

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI CATANIA

**FACOLTA' DI SCIENZE MATEMATICHE, FISICHE E
NATURALI**

CORSO DI LAUREA IN SCIENZE BIOLOGICHE

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA ANIMALE "M. La Greca"

**ANTICORPI ANTISPERMATOZOO ED INFERTILITA'
MASCHILE**

FEDERICA TUMINO

Relatore:
CHIAR.MA PROF.SSA RENATA

Correlatore:
DOTT. GIOVANNI BRACCHITTA

ANNO ACCADEMICO 2010/2011

PREMESSA

L'indagine biologica sulla fertilità maschile risale al 1677, quando Antonie Van Leeuwenhoek, studiando il liquido seminale scoprì la presenza degli spermatozoi (dal greco "*esperien*", seminare); analizzando al microscopio tale liquido, notò dei corpi rotondi, che chiamò animalculi, che presentavano un aculeo sulla parte posteriore, cinque o sei volte più lungo del corpo. Van Leeuwenhoek ipotizzò che l'embrione fosse ubicato nella testa rotonda degli animalculi e che esso, una volta entrato nell'utero della donna, ricevesse il nutrimento grazie alla presenza di globuli rotondi (oggi noti come cellule di sfaldamento vaginale). Inoltre individuò i testicoli come la sede in cui avveniva la produzione degli spermatozoi. Van Leeuwenhoek teorizzò che ci fossero due tipi diversi di spermatozoi: quelli più tondeggianti e piccoli, che avrebbero portato alla formazione di un uomo, e quelli più grandi e ovoidali, che avrebbero portato alla formazione della donna. Tuttavia tale teoria si opponeva a quella ovista (la quale affermava che nell'apparato femminile si aveva la presenza di uova trasportate dalle ovaie nell'utero), per cui tali considerazioni furono accolte con difficoltà.

Nicolas Andry ipotizzò che lo spermatozoo penetrasse nell'uovo attraverso un forellino che lo stesso spermatozoo chiuderebbe con la sua coda.

La svolta decisiva si ebbe solo nel 1824 grazie a Prevost e Dumas i quali, grazie ad esperimenti e osservazioni dell'apparato genitale maschile verificarono come gli spermatozoi fossero realmente prodotti dal testicolo e che la vita del feto dipendesse

unicamente dall'incontro dell'uovo con lo spermatozoo, nelle tube. Attraverso i loro studi Prevost e Dumas affermarono inoltre che la fecondazione avviene in un secondo momento rispetto alla loro unione.

Nel 1929 Macomber e Sanders verificarono l'utilità della concentrazione degli spermatozoi per differenziare gli uomini fertili da quelli infertili.

Nel 1951 MacLeod e Gold proposero il valore di 20 milioni di spermatozoi per millilitro di eiaculato come limite per distinguere i pazienti fertili da quelli infertili, mentre nel 1977 Smith e Steinberger proposero un valore di 10 milioni di spermatozoi.

Oggi la World Health Organization afferma che un paziente è considerato infertile se presenta una concentrazione di spermatozoi nel liquido seminale inferiore a 15 milioni per millilitro di eiaculato.

Le attuali conoscenze mediche ci dicono che, oltre al ridotto numero di spermatozoi, possono esserci altre cause di infertilità maschile, più o meno frequenti, distinguibili in:

Cause pre-testicolari:

-Disordini ormonali, dovuti ad un deficit funzionale dell'ipofisi con diminuita secrezione di FSH (ormone follicolo stimolante) e di LH (ormone luteinizzante) con conseguente ridotta produzione di spermatozoi; tali disordini possono essere causati anche da deficit ipotalamici;

Cause testicolari:

-Esposizione ad agenti tossici: il *fumo*, che aumenta la probabilità di avere spermatozoi con una ridotta motilità, *l'alcool*, che tende ad abbassare i livelli di testosterone e provoca un'alterazione nella morfologia degli spermatozoi, le *droghe leggere e pesanti*, che provocano una riduzione della quantità di liquido seminale, e poi *farmaci antitumorali, pesticidi, metalli e radiazioni*;

-Esposizione a fonti di calore: se continuativa può elevare la temperatura testicolare (>35,5°C) con conseguente alterazione della spermatogenesi.

-Traumi meccanici

-Tumori

-Varicocele / idrocele

Cause post- testicolari:

-Epididimiti: ovvero infiammazioni dell'epididimo, sede in cui gli spermatozoi acquisiscono la mobilità; se non curate, queste infiammazioni possono provocare la distruzione dell'epididimo, estendersi al testicolo e provocare sterilità;

-Infezioni: provocate dagli agenti responsabili delle malattie veneree, tra cui la *neisseria gonorrhoeae*, la *chlamydia trachomatis* e il *treponema pallidum*, possono determinare nei casi più gravi l'ostruzione dei dotti deferenti, con conseguente azoospermia escretiva. Le infezioni possono essere causate anche da virus, tra cui quello della parotite che può provocare una grave orchite con distruzione del tessuto germinativo testicolare con conseguente azoospermia.

-Ipospadia: sviluppo anomalo degli organi genitali esterni durante la vita fetale;

-Eiaculazione retrograda: dovuta generalmente a disfunzioni della prostata, in questi casi il liquido seminale non viene eiaculato ma viene riversato, tutto o in parte, in vescica.

-Malformazioni peniene.

-Cause genetiche: quali la sindrome di Klinefelter, traslocazioni robertsoniane, mutazioni del gene della fibrosi cistica che sono associate ad agenesia dei dotti deferenti.

-Cause immunologiche

La presenza di anticorpi può interferire:

-con la normale funzione dei nemaspermi, in quanto se legati alla coda possono provocare una riduzione della motilità dello spermatozoo o avere un effetto citotossico e portare a necrospermia.

-con il trasporto degli spermatozoi, poiché il legame degli anticorpi alla superficie degli spermatozoi può alterarne la motilità nel muco cervicale mediante il fenomeno dello shaking (scodinzolamento) in cui gli spermatozoi presentano la coda mobile ma non riescono ad avanzare. La presenza di anticorpi antispermatozoo può, mediante attivazione del sistema del complemento, tramite il legame con la proteina C3, aumentare l'opsonizzazione degli spermatozoi stessi e provocarne la fagocitosi da parte dei macrofagi.

-con l'interazione con il gamete femminile, impedendo l'ingresso dello spermatozoo nell'ovocita.

Anticorpi legati alla testa dello spermatozoo possono coprire le proteine situate nella

membrana dello spermatozoo impedendo così il loro corretto riconoscimento da parte delle proteine presenti nella zona pellucida dell'ovocita. Tale interazione è indispensabile perché avvenga la fecondazione.



INTRODUZIONE

La riproduzione, ovvero l'insieme dei meccanismi che permettono la conservazione di una data specie nel tempo, è possibile solo grazie al corretto funzionamento dell'apparato riproduttore femminile e maschile. Tali apparati sono deputati alla produzione di cellule specializzate per la riproduzione, i gameti, a permettere l'incontro reciproco di tali cellule e a consentire lo sviluppo dell'embrione derivato dalla loro fusione.

APPARATO RIPRODUTTORE FEMMINILE

L'apparato riproduttore femminile è costituito da organi genitali interni, situati nella porzione inferiore dell'addome, la pelvi, e organi genitali esterni.

Gli organi genitali interni sono:

-L'ovaio, organo pari, simmetrico, situato ai lati dell'utero, avente funzione endocrina, produzione di ormoni femminili estrogeni e progesterone, rappresenta la gonade femminile, sede di maturazione degli ovociti;

-Le tube, dotti pari e simmetrici mettono in comunicazione la cavità dell'utero con lo spazio interno della pelvi. La prima porzione delle tube si innesta nella parete dell'utero; nella porzione superiore, chiamata ampolla, avviene la fecondazione; spostandoci in direzione apicale troviamo il padiglione e, al termine, le fimbrie che costituiscono la porzione più apicale. La parete interna delle tube è rivestita da due tipi di cellule: alcune presentano delle ciglia microscopiche che facilitano il trasporto dell'ovocita, mentre altre secernono sostanze nutritive che permettono la sopravvivenza dell'ovocita, degli spermatozoi e dell'embrione. Al di sotto di queste cellule si ha uno strato di cellule muscolari che, grazie a piccole contrazioni, aiuta lo spostamento dell'ovocita e dell'embrione;

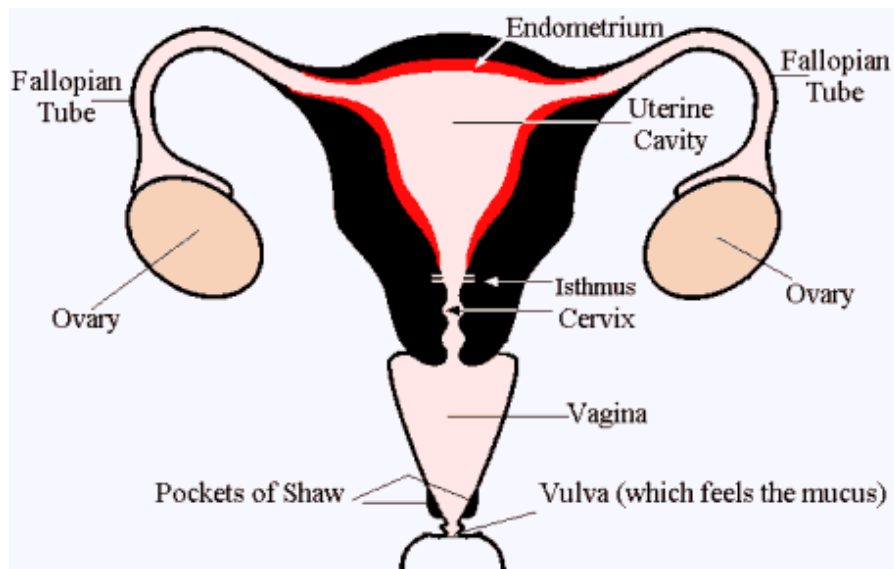
-L'utero, organo muscolare costituito da: *corpo*, la parte superiore in cui agli estremi si inseriscono le tube, e *cervice*, la parte inferiore, che comunica in basso con la vagina.

All'interno della cervice si ha il canale cervicale, al cui interno sono presenti cellule ghiandolari il cui secreto costituisce il muco cervicale che svolge la funzione di

barriera tra la cavità uterina e l'ambiente vaginale. All'interno del canale cervicale ritroviamo delle invaginazioni, dette cripte, in cui si accumulano gli spermatozoi nel percorso di risalita verso l'utero. L'utero è l'organo della gestazione, in cui si impianta la blastocisti e avviene lo sviluppo fetale.

-*La vagina*, è l'organo copulatore della femmina e costituisce il canale per il parto. È costituita internamente da una mucosa che, stimolata dagli estrogeni, produce glicogeno; la presenza del glicogeno viene sfruttata dai lattobacilli per produrre acido lattico, il rilascio di tale catabolita nell'ambiente vaginale causa un abbassamento del pH con conseguente ostacolo allo sviluppo di microrganismi patogeni.

Gli organi genitali esterni sono: un rilievo cutaneo definito “monte di Venere”, le “grandi labbra” e le “piccole labbra”, il “clitoride” e le “ghiandole del Bartolini”.



APPARATO RIPRODUTTORE MASCHILE

L'apparato riproduttore maschile è composto dai testicoli, dalle vie seminali, dalle ghiandole annesse, e dai genitali esterni.

Il testicolo o didimo rappresenta la gonade maschile, è la sede della produzione degli spermatozoi e della secrezione degli ormoni sessuali maschili. È una ghiandola tubulare composta, pari, è contenuta all'interno di una sacca cutanea detta "scroto", che è posto all'esterno dell'organismo al fine di mantenere una temperatura leggermente più bassa rispetto a quella corporea come necessario per una corretta spermatogenesi.

Ciascun testicolo è suddiviso in 200-300 spazi di forma piramidale, denominati "logge o lobuli" al cui interno sono presenti dei dotti convoluti, i "tubuli seminiferi contorti", tra i quali sta un connettivo lasso contenente le cellule interstiziali endocrine del testicolo o "cellule del Leyding", deputate alla secrezione degli androgeni.

I tubuli seminiferi sono formati da un sottile tonaca connettivale e dall'epitelio germinativo, che comprende due categorie di cellule: le cellule germinali nei vari stadi di maturazione e le cellule del Sertoli, deputate al sostegno meccanico e trofico delle cellule germinali in fase di maturazione.

I tubuli seminiferi si continuano con i "tubuli seminiferi retti", i quali terminano in una rete di formazioni cave, denominata "rete testis", a sua volta in comunicazione con i "condotti efferenti" che formano la testa dell'epididimo.

L'epididimo, distinto in testa, corpo e coda, è un piccolo organo situato sopra il testicolo e costituito da un sottile tubulo raggomitolato, in cui gli spermatozoi provenienti dal testicolo si accumulano per raggiungere la maturazione definitiva e per acquisire la motilità autonoma. Dall'epididimo si diparte il dotto deferente che nell'ultima porzione si dilata a formare l'ampolla deferenziale che, alla base della prostata, da origine al dotto eiaculatore che attraversa la prostata e sbocca nell'uretra prostatica. Il liquido seminale, costituito dal fluido prostatico, dal fluido prodotto dalle vescichette seminali e dagli spermatozoi, fuoriesce attraverso l'uretra, un condotto in comune tra apparato genitale e apparato urinario.

I genitali esterni sono costituiti dal pene e dallo scroto.

Il pene è l'organo copulatore maschile ed è formato da una radice, da un corpo e dal glande. La radice è costituita dalle 2 radici dei corpi cavernosi e dal bulbo. Il *corpo* del pene è cilindrico quando flaccido, e triangolare in erezione, ed è formato dai due corpi cavernosi, continuazioni delle radici, e dal corpo spongioso, continuazione del bulbo spongioso. Il glande costituisce la parte terminale del pene, ha la funzione di favorire la penetrazione, e termina al suo vertice con l'apertura uretrale, il meato, tramite il quale avviene l'emissione all'esterno dell'urina (minzione) e dello sperma (eiaculazione).

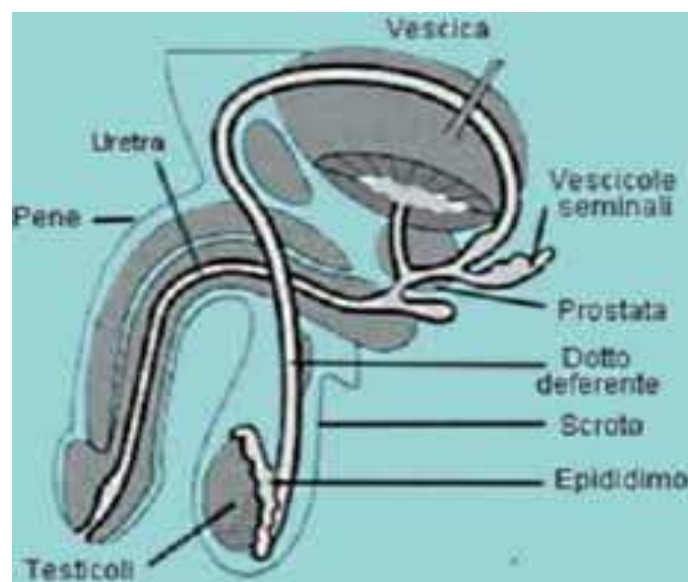
Lo *Scroto* serve a contenere il testicolo, l'epididimo e la parte iniziale del dotto deferente, è costituito da 6 tonache di cui la più esterna è la cute.

Le ghiandole annesse alle vie seminali sono: la prostata, le vescichette seminali e le ghiandole bulbo uretrali.

La prostata secreta "il liquido prostatico", che aumenta il volume del liquido seminale ed è caratterizzato da un pH=6.5, più alcalino delle secrezioni vaginali; la funzione del secreto prostatico è di mantenere la vitalità degli spermatozoi contrastando il pH acido vaginale.

Le vescichette seminali: rappresentate da due sacculi posti ai lati della vescica, secernono un materiale viscoso ricco in fruttosio e prostaglandine, che stimolano le contrazioni uterine, favorendo la risalita degli spermatozoi nell'apparato genitale femminile.

Le ghiandole bulbo-uretrali secernono "il liquido pre-eiaculatorio", che serve a lubrificare l'uretra prima del passaggio del liquido seminale.



SPERMATOGENESI

Intorno alla quarta settimana dello sviluppo fetale, le cellule germinali primordiali, i protogoni, raggiungono la gonade che si sta abbozzando dove subiscono numerose mitosi e acquisiscono i caratteri di prospermatogoni, mentre le cellule di sostegno, di dimensioni più piccole, diventeranno le cellule del Sertoli. Negli ultimi mesi dello sviluppo fetale le cellule germinali e le cellule di sostegno aumentano di numero e subiscono delle modificazioni morfologiche, il processo di modificazione si interrompe per riprendere nuovamente durante la pubertà, in cui ha inizio la spermatogenesi. La spermiogenesi porta alla formazione di cellule specializzate, gli spermatozoi, a partire da cellule germinali immature, avviene nel testicolo all'interno dei tubuli seminiferi dove si trovano le cellule germinali disposte in modo centripeto verso il lume del tubulo in differenti stadi di maturazione.

La spermiogenesi è un processo che dura diverse settimane e può essere suddiviso in 3 fasi: fase mitotica, fase meiotica, fase spermiogenetica. La fase mitotica dura da 8 a 10 giorni, in questa fase gli spermatogoni staminali dotati di una capacità indefinita di dividersi, danno origine sia ad altri spermatogoni staminali, mantenendone così il numero sempre costante, sia a spermatogoni di tipo A. La mitosi comprende solo una piccola parte del ciclo cellulare che è diviso in interfase, e fase mitotica. L'interfase comprende la fase S, in cui avviene la sintesi del DNA, ed è preceduta e seguita da due fasi non sintetiche denominate G1 e G2; nella fase G1 che segue la mitosi, si ha la sintesi di RNA e proteine per ripristinare il volume proprio della cellula madre,

mentre nella fase G2 si hanno processi metabolici che preparano la cellula alla divisione cellulare. La fase M in cui avviene la divisione cellulare si divide in 4 stadi: profase, metafase, anafase, telofase. Durante la profase il DNA, disperso nel nucleo sotto forma di eucromatina, si spiralizza a formare i cromosomi che si accostano alla membrana nucleare lasciando la parte centrale vuota, e contemporaneamente si organizza l'apparato mitotico. Prima di passare alla metafase si ha una pro-metafase, che segna la fine della profase, in cui l'involucro si frammenta ed entra a far parte del sistema membranoso del citoplasma. Nella metafase i cromosomi si dispongono sul piano equatoriale a formare la piastra equatoriale ed entrano in rapporto con le fibre del fuso. Nella fase successiva i cromatidi fratelli di ogni cromosoma si separano migrando verso i poli opposti della cellula con un evento sincrono in tutti i cromosomi. Nell'ultima fase si verificano degli eventi in direzione opposta a quelli della profase; i cromosomi si despiralizzano (passaggio da etero cromatina ad eucromatina), e attorno ai due nuclei delle cellule figlie si ricostituisce l'involucro nucleare. Contemporaneamente agli eventi che interessano il nucleo si ha la citodieresi durante la quale tutti i componenti citoplasmatici si distribuiscono tra le due cellule figlie; al centro della cellula compare un solco che man mano si restringe fino a dividere in due la cellula. Nel processo di formazione degli spermatozoi l'ultima fase della mitosi, la citodieresi, non viene completata ma rimane un ponte citoplasmatico tra le cellule, questo si mantiene fino alla fine della spermatogenesi e fa sì che gli spermatozoi si sviluppino in modo sincronizzato.

Dagli spermatogoni di tipo A mediante un altro ciclo di mitosi prendono origine gli spermatogoni di tipo B, e da questi, prima di iniziare la fase meiotica, originano gli spermatociti I. Questo evento segna l'inizio della fase meiotica che dura dai 13 ai 18 giorni. La meiosi, diversamente dalla mitosi, è un processo di divisione cellulare che riduce il corredo cromosomico a metà, consta di due divisioni successive di cui la prima di tipo riduzionale e la seconda di tipo equazionale. Ciascuna delle due divisioni si suddivide in 4 fasi che, così come per la mitosi, sono: profase I/II, metafase I/II, anafase I/II e telofase I/II. A differenza della mitosi, la profase I viene divisa in ulteriori sottofasi che prendono il nome di: leptotene, zigotene, pachitene, diplotene e diacinesi. In leptotene i cromosomi cominciano a spiralizzarsi, assumono un aspetto filamentoso e sono rivolti con i telomeri verso l'involucro nucleare. In zigotene i cromosomi omologhi si appaiano a partire dai telomeri, e nella fase successiva, pachitene, i cromosomi appaiati si scambiano tratti di DNA, per garantire la variabilità genetica, attraverso il meccanismo del crossing-over. In diplotene i cromosomi omologhi cominciano a respingersi e a separarsi, ma rimangono uniti tra loro in corrispondenza dei punti in cui è avvenuto lo scambio assumendo una forma di croce che prende il nome di "chiasma". L'ultima fase della profase I è la diacinesi in cui i chiasmi si spostano verso la zona terminale dei cromosomi, il nucleolo e l'involucro nucleare scompaiono e inizia la metafase I, durante questa fase i cromosomi si dispongono lungo la regione equatoriale del fuso per migrare, nella fase successiva, verso i poli opposti della cellula. Infine, nella telofase, si riorganizza

l'involucro nucleare e compare il setto tra le due cellule figlie, siamo allo stadio di spermatociti II. Dagli spermatociti II, mediante la seconda divisione meiotica, analoga ad una mitosi, originano gli spermatidi che, a sviluppo ultimato, hanno un nucleo sferico con la cromatina finemente dispersa e dei piccoli cromocentri.

Terminata la fase meiotica inizia la fase spermiogenetica, detta anche spermioistogenesi, che, in circa 22 giorni, porta alla maturazione degli spermatozoi.

La spermioistogenesi viene suddivisa in 4 fasi: fase del Golgi, fase del cappuccio, fase acrosomale e fase di maturazione.

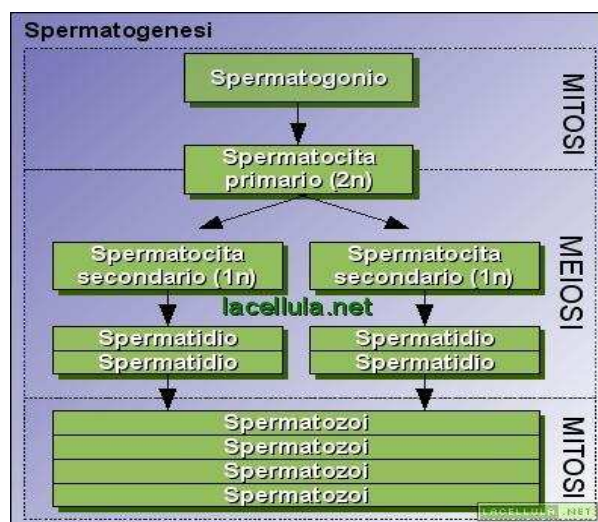
Durante la fase del Golgi all'interno del complesso di Golgi si ha la comparsa di granuli proacrosomali, che, confluendo tra loro, formano un singolo granulo acrosomico avvolto da una membrana che si addossa alla membrana nucleare.

Nella fase del cappuccio la vescicola acrosomica si ingrandisce e ricopre circa i 2/3 del nucleo formando così il cappuccio acrosomico. I due centrioli migrano al polo opposto rispetto al nucleo e costituiscono il centriolo prossimale e quello distale, da quest'ultimo prenderà origine il flagello.

Nella fase acrosomale, si hanno modificazioni dell'acrosoma, del nucleo e del flagello. Il nucleo si allunga e si sposta verso la periferia, la cromatina presente al suo interno si condensa e diventa inattiva; l'acrosoma si adatta alla superficie del nucleo e il citoplasma si allunga verso il polo posteriore del nucleo e va ad avvolgere la parte prossimale del flagello.

Nella fase di maturazione si forma il segmento di connessione tra il nucleo e il flagello e i mitocondri si dispongono a spirale intorno alla porzione prossimale del flagello. Terminata la spermioistogenesi si interrompono i ponti citoplasmatici tra le cellule e si formano così i corpi residuali attraverso cui viene eliminato più del 70% del citoplasma che verrà fagocitato dalle cellule del Sertoli; in questo modo si ottengono spermatozoi liberi che vengono liberati nel lume del tubulo seminifero.

Il processo di spermatogenesi avviene sotto controllo endocrino, grazie all'azione di ormoni prodotti dalla neuroipofisi: l'FSH (ormone follicolo stimolante) che stimola la maturazione delle cellule germinali in spermatozoi, l'LH (ormone luteinizzante) che stimola le cellule di Leyding, a produrre il testosterone, che contribuisce alla maturazione dei gameti maschili.



MATURAZIONE EPIDIDIMARIA E CAPACITAZIONE.

La spermatogenesi si completa nell'epididimo, dove gli spermatozoi completano la maturazione. L'attraversamento dell'epididimo dura 12 giorni, in questa fase gli spermatozoi acquisiscono sia la motilità che la capacità fecondante.

Per poter fecondare la cellula uovo, lo spermatozoo deve subire la capacitazione, consistente in modificazioni delle molecole presenti nella membrana plasmatica. Gli spermatozoi, infatti, prima della capacitazione, posseggono quattro classi di molecole: glicoproteine mobili, glicoproteine fisse, glicolipidi e componenti periferiche di membrana che sono associate alle glicoproteine mobili; con la capacitazione avviene il taglio dei componenti periferici di membrana e un riassetto delle glicoproteine. Altre modificazioni riguardano l'acrosoma e preparano lo spermatozoo a liberare gli enzimi necessari per permettere l'entrata nella zona pellucida (una zona costituita da glicoproteine che circonda l'ovocita).

Lo spermatozoo maturo è costituito da 3 tratti:

-La testa, contiene il nucleo, con un corredo cromosomico aploide, ed è ricoperta da due membrane che delimitano l'*acrosoma*. L'acrosoma riveste un ruolo fondamentale nel processo di fecondazione poiché contiene gli enzimi acrosomiali, che permettono allo spermatozoo di penetrare all'interno dell'ovocita;

-Il tratto intermedio, che unisce la testa alla coda. Tale porzione contiene il collo e presenta numerosi mitocondri disposti ad elica attorno ad una struttura centrale.

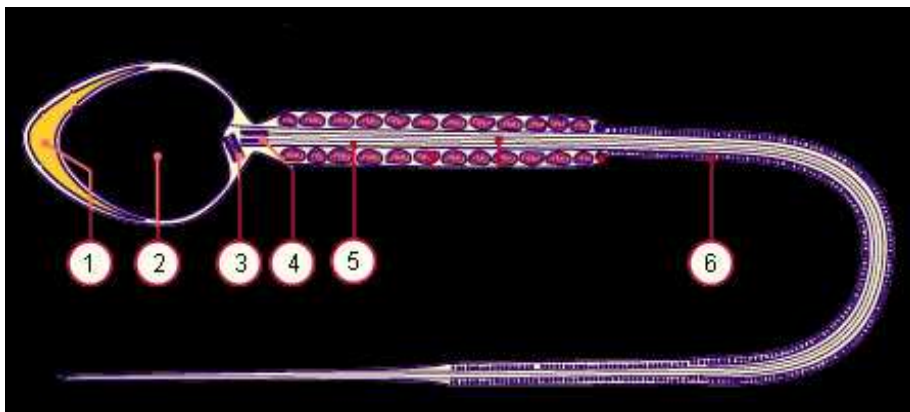
Questi mitocondri sono responsabili della produzione di energia che consente il

movimento dello spermatozoo.

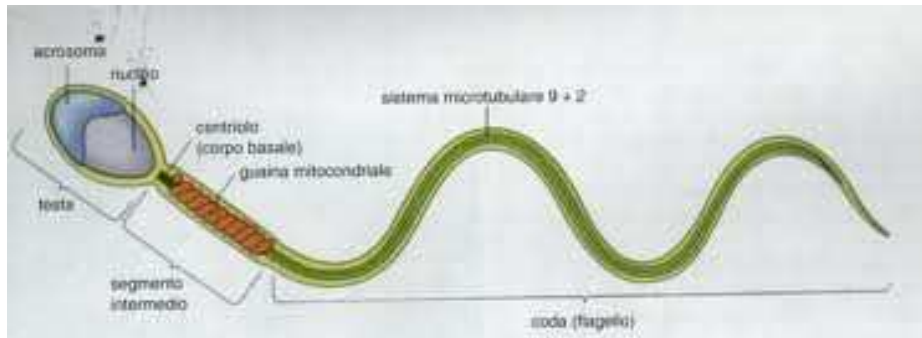
Nel tratto intermedio si ritrovano il centriolo ed una placca fibrosa, detta capitulum, dalla quale si dipartono le fibre che costituiscono la struttura portante centrale del tratto intermedio stesso e del flagello, detta assonema.

Il centriolo e' una struttura di enorme importanza, in quanto dopo la fecondazione provvede ad organizzare i micrutubuli del fuso mitotico, responsabile della segregazione dei cromosomi durante le prime mitosi dell'embrione.

-*La coda*, comprende un segmento principale ed un segmento terminale. I movimenti della coda permettono allo spermatozoo di avanzare in modo rettilineo e progressivo, pertanto una alterazione della coda può determinare una anomalia della motilità degli spermatozoi con conseguente infertilità.



1)acrosoma 2)nucleo 3-4)centrioli 5)collo 6)coda



DEFINIZIONE DI INFERTILITA' E STERILITA'

Secondo l'organizzazione Mondiale della Sanità (O.M.S.) e l'American Fertility Society (A.F.S.) una coppia è da considerarsi infertile quando non è in grado di concepire dopo un anno o più di rapporti sessuali non protetti; viceversa è da considerarsi sterile quella coppia nella quale uno od entrambi i coniugi sono affetti da una condizione fisica permanente che non renda possibile portare avanti una gravidanza. Vengono definite affette da infertilità secondaria quelle coppie che non riescono ad avere un bambino dopo una gravidanza coronata da successo.

La definizione di infertilità proposta dall'O.M.S. e dall'A.F.S. trae origine da un noto lavoro di M J. Whitelaw pubblicato nel 1960 che dimostrava, sulla base di uno studio condotto in una popolazione omogenea degli Stati Uniti, come circa il 56% delle coppie sane concepiva entro il 1° mese di rapporti sessuali; il 78% entro il 6° mese e ben l'86% delle coppie concepiva entro il 12° mese.

EPIDEMIOLOGIA APPLICATA ALL'INFERTILITA'

Il fenomeno dell'infertilità riguarda circa il 15% delle coppie. In normali condizioni di fertilità, ciascuna di esse ha circa il 30% di possibilità di concepire ad ogni ciclo mestruale ma tale percentuale è influenzata da vari fattori, tra cui, primo tra tutti l'età. Si è visto che una donna che ha un'età superiore ai 35 anni ha solo il 20% di probabilità di concepire ad ogni ciclo mestruale, percentuale che si riduce significativamente progredendo con l'età della donna fino ad arrivare al 10% di possibilità per una donna avente età superiore ai 40 anni (*cit. Istituto Superiore della Sanità*). Nel caso in cui l'incapacità di procreare si protragga ininterrottamente per un anno è utile ricorrere ad un centro specializzato nella cura dell'infertilità. Nonostante non siano disponibili dati epidemiologici esaurienti, sulla base delle stime dell'OMS in merito alla percentuale di coppie con problemi di fertilità nei paesi industriali avanzati, il numero di persone con problemi di infertilità in Italia è stimato in 45-50mila. Alcune delle disfunzioni riproduttive hanno un'origine genetica, mentre altre sono il risultato di influenze esterne. Alla radice del problema sono individuabili fattori sia di origine maschile che femminile in misura comparabile, come indicato nella seguente tabella:



L'applicazione degli studi epidemiologici all'infertilità e alla sterilità maschile e femminile risente di alcune limitazioni in quanto non possono essere analizzate con certezza né le caratteristiche né la diffusione di un agente eziologico ben preciso; l'infertilità e la sterilità sono infatti espressione di agenti eziologici diversi, che possono essere sintomatici, ma che il più delle volte risultano essere asintomatici da un punto di vista clinico. Quindi per poter stimare l'infertilità e la sterilità di una popolazione bisogna avvalersi di metodi approssimativi di tipo indiretto o diretto.

Prendendo in esame i dati raccolti in Italia è stato visto che ogni anno si hanno circa 240.000 matrimoni e a due anni dal matrimonio, sono 48.000 le coppie che scoprono di avere difficoltà a concepire, per cui oltre 20.000 di esse ogni anno chiedono consulenza medica per scoprire le cause di infertilità e circa la metà si sottopongono a trattamenti di fecondazione assistita (*fonte: Associazione Italiana per l'Educazione Demografica*). Le coppie che non hanno gravidanza entro due anni

possono avere destini diversi: la metà delle coppie senza anomalie andrologiche e ginecologiche otterrà una gravidanza entro i successivi 6 anni mentre in presenza di Oligo-Asteno-Teratospermia medio-severa, solo il 22-35% delle coppie otterrà gravidanza spontanea entro 12 anni (*fonte: Schoysman R.: "Valutazione del fattore maschile.: che cosa è determinante?" Giornale SIFES*).

Ormai è ben conosciuto che il problema dell'infertilità, coinvolgente circa il 15-20% delle coppie, riconosce:

- per il 35,4% una causa maschile;
- per il 36,5% una patologia femminile;
- per il 15% un problema sanitario di entrambi;
- per il restante 13,1% una causa idiopatica.

(Fonte: Istituto Superiore della Sanità)

L'incidenza dell'infertilità di coppia è inoltre destinata ad innalzarsi a causa dei fattori sociali (mutamenti socio-culturali ed economici che innalzano sempre più l'età media della prima ricerca di gravidanza) e dei fattori ambientali (inquinamento fisico/chimico, alimentare e non, alterante la spermatogenesi: da estrogeni, pesticidi, solventi, alte temperature, agenti chimici, campi magnetici, radiazioni ionizzanti).

I dati raccolti e analizzati dal Registro nazionale della procreazione medicalmente assistita (PMA) dell'Istituto superiore di sanità (ISS), presentati nella relazione 2010 del ministero della Salute sulla Pma, confermano il trend degli anni precedenti: aumentano le coppie che si sottopongono ai trattamenti di fecondazione assistita, i cicli iniziati, le gravidanze ottenute e i

bambini nati, che nel 2008 superano per la prima volta la soglia dei diecimila, considerando tutte le tecniche di Pma applicate, di I, II e III livello. Nel 2008, nei 354 centri autorizzati italiani sono state trattate con tecniche di procreazione medicalmente assistita oltre 59 mila coppie e sono stati iniziati quasi 80 mila cicli. Delle 12.767 gravidanze ottenute, 1942 sono state perse al follow-up e i bambini nati vivi sono stati oltre 10 mila. Nel corso del 2008, l'età media delle donne che in Italia hanno fatto ricorso alle tecniche di Pma (età media 36,1 anni) è aumentata ulteriormente e si è confermata al di sopra delle media europea, che era nel 2005 pari a 33,8 anni. I parti gemellari si sono attestati attorno al 21% e quelli trigemini attorno al 2,6%.

INFERTILITA' MASCHILE

Sono numerosi i fattori che possono contribuire ad uno stato di infertilità, e possono essere acquisiti o congeniti. Nel primo caso le condizioni di infertilità saranno caratterizzate da differenti aspetti clinici e da diversa eziologia, nel secondo caso saranno legate a condizioni di alterazioni genetiche.

Tra le cause più frequenti abbiamo:

-Prostatite, cioè l'infiammazione della ghiandola prostatica. Ciò può creare problemi in quanto il 30% del volume totale seminale è secreto dalla prostata e presenta fattori che proteggono gli spermatozoi dall'acidità del secreto vaginale e influenzano la loro motilità. Le prostatiti sono in genere causate dalla presenza di batteri, come *E. coli* ma anche *Ureaplasma Uraliticum*, che può legarsi agli spermatozoi riducendone la motilità, alterando la morfologia degli spermatozoi o provocando la riduzione della

capacità di penetrazione degli ovociti, e *Chlamydia Trachomatis*, che può provocare oligozoospermia severa. Le infezioni prostatiche sono responsabili del 14,7% dei casi infertilità maschile;

-*Varicocele*, ovvero la dilatazione delle vene che portano il sangue all'esterno dello scroto e che circondano i testicoli. Creano una condizione di ristagno di sangue e un aumento della temperatura scrotale. L'innalzamento della temperatura è in grado di determinare modificazioni a livello delle cellule del Sertoli e di Leyding, e quindi si abbassano i livelli di testosterone, che in condizioni normali, interviene nella maturazione degli spermatozoi. Influisce per il 19,3% nei casi di infertilità maschile ;

-*Criptorchidismo*, cioè la mancata discesa del testicolo nel sacco scrotale. Questa condizione porta ad un alterazione del funzionamento del testicolo non solo perché si assiste ad una riduzione degli spermatozoi ma influisce anche in termini di riproduzione cellulare con tendenza allo sviluppo di tumori maligni. Questo fenomeno colpisce il 2,7% degli uomini;

-*Ipogonadismo endocrino*, vale a dire l'insufficiente produzione di testosterone e degli altri ormoni androgeni. Ciò comporta delle conseguenze a livello dello sviluppo fisico e sessuale. Le cause possono essere dovute ad alterazioni genetiche (es: sindrome di Klinefelter) o congenite (criptorchidismo), a patologie ipofisarie, ad infezioni, all'azione di agenti tossici o radianti. Si pensa ci sia una correlazione anche con l'età. Interviene nei casi di infertilità maschile per lo 0,9% dei casi;

-*Ostruzioni delle vie seminali*, dovute a processi infiammatori o infettivi che hanno

compromesso la pervietà delle vie seminali, impedendo così la libera fuoriuscita degli spermatozoi dal testicolo. Sono responsabili dell'infertilità maschile in circa l'8% dei casi;

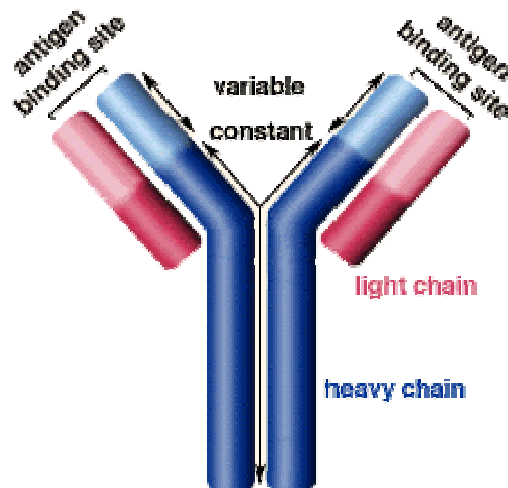
-Disfunzione erettile-eiaculatoria, ovvero l'incapacità di ottenere o mantenere una sufficiente erezione necessaria per permettere il rapporto sessuale. Le cause possono essere diverse, tra queste: squilibri endocrini, farmaci, cause psicologiche e stress, cause neurologiche (lesioni del midollo spinale o lesioni cerebrali);

-Cause genetiche, dovute ad alcune patologie come la Sindrome di Klinefelter (in cui l'individuo ha un cariotipo 47,XXY) o dovute alla presenza di microdelezioni che riguardano il gene *DATS*, a livello dei locus AZF, BZF e CZF, presente nel cromosoma Y. Le cause genetiche influiscono per il 10-15% nell'infertilità maschile;

-Cause immunitarie, dovute alla presenza di anticorpi antispermatozoo (ASA). Questa condizione è presente in circa il 10% dei casi di infertilità maschile idiopatica e in ben il 25-40% dei casi di infertilità di coppia senza causa apparente (*fonte: Claudio Manna, direttore centro fecondazione assistita Genesis-Roma*).

Gli anticorpi sono delle glicoproteine prodotte dalle plasmacellule, (la forma differenziata dei linfociti B), che presentano due catene polipeptidiche corte costituite da circa 200 amminoacidi, dette catene leggere (L), e due catene lunghe costituite da circa 400 amminoacidi, dette catene pesanti (H); tutte e quattro le catene polipeptidiche sono unite tra loro dalla presenza di ponti disolfuro e presentano rispettivamente delle regioni variabili e delle regioni costanti. La regione costante è denominata "Fc"

e permette l'interazione dell'anticorpo con il sistema del complemento, mentre la regione variabile, definita "Fab", permette il riconoscimento dell'antigene e il suo legame. Tale regione è quindi variabile a seconda della specificità dell'anticorpo per un dato antigene. La struttura finale dell'anticorpo somiglia ad una Y. Nell'uomo sono 5 le classi principali di immunoglobuline: IgG, IgA, IgD, IgM, IgE, e per l'indagine immunologica riguardante il liquido seminale vengono presi in considerazione solo le IgG e le IgA poiché le IgE intervengono solo in casi di allergia mentre le IgD si pensa fungano da recettori per gli stessi linfociti B.



La presenza di anticorpi antispermatozoo è dovuta ad un'interruzione della barriera emato-testicolare che consente lo svolgimento di una normale funzione spermatogenetica in un perfetto equilibrio immunologico. La barriera emato-testicolare è una struttura presente nei tubuli seminiferi costituita da tight junction nel versante baso-laterale delle cellule del Sertoli e dall'endotelio vasale. Tale barriera evita la diffusione delle grosse molecole idrofile, tra cui gli anticorpi, nell'ambiente dei tubuli seminiferi. In seguito all'interruzione della barriera emato-testicolare le

cellule germinali e gli spermatozoi, normalmente separati dal sistema immunitario dell'organismo, vengono esposti alle cellule immunocompetenti, che li riconoscono come *non self*, poiché gli spermatozoi, presentano un corredo cromosomico aploide, ovvero costituito da 23 cromosomi, al contrario di tutte le altre cellule presenti nel nostro organismo, che presentano un corredo cromosomico diploide, costituito da 46 cromosomi. L'interruzione della barriera emato-testicolare è dovuta a varie cause, tra queste: orchiti, fenomeni infiammatori locali del testicolo, traumi testicolari, torsioni testicolari, vasectomia. Tuttavia sembra che in questi casi giochino un ruolo importante anche i fattori genetici ma ciò non è stato provato. Il legame degli anticorpi con gli spermatozoi generalmente si instaura nell'epididimo o nelle vie spermatiche superiori e tali anticorpi solitamente si localizzano a livello della testa dello spermatozoo o del flagello.

L'infertilità immunologica dovuta alla presenza di anticorpi antispermatozoo può essere trattata in due modi: mediante somministrazione di farmaci steroidei, quali il cortisone, che sopprimono la risposta immunitaria con lo scopo di ridurre la presenza di anticorpi. Tali farmaci però, se presenti in alte concentrazioni nell'organismo, possono provocare effetti collaterali quali aumento del peso corporeo o della pressione sanguigna.

L'unica seria alternativa al trattamento ormonale è rappresentata dalle tecniche di fecondazione assistita e precisamente dalla fecondazione in vitro con tecnica ICSI,

una procedura in cui lo spermatozoo viene iniettato nell'ovocita con l'aiuto di un micromanipolatore.



MATERIALI E METODI

SPERMIOGRAMMA

Lo spermioγραμμα è l'analisi del liquido seminale, effettuata per analizzare il numero, la motilità, la morfologia degli spermatozoi. Per l'esecuzione dell'esame del liquido seminale sono necessari degli accorgimenti:

-Astinenza sessuale per un periodo compreso tra i 3 e i 7 giorni. Difatti se l'astinenza è inferiore ai 3 giorni si assiste ad una diminuzione della concentrazione degli spermatozoi, mentre se il periodo di astinenza è superiore ai 7 giorni diminuisce la

motilità degli spermatozoi;

-Sospensione di terapie farmacologiche, a base di farmaci anti-infiammatori, antibiotici, ormoni e steroidi;

-Raccolta del campione mediante masturbazione manuale, stando attenti a non perdere frazioni del campione.

-Raccolta del campione nel centro in cui si effettua l'analisi del liquido seminale. Se ciò non è possibile il campione può essere prodotto a casa e deve essere portato entro un intervallo di tempo di 30 minuti al laboratorio dove deve essere effettuata l'analisi.

Il campione deve essere raccolto in un contenitore sterile per le urine e deve essere mantenuto ad una temperatura compresa tra i 20° e i 37° C.

Il campione da analizzare è sottoposto ad un esame macroscopico e un esame microscopico. L'esame macroscopico si effettua dopo circa 15 minuti dall'avvenuta raccolta e viene effettuato per determinare i parametri chimico-fisici quali:

-Colore, che in condizioni normali deve essere grigio opalescente. Se biancastro può indicare danni a carico delle vescichette seminali, mentre se il colore vira al giallo può indicare o una contaminazione urinaria, o la presenza di granulociti o, raramente, la presenza di bilirubina;

-Volume, deve avere valori di almeno 1,5 ml, in presenza di volumi inferiori l'eiaculato si caratterizza per ipospermia, che può essere causata da un'infezione genitale, da un'alterazione congenita dei vasi deferenti o da eiaculazione retrograda.

Il volume dell'eiaculato fornisce informazioni riguardo la funzionalità delle

vescichette seminali, responsabili della produzione di circa il 60-70% del liquido seminale, e della prostata, responsabile del 30-40% del secreto.

-pH, deve essere compreso tra 7.2 e 8 e riflette l'equilibrio tra i valori di pH presenti nei diversi secreti delle ghiandole accessorie, principalmente la secrezione alcalina prodotta dalle vescichette seminali e la secrezione acida prodotta dalla prostata. Valori più bassi di pH indicano una presunta disfunzione delle vescichette seminali mentre un pH superiore può indicare la presenza di un'infezione;

-Liquefazione. Appena emesso il liquido seminale tende a coagulare e solo dopo circa 20-30 minuti, alla temperatura di 37 °C tende a liquefarsi. La coagulazione avviene grazie alla presenza di enzimi prodotti dalle vescichette seminali, mentre la liquefazione si ha ad opera di enzimi prodotti dalla prostata; una mancata liquefazione fa sospettare una anomalia nel secreto prostatico;

-Viscosità, non va confusa con la liquefazione, in quanto questa tende a dissolversi mentre la viscosità è una caratteristica permanente del liquido seminale. In condizioni normali non deve essere eccessiva. Viene valutata prendendo con una siringa in cui è stato tolto l'ago o con una pipetta il liquido seminale e facendolo cadere goccia a goccia. Se il liquido seminale forma una filanza maggiore di 2 cm allora si ha viscosità che impedisce agli spermatozoi di muoversi liberamente. La presenza di elevata viscosità può essere causata da una disfunzione della prostata.

L'esame microscopico consiste nella conta degli spermatozoi e nell'analisi della morfologia e della motilità.

La conta spermatozoaria viene eseguita mediante camera di Makler, contando gli spermatozoi presenti all'interno di una apposita griglia di conta. Un campione è considerato normale se presenta una concentrazione di spermatozoi maggiore di 15 milioni/ml, in presenza di valori inferiori il campione si definisce oligozoospermico.

In assenza di spermatozoi ai primi controlli, si procede alla centrifugazione del campione e all'osservazione del sedimento, la presenza di spermatozoi nel sedimento caratterizza la *Criptozoospermia*, altrimenti si è in presenza di **Azoospermia**, cioè totale assenza di spermatozoi nell'eiaculato.

La motilità è basata sull'osservazione del liquido seminale al microscopio. La motilità dipende fisiologicamente dalla durata dell'astinenza (diminuisce dopo il quinto giorno) e può essere influenzata dalla temperatura di conservazione del campione, dall'incompleta liquefazione o dall'aumento della viscosità.

Distinguiamo 4 tipi differenti di motilità da parte degli spermatozoi:

-Motilità progressiva veloce (tipo a): in questo caso gli spermatozoi si muovono con un moto rettilineo rapido, quindi il movimento flagellare è anterogrado;

-Motilità progressiva lenta (tipo b), in cui gli spermatozoi si muovono in maniera rettilinea, ma lentamente;

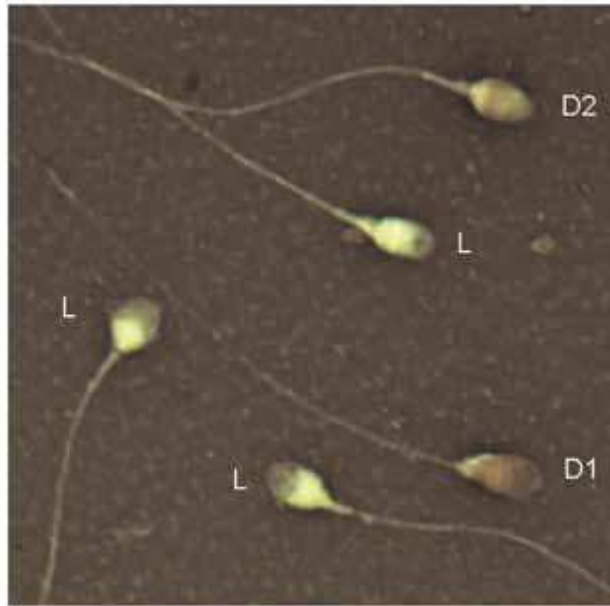
-Motilità di tipo non progressiva (tipo c): in questo caso gli spermatozoi sono caratterizzati da motilità *in situ* poiché non percorrono nessuna traiettoria, quindi non si spostano;

-Immobilità (tipo d), ovvero gli spermatozoi non presentano alcun movimento

flagellare.

Un campione di liquido seminale può essere considerato normale se la percentuale di spermatozoi che si muovono con una motilità di tipo a e di tipo b, motilità progressiva totale PR, è superiore al 32%; in caso contrario si parla di astenozoospermia.

Quando si ha un'elevata percentuale di spermatozoi immobili viene effettuato il test di vitalità. Tale test usa 2 coloranti, rispettivamente l'eosina, che penetra attraverso la membrana plasmatica degli spermatozoi non vitali, e la nigrosina che permette la contro-colorazione. Nel caso in cui la testa degli spermatozoi si colora in rosa, allora vuol dire che gli spermatozoi immobili sono effettivamente morti. Il metodo si basa quindi sul principio che la membrana plasmatica degli spermatozoi morti sia danneggiata, permettendo quindi l'entrata del colorante. Il test viene effettuato inserendo 100 microlitri di seme con 200 microlitri di eosina; si attendono 30 secondi e poi si aggiungono 300 microlitri di nigrosina e si attendono altri 30 secondi. A questo punto è possibile allestire il vetrino e procedere all'osservazione al microscopio.



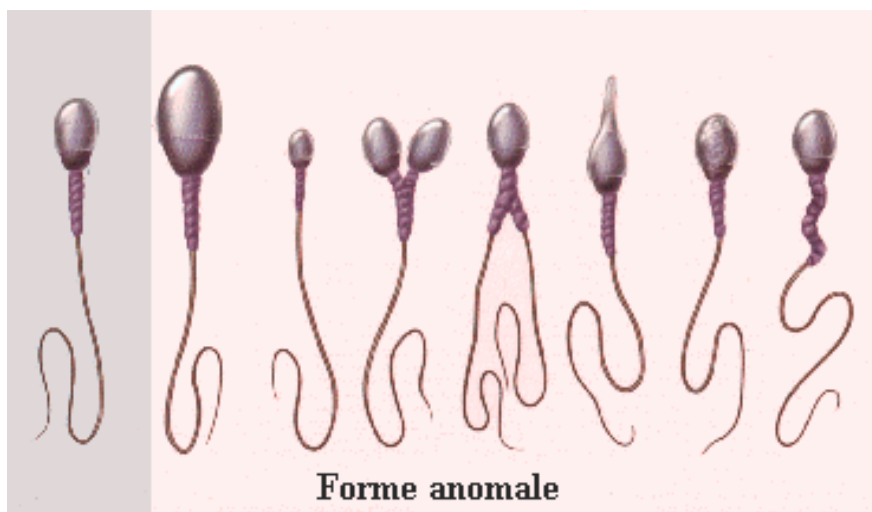
L= spermatozoi vivi D1-D2= spermatozoi morti

L'esame della morfologia si effettua mediante l'allestimento di vetrini strisciati e colorati mediante colorazione di May Grunwald – Giemsa. Si studia la forma dello spermatozoo e si analizza rispettivamente la testa, il tratto intermedio e la coda. Le alterazioni della testa possono riguardare sia le dimensioni, e per questo motivo deve essere presa in considerazione la lunghezza della testa, il suo diametro e il rapporto tra la lunghezza e il diametro. Si parla di microcefalia se la testa dello spermatozoo è più piccola rispetto alla norma, mentre si parla di macrocefalia se la testa dello spermatozoo è più grande rispetto alla norma. Altre alterazioni della testa interessano la forma, che può essere a punta, allungata, tonda, amorfa; possono inoltre essere presenti spermatozoi che presentano più di una testa e spermatozoi che hanno un acrosoma ridotto, asimmetrico o assente.

Le alterazioni riguardanti il tratto intermedio sono dovute ad un eccessivo

inspessimento o assottigliamento del tratto intermedio, mentre le alterazioni che riguardano il flagello sono dovute al fatto che esso può essere avvolto su se stesso, o può essere spezzato, gonfio, oppure possono essere presenti due o più flagelli.

Si prende nota del numero di spermatozoi anomali, delle anomalie presenti e della percentuale di spermatozoi normoconformati, si considera normale un liquido seminale in cui è presente una percentuale di spermatozoi normoconformati uguale o superiore al 4%, per valori inferiori al 4% si definisce un campione con teratozoospermia.



Durante l'analisi della morfologia spermatica si ricercano gli elementi germinali immaturi, la presenza eccessiva di spermatogoni o spermatociti primari, può far sospettare una condizione di sofferenza testicolare, a sua volta dovuta ad esposizione prolungata al calore, ad agenti tossici, a radiazioni, a farmaci.

Si registra la presenza di eritrociti e di cellule della linea infiammatoria, che

possono essere un segnale di infezioni o infiammazioni delle vie seminali.

Al fine di evidenziare eventuali agglutinazioni specifiche tra gli spermatozoi, se già non evidenti nell'eiaculato, si allestisce un vetrino in cui una aliquota di liquido seminale viene mescolata con una soluzione densa, il PVP, al fine di rallentare la motilità progressiva degli spermatozoi. In presenza di agglutinazioni abbondanti tra gli spermatozoi si prende nota nel referto del tipo di agglutinazione osservata: testa – testa, collo – collo, coda – coda.

POST COITAL TEST (PCT)

Il post coital test o test di Sims Huhner è un'indagine di primo livello effettuata nella diagnostica della coppia sterile per determinare il numero di spermatozoi presenti nel muco cervicale e per valutarne la sopravvivenza dopo alcune ore dal rapporto sessuale. Le caratteristiche del muco cervicale sono regolate dagli ormoni estrogeni e quindi variano con le diverse fasi del ciclo mestruale: nel periodo dell'ovulazione il muco si trasforma in modo tale da facilitare il passaggio degli spermatozoi dalla vagina all'utero, mentre nelle altre fasi del ciclo funge da barriera nei confronti degli spermatozoi. Il post coital test pertanto permette di evidenziare i rapporti esistenti tra il muco cervicale della donna e il liquido seminale, dopo un rapporto sessuale. Il test consiste nel prelievo, mediante un apposito catetere, di parte delle secrezioni cervico-vaginali e dalla loro osservazione al microscopio. Tale test viene generalmente effettuato durante la fase periovulatoria, uno o due giorni prima rispetto all'ovulazione poiché in questo periodo la quantità e le caratteristiche

chimico-fisiche del muco dovrebbero favorire una motilità ottima e una maggiore sopravvivenza degli spermatozoi. Per poter effettuare il test è necessario:

- Astenersi da rapporti sessuali* nei due giorni precedenti dall'effettuazione del test;
- Avere rapporti sessuali* la notte prima della data del test;
- Non usare lubrificanti vaginali* durante il rapporto sessuale;
- Evitare di effettuare il bagno* da parte della donna (può essere fatta la doccia);
- Recarsi presso l'ambulatorio dopo circa 2-8 ore dal rapporto sessuale* alla data fissata per il test.

Una volta effettuato il test, il muco cervicale viene posto in un vetrino porta-oggetto e coperto da un vetrino copri-oggetto e viene analizzato al microscopio. Il numero di spermatozoi presenti nel canale cervicale dipende dal periodo di tempo trascorso dal rapporto sessuale. Infatti, se analizziamo il muco dopo 2-3 ore dall'avvenuto rapporto sessuale notiamo la presenza di un elevato numero di spermatozoi ma tale numero tende a diminuire con il passare del tempo. Oltre al numero degli spermatozoi, altro parametro da tenere in considerazione è la motilità degli spermatozoi, che può essere distinta in:

- PR*, se gli spermatozoi hanno una motilità progressiva;
- NP*, se gli spermatozoi hanno una motilità non progressiva;
- IM*, se gli spermatozoi sono immobili.

Sulla base di quanto detto si possono avere due tipologie di risultati:

- Positivo*, quando si ha un muco abbondante, limpido (o trasparente), con una buona

filanza e con un pH compreso tra 7 e 8,5. Nel muco devono inoltre essere presenti, per ogni campo microscopico di osservazione a 400 ingrandimenti, almeno 10 spermatozoi dotati di una buona motilità, rettilinea ed uniforme. In questo caso è da escludere i fattori cervicali come causa di sterilità.

-Negativo. In questo caso il risultato può derivare da problematiche maschili (come l'oligo-astenospermia ovvero presenza di pochi spermatozoi che hanno anche una ridotta vitalità o l'azoospermia), da alterazioni del muco cervicali dovute a fattori anatomici (come interventi sul collo dell'utero), funzionali (dati da un muco cervicale ostile o che presenta un pH acido), infiammatori (endocerviti), da fattori immunologici dovuti alla presenza di anticorpi antispermatozoo. In presenza di un risultato negativo si consiglia di ripetere il test il mese successivo al fine di escludere le variabili inerenti la dinamica del rapporto stesso.

MAR TEST: TEST DI AGGLUTINAZIONE MISTA.

Una volta effettuato lo spermioγραμμα, se risulta evidente la presenza di agglutinazioni, o se si ha astenozoospermia non associata a riduzione del numero di spermatozoi, o ancora se si è in presenza di malattie autoimmuni o si è in presenza di infertilità inspiegata, si procede effettuando il dosaggio degli anticorpi antispermatozoo. Tale dosaggio può essere svolto con il MAR TEST, in cui gli spermatozoi vengono incubati con particelle in lattice ricoperte da IgA e antisiero verso le IgA umane. Inizialmente si mettono in un vetrino porta-oggetto 10 microlitri

di particelle in lattice ricoperte di IgA, poi vanno aggiunti 10 microlitri di liquido seminale, e dopo aver mescolato il tutto con una pipetta, si aggiungono 10 microlitri di antisiero diretto contro gli anticorpi IgA. Infine mettiamo un vetrino copri-oggetto e guardiamo al microscopio.



In presenza di anticorpi adesi alla superficie degli spermatozoi, si osserverà agglutinazione tra le sferette di lattice e gli spermatozoi proprio in virtù della presenza nell'antisiero, di anticorpi anti IgA umane. Un'infertilità immunologica è ipotizzabile se oltre il 50% degli spermatozoi è attaccata alle sfere di lattice.

SCOPO DEL LAVORO

Scopo del lavoro è quello di individuare, nel liquido seminale, dei parametri predittivi che permettano di ipotizzare, con una certa affidabilità, la presenza di anticorpi antispermatozoo, responsabili di infertilità immunologica. Il rilevamento di anticorpi antispermatozoo può essere facilmente eseguito mediante applicazione di un test economico, affidabile e di veloce esecuzione: il MAR test.

RISULTATI

Sono stati analizzati i dati inerenti trentuno pazienti in cura presso il Centro di Diagnosi e Cura della Sterilità, sito in Clinica del Mediterraneo a Ragusa.

I dati ottenuti dall'analisi del liquido seminale, con relativa anamnesi patologica del paziente, i risultati del MAR test e del PCT, eseguito per ogni coppia arruolata, sono riportati in tabella al fine di rendere agevole la loro elaborazione.

Codice	volume	concentrazione	motilità	agglutinazioni al PVP	PCT	Diagnosi				MAR-TEST	IB TEST muco
						Parotite	Traumi	infezioni	varicocele		
S 886	3 ml	94 milioni/ml	A=35% B=43%	positivo	mobili	nega	nega	nega	nega	0%	
S 821	2,5 ml	18 milioni/ml	A=10% B=45%	positivo	Shaking	nega	nega	positivo	nega	positivo al 43%	
S 890	3 ml	178 milioni/ml	A=39% B=31%	positivo	mobili	età pediatrica	nega	nega	nega	0%	
S 894	4 ml	12 milioni/ml	A=39% B=46%	negativo	immobili	età pediatrica	nega	nega	nega	0%	
S 895	3,5 ml	16 milioni/ml	A=25% B=46%	positivo	mobili	età pediatrica	interv scroto	positivo	I grado	0%	
S 896	3,5 ml	51 milioni/ml	A=9% B=21%	negativo	immobili	età pediatrica	ernia inguinale	nega	nega	0%	
S 898	2,5 ml	41 milioni/ml	A=27% B=47%	positivo	mobili	età pediatrica	nega	positivo	nega	0%	
S 900	3 ml	42 milioni/ml	A=10% B=40%	negativo	Shaking	età adulta	nega	nega	III grado	positivo al 10%	Positivo
S 953	3,5 ml	44 milioni ml	A=26% B= 48%	negativo	Shaking	nega	nega	nega	nega	positivo al 18%	Positivo
S 901	2,5 ml	24 milioni/ml	A=9% B=61%	negativo	Shaking	nega	nega	positivo	III grado	positivo al 7%	
S 722	3,5 ml	60 milioni/ml	A=22% B=33%	positivo	Shaking	nega	nega	positivo	nega	0%	
S 935	4 ml	52 milioni/ml	A=19% B=41%	positivo	Shaking	nega	nega	nega	nega	0%	
S 909	2 ml	188 milioni/ml	A=26% B=45%	positivo	mobili	età pediatrica	nega	nega	nega	0%	
S 913	5 ml	87 milioni/ml	A=16% B=52%	positivo	mobili	età pediatrica	nega	nega	nega	0%	
S 968	3 ml	38 milioni/ml	A=20% B=35%	positivo	Shaking	nega	inter. Idrocele	positivo	nega	65%	
S 916	2 ml	30 milioni/ml	A=20% B=55%	positivo	mobili	età pediatrica	nega	positivo	I grado	0%	
S 917	3 ml	24 milioni/ml	A=15% B=44%	negativo	Shaking	nega	nega	nega	nega	0%	
S 921	2,5 ml	133 milioni/ml	A=33% B=36%	positivo	mobili	nega	nega	nega	nega	0%	
S 922	2 ml	42 milioni/ml	A=23% B=43%	positivo	Shaking	età pediatrica	nega	nega	II grado	positivo al 30%	
S 925	1,5 ml	120 milioni/ml	A=18% B=44%	negativo	Shaking	nega	idrocele sx	nega	nega	positivo al 40%	
S 972	4 ml	68 milioni ml	A=22% B= 53%	negativo	Shaking	nega	nega	nega	nega	0%	Positivo
S 927	4 ml	67 milioni/ml	A=3% B=24%	negativo	Shaking	età pediatrica	nega	nega	nega	positivo al 12%	
S 928	3 ml	69 milioni/ml	A=27% B=34%	positivo	mobili	età pediatrica	nega	nega	II grado	positivo al 5%	
S 983	4 ml	46 milioni/ml	A=12% B=23%	positivo	Shaking	nega	ematoma	nega	nega	55%	
S 929	1,5 ml	116 milioni/ml	A=5% B=35%	negativo	Shaking	nega	nega	nega	nega	0%	Positivo
S 930	1,5 ml	367 milioni/ml	A=48% B=25%	positivo	mobili	età pediatrica	nega	nega	nega	0%	
S 931	5,5 ml	61 milioni/ml	A=42% B=32%	negativo	Shaking	età pediatrica	nega	positivo	nega	0%	
S 937	5 ml	48 milioni/ml	A=12% B=31%	positivo	mobili	età pediatrica	nega	positivo	III grado	positivo al 4%	
S 995	3 ml	13 milioni/ml	A=10% B= 51%	negativo	immobili	nega	torsione testicolare	nega	nega	Positivo al 30%	

S 998	2,5 ml	28 milioni ml	A=16% B= 42%	negativo	Shaking	nega	nega	nega	nega	0%	Positivo
S 780	1,8 ml	13 milioni/ml	A=10% B=24%	positivo	Shaking	nega	orchite	positivo	nega	68%	

Tabella 01: risultati

Dall'esame dei dati riassunti in tabella si evince che:

- ④ N° 3 pazienti presentano agglutinazioni al pvp, positività al MAR test con % > 50% e movimento tipo shaking in PCT (tabella 02)
- ④ N° 10 pazienti sono risultati positivi al MAR test con risultato < 50%, di questi:
 - 1 paziente presenta spz immobili al PCT (giallo)
 - 2 pazienti presentano spz mobili al PCT (viola)
 - 7 pazienti presentano movimento tipo shaking degli spz al PCT (azzurro) e di questi:
 - 2 pazienti hanno PVP positivo alle agglutinazioni (rosso)
 - 5 pazienti hanno PVP negativo alle agglutinazioni
- ④ N° 18 pazienti sono risultati con MAR test negativo, di questi, 11 pazienti hanno PVP positivo alle agglutinazioni (tabella 04)

agglutinazioni al PVP	PCT	Diagnosi				MAR-TEST	IB TEST muco
		Parotite	Traumi	infezioni	varicocele		
positivo	Shaking	nega	inter. Idrocele	positivo	nega	Positivo al 65%	
positivo	Shaking	nega	Ematoma	nega	nega	Positivo al 55%	
positivo	Shaking	nega	Orchite	positivo	nega	Positivo al 68%	

Tabella 02

agglutinazioni al PVP	PCT	Diagnosi				MAR-TEST	IB TEST muco
		Parotite	Traumi	infezioni	varicocele		
positivo	Mobili	età pediatrica	Nega	nega	II grado	positivo al 5%	
positivo	Mobili	età pediatrica	Nega	positivo	III grado	positivo al 4%	
positivo	Shaking	Nega	Nega	positivo	nega	positivo al 43%	
negativo	Shaking	età adulta	Nega	nega	III grado	positivo al 10%	Positivo
negativo	Shaking	Nega	Nega	nega	nega	positivo al 18%	Positivo
negativo	Shaking	Nega	Nega	positivo	III grado	positivo al 7%	
positivo	Shaking	età pediatrica	Nega	nega	II grado	positivo al 30%	
negativo	Shaking	Nega	idrocele sx	nega	nega	positivo al 40%	
negativo	Shaking	età pediatrica	Nega	nega	nega	positivo al 12%	
negativo	immobili	Nega	torsione testicolare	nega	nega	Positivo al 30%	

Tabella 03

agglutinazioni al PVP	PCT	Diagnosi				MAR-TEST	IB TEST muco
		Parotite	Traumi	infezioni	varicocele		
positivo	Mobili	Nega	Nega	nega	nega	0%	
positivo	Mobili	età pediatrica	Nega	nega	nega	0%	
negativo	immobili	età pediatrica	Nega	nega	nega	0%	
positivo	Mobili	età pediatrica	interv scroto	positivo	I grado	0%	
negativo	immobili	età pediatrica	ernia inguinale	nega	nega	0%	
positivo	Mobili	età pediatrica	Nega	positivo	nega	0%	
positivo	Shaking	Nega	Nega	positivo	nega	0%	
positivo	Shaking	Nega	Nega	nega	nega	0%	
positivo	Mobili	età pediatrica	Nega	nega	nega	0%	
positivo	Mobili	età pediatrica	Nega	nega	nega	0%	
positivo	Mobili	età pediatrica	Nega	positivo	I grado	0%	
negativo	Shaking	Nega	Nega	nega	nega	0%	
positivo	Mobili	Nega	Nega	nega	nega	0%	
negativo	Shaking	Nega	Nega	nega	nega	0%	Positivo
negativo	Shaking	Nega	Nega	nega	nega	0%	Positivo
positivo	Mobili	età pediatrica	Nega	nega	nega	0%	
negativo	Shaking	età pediatrica	Nega	positivo	nega	0%	
negativo	Shaking	Nega	Nega	nega	nega	0%	Positivo

Tabella 04

DISCUSSIONE

Dai dati riassunti nella tabella n° 02 riguardanti i tre pazienti con anamnesi positiva per traumi testicolari, e quindi probabile interruzione della barriera ematotesticolare, la positività al MAR test con percentuale superiore al 50% si associa alla presenza di fenomeni di Shaking al PCT ed alle agglutinazioni in PVP. Quindi la presenza di agglutinazioni in PVP potrebbe avere un valore predittivo positivo della presenza di anticorpi anti spermatozoo nel liquido seminale.

Dai dati riassunti nella tabella n° 03 riguardanti i dieci pazienti con anamnesi negativa per traumi maggiori e positività al MAR test con percentuale inferiore al 50%, non si ha associazione diretta tra MAR test positivo ed agglutinazioni al PVP, quindi la ridotta presenza di anticorpi potrebbe ascrivere soltanto a lievi fenomeni flogistici locali in grado di stimolare una seppur minima risposta immunitaria.

Dai dati riassunti nella tabella n° 04 riguardanti i diciotto pazienti con anamnesi negativa per traumi maggiori e negatività al MAR test ma con variabile espressione della positività al PVP si può desumere che tali alterazioni siano imputabili ad alterazioni di membrana dovuti ad eventi ossidativi e/o fenomeni infiammatori del distretto urogenitale.

CONCLUSIONI

Dall'analisi dei dati ottenuti dalla tabella 02 si evince che da una corretta interpretazione dei parametri microscopici del liquido seminale, ed in particolar modo dalla presenza di agglutinazioni specifiche tra spermatozoi (agglutinazioni testa – testa, collo – collo, coda – coda e agglutinazioni miste) in pazienti infertili, si potrebbe supporre la presenza di anticorpi antispermatozoo nel liquido seminale e quindi procedere con il MAR test per la conferma.

La positività al MAR test, quindi presenza di anticorpi antispermatozoo, permetterebbe al medico la diagnosi immediata di infertilità immunologica con tecniche non invasive, semplici ed economiche, con il vantaggio di poter proporre alla coppia, già dai primi incontri, la corretta strategia terapeutica per il raggiungimento della gravidanza.

L'esiguità del campione non permette di avere una significatività statistica, pertanto tale studio dovrà essere continuato al fine di raggiungere la dimensione campionaria minima.

Bibliografia

AA.VV., *Understanding Semen Analysis*, Stonybrook-State University of New York, 1999.

Citrino G., Check J.H., Bollendorf A., Hourani W., Diantonio A., *Clin Exp, Obstet Gynecol*, 2011.

Essig, M.G. *Semen Analysis in Healthwise*, WebMD, 2007.

Ellington J., *Understanding Sperm Analysis*, INGfertility, 2004.

Ellington J., "Use of a Specialized Condom to Collect Sperm Samples for Fertility Procedures", INGfertility, 28-06-2008.

Hirano Y., Shibahara H., Koriyama J., Tokunaga M, Shimada K., Suzuki M., *Am J Reprod Immunol*, 2011.

Kucuk T., *Intrauterine insemination*, J.Assist Reprod Genet, 2008.

Naz RK, *Am J Reprod Immunol*, 2011.

Schoyman R. , "Valutazione del fattore maschile: che cosa è determinante?", *Giornale SIFES* 1, 9-16, 1994

Zhao Y., Brezina P., Hsu CC., Garcia J., Brinsden PR., Wallach E., *Biochim, Biophys Acta*, 2011

Zini A., Fahmy N., Belzile E., Ciampi A., Al-Hathal N., Kotb A., *Hum Reprod*, 1288-

95, EPub, 2011.

Zini A., Lefebvre J., Kornitzer G., Bissonnette F., Kadoch IJ., Dean N, Phillips S., *J*

Reprod Immunol, 2011

SITI INTERNET – CONSULTATI

<http://www.embrio.it/online/gametogenesi-maschile.html>, 03-04-2011.

http://www.fecondazioneassistita.it/capacitazione_del seme.htm, 15-04-2011.

http://www.fondazione serono.org/23?news_fertilita=1786, 29-03-2011.

http://www.fondazione serono.org/23?news_fertilita=1694, 30-03-2011.

http://www.gynevra.it/guide/SezGUI_12-leggere_le_analisi-muco_cervicale.html,
21-03-2011.

http://www.irema.org/seminograma_it.htm, 19-02-2011.

<http://www.iss.it/binary/publ/publi/2001b.1109060436.pdf>, 04- 02-2011.

http://www.lacellula.net/appunti/zoologia/gametogenesi_spermatogenesi_ed_ovogenesi.html, 28-11-2010.

<http://www.medicinalive.com/medicina-tradizionale/dizionario-termini-medici/ipogonadismo-definizione-e-sintomi/>, 05-03-2011.

http://www.ricercaitaliana.it/prin/dettaglio_prin-2005062572.htm, 22-03-2011.

<http://www.riproduzione.org/biofertility/01/01.asp>, 12-11-2010.