

UNIVERSITA' DI ROMA "LA SAPIENZA"

Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali

Corso di Laurea Triennale in Scienze Biologiche

Curriculum: Genetico Molecolare

TITOLO

Studio ed Applicazione di Tecniche di Fecondazione Assistita di Primo Livello

Candidata: Daniela Scribano N° di matricola: 696740

Relatrice interna: *Chiar.ma Prof.ssa* Ada Maria Tata

Dipartimento di Biologia Cellulare e dello Sviluppo

Relatore esterno: *Dott.* Giovanni Bracchitta

Centro ASTER di Diagnosi e cura della Sterilità Clinica del
Mediterraneo Ragusa

Anno Accademico 2004 / 2005

UNIVERSITA' DI ROMA "LA SAPIENZA"

Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali

Corso di Laurea Triennale in Scienze Biologiche

TITOLO

Studio ed applicazione di Tecniche di Fecondazione Assistita di Primo Livello

Desidero ringraziare la Prof.ssa Ada Maria Tata per avermi seguito nella realizzazione di questo lavoro e ringrazio il Dott. Giovanni Bracchitta e il Dott. Nunzio Minniti, del Centro Aster di Diagnosi e Cura della Sterilità della Clinica del Mediterraneo di Ragusa, per la disponibilità e la collaborazione offertami.

Indice

Premessa	Pag. 1
Introduzione	Pag. 6
Apparato genitale femminile	Pag. 6
Apparato genitale maschile	Pag. 7
L'ovogenesi	Pag. 8
La spermatogenesi	Pag. 9
La fecondazione	Pag. 14
Proprietà del muco cervicale	Pag. 16
Fisiopatologia del liquido seminale	Pag. 17
Crioconservazione	Pag. 22
Materiali e Metodi	Pag. 23
Esame del liquido seminale	Pag. 23
Inseminazione omologa intrauterina	Pag. 28
Procedura di crioconservazione	Pag. 33
Risultati	Pag. 35
Conclusioni	Pag. 41
Bibliografia	Pag. 42

PREMESSA

La Biologia della Riproduzione è un ramo delle Scienze Biologiche che “oggi” sta attraversando un rapido sviluppo per far fronte ai problemi “dell’uomo del ventunesimo secolo”: problemi riguardanti la sfera procreativa. Oggi, infatti, la possibilità di procreare risulta essere messa a rischio oltre che da una serie di fattori patologici, anche dalla correlazione tra il contesto socio-economico-culturale ed il comportamento riproduttivo. L’organizzazione della società contemporanea induce, in primo luogo, un accentuato ritardo rispetto all’età biologica nell’unione tra uomini e donne ed in secondo luogo un ulteriore ritardo nella ricerca della prima gravidanza. Inoltre, la capacità a procreare di entrambi i partners è messa a rischio dai numerosi fattori ambientali ed occupazionali, associati a stili di vita sicuramente scorretti.

La presente relazione descrive l’attività svolta in laboratorio che si è focalizzata sull’analisi dell’efficienza delle diverse metodologie utilizzate per la preparazione del liquido seminale, al fine di individuare la tecnica più appropriata atta a garantire la migliore qualità e quantità nemaspermica iniettabile, per l’esecuzione di una AIH (artificial insemination homologous) prendendo in considerazione le caratteristiche del campione di partenza. Questa è una tecnica di Procreazione Medicalmente Assistita (PMA) la cui applicazione è indicata alle coppie in cui si riscontrano:

- 1) un liquido seminale moderatamente alterato,
- 2) un’ostilità del muco cervicale,
- 3) una infertilità psicologica. (9,16)

Le tecniche di PMA comprendono, quindi, tutte quelle procedure che tendono al raggiungimento di una gravidanza nei casi in cui essa non si realizzi naturalmente per motivi di infertilità della coppia.

In primo luogo si può affermare che, biologicamente, l’uomo è un animale poco fertile infatti una giovane coppia senza problemi di salute che ha

rapporti regolari senza precauzioni contraccettive non ha più del 25% di possibilità di gravidanza per ogni ciclo ovulatorio. Partendo da questo dato di riferimento vengono poi ad aggiungersi le patologie vere e proprie rilevate dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO) secondo cui la percentuale di coppie con problemi di fertilità, di varia origine, nei paesi industrializzati è circa del 10-20% e secondo le stime dell'ISTAT in Italia le coppie con problemi di fertilità sono circa il 20%.

Una coppia, secondo le linee guida emesse in allegato alla legge 40 è considerata infertile se non riesce ad ottenere una gravidanza dopo 24 mesi di rapporti regolari non protetti (1). È essenziale sottolineare che il parametro dei "2 anni" non deve essere necessariamente rispettato; infatti se l'età della donna è già di 34-35 anni è conveniente rivolgersi ad un centro specializzato di diagnosi e cura della sterilità anche dopo un anno di ricerca infruttuosa di gravidanza. Questo può, e deve essere fatto senza ulteriori attese, nei casi in cui entrambi o uno dei due membri della coppia siano stati affetti da patologie che abbiano interessato l'apparato riproduttivo.

La scelta della tecnica da eseguire, adeguata ovviamente alle esigenze della coppia, tende a rispettare il minimo grado di invasività per il corpo femminile e la possibilità di ripetibilità. Entrambe queste caratteristiche sono presenti nelle tecniche di PMA di primo livello. A queste tecniche di fecondazione assistita fa parte l'inseminazione omologa intrauterina (9).

Attraverso il censimento dei centri di PMA, da parte dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS) condotto nel 2003 si stima che le tecniche di primo livello siano le più frequentemente applicate nella maggior parte dei centri (figura 1), e che la percentuale di successo ottenuto nei trattamenti di AIH sia di circa il 27%, (tabella 1) (2). Proprio da quest'anno 2006 il censimento dei centri sarà obbligatorio perchè è stato istituito il **Registro di PMA** (3). Questo rappresenta uno strumento prezioso per garantire alle

coppie maggiore trasparenza e una migliore informazione in questo ambito così delicato, in cui la valutazione della qualità e dell'efficacia delle prestazioni è sempre un'operazione molto complessa. Il Registro permette di fare un quadro chiaro su chi attua le pratiche di riproduzione assistita in Italia, su quali tecniche vengono effettuate e con che risultati (4). Questo ovviamente è essenziale se consideriamo il notevole numero di pazienti che ricorrono a queste tecniche, in Italia, infatti, soltanto nel 2004 sono nati 1711 bimbi grazie alle tecniche di procreazione medicalmente assistita di primo livello (5).

Il fine della procreazione medicalmente assistita è quello di cercare di aiutare le coppie con problemi di infertilità nell'ottenimento di una gravidanza creando loro una condizione psicologica e fisiologica che si avvicini il più possibile a quella delle coppie normali. Infatti prendendo in considerazione la percentuale di successi ottenuti tramite l'applicazione della AIH pubblicata dall'ISS, si evidenzia chiaramente che questo valore si sovrappone alla percentuale di procreare che normalmente ha una coppia fertile.



Fig. 1: distribuzione territoriale dei centri di PMA di primo livello

Totale: 198

Tabella 1

REGIONE	* % dei parti ottenuti con AIH
PIEMONTE	12.0
VALLE D'AOSTA	41.7
LOMBARDIA	13.0
PROV. AUTON. TRENTO	non indicato
VENETO	14.0
FRIULI VENEZIA GIULIA	28.0
LIGURIA	11.5
EMILIA ROMAGNA	7,6
TOSCANA	12.8
UMBRIA	11.1
MARCHE	64.7
LAZIO	non indicato
ABRUZZO	38.4
CAMPANIA	17.4
PUGLIA	78.5
BASILICATA	28.6
SICILIA	30.6
SARDEGNA	16.7
% totale anno 2003	26,7

** le percentuali si riferiscono alle percentuali dei parti ottenuti tramite inseminazione intrauterina sul totale dei parti ottenuti con le tecniche di PMA che nell'anno 2003 sono stati di 7.284 – Fonte Ministero della Salute – CeDAP 2003*

INTRODUZIONE

APPARATO GENITALE FEMMINILE

L'apparato genitale femminile è costituito da un complesso di organi (ovaie, tube di Falloppio, utero, vagina), che cooperano insieme e permettono la formazione dei gameti femminili, la fecondazione, lo sviluppo dell'embrione e l'espulsione del feto durante il parto. La capacità gametogenetica (produzione delle cellule uovo) e quella endocrina (produzione di ormoni) è propria delle ovaie. La vagina, l'utero e le tube rappresentano le vie genitali che permettono allo spermatozoo di raggiungere l'ovocita e assolvere al compito per cui è stato finalizzato.



Fig. 2: apparato genitale femminile

APPARATO GENITALE MASCHILE

L'apparato genitale maschile è costituito dalle borse scrotali, dai testicoli con i relativi epididimi, dalle vie spermatiche, dalle formazioni annesse alle gonadi e alle vie spermatiche e dall'organo della copulazione. La funzione gametogenetica (produzione degli spermatozoi) ed endocrina (produzione di ormoni) è assolta dai testicoli, i quali sono raccolti nella borsa scrotale che ha il compito di mantenerli ad una temperatura più bassa di quella corporea. Le formazioni annesse alle gonadi sono rappresentate dalla prostata la quale secreta enzimi di fluidificazione, dalle vescichette seminali che producono un liquido con funzione diluitiva, dalle ghiandole bulbo-uretrali a funzione lubrificante l'uretra. Le vie spermatiche sono costituite dai condotti deferenti che dirigono gli spermatozoi dall'epididimo verso l'esterno e che prima di raggiungere l'uretra ricevono lo sbocco delle vescichette seminali e della prostata.

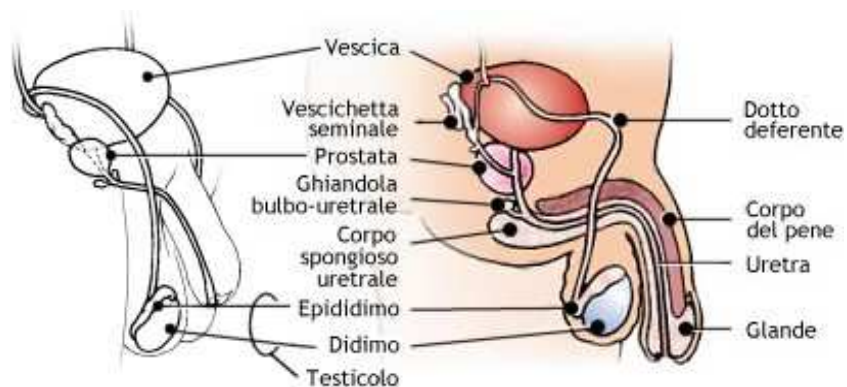


Fig. 3: apparato genitale maschile

L'OVOGENESI

Dalla nona settimana di vita embrionale le *cellule germinali primordiali* (PGC) migrano dalla regione del sacco vitellino, e aumentando il loro numero per mitosi, si localizzano a livello delle creste genitali. Dalla dodicesima alla tredicesima settimana gli ovogoni proliferanti si localizzano nella corticale profonda dell'ovaio e iniziano il loro differenziamento in *ovociti*. Gli ovociti primari si accrescono, replicano il DNA ed entrano in profase della prima divisione meiotica e si arrestano in diplotene, fase nella quale possono restare anche per circa 40 anni. Gli ovogoni e gli ovociti sono circondati da uno strato di cellule somatiche del blastema ovarico che si dividono attivamente e li circondano formando la struttura prefollicolare, il *follicolo primordiale*. Le cellule prefollicolari hanno il compito di dirigere la maturazione degli ovociti ed entrambi vanno in contro a diversi stadi di sviluppo: follicolo primario, follicolo secondario preantrale, follicolo antrale e follicolo di Graaf che accompagnano la completa maturazione del follicolo primordiale. Al quinto mese di vita intrauterina il numero delle cellule germinali raggiunge circa 6-7 milioni ma successivamente subisce un imponente impoverimento dovuto ad un meccanismo di degenerazione programmata fino a ridursi alla nascita, a 1.500.000 *follicoli primordiali*. Molti di questi subiscono fenomeni di atresia e si è calcolato che il numero medio complessivo di follicoli all'inizio della pubertà sia di 30.000-40.000 (17).

LA SPERMATOGENESI

La spermatogenesi è un processo di proliferazione e differenziazione di cellule staminali della linea germinale in spermatozoi. Nell'abbozzo della gonade le cellule epiteliali proliferano dando origine ai cordoni cellulari primitivi, che si differenzieranno in cordoni secondari; anche il mesenchima prolifera formando setti che attraversano i cordoni. I cordoni continuano a proliferare, si canalizzano formando i *tubuli seminiferi* che sono costituiti dalle *cellule del Sertoli* le quali circondano i gonociti. L'inizio della spermatogenesi è caratterizzato dalla differenziazione delle cellule germinali in *spermatogoni*, questi raramente si trovano nel testicolo alla nascita, piuttosto, i gonociti si iniziano a dividere al decimo anno di vita e si preparano al processo spermatogenetico che si realizzerà alla pubertà. Gli spermatogoni si trovano nella regione basale dell'epitelio seminifero e si riconoscono facilmente perché sono cellule grandi. Nel testicolo umano se ne riconoscono tre tipi: il tipo A scuro che è la cellula germinale che da origine alle cellule che costituiscono la riserva di spermatogoni e allo spermatogonio di tipo A chiaro che a sua volta da origine al tipo B, lo spermatogonio differenziato. Tra tutte le cellule della linea spermatogenetica gli spermatogoni risentono maggiormente dei fattori nocivi come radiazioni ionizzanti, malattie infettive, alcoolismo, alimentazione inadeguata, sostanze tossiche presenti nell'ambiente, ecc. Durante la fase proliferativa gli spermatogoni di tipo B, che derivano dalle ultime divisioni mitotiche, dove le cellule non si dividono completamente ma rimangono unite da ponti citoplasmatici, essi perdono la capacità di dividersi e si differenziano in *spermatociti di primo ordine*. Lo spermatocita di primo ordine è una cellula che si sta preparando alla divisione meiotica per cui sta replicando il proprio DNA ed è il tipo cellulare più grande che si riscontra nell'epitelio. Esso subisce la prima divisione meiotica dando origine agli *spermatociti di secondo ordine* che

completano la divisione diventando cellule aploidi: gli *spermatidi*, anche gli spermatidi risultano ancora uniti da ponti citoplasmatici. Gli spermatidi appaiono notevolmente più piccoli e sono localizzati quasi alla superficie dell'epitelio. Queste cellule andranno incontro al processo di spermioistogenesi che permette la formazione degli spermatozoi. Questo processo si compie nei tubuli seminiferi dei testicoli e più precisamente nell'epitelio seminifero che li circonda. L'epitelio seminifero è formato da diversi strati cellulari ognuno rappresentante di diverse fasi di sviluppo, infatti nella regione basale si riscontrano le cellule più giovani, invece quelle più differenziate si trovano negli strati più alti vicino al lume del tubulo. Il numero medio di stadi differenziativi per ciclo è sei e generalmente la completa maturazione da spermatogonio e spermatide si realizza in circa 70 giorni. Il processo consiste di quattro fasi: la fase del Golgi, la fase del cappuccio, la fase dell'acrosoma e la fase di maturazione.

La Fase del Golgi: prende questo nome per la comparsa nel Golgi di granuli polisaccaridici che vengono chiamati granuli preacrosomiali e sono contenuti in vescicole. Queste a mano a mano si fondono dando origine al *granulo acrosomiale* che si localizza davanti al nucleo in prossimità della membrana plasmatica.

La Fase del cappuccio: durante questa fase si forma una membrana intorno all'acrosoma, che continua ad accrescersi, racchiudendolo interamente, formando il cappuccio.

Fase dell'acrosoma: il nucleo si allunga e si appiattisce mentre la cromatina si condensa fortemente. Contemporaneamente compaiono nel citoplasma i microtubuli che si organizzano posteriormente al nucleo.

Fase della maturazione: si forma la zona di connessione tra il nucleo e il flagello e la guaina fibrosa lungo il flagello. Successivamente viene perso il citoplasma che viene fagocitato dalle cellule del Sertoli, vengono

eliminati anche i ponti citoplasmatici e solo una piccola porzione di citoplasma contenente gocce lipidiche rimane nello spermatozoo liberato nel tubulo. Questa verrà persa successivamente.

Completamento della maturazione dello spermatozoo

Avviene lungo le vie genitali maschili e si completa in quelle femminili.

Appena rilasciati nel lume dei tubuli seminiferi, gli spermatozoi vengono spinti nei tubuli retti che, con la loro funzione secretoria, arricchiscono il liquido, in cui sono immersi, di sostanze molecolari e di potassio che inducono i cambiamenti maturativi. I tubuli retti confluiscono nella rete testis e da qui gli spermatozoi vengono convogliati verso i condotti deferenti che li trasportano al canale dell'epididimo.

Durante il passaggio nell'epididimo gli spermatozoi si modificano e perdono la goccia di citoplasma raggiungendo la forma finale. I principali cambiamenti che avvengono durante il passaggio nell'epididimo sono: il completamento della formazione della guaina mitocondriale, la completa organizzazione delle fibre dense e il mascheramento delle proteine autologhe a funzione antigenica.

Grazie alla particolare costituzione chimica delle secrezioni delle cellule dell'epitelio epididimario, gli spermatozoi acquisiscono la capacità di muoversi raggiungendo la loro completa maturazione.

L'emissione degli spermatozoi

Dall'epididimo gli spermatozoi raggiungono il canale deferente che li trasporta dalla regione scrotale alla cavità pelvica attraverso il canale inguinale. Il canale deferente termina con una porzione più larga detta ampolla deferenziale che si trova alla base della vescica, qui si trova anche la vescichetta seminale che insieme al canale deferente continua nel dotto eiaculatore. Quest'ultimo attraversa il parenchima della prostata e sbocca nell'uretra prostatica; nell'uomo adulto la prostata secerne 0,5-2,0 ml di

fluido al giorno che è composto da: acido citrico, Ca^{++} , zinco, enzimi proteolitici che permettono la liquefazione del coagulo e la fosfatasi acida che è coinvolta nel metabolismo della fosfoglicerilcolina in colina. La secrezione prostatica conferisce al liquido seminale un colore lattescente inoltre stimola la motilità degli spermatozoi perché è ricca di albumina. Le ghiandole bulbo-uretrali che si trovano alla base del pene e che si aprono nell'uretra secernono una sostanza mucoide ricca di sialoproteine durante l'erezione, e probabilmente lo scopo è quello di lubrificare l'uretra e renderla leggermente basofila e quindi ideale per il passaggio degli spermatozoi.

L'uretra è il dotto in comune tra apparato urinario e riproduttivo, nel suo ultimo tratto l'uretra decorre nel pene e grazie alle contrazioni muscolari permette la fuoriuscita dello sperma.

Dopo che il seme viene emesso si forma un coagulo provocato dagli enzimi di origine vescicolare, successivamente questo coagulo viene liquefatto nel giro di mezz'ora da altri enzimi prodotti dalla prostata sottoforma di proenzimi.

L'eiaculato non è uniforme, piuttosto lo sperma viene emesso in tre frazioni:

- circa 1 ml deriva dalla prima frazione, molto povera di spermatozoi contenente liquidi derivanti da prostata e dalle ghiandole bulbo-uretrali,
- la seconda frazione deriva dall'epididimo ed è ricca di spermatozoi,
- la terza frazione raccoglie i liquidi provenienti dalle vescicole seminali e contiene pochi spermatozoi ma molto attivi (15,17).

LA FECONDAZIONE

L'eiaculazione nelle vie genitali femminili permette il raggiungimento del luogo della fecondazione dopo circa un'ora dall'emissione. La maggior parte degli spermatozoi rimane intrappolata nella cavità uterina degenerando e subendo il processo di fagocitosi e solo una piccola parte di questi riesce a raggiungere l'ovidutto. La frazione di spermatozoi tubarici è molto inferiore alla frazione di spermatozoi uterini; questo è dovuto sia al processo di selezione del muco cervicale sia al lungo percorso che essi devono affrontare per raggiungere l'ampolla tubarica. Durante il tempo di permanenza degli spermatozoi nelle vie genitali femminili, inizia per loro il processo di *capacitazione* cioè quella serie di eventi biomolecolari che rendono lo spermatozoo capace di fecondare.

In prossimità dell'ovocita avvengono i fenomeni di riconoscimento e legame dello spermatozoo alla **Zona Pellucida** con la quale realizza una particolare interazione che induce la *reazione acrosomiale*.

L'ingresso dello spermatozoo induce l'attivazione dell'ovocita, questo processo genera una serie di fenomeni che impediscono la polispermia: nella specie umana prevale quello che viene definito blocco lento o *reazione corticale* che consta nel rilascio del contenuto dei granuli corticali il quale, essendo composto da enzimi proteolitici, permette la modificazione irreversibile della ZP.

Contemporaneamente lo spermatozoo induce nell'ovocita il completamento della seconda divisione meiotica, i cromosomi nel citoplasma despiralizzano e vengono circondati da un involucro nucleare prodotto nel reticolo endoplasmatico rugoso formando il pronucleo femminile. Il nucleo dello spermatozoo si rigonfia formando il pronucleo maschile.

Alla fusione dei due pronuclei i cromosomi si replicano, condensano e si dispongono sulla piastra equatoriale preparandosi alla prima segmentazione. Si è formato così lo zigote che rappresenta il primo stadio dello sviluppo dell'embrione (10).

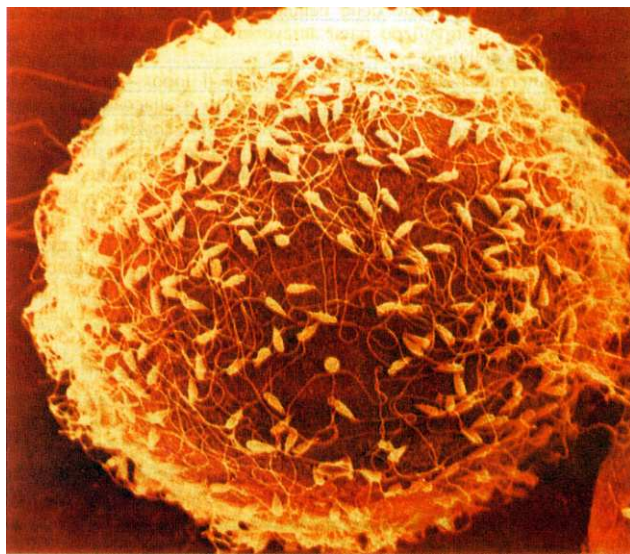


Fig. 4: fecondazione

PROPRIETA' DEL MUCO CERVICALE

Il muco cervicale è il risultato della secrezione delle cellule dell'epitelio della cervice uterina, arricchito da fluidi provenienti dalle tube, dall'endometrio e dal follicolo e la sua composizione varia a seconda della fase del ciclo. Esso ha determinate caratteristiche:

- consistenza,
- spinnebarkeit o filanza
- ferning.

La consistenza dipende dall'aggregazione molecolare e dalla presenza di proteine e ioni; la filanza descrive la fibrosità e la elasticità del muco cervicale; il ferning invece si riferisce alla caratteristica cristallizzazione a foglia di felce che si osserva se un muco, senza alterazioni, si essicca su un vetrino. Il muco cervicale ha una componente a bassa e una ad alta viscosità, la componente ad alta viscosità è costituita dalla rete macromolecolare di mucina. La composizione del muco cervicale influenza l'ingresso e la vitalità degli spermatozoi, li protegge dalle secrezioni vaginali e dalla fagocitosi, fornisce loro energia per la migrazione e dà luogo all'avvio delle reazioni di capacitazione. Un muco ostile agli spermatozoi si ha per cause di natura ormonale, infiammatoria, meccanica o immunitaria (13).

FISIOPATOLOGIA DEL LIQUIDO SEMINALE

Lo studio fisiologico del liquido seminale e le sue alterazioni vengono caratterizzati valutando i seguenti fattori:

Aspetto

Il liquido seminale ha una colorazione grigio opalescente. La trasparenza indica una scarsa concentrazione spermatozoaria; una colorazione rossastra indica emospermia cioè presenza di eritrociti causata da infezioni, infiammazioni, ostruzioni dei dotti, fragilità vascolare e fattori sistemici e iatrogeni; un colore fortemente giallastro indica piospermia cioè la presenza di cellule della linea infiammatoria nelle vie genitali.

Volume

Il volume è compreso da 2 a 6 ml. Al di sotto di 0,5 ml si è in presenza di una condizione di ipoposia che spesso indica una patologia dei dotti eiaculatori o deficit secretivo delle vescichette seminali. Al di sopra di 6 ml, condizione di iperposia, è indice di infezioni a carico delle ghiandole accessorie.

Viscosità

La viscosità dipende dalle caratteristiche reologiche del liquido. La presenza di granuli gelatinosi, che aumentano la viscosità del liquido, è indice di una non completa liquefazione e questo potrebbe essere causato da una infezione a carico delle ghiandole accessorie, ad esempio la prostata. Le agglutinazioni e pseudoagglutinazioni, che se presenti nel liquido seminale causano l'aumento della viscosità, sono originati dall'aggregazione cellulare tra spermatozoi che risultano essere uniti testa-testa, coda coda, testa coda e possono verificarsi tra spermatozoi mobili, immobili o misto. Questo tipo di aggregazione potrebbe indicare una infertilità di natura immunologica. Viceversa una viscosità molto bassa potrebbe indicare scarsa concentrazione nemaspermica.

pH

Il pH dipende dal rapporto tra le secrezioni basiche delle vescichette seminali e dalla secrezione acida della prostata ed è leggermente alcalino, (range 7,2-8). Patologie flogistiche causano un aumento del pH viceversa patologie ostruttive dei dotti eiaculatori abbassano il pH perché il liquido seminale è prevalentemente costituito dalla secrezione prostatica.

Concentrazione nemaspermica

La concentrazione nemaspermica nel liquido seminale va da 20 milioni/ml a 100-200 milioni/ml.

Se la concentrazione di spermatozoi è minore di 20 milioni/ml allora si ha una condizione di oligozoospermia, se inferiore a 1 milione /ml si ha una condizione di criptozoospermia ed infine la totale assenza di spermatozoi nell'eiaculato determina una condizione di azoospermia.

Motilità

Un liquido seminale fecondante deve contenere almeno il 50% di spermatozoi mobili progressivi rapidi cioè con velocità maggiore di 25 μ m/sec. Al di sotto di questo valore si presenta una condizione di astenozoospermia.

Morfologia

La morfologia di uno spermatozoo normale e maturo, osservata al microscopio ottico è costituita da una porzione apicale detta "testa" (lunghezza 4,0-5,0 μ m; larghezza 2,5-3,5 μ m); e dalla coda che nel suo tratto intermedio è lunga da 5 a 7 μ m e spessa 1 μ m; nel tratto principale è lunga 45 μ m e nel tratto terminale è lunga 5-7 μ m.

Le classi di anomalie morfologiche sono:

1. **anomalie della testa** che comprendono teste grandi, piccole, allungate, piriformi, rotonde, amorfe, vacuolate, teste con acrosoma alterato o teste duplici e qualsiasi combinazioni di queste categorie;
2. **anomalie del collo e del tratto intermedio** che comprendono una coda angolata, inserzione asimmetrica del tratto intermedio nella testa, tratto intermedio ispessito o irregolare o eccessivamente sottile, presenza di residui citoplasmatici;
3. **anomalie della coda:** code multiple, coda arrotolata, rotta o di spessore irregolare;

Se più del 70% degli spermatozoi in un campione manifesta una anomalia morfologica si delinea una situazione di teratozoospermia.

Vitalità

Il campione di liquido seminale è considerato fecondante se più del 50% di spermatozoi sono vivi e questo è valutato applicando diversi test.

Conservazione della motilità

È importante valutare il grado di motilità degli spermatozoi successivamente al loro permanere, per un lungo periodo di tempo, immersi nel liquido seminale, al fine di individuare la tossicità o meno delle sue componenti (13).



Fig. 5: spermatozoo normoconformato



Fig. 6: anomalia della coda

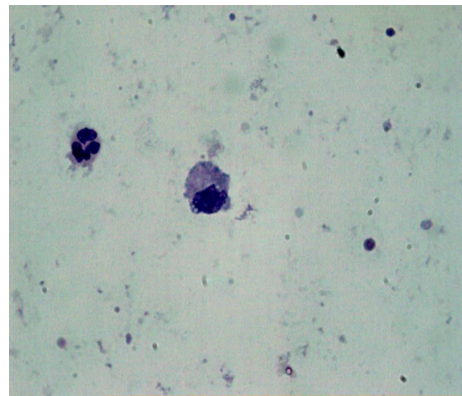
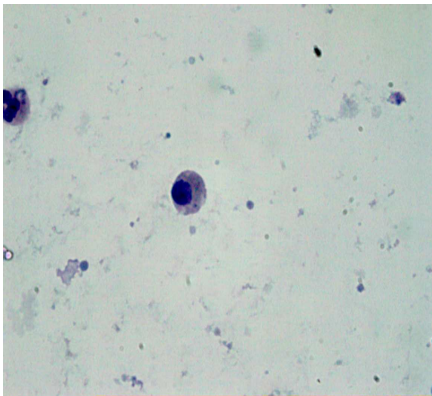


Fig. 7, 8: cellule rotonde della linea germinale

LA CRIOCONSERVAZIONE

Le tecnologