- *altre sindromi genetiche associate all'infertilità maschile*: fibrosi cistica (il 75% dei maschi con agenesia congenita dei vasi deferenti presenta il gene CFTR mutato, anche in assenza di sintomi polmonari), emocromatosi, anemia falciforme, talassemia major, distrofia miotonica, mutazione del gene AR (Androgen Receptor)

b) alterazioni secondarie, dovute a cause

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

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

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

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

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

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

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

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

la Sindrome di Klinefelter

il criptorchidismo

il varicocele

le alterazioni della composizione del plasma seminale, dovute ad alterazioni

delle ghiandole accessorie e dei dotti di deflusso o a modificazioni nei componenti del liquido seminale, quali il fruttosio le orchiti, le sequele post-traumatiche, i disturbi iatrogeni o secondari ad irradiazione o intossicazione da farmaci o stupefacenti

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

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

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

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

Valutazione dell'infertilità maschile

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

dell'anormalità dell'esame del liquido seminale, come succede in molti pazienti, si parla di infertilità idiopatica.

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

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

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

Test post-coitale: è l'unica indagine che consente di studiare in vivo le interazioni degli spermatozoi con le secrezioni vaginali e di valutare un'eventuale aggressività del muco cervicale nei confronti degli spermatozoi. Esso consiste nella valutazione quantitativa e qualitativa degli spermatozoi presenti nel muco cervicale periovulatorio a circa 8 ore dal rapporto sessuale.

Screening genetico: le alterazioni genetiche sono presenti in circa 15% degli uomini e 10% delle donne infertili e queste includono sia alterazioni cromosomiche sia mutazioni di singoli geni. La ricerca genetica in questo campo ha subito un notevole sviluppo negli ultimi anni ed ha seguito i progressi delle

tecniche di fecondazione in vitro che rendono possibile la trasmissione di alterazioni genetiche dai genitori ai figli. I dubbi maggiori circa un possibile aumento di malattie genetiche nei figli sono stati suscitati dall'utilizzo dell'iniezione intracitoplasmatica di un singolo spermatozoo (ICSI), poiché essa oltrepassa i normali meccanismi fisiologici della fecondazione. Tuttavia il rischio di trasmissione riguarda anche la fecondazione in vitro (FIVET) classica e l'inseminazione intrauterina (IUI). L'identificazione dei fattori genetici in una coppia infertile è pertanto obbligatoria sia per una diagnosi ed un trattamento adeguati, sia ai fini prognostici.

Le più frequenti cause genetiche di infertilità maschile sono:

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

L'azoospermia e/o una severa oligospermia sono spesso associate ad alterazioni genetiche. I pazienti affetti da azoospermia non ostruttiva e/o severa oligospermia potrebbero essere portatori di alterazioni cromosomiche o microdelezioni del cromosoma Y, coloro che sono affetti da azoospermia secondaria da agenesia bilaterale dei dotti deferenti potrebbero presentare mutazioni a carico del gene per la fibrosi cistica (CFTR). Da questa breve trattazione si può dunque evincere che i test genetici per l'infertilità maschile comprendono:

1. *Analisi del cariotipo*: valuta le alterazioni di numero e struttura dei cromosomi. La frequenza di anomalie del cariotipo è inversamente proporzionale alla conta degli spermatozoi, con una prevalenza del 10-15% nei soggetti azoospermici, circa del 5% negli oligospermici e meno dell'1% nei normospermici. Il 75% di anomalie cromosomiche che si osserva negli uomini infertili è rappresentato dall'aneuploidia dei cromosomi sessuali (Sindrome di Klinefelter).
2. *Analisi delle microdelezioni del cromosoma Y*: il test è consigliato ai soggetti azoospermici o oligospermici (meno di 10 milioni per ml). È possibile

riscontrare microdelezioni del cromosoma Y nel 10–15% di uomini affetti da azoospermia e/o severa oligospermia.

3. *Analisi del gene della fibrosi cistica (CFTR)*: il test è consigliato ai soggetti azoospermici e/o oligospermici (meno di 10 milioni per ml).

Valutazione ormonale: i disordini ormonali, soprattutto alterazioni nell'asse ipotalamo-ipofisi-testicolari, sono estremamente rari nel soggetto che presenta dei valori normali dello spermogramma. Tale analisi consiste nella misurazione dell'ormone follicolo-stimolante (FSH) e del testosterone sierico; livelli elevati di FSH sono indice di danno testicolare. Se si riscontrano bassi livelli di testosterone è consigliabile ripetere l'esame effettuando la misurazione del testosterone libero e totale, dell'ormone luteinizzante (LH) e della prolattina. Molti pazienti con anomalie della spermatogenesi presentano valori normali di FSH sierico, tuttavia un aumento del FSH è caratteristico di un'alterazione nel processo di spermatogenesi.

TECNICHE DI PROCREAZIONE MEDICALMENTE ASSISTITA

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

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

La fecondazione *in vitro* vera e propria, seguita dal trasferimento del suo prodotto (*embryo transfer*), inizia nel 1958 quando i ricercatori McLaren e Biggers riescono a dimostrare che alcune blastocisti di ratto, coltivate *in vitro*, una volta impiantate nell'utero di una madre adottiva, si sviluppano fino a diventare ratti adulti, normali e fertili. Dieci anni più tardi, nel 1968, il biologo Edwards e il ginecologo Steptoe iniziano quella proficua collaborazione che poi, il 26 luglio del 1978, porta alla nascita di Louise Brown, primo essere umano

venuto al mondo grazie alle tecniche di fecondazione extra-corporea di ovociti recuperati per aspirazione follicolare. Il 18 maggio 1984 nasce a Palermo il primo bambino italiano da FIVET. Dati dai vari Registri Internazionali stimano che ogni anno vengano eseguiti nel mondo più di un milione di cicli e che, grazie a queste tecnologie, siano nati più di 7 milioni di individui. In accordo con le linee guida emanate dal Ministero della Salute, sotto la definizione di Procreazione Medicalmente Assistita sono compresi quell'insieme di interventi biomedici finalizzati a dare inizio ad una gravidanza e che si concretizzano in una gamma di opzioni terapeutiche di varia complessità e di diverso grado d'invasività sia tecnica che psicologica sulla coppia. Gli interventi di PMA possono essere suddivisi in tre livelli (Forabosco, 2005):

tecniche di primo livello:

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

tecniche di secondo livello:

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

tecniche di terzo livello:

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

In ottemperanza del concetto di “gradualità terapeutica”, previsto dalla Legge 40 del 2004, legge che definisce le norme in materia di Procreazione Medicalmente Assistita, resta fermo il fatto che bisogna giungere alle tecniche di fecondazione

assistita qualora le alternative medico-chirurgiche adottate non abbiano dato gli effetti sperati, nonché quando sono compromesse le reali possibilità di procreare in modo naturale in un tempo ragionevolmente breve ed in relazione all'età riproduttiva della singola coppia. Tutto ciò per evitare il rischio che queste tecniche vengano utilizzate in modo improprio ed esagerato. Una corretta gestione delle coppie prevede dunque un accurato *iter* diagnostico ed un approccio terapeutico multidisciplinare, farmacologico e/o chirurgico, che abbiano come obiettivo di rendere il percorso, che porterà le coppie ad ottenere la gravidanza, il più agevole possibile (Inaudi et al., 2005).

Stimolazione della crescita follicolare

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

I farmaci solitamente somministrati durante le procedure di IVF sono le gonadotropine. La dose di gonadotropine impiegata viene stabilita sulla base di programmi individualizzati. In rapporto alle caratteristiche cliniche della paziente la stimolazione è finalizzata alla produzione di un numero di follicoli più elevato possibile: questo perché il rischio di gravidanza plurima dipende essenzialmente dal numero di embrioni che si decide di trasferire successivamente e non dal numero di ovociti ottenuti. D'altra parte il dosaggio dei farmaci deve essere limitato per ridurre il rischio di insorgenza di importanti effetti collaterali come ad esempio la Sindrome da Iperstimolazione Ovarica. Al fine di evitare una ovulazione prematura in corso di stimolazione ovarica viene eseguita inoltre la cosiddetta "soppressione ipofisaria" che consiste nella somministrazione di farmaci che bloccano l'attività dell'ipofisi (ghiandola deputata alla regolazione dell'attività dell'ovaio), facendo sì che quest'ultima dipenda esclusivamente dai farmaci somministrati in corso di stimolazione. Lo sviluppo follicolare viene quindi monitorato mediante controlli ecografici ripetuti e dosaggi dei livelli di estradiolo fintanto che i follicoli di maggiori dimensioni

non abbiano raggiunto un diametro medio superiore ai 17-18 mm. A questo punto viene somministrata una dose di Gonadotropina Corionica (HCG) necessaria per conseguire la maturazione finale degli ovociti. In rapporto alla risposta della paziente alla terapia di stimolazione della funzione ovarica ed in base al livello di picco dell'estradiolo ottenuto nel corso di tale terapia, le pazienti vengono classificate in *high*, *intermediate* and *low responders* e l'appartenenza all'una o all'altra classe sembra essere predittiva dell'esito del ciclo di fecondazione in vitro (Muasher, 1992).

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

Prelievo degli ovociti

Il prelievo degli ovociti, comunemente definito *pick-up* (PU), viene effettuato dopo circa 36 ore dalla somministrazione del HCG, che ha lo scopo di indurre la maturazione finale degli ovociti. Durante tale procedura, eseguita previa anestesia locale o sedazione profonda, un apposito ago montato su una sonda ecografica transvaginale viene utilizzato per aspirare il fluido follicolare con conseguente raccolta degli ovociti in esso contenuti. Il liquido follicolare viene recuperato in una provetta mantenuta a 37°C, che viene in seguito consegnata all'embriologo per l'identificazione degli ovociti (Figura 1). Il contenuto della provetta viene svuotato in appositi contenitori e allo stereomicroscopio l'embriologo inizia la ricerca degli ovociti. L'ovocita recuperato è circondato da cellule della granulosa che formano un complesso detto cumulo ooforo. La parte interna di questo cumulo, a stretto contatto con l'ovocita, viene detta corona radiata. Quindi in definitiva, al momento del *pick-up* vengono recuperati i complessi cumulo ooforo-ovocita (COC)(Figura 1).



Figura 1. COCs allo stereomicroscopio.

Fecondazione *in vitro*

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

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

FIVET

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

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

- infertilità idiopatica

Quando viene scelta come metodica di fecondazione la FIVET, i COC identificati al *pick-up* vengono inseminati con un determinato numero di spermatozoi capacitati. Dopo 16-18 ore di incubazione si procede al controllo dell'avvenuta fecondazione all'invertoscopio, ossia si valuta la presenza di due pronuclei accostati che contengono rispettivamente il patrimonio genetico maschile e femminile prima che si fondano per completare la fecondazione e divenire zigote (Figura 2). In genere il 65-75% degli ovociti si feconda; nel caso in cui la FIVET non dia risultati, si può ricorrere alla ICSI.

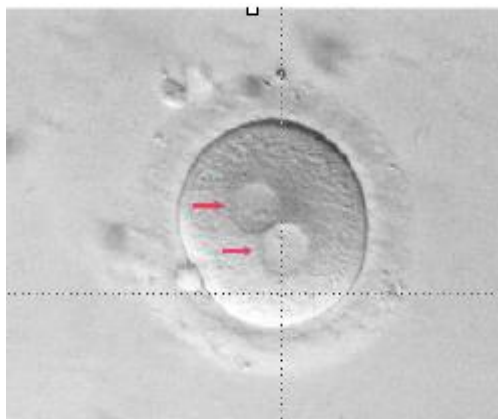


Figura 2. Ovocita fertilizzato

(le frecce rosse indicano la presenza dei due pronuclei).

ICSI

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

Le indicazioni attuali per la ICSI sono:

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

- limitato numero di ovociti disponibili da inseminare

L'aspetto innovativo di tale tecnica consiste nella microiniezione diretta di un singolo spermatozoo nel citoplasma dell'ovocita. Gli ovociti vengono iniettati utilizzando delle sofisticate apparecchiature che comprendono l'uso di un microscopio a forte ingrandimento, dei microaghi ed un micromanipolatore (Figura 3).

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



Figura 3. Micromanipolatore.

A differenza della FIVET in questo caso è necessario, prima dell'inseminazione, attuare la rimozione del cumulo ooforo e della corona radiata che circondano l'ovocita, mediante mezzi meccanici ed enzimatici. Dopo questa fase è possibile valutare il grado di maturità degli ovociti e la loro qualità morfologica. Solo gli ovociti maturi in Metafase II della seconda divisione meiotica che presentano il primo globulo polare estruso vengono fecondati mediante ICSI (Figura 4).



Figura 4. ovocita in metafase II.

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

Uno spermatozoo viene iniettato mediante la micropipetta *injecting* all'interno del citoplasma di un'ovocita maturo fissato con una pipetta chiamata *holding*. Per evitare il danneggiamento del fuso mitotico l'ovocita viene posizionato con il globulo polare a ore 6 o a ore 12 in modo che il fuso sia lontano dal punto di entrata dell'ago (a ore 3) contenente lo spermatozoo (Rienzi et al., 2003)(Figura 5). Dopo 16-18 ore di incubazione viene controllata l'avvenuta fertilizzazione.

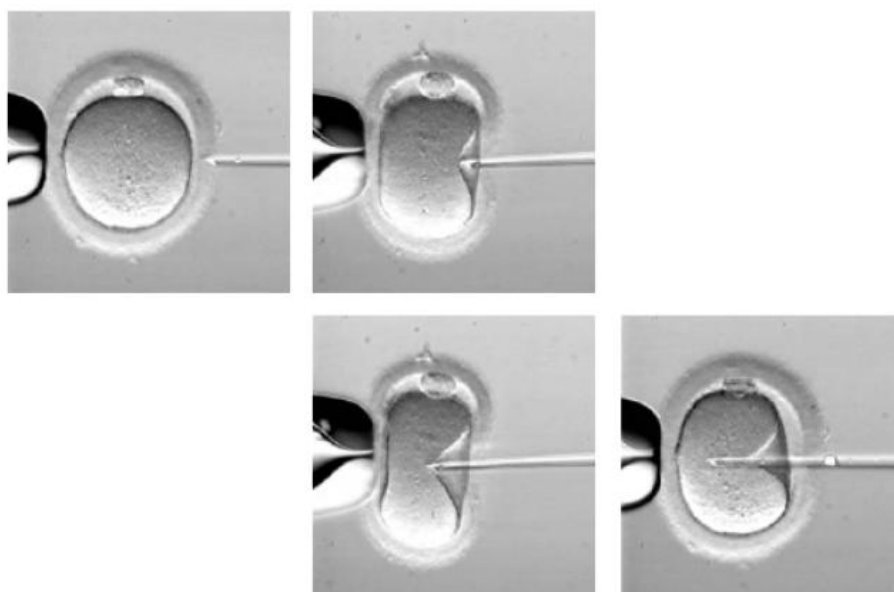


Fig.5 Tecnica ICS

Scopo dello studio

La necessità di effettuare diagnosi sempre più accurate di infertilità e il rapido espandersi delle tecniche di PMA hanno permesso in questi ultimi anni di condurre indagini più precise e maggiormente riproducibili.

Considerando che il fattore maschile ha un ruolo sempre più rilevante nell'infertilità di coppia, il mondo scientifico si sta orientando alla ricerca di terapie più mirate per risolvere il problema, qualora possibile.

Sulla base delle premesse esplicitate, questo studio si propone di:

- Analizzare nel contesto internazionale e nazionale l'applicazione e il significato sociale delle tecniche di fecondazione assistita adoperate in relazione all'incidenza del fattore maschile.
- Evidenziare in un modello specifico i criteri di scelta delle due principali tecniche di riproduzione (FIVET o ICSI) per la risoluzione delle problematiche riproduttive dovute ad una ipofertilità maschile.

Materiali e metodi

Per valutare l'applicazione delle tecniche di fecondazione assistita a livello internazionale ho analizzato i dati forniti da rassegne bibliografiche internazionali: riviste di settore indicizzate (Banca del seme, Registro Europeo e dati ESHRE). I dati ufficiali del Registro Nazionale sono il quadro di riferimento per l'analisi del sistema italiano in materia, necessari per esaminare in maniera più accurata la diffusione del fenomeno PMA in tutte le sue applicazioni, la sua rilevanza, le eventuali problematiche correlate all'efficacia dei trattamenti (FIVET-ICSI) e alla loro sicurezza. Infine, ho citato i dati relativi all'attività del centro ospedaliero CHU-BRUGMANN di Bruxelles dove ho avuto modo di svolgere uno stage.

Il principale obiettivo del mio lavoro è stato la valutazione degli spermatozoi di 35 pazienti: 16 con astenozoospermia, 9 con oligo-astenozoospermia e 10 soggetti con parametri normali del liquido seminale, reclutati mediante consenso informato nel laboratorio di Seminologia ed Andrologia presso il centro ospedaliero poc'anzi menzionato.

Il materiale spermatico, è stato esaminato, in prima istanza su materiale a fresco al M.O. e successivamente dopo incubazione a 37°C per 30 minuti. Al termine del periodo di incubazione sono stati presi in considerazione i seguenti parametri:

motilità progressiva;

motilità non progressiva;

immobili.

SPERMIOGRAMMA

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

campione di liquido seminale di base.

Raccolta e analisi del seme. Esame macroscopico.

I campioni di eiaculato in esame, sono stati raccolti dopo un periodo di astinenza variabile da 2 a 5 giorni, mediante ipsazione, in apposito contenitore sterile.

Lo studio delle caratteristiche morfologiche e microscopiche del liquido seminale raccolto, è stato effettuato entro 30 minuti dalla fluidificazione, per limitare gli effetti deleteri della deidratazione, del pH e dei cambiamenti di temperatura.

Completata la fluidificazione, è seguita la valutazione dei parametri chimico-fisici:

- La viscosità e il volume sono stati determinati mediante una pipetta monouso in plastica che consente di prelevare per intero il campione dal contenitore e di lasciarlo gocciolare per gravità in modo da verificare la lunghezza del filamento ottenuto: un liquido seminale normale fluisce goccia a goccia dalla pipetta ed ha un volume pari o maggiore a 1,5 ml mentre un seme anomalo forma un filamento lungo più di 2 cm.
- Il liquido seminale è di colore avorio ma può apparire diversamente se alterato, ad esempio è rossastro se è presente emospermia, cioè se contiene emazie e giallastro in pazienti affetti da ittero o che assumono alcuni tipi di vitamine e farmaci.
- Il pH è stato valutato tramite un indicatore con range da 7 a 8,4 tenendo presente che un pH pari a 7,2 è considerato come valore minimo soglia.

Esame microscopico.

A questo punto è stato utile effettuare una prima valutazione microscopica a fresco, su microscopio invertito ad ingrandimento 10x, che permette di valutare la presenza di spermioagglutinazione e di aggregazione nemaspermica, vale a dire la presenza di adesione degli spermatozoi mobili o immobili tra di loro ma anche ai filamenti di muco, alle altre cellule o ai detriti. Tale osservazione consente di stimare il numero di altre cellule presenti nel liquido seminale, cellule epiteliali del tratto genitourinario e cellule rotonde (leucociti e cellule

germinali). (Fig.6).

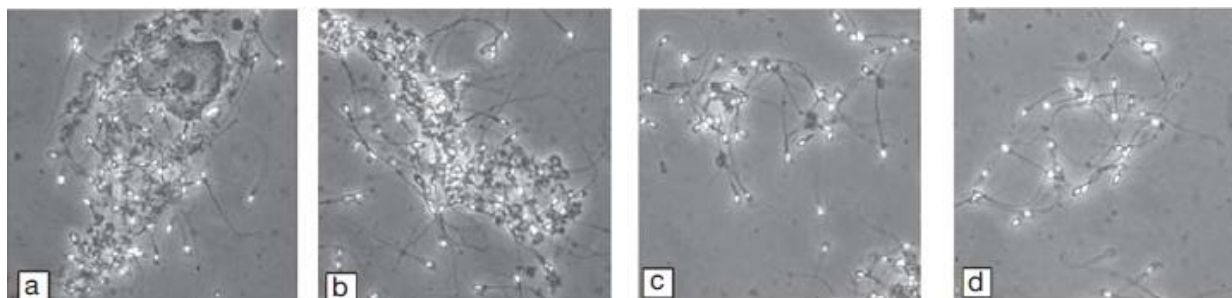


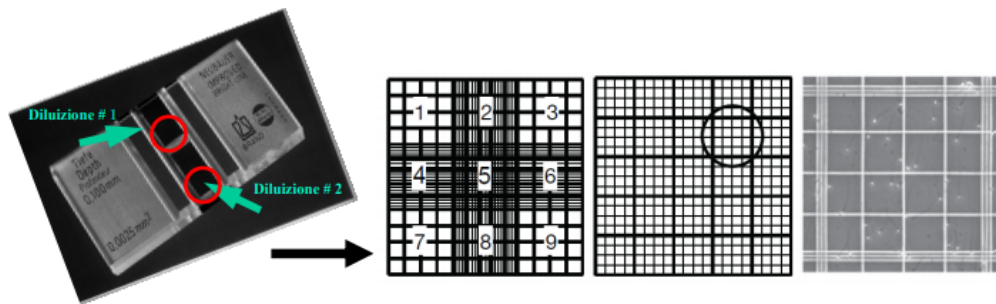
Fig.6 Aggregazione non specifica di spermatozoi nel liquido seminale. Quadri di spermatozoi aggregati a cellule epiteliali (a), detriti (b) o spermatozoi (c, d).

La motilità spermatica è stata valutata con un'osservazione microscopica a fresco entro la prima ora dall'eiaculazione per limitare le alterazioni dovute alla disidratazione, al pH, ai cambiamenti di temperatura; collocando su un vetrino porta-oggetto 10 μ l di campione, coprendo con vetrino copri-oggetto 22x22 mm ed effettuando l'osservazione su un microscopio invertito ad ingrandimento 40x distinguendo gli spermatozoi in quattro categorie in base al tipo di motilità:

1. Spermatozoi con motilità di tipo a (progressiva veloce), quelli che si muovono attivamente in modo lineare ($> 25 \mu\text{m/s}$ a $37 \text{ }^\circ\text{C}$);
2. Spermatozoi con motilità di tipo b (progressiva lenta o irregolare);
3. Spermatozoi con motilità di tipo c (non progressiva);
4. Spermatozoi con motilità di tipo d (immobili);

Per determinare la conta spermatica, cioè il calcolo della concentrazione nemaspermica nel liquido seminale è stato necessario diluire un'aliquota del campione in acqua con rapporto 1:1 e utilizzare la camera di conta di Makler, costituita da due parti: una base metallica porta-oggetto su cui vengono posti 10 μ l di campione e una parte superiore copri-oggetto su cui è disegnata al laser una griglia quadrettata (100 quadretti di $0,1 \times 0,1 \text{ mm}$ ciascuno) (Figura 7).

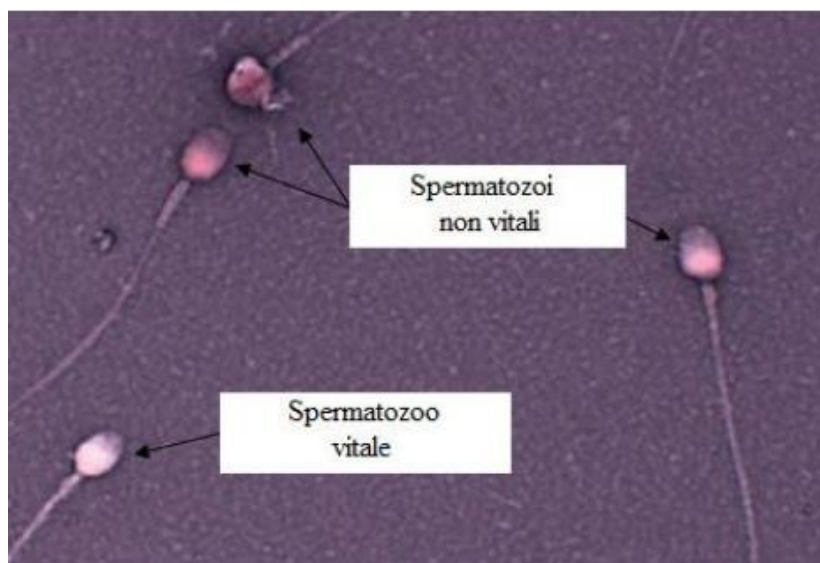
Osservando la camera di conta al microscopio invertito ad ingrandimento 10x risulta che il numero di spermatozoi contati su ogni riga della griglia equivale alla concentrazione in milioni/ml.



Un ulteriore parametro valutato è stata la vitalità nemaspermica mediante test Eosina/Nigrosina. Grazie a questa procedura la vitalità degli spermatozoi è stata determinata tenendo conto che le membrane plasmatiche delle cellule morte permettono la penetrazione di coloranti i quali invece non permeano le membrane delle cellule vitali. Per evitare effetti negativi dovuti alla disidratazione o al cambiamento di temperatura il test Eosina/Nigrosina deve essere effettuato entro la prima ora dalla fluidificazione del campione.

Per eseguire il test Eosina/Nigrosina è stata utilizzata una soluzione contenente 0,1 g di eosina in 10 ml di soluzione allo 0,9% di NaCl e una contenente 1g di nigrosina in 10 ml di acqua distillata che, rendendo il fondo scuro, consente di distinguere più facilmente anche gli spermatozoi scarsamente colorati. La preparazione del vetrino prevede l'aggiunta di 50 μ l di campione a 100 μ l di soluzione contenente eosina, con aggiunta ulteriore di 150 μ l di soluzione contenente nigrosina dopo aver atteso circa 30 secondi; sul vetrino porta-oggetto vengono infine collocati e strisciati con un vetrino copri-oggetto 10 μ l della sospensione ottenuta. Il vetrino è stato esaminato su un microscopio ottico in campo chiaro ad ingrandimento 1000x ad immersione contando 100 spermatozoi e distinguendoli in vitali e non vitali (Figura 8).

Fig.8 Immagine al microscopio ottico di vetrino per il test Eosina/Nigrosina

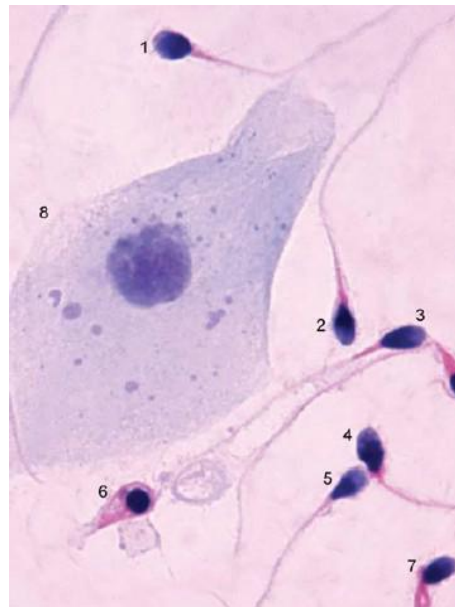


Infine, per completare l'analisi del liquido seminale, è stato necessario effettuare la valutazione della morfologia spermatica. Dopo aver strisciato 10 μ l di seme su un vetrino porta-oggetto, il campione è stato fatto essiccare e successivamente si è proceduto con la colorazione. Il processo prevede due diverse fasi:

1. Il primo colorante utilizzato è il May-Grunwald, costituito da eosinato di blu di metilene, che ci permette di evidenziare i nuclei in rosso-violaceo ed il citoplasma basofilo in blu. Il vetrino resta a contatto con il colorante per quattro minuti e poi viene sciacquato con acqua distillata.
2. Il secondo è il colorante Giemsa, una miscela costituita da blu di metilene cloruro, blu di metilene eosinato, azzurro II eosinato, che aumenta l'intensità della colorazione nucleare e la capacità di evidenziare selettivamente gli elementi cellulari. Tale colorante viene diluito 1:10 in acqua distillata, agisce per 18 minuti ed è poi rimosso tramite lavaggio del vetrino in abbondante acqua. Asciugato il vetrino a temperatura ambiente, la valutazione della morfologia spermatica è stata effettuata mediante l'osservazione di 200 spermatozoi in un microscopio ottico in campo chiaro con obiettivo 100x ad immersione ad olio. È stato osservato ogni spermatozoo esaminando la testa, il collo e la coda al fine di identificare se esso fosse normale o presenta anomalie nelle sue diverse strutture; per considerare uno spermatozoo normale sia la testa che la coda devono essere normali e rispettare criteri precisi.

Fig.9 Valutazione della morfologia nemaspermica.

- Forma della testa normale (1, 2, 4)
- Forma della testa atipica (4, 5, 7)
 - Spermatozoo atipico (6)
 - Cellula epiteliale (8)



Poiché l'esame standard del liquido seminale che consente di isolare il maggior numero di spermatozoi vivi, dotati di buona motilità progressiva e morfologia, minimizzando lo stress ossidativo; non è predittivo nei confronti della capacità fecondante degli spermatozoi, è stato fondamentale indurre in vitro la CAPACITAZIONE. Si tratta della fase finale di maturazione dello spermatozoo dove acquista la capacità di interagire con il complesso cumulo-ovocita, subisce la reazione acrosomiale e diventa potenzialmente in grado di fecondare gli ovociti. Per raggiungere tali obiettivi, è stato necessario procedere alla *separazione degli spermatozoi dal plasma seminale*. La metodica utilizzata in tutti gli esperimenti descritti in questo lavoro è quella dello *Swim-Up da pellet* (Kerin et al., 1984).

Swim-Up da pellet

Il liquido seminale appena raccolto è stato lasciato a 37°C per circa 20-30 minuti, al fine di permetterne la liquefazione. Il campione è stato diluito con un egual volume di terreno di lavaggio SPM (Origio MediCult Media, Denmark) preriscaldato a 37°C e centrifugato a 400 x g per 10 minuti; il soprannatante è stato eliminato e il *pellet* stratificato con 0,5 ml di terreno IVF contenente albumina al 5% (Origio MediCult, Denmark) preriscaldato a 37°C (5% di CO₂). Dopo un'incubazione di 30-45 minuti a 37°C al 5% di CO₂, lo strato superiore contenente gli spermatozoi capacitati, è stato prelevato e analizzato.



Figura 10. Rappresentazione schematica del procedimento di capacitazione *in vitro* la metodica dello Swim-Up da pellet (Kerin et al., 1984)

Infine i campioni di liquido seminale sono stati suddivisi in base alla tipologia di fecondazione *in vitro* effettuata (FIVET o ICSI).

FECONDAZIONE IN VITRO

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

Metodica di microiniezione (ICSI)

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

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

Metodica FIVET

I complessi oocita-cumulo ooforo (COC) sono stati lasciati in incubazione a 37°C in atmosfera al 5% di CO₂ prima di effettuare la FIVET. Nel frattempo è stata effettuata la capacitazione *in vitro* degli spermatozoi mediante la metodica dello *Swim up da pellet*. È stata valutata la concentrazione e la motilità degli spermatozoi capacitati e stimata la maturità degli oociti osservando i COC all'invertoscopio. I COC prescelti sono stati posizionati separatamente in gocce di 50 µl di terreno poste su una capsula Petri ricoperta d'olio. A ciascuna goccia sono stati aggiunti circa 15000 spermatozoi capacitati e successivamente la capsula Petri è stata posta in incubazione a 37°C (5% CO₂) per permettere la fertilizzazione.

Controllo della fertilizzazione

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

pipette di diametro pari a 140 μm . Osservando l'ovocita, l'avvenuta fertilizzazione è stata confermata valutando la presenza di due pronuclei, uno derivante dall'ovocita ed uno dallo spermatozoo, e due globuli polari. Il secondo globulo polare viene estruso dopo l'attivazione dell'ovocita e va a completare la seconda divisione meiotica.

Gli zigoti che presentavano 1 o 3 pronuclei, contenenti quindi un alterato corredo cromosomico, sono stati eliminati, mentre gli zigoti derivanti da una normale fertilizzazione sono stati classificati in base alla morfologia dei pronuclei e alla disposizione dei nucleoli quindi depositati nelle piastre di terreno fresco e mantenuti in incubatore a 37°C (5% CO₂). In questo studio il tasso di fertilizzazione (%) è stato calcolato per ogni coppia dividendo il numero di ovociti fertilizzati per il numero di ovociti inseminati. In seguito alla valutazione della qualità degli embrioni, i migliori sono stati trasferiti in utero.

Risultati

Su Focus on Reproduction (la newsletter dell'ESHRE), è stata pubblicata una sintesi in anteprima degli ultimi dati sul monitoraggio annuale che la Società Europea per la Riproduzione ha svolto sull'attività di 1.003 centri europei di fecondazione assistita (34 paesi del vecchio continente inclusa l'Italia).

In Europa sono stati posti in essere 530.000 cicli di fecondazione assistita mentre negli Stati Uniti 189.232.

I paesi europei più attivi risultano essere la Francia (74.767 cicli), la Germania (68.041 cicli), il Regno Unito (34.314 cicli), la Spagna (54.266 cicli) e l'Italia (52.032 cicli). Interessante è il dato riguardante l'applicazione delle tecniche ICSI o FIVET per milione di abitanti e si calcola intorno a 1.500 cicli; solo pochi paesi lo superano (Danimarca: 2.726 cicli per milione di abitanti) o lo raggiungono (Belgio, Repubblica Ceca, Slovenia, Svezia, Finlandia, Norvegia). Non c'è molta omogeneità nei risultati per via delle diverse legislazioni in vigore nei vari paesi ma anche delle abitudini (non paragonabili) nel modo di eseguire le tecniche. La disparità legislativa ha avuto come conseguenza una massiccia "migrazione" di italiani all'estero per realizzare il desiderio di genitorialità attraverso una gravidanza assistita. Il superamento di moltissimi limiti precedentemente previsti dalla legge ha portato a un vero e proprio boom della PMA nel nostro paese. Fra le svolte che hanno segnato una vera e propria rivoluzione in questo settore va annoverata senz'altro l'introduzione dell'ICSI (Intra-Cytoplasmatic Sperm Injection, iniezione intra-citoplasmatica di spermatozoi); che dal suo esordio ha fatto registrare un aumento esponenziale delle richieste, grazie alle elevate percentuali di successo come confermato dai dati rilevati a livello mondiale con la sua applicazione nel 69,1% dei casi e a livello Europeo nel 67% rispetto alla FIVET con il suo 33%.

	Registro Europeo ESHRE (2013)		Registro Regno Unito HFEA (2014)	Registro Italiano ISS (2015)	Futura PMA (2016)
Cicli iniziati	374.177		46.137	55.239	712
Età media donna	/		35,0	36,7	36,9
% grav/pick	FIVET 29,4	ICSI 27,8	/	20,1	25,6
% grav/transfer	FIVET 33,8	ICSI 32,3	36,3	26,5	29,1
% gemellarità	17,3		15,9	17	19,8
% trigemine	0,6		n.v.	0,8	0
% parto/pick	/		25 (% su cicli iniziati)	N.V. (13,1% perse al follow up)	22 (1 grav persa al follow up =0,8%)
% gravidanza da scongelamento embrionario/transfer	27%		33,7%	28,5%	25,9%

Risultati dei cicli di FIVET e ICSI secondo le principali casistiche europee.

Distribuzione dei cicli iniziati con tecniche a fresco ed età media per il tipo di tecnica utilizzata nell'anno 2016, secondo la tipologia di servizio del centro.

Tipologia del servizio	Cicli iniziati da tecniche a fresco	FIVET			ICSI		
		Cicli	%	Età media delle pazienti	Cicli	%	Età media delle pazienti
Pubblico	21.162	4.244	20,1	36,4	16.918	79,9	36,4
Privato convenzionato	14.988	1.731	11,5	36,2	13.257	88,5	36,9
Privato	17.756	1.609	9,1	37,4	16.147	90,9	37,2
Totale	53.906	7.584	14,1	36,5	46.322	85,9	36,8

Anche in Italia si conferma dai dati riportati nel Registro Nazionale un maggior successo nell'esecuzione della tecnica ICSI (85%) rispetto alla FIVET (14%).

L'età della paziente è una delle variabili che maggiormente influisce sul buon esito dell'applicazione delle tecniche di fecondazione assistita e quindi sulla probabilità di ottenere una gravidanza.

La quota di donne con età superiore ai 40 anni è in aumento sia per la tecnica ICSI (+1,4%) che per la tecnica FIVET (+1,8%).

Il dato sull'accesso alle tecniche delle donne che hanno almeno 40 anni è tra i

più alti nei paesi europei: nell'ultimo articolo pubblicato dal Registro europeo, riferito all'attività del 2013, le percentuali di donne con più di 40 anni che iniziano un ciclo a fresco in paesi confrontabili con l'Italia per numero di cicli iniziati con tecniche a fresco sono il 14,9% in Francia, il 21,7% in Germania ed il 17,4% nel Regno Unito.

Anche per il partner maschile la classe di età maggiormente rappresentata è quella 35-39 anni con il 33,9% dei cicli iniziati, dato comunque in diminuzione (-1,5%) a favore delle 2 classi che raccolgono i partner con più di 40 anni che raggiungono il 49,3%.

Distribuzione dei cicli iniziati con tecniche a fresco secondo le classi di età del partner maschile.

Classi di età del partner maschile	Cicli Iniziati con tecniche a fresco	
	N	%
≤ 34 anni	9.038	16,8
35-39 anni	18.282	33,9
40-44 anni	16.762	31,1
≥ 45 anni	9.824	18,2
Totale	53.906	100

Avendo il partner maschile un ruolo sempre più rilevante nell'infertilità di coppia ed essendo la qualità del liquido seminale di un uomo indicatore del suo stato di salute generale, mi sono proposta con il mio progetto di lavoro, di analizzare 35 liquidi seminali (16 pazienti con astenozoospermia, 9 pazienti con oligo astenozoospermia, e 10 soggetti con parametri normali) di partner appartenenti a coppie infertili sottoposte a tecniche di fecondazione in vitro (FIVET, ICSI), accolte presso il centro ospedaliero CHU BRUGMANN di Bruxelles, previo consenso informato. Come riportato nella sezione materiali e metodi, di ciascun campione è stata valutata, secondo le linee guida del WHO del 1999, la concentrazione, la motilità progressiva rapida e lenta degli spermatozoi e indotta la capacitazione in vitro per garantire la selezione di spermatozoi vitali con caratteristiche migliori.

Pazienti	Volume	N° spz/ml	Conc/ eiaculato	Motilità progressiva	Motilità totale	Vitalità
10	2,4	116*10 ⁶	188*10 ⁶	45,00%	78,00%	89,00%
16	2,9	80 *10 ⁶	36*10 ⁶	3,00%	11,00%	68,00%
9	2	6*10 ⁶	-	-	-	-

Tra le tecniche di procreazione medicalmente assistita usate abbiamo selezionato le tecniche di II livello. La decisione circa la scelta della tecnica da adoperare sui pazienti è stata adottata in base alla qualità del liquido seminale (il giorno del prelievo ovocitario) e alla storia clinica del paziente. In laboratorio si è applicata l'ICSI nei pazienti affetti da oligoastenozoospermia e astenozoospermia mentre la FIVET nei pazienti che presentavano parametri normali del liquido seminale. Dai dati raccolti presso la clinica dove ho svolto il mio stage si evince che l'ICSI ha registrato un aumento esponenziale dei tassi d'impianto passando dal 17.6 % nel 2011 al 25.3 % nel 2017, pure il numero di ovociti trasferiti è aumentato notevolmente dal 32.8 % nel 2011 al 39.8 % nel 2017 rispetto all'utilizzo dell'inseminazione convenzionale FIV (fecondazione in-vitro).

FIV	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017
OPU/anno	882	781	814	694	702	681	738
Tasso oociti maturi %	82	84	86	86	83	84	84
Tasso di fertilizzazione %	69	69	68	71	71	72	71
% OPU ICSI			56	57	57	54	59
% hCG + trasferimento	32,8	31,3	34,5	38,5	36,3	35,6	39,8
Tasso d'impianto %	17,6	17,0	21,1	21,8	18,2	22,6	25,3

Discussione

A quarant'anni dalla nascita di Louise Brown, la prima bambina concepita in *provetta*, il numero dei bambini nel mondo nati grazie alla fecondazione in vitro e altri trattamenti contro l'infertilità è salito oltre gli 8 milioni. Ad annunciarlo durante il 34esimo congresso della European Society of Human Reproduction and Embryology (Eshre) in corso a Barcellona è stato Christian de Geyter, presidente dell'Ivf Monitoring Consortium dell'Eshre. Il calcolo dell'attuale cifra è stato effettuato grazie ai dati dei registri mondiali e nazionali dal 1991 al 2014 e indica l'aumento del ricorso all'uso dell'ICSI per il trattamento dell'infertilità. Secondo le stime Eshre, nascono ogni anno in media oltre mezzo milione di bambini per mezzo della PMA e, in totale, vengono effettuati più di 2 milioni di cicli di trattamento e di questi il 69,1% sono realizzati mediante l'impiego della tecnica ICSI. In relazione ai dati riportati nel registro Europeo, in Europa è stato confermato il continuo ricorso all'uso dell'ICSI pari al 67% per il trattamento dell'infertilità rispetto alla FIVET con il suo 33%.

La Spagna rimane il paese più attivo con 119.875 cicli di trattamento eseguiti nel 2015, seguita dalla Russia con 110.723 cicli, Germania con 96.512 e Francia con 93.918. In Italia, gli ultimi dati riportati dal Ministero della Salute evidenziano come la tecnica ICSI sia utilizzata nell'84% dei casi contro il 16% di cicli con FIVET. Analoghi risultati sono stati riscontrati nella clinica CHU-BRUGMANN di Bruxelles dove si è registrato un aumento esponenziale per la tecnica ICSI dei tassi d'impianto, passando dal 17.6 % nel 2011 al 25.3% nel 2017, unito ad un notevole aumento del numero di ovociti trasferiti mutando dal 32.8 % nel 2011 al 39.8 % nel 2017. L'applicazione di questa metodica nei cicli a fresco è in crescita e il suo eccessivo impiego, è oggi oggetto di dibattiti. La ICSI in determinati casi è consigliata/obbligata ma ciò non giustifica l'elevato numero di procedure eseguite attraverso questa metodica, rispetto all'uso dell'inseminazione convenzionale FIVET, che prevede di mettere a contatto gli spermatozoi, accuratamente trattati, con l'ovocita. La principale indicazione al trattamento con ICSI è l'infertilità da fattore maschile, presente nel 40% dei casi, da qui si deduce l'uso smodato. Nella più recente analisi compiuta dalla Practice Committee della American Society for Reproductive Medicine (Practice

Committees of the American Society for Reproductive Medicine and Society for Assisted Reproductive Technology Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) for nonmale factor infertility: a committee opinion. *Fertil Steril* 2012) sono state esaminate alcune tra le applicazioni oggi più comuni della tecnica ICSI in assenza del fattore maschile. Dall'analisi dei dati si evince che il principale impiego riguarda i casi di infertilità inspiegata, il basso numero di ovociti, il fallimento dei cicli precedenti di fertilizzazione e l'età avanzata della donna. Benché, secondo alcuni studi l'applicazione della tecnica ICSI comporti un miglioramento dei risultati primari (tasso di fertilizzazione e qualità embrioni), i dati sulle gravidanze non mostrerebbero una significativa variazione.

Da ciò deriva che, in assenza di fattore maschile, la FIVET dovrebbe essere considerata ad oggi, la scelta preferenziale per il trattamento. Nei casi in cui ci sia un fattore maschile severo, a causa della presenza di spermatozoi con ridotta motilità o con profili morfologici carenti, la ICSI è la tecnica indicata. Notevoli progressi sono stati compiuti di recente nelle strategie terapeutiche, come la fertilizzazione in vitro (IVF) e la micro inseminazione; tuttavia tali miglioramenti sono limitati al trattamento dei sintomi, ma non fanno luce sulle cause che conducono all'infertilità quindi non c'è progresso nell'ambito della prevenzione. Si ritiene che un'infertilità (primitiva o secondaria) può interessare circa il 15% di tutte le coppie durante la loro vita riproduttiva; circa nella metà dei casi la causa si individua nel maschio, infatti negli ultimi 10-15 anni si è registrato un poderoso aumento dell'infertilità maschile. Un dato allarmante, che si attesta intorno al 90%, dovuto alla mancata prevenzione e alla ricerca del parere di un andrologo solo in caso di sospetto concreto di patologia. Le statistiche condotte a livello internazionale evidenziano che soltanto il 56% delle coppie infertili chiede tempestivamente aiuto a degli specialisti e, di queste, soltanto il 22% decide di sottoporsi a un percorso adeguato di cura. Un problema molto evidente anche in Italia: uno studio multicentrico condotto nel 2013 ha messo in evidenza come l'intervallo medio fra la presa di coscienza di un'eventuale infertilità e la prima consultazione medica è di circa 13 mesi, mentre il lasso di tempo fra la prima visita medica e lo sviluppo di un percorso di cura da parte di un centro specialistico è di circa 10 mesi. Un recente studio condotto su un campione di 43.000 pazienti dalla Hebrew University di Gerusalemme e pubblicato sulla rivista *Human Reproduction Update*, ha

sottolineato che il numero di spermatozoi nei maschi occidentali negli ultimi decenni è diminuito drasticamente: dal 1973 al 2011, si sarebbe verificato un calo del 52,4% della concentrazione dello sperma; quest'ultima è associata ad alterazioni metaboliche, a rischi cardiovascolari e ad una ridotta massa ossea. Nello specifico, gli uomini infertili con bassa concentrazione spermatica, hanno più frequentemente sovrappeso, ipertensione, livelli di colesterolo 'cattivo' (LDL) trigliceridi più elevati e un colesterolo 'buono' ridotto. I ricercatori hanno dimostrato inoltre che questi soggetti hanno un rischio 12 volte maggiore di manifestare ipogonadismo, cioè bassi livelli di testosterone, il più importante ormone 'maschile' prodotto dai testicoli. La metà degli uomini con un basso livello di testosterone presenta già nella giovane età segni di osteoporosi. Altri fattori responsabili sono lo stress, il fumo e l'esposizione a fattori inquinanti. Oltre alle cause che colpiscono il liquido seminale, come la aspermia (assenza del liquido stesso), la azoospermia (mancanza di spermatozoi), o l'astenospermia (la ridotta motilità degli spermatozoi), non sono rare le anomalie strutturali come il varicocele che coinvolge il 10% degli uomini, causando problemi di infertilità in circa il 30% dei pazienti che ne soffre. La principale conclusione è che, il trattamento dell'infertilità maschile non dovrebbe focalizzarsi solo nel cercare di avere un figlio. In questi soggetti, infatti, un cambiamento dello stile di vita o il ricorso precoce a cure specifiche rappresentano un mezzo straordinario di prevenzione di malattie potenzialmente pericolose. In occasione del congresso ESHRE, sono stati presentati con due diversi studi alcuni fra i più straordinari risultati raggiunti recentemente per la risoluzione dei problemi legati all'infertilità maschile. La prima ricerca, condotta dalla Dottoressa di Barcellona Marga Esbert, ha analizzato la capacità predittiva di alcuni fattori per osservare la presenza di spermatozoi nei testicoli e di conseguenza valutare un'eventuale azoospermia. Questo studio, che ha esaminato i dati di tutti i pazienti azoospermici trattati dalla clinica IVI di Barcellona fra il 2004 e il 2017, ha preso in considerazione parametri come l'età, la durata della sterilità, il livello di FSH, l'indice di massa corporea e la dimensione testicolare. Secondo i risultati un parametro predittivo attendibile della azoospermia può essere rappresentato dal volume dei testicoli. Un dato incoraggiante da cui ripartire nella prossima fase finalizzata all'individuazione di altri tipi di marcatori. Il secondo studio, realizzato dalla Dottoressa Rocío Rivera della clinica di

Valencia, ha analizzato il profilo proteico del campione di spermatozoi di diversi pazienti, per valutare e individuare quali sono le proteine in grado di incidere sulla capacità riproduttiva. Dai risultati è emersa una differenza fra i campioni esaminati ed si è aperta la strada alla possibilità di utilizzare le proteine come markers, che consentano di distinguere gli spermatozoi che possono portare a una gravidanza da quelli che non permettono di raggiungere questo traguardo. Un traguardo che potrebbe essere “combinato” con la selezione immunomagnetica ossia la tecnica MACS, che al fine dell’impiego in procedure di procreazione medicalmente assistita, consente di selezionare gli spermatozoi dalle migliori caratteristiche.

Produrre spermatozoi artificiali pare sia la prossima frontiera nelle terapie contro l’infertilità maschile. E, sebbene la strada sia ancora lunga, sembra che gli scienziati abbiano fatto notevoli progressi. Ad annunciarlo durante il Progress Educational Trust (la conferenza annuale genetica e procreazione assistita tenutasi di recente a Londra) è Azim Surani, direttore della ricerca sulle linee germinali e sull’epigenetica del Gurdon Institute dell’ Università di Cambridge: il suo team, infatti, è riuscito a replicare un’importante tappa intermedia nel processo naturale di formazione di queste particolari cellule. Lo scopo da raggiungere nei prossimi 10 anni sarà quello di fabbricare in laboratorio spermatozoi e ovuli a partire da cellule staminali o addirittura da cellule della pelle. I ricercatori di Cambridge hanno costruito delle organoidi gonadici, strutture artificiali costituite da cellule tipiche dei testicoli immerse in un gel, che ricreano l’ambiente per la differenziazione delle cellule staminali in spermatozoi. Dai primi risultati (ancora in fase di valutazione, per la prossima pubblicazione su una rivista scientifica), pare che le cellule stiano ricevendo gli input chimici giusti e che siano arrivate, per ora, a metà del percorso per poter diventare spermatozoi a tutti gli effetti. È la prima volta che un gruppo di ricercatori riesce a portare cellule staminali umane fino ai primi stadi di sviluppo della linea germinale maschile. In passato, sono stati condotti con successo esperimenti su topi per creare spermatozoi funzionanti da cellule staminali, ma i successivi tentativi con cellule umane non hanno dato i risultati sperati. La meiosi, il delicatissimo processo naturale che trasforma alcune cellule dell’essere umano in spermatozoi immaturi già durante lo sviluppo embrionale, non è del tutto chiara in ogni suo aspetto. Evidentemente nel

passaggio dal modello animale a quello umano qualcosa è stato trascurato. La squadra di Surani ha ipotizzato che uno dei punti critici potesse essere la diversa tempistica di maturazione dei gameti nelle due specie - molto più lunga nell'essere umano rispetto al topo: sono necessarie 8 settimane di sviluppo prima che le cellule staminali umane destinate a dare origine ai gameti intraprendano la strada per diventare o spermatozoi o cellule uovo, mentre nel topo tutto si esaurisce in 13 giorni. Questo intervallo di tempo è essenziale affinché si possano ottenere artificialmente dei gameti funzionanti e corretti dal punto di vista genetico. È in questo frangente infatti, che il DNA delle cellule che diventeranno ovuli o spermatozoi del nuovo individuo, subisce il processo di *cancellazione* dell'epigenetica, cioè delle modifiche chimiche che il DNA ereditato dai genitori ha subito nel corso della vita. Garantire che le operazioni di *messa a nuovo* del DNA dei gameti avvengano correttamente, è un passaggio fondamentale se si vuole pensare a una futura applicazione clinica; per esempio, per consentire alle coppie omosessuali di avere figli geneticamente correlati a entrambi i genitori, o per produrre in laboratorio cellule uovo a partire da cellule della pelle evitando alle donne con problemi di fertilità la sottoposizione a cicli di stimolazione delle ovaie.

Conclusioni

Le metodiche di procreazione medicalmente assistita hanno conosciuto una continua evoluzione, approdando a risultati sempre più incoraggianti. Tra tutte le innovazioni riportate dal progresso scientifico, l'introduzione nel 1992 dell'ICSI ha rappresentato la svolta maggiore nel raggiungimento di tali successi. Si tratta di una tecnica particolarmente indicata in quei casi in cui è presente un fattore maschile severo, ad esempio spermatozoi con ridotta motilità o con profili morfologici carenti.

Questa procedura, consente, qualora necessario, di prelevare il campione di sperma e selezionarlo attraverso una biopsia testicolare; così, viene garantito per la fecondazione degli ovociti, l'impiego di spermatozoi della migliore qualità. L'ICSI, quindi consente di agevolare la fecondazione nei casi in cui lo spermatozoo ha notevoli difficoltà a raggiungere l'ovulo per via naturale o attraverso la FIVET. Un ulteriore vantaggio è la possibilità di congelamento dei campioni di liquido seminale prima che il partner maschile si sottoponga a chemioterapia o a radioterapia. Qualora dopo il trattamento antitumorale la qualità degli spermatozoi sia scarsa, sarà possibile procedere alla fecondazione assistita mediante ICSI utilizzando il campione congelato. L'ICSI rappresenta l'unica strategia attuabile nel caso in cui si esegua diagnosi genetica preimpianto. Contro tutti questi vantaggi è da tener presente che la tecnica, introducendo direttamente nell'ovocita lo spermatozoo scelto dall'operatore, bypassa il naturale percorso di selezione dello spermatozoo.

In assenza di fattore maschile, la FIVET dovrebbe essere considerata ad oggi la scelta preferenziale per il trattamento. In conclusione, è fondamentale uno studio accurato della coppia per identificare il miglior iter terapeutico.

Un percorso corretto di trattamento, obbligato dalla nostra normativa attuale (Legge 19 Febbraio 2004, N. 40, Articolo 15, Ministero della Salute 2012) dovrebbe infatti sempre prevedere un approccio graduale, partendo da tecniche meno invasive.

Bibliografia

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

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

Boitani C and Puglisi R. Selenium, a key element in spermatogenesis and male fertility. *Adv Exp Med Biol*. 2008;636: 65–73.

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

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

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

Colagar AH, Marzony ET and Chaichi MJ. Zinc levels in seminal plasma are associated with sperm quality in fertile and infertile men. *Nutr Res*. 2009; 29: 82–88.

Collins JA Van Steirteghem A. Overall prognostic with current treatment of infertility. *Hum reprod Update* 10:309-316, 2004; Benagiano G. Reproductive health: a goal for all woman. *Int J Gynaecol Obstet*. 46(1):1- 2,1994.

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

Definitions and indicators in family planning maternal and child health and reproductive health used in the WHO Regional office for Europe.

De Jonge, C. (2005) Biological basis for human capacitation. *Hum Reprod Update*,

11, 205-214.

Dubin, L. and Amelar, R.D. (1971) Etiologic factors in 1294 consecutive cases of male infertility. *Fertil Steril*, 22, 469-474.

Dunson, D.B. (2002) Changes with age in the level and duration of fertility in the menstrual cycle. *Hum Reprod*, 17, 1399-1403.

E. Johannisson, A. Campana, R. Luthi, A. De Agostini. Evaluation of round cells in semen analysis: a comparative study. *Hum. Reprod.* Pp404-412.

Fields E, Chard J, James D, Treasure T; Guideline Development Group. Fertility (update): summary of NICE guidance. *BMJ* 2013;346:f2866.

Forabosco Antonio, *Medicina della Procreazione Medicalmente Assisita*, Ulisse Ed. 2005.

Forti G, Krausz C. Clinical review 100: evaluation and treatment of the infertile couple. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;83:4177.

Gardner, D.G., Weissman, A., Howlwa, C.M., Shoham, Z. *Textbook of Assisted Reproductive Techniques, Laboratory and Clinical Perspectives*, Taylor & Francis Group, 2004.

Guida alla diagnostica di laboratorio dell'infertilità maschile A. A. Sinisi, D. Pasquali, D. Esposito, A. Notaro, A. Bellastella. *Riv Med Lab – JLM*, Vol. 2, S.1, 2001.

Homan, G.F., Davies, M. and Norman, R. (2007) The impact of lifestyle factors on reproductive performance in the general population and those undergoing infertility treatment: a review. *Hum Reprod Update*, 13, 209-223.

Inaudi P., Petrilli S, *Gradualità delle tecniche; Alle porte della vita*, D'Amato G., Borini A., Ubaldi A , *Syllabus*, 2005.

Jaiswal, B.S., Eisenbach, M. Capacitation. In: Hardy DM (ed.). *Fertilization*. San Diego: Academic Press, 2002, 57-117.

Keltz J, Zapantis A, Jindal SK, Lieman HJ, Santoro N, Polotsky AJ. Overweight men: clinical pregnancy after ART is decreased in IVF but not in ICSI cycles. *J Assist Reprod Genet* 2010; 27:539-44; PMID:2063513.

Kerin, J.F., Warnes, G.M., Quinn, P., Jeffrey, R., Godfrey, B., Broom, T.J., McEvoy, M., Kirby, C., Johnson, M. and Cox, L.W. (1983) *The effect of clomid induced superovulation on human follicular and luteal function for extracorporeal fertilization and embryo transfer. Clin Reprod Fertil*, 2, 129-142.

Kerin, J.F., Warnes, G.M., Quinn, P., Kirby, C., Jeffrey, R., Matthews, C.D., Seamark, R.F., Texler, K., Antonas, B. and Cox, L.W. (1984) *In vitro fertilization and embryo transfer program, Department of Obstetrics and Gynecology, University of Adelaide at the Queen Elizabeth Hospital, Woodville, South Australia. J In Vitro Fert Embryo Transf*, 1, 63-71.

La Sala GB, Cittadini E. *Unexplained infertility. Acta Eur fertil*, 25(1):7-17, 1994

Linee guida contenenti le indicazioni delle procedure e delle tecniche di Procreazione Medicalmente Assistita, Art. 7 – Legge 40/2004.

Manuale di laboratorio WHO per l'analisi del liquido seminale. Quinta edizione.

Menchini-Fabris F, Rossi P, Palego P, Simi S, Turchi P, Turchi P, *Declining sperm counts in Italy during the past 20 years. Andrologia* 28:304, 1996.

Physiopathological determinants of human infertility. (2002) Hum Reprod Update, 8, 435-447.

Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss. Fertil Steril. 2008;90(suppl. 5): S60.

Queiroz, E.K. and Waissmann, W. (2006) *Occupational exposure and effects on the male reproductive system. Cad Saude Publica*, 22, 485-493.

Registro Nazionale Procreazione Medicalmente Assistita.

Relazione del Ministro della salute al Parlamento sullo stato di attuazione della legge contenente norme in materia di Procreazione Medicalmente Assistita (Legge 19 Febbraio 2004, N. 40, Articolo 15), Ministero della Salute 2012.

R. Menkveld et al. *Semen parameters including WHO and strict criteria morphology in a fertile and subfertile population: an effort towards standardization of in vivo thresholds.*

Rienzi, L., Ubaldi, F., Martinez, F., Iacobelli, M., Minasi, M.G., Ferrero, S., Tesarik,

Jand Greco, E. (2003) Relationship between meiotic spindle location with regard to the polar body position and oocyte developmental potential after ICSI. *Hum Reprod*, 18, 1289-1293.

Rienzi, L. Ubaldi, F. M., Iacobelli, M., Minasi, M. G., Romano, S., Ferrero, S., Sapienza,

F., Baroni, E., Litwicka, K., Greco, E. (2008) Significance of metaphase II human oocyte morphology on ICSI outcome. *Fertil Steril*, 90, 1692-1700.

Taylor, A. (2003) ABC of subfertility: extent of the problem. *Bmj*, 327, 434-436.

Tomao, F., Miele, E., Spinelli, G.P. and Tomao, S. (2006) Anticancer treatment and fertility effects. Literature review. *J Exp Clin Cancer Res*, 25, 475-481.

Travaglini P, Pizzocaro A, Beck-Peccoz P, Colpi G, *Malattie endocrine del testicolo. Malattie de sistema endocrino e del metabolismo* Mc Graw-Hill, Milano pp257-286, 2006.

Vicari E, La Vignera S, Garrone F, Aiello B, Calogero AE. *Terapia ormonale e non ormonale nell'infertilità maschile: indicazioni e nuove prospettive. Contraccezione Fertilità Sessualità* 33:236.242, 2006.

Vicari E, La Vignera S, Garrone F, Aiello B, Calogero AE. *Terapia ormonale e non ormonale nell'infertilità maschile: indicazioni e nuove prospettive. Contraccezione Fertilità Sessualità* 33:236.242, 2006.

Vicino, M., Loverro, G., Simonetti, S., Mei, L. and Selvaggi, L. (1999) [The correlation between idiopathic leukocytospermia, embryo quality and outcome in the FIVET and ICSI procedures]. *Minerva Ginecol*, 51, 413-420.

World Health Organization (WHO). *Laboratory manual for the examination of the human ejaculate and sperm-cervical mucus interaction* 2010.

Workowski, K.A., Levine, W.C. and Wasserheit, J.N. (2002) U.S. Centers for Disease Control and Prevention guidelines for the treatment of sexually transmitted diseases: an opportunity to unify clinical and public health practice. *Ann Intern Med*, 137, 255-262.

Zorn, B., Vidmar, G. and Meden-Vrtovec, H. (2003) Seminal reactive oxygen species as predictors of fertilization, embryo quality and pregnancy rates after

conventional in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. Int J Androl, 26, 279-285.

Ringraziamenti

A conclusione di questo lavoro, è doveroso ringraziare le persone che ho avuto modo di conoscere in questo fondamentale periodo della mia vita. Persone che mi hanno aiutata a crescere sia dal punto di vista professionale che umano.

È difficile in poche righe ricordare tutte le persone che, a vario titolo, hanno contribuito a rendere migliore questo percorso universitario.

Ringrazio il Prof. Sergio Ledda per avermi seguita in questi mesi con il suo sostegno e i suoi preziosi consigli, accompagnandomi e aiutandomi nella realizzazione della tesi. Grazie a lui ho avuto modo di superare me stessa, accogliendo per poi far mio un prezioso bagaglio di conoscenze utili per il mio futuro.

Un ringraziamento speciale va alla Dott.ssa Giovanna Bassu che nella realizzazione di questo lavoro ha avuto un ruolo fondamentale. Mi ha permesso di lavorare con lei, contribuendo a farmi sentire fiera ed orgogliosa del mio operato. Mi ha sostenuta quando mi trovavo lontano da casa, dandomi l'opportunità di vivere un'esperienza unica.

Ringrazio la Dott.ssa Evelyne Bertrand, responsabile del laboratorio di Fecondazione in vitro presso il centro ospedaliero Saint-Pierre di Bruxelles. Un anno fa mi ha accolta facendomi sentire sin da subito parte integrante della sua équipe, mettendomi sempre a mio agio e permettendomi di essere costantemente partecipe in ogni attività svolta. Un sincero ringraziamento per avermi trasmesso la sua dedizione e passione per questo meraviglioso lavoro; accanto a lei ho maturato la consapevolezza che questa è la mia strada.

Ai miei genitori, che mi hanno aiutata e sostenuta in qualsiasi scelta, condividendo con me i momenti di gioia e successo, incoraggiandomi nei momenti di difficoltà. Senza di loro non sarei al mondo e non sarei quella che sono. A LORO DEVO TUTTO: il bene più importante che è la vita, i principi morali che mi hanno trasmesso ed i pregi e difetti che contraddistinguono il mio carattere. Ho raggiunto questo traguardo e lo devo a loro perchè oltre al sostegno economico, mi hanno supportata moralmente nei momenti in cui ne avevo bisogno. Ringrazio mio padre, per l'interesse dimostrato, per avermi

sempre incitata a studiare con la solita frase: "Picati su libru"! Un grazie di cuore a mia madre, per i suoi consigli e il suo sostegno, per aver gioito con me durante i miei successi e avermi consolato e incoraggiato dopo le piccole sconfitte. La prima telefonata dopo gli esami era sempre per te!

Voglio ringraziare una persona speciale e unica, mio grande punto di riferimento, mia sorella Giovanna sempre pronta ad ascoltarmi e darmi consigli. In questi anni hai saputo smorzare i miei picchi di nervosismo e di sconforto, sei stata paziente, mi hai sempre aiutata e sostenuta quando qualcosa non andava. Ogni occasione era buona per darmi una mano a migliorare e accrescere la mia autostima, mi hai insegnato a camminare a testa alta senza aver paura dei giudizi altrui. Tutte le volte che ho bisogno di te, sei sempre presente. In questi lunghi anni ci siamo sostenute l'un l'altra, ci siamo incoraggiate, ci siamo confrontate e abbiamo fatto una marea di sacrifici. Grazie per esserci stata e anche oggi, in questo giorno importante, sei qui con me a festeggiare insieme il mio traguardo, questa mia vittoria.. che non è solo la mia, ma la nostra vittoria!

Al mio piccolo ma grande fratello, che nonostante sia il mio "piccolino" è un grande uomo.

Grazie perché senza di voi non sarei mai arrivata fino in fondo a questo difficile, lungo e tortuoso cammino. Questa tesi la dedico a voi che siete la mia famiglia, il mio più grande sostegno e la mia guida.

Un pensiero speciale va a mia nonna Maria Grazia, che oggi non può essere qui con me, ma che spero sia orgogliosa di me e della donna che sono diventata.

Non so se trovo le parole giuste per ringraziare mio padrino Antonio e sua moglie Teresa per l'affetto che non mi hanno mai fatto mancare, per essere sempre stati orgogliosi di me e per avermi sostenuto in qualunque momento. Ho raggiunto questo traguardo anche grazie a voi, voi che con la vostra costanza e presenza mi avete aiutato a capire che potevo farcela, spingendomi a "non mollare mai".

Un ringraziamento al mio insostituibile padrino Giuseppe, mi ha sempre incoraggiata soprattutto nei momenti difficili, e l'hai saputo fare anche

attraverso un telefono. Sei grande! In questi anni sei stato sempre al mio fianco, ti sei sempre interessato dei miei esami e mi hai sostenuto in tutte le mie scelte. Sei stato presente anche quando ero lontana e mi hai sempre dimostrato il tuo affetto e la tua stima.

Non potevo dimenticarmi di te! Grazie a mia madrina Assunta, per essermi stata sempre vicina, hai sempre mostrato per quello che faccio una fiducia cieca e priva di incertezze, spronandomi sempre ad andare avanti per la mia strada. Con le tue risate riesci sempre a mettermi di buon umore, le tue chiamate alleggerivano i miei pomeriggi stressanti e rendevano la giornata più piacevole.

Per ultime ma non meno importanti, le mie amiche *che ogni giorno hanno condiviso con me gioie, sacrifici e successi, senza voltarmi mai le spalle. L'affetto e il sostegno che mi hanno dimostrato rendono questo traguardo ancora più prezioso.*

Un grazie alla mia Maria Pina, un'amica sincera e leale che mi ha fatto riscoprire la bellezza di avere una persona a cui poter confidare senza "riserve" i miei pensieri e le mie emozioni. In pochissimo tempo hai riempito le mie giornate, il mio cuore e la mia vita in generale tra messaggi audio su whatsapp, immagini compromettenti, gossip dell'ultimo momento e pomeriggi alternativi. Con te, ho trascorso questi bellissimi anni di università, abbiamo gioito insieme e nelle difficoltà mi hai sempre supportata.

Un grazie a Erika, la mia compagna di serate indimenticabili, di chiacchierate interminabili, di risate, di momenti unici. Nonostante il mio percorso si sia concluso in tempi diversi dal tuo il nostro legame è rimasto forte e saldo.

Grazie a Silvia, un'amica unica, sincera, sensibile e dolce. Grazie per la tua solarità e gioia, ma anche per la tua sensibilità e profondità, per la capacità di ascoltarmi dandomi sempre i consigli giusti. Spero ci saranno ancora occasioni per fare insieme lunghe chiacchierate e, ovviamente, divertirci durante allegre serate.

Grazie a Francesca Lai, per il tuo umorismo contagioso, per l'ottimismo e il tuo modo "leggero" di affrontare le difficoltà, per essermi sempre stata vicina e aver colorato le mie giornate. Ti conosco da poco ma hai già un posto speciale nel

mio cuore!

Un super abbraccio alle mie adorate sorelle Raffaella e Maria Antonietta siete due grandissime amiche da ormai non so quanti anni, se ho voglia di simpatia, allegria e solarità con voi non manca mai. Siete due amiche di cui mi fido ciecamente e sono davvero felice di avermi al mio fianco oggi un giorno importante per me. La vostra "lealtà" è più unica che rara, ed è per questo che non vi sostituirei per niente al mondo! Siete uniche! Ora che la mia vita tornerà a trasferirsi a casa, sono sicura che avremo di nuovo tante occasioni per vederci, e altrimenti le creeremo noi!

Grazie a Lucia e Francesca, per gli anni passati insieme, per la vostra sensibilità e allegria, per l'affetto che anche a distanza è sempre vivo e presente.

Vorrei che questi ringraziamenti siano un punto di arrivo da una parte, ma anche un punto d'inizio, perchè credo che non si finisca mai di crescere e spero di poter raggiungere nuovi traguardi importanti nella mia vita con tutti voi ancora al mio fianco.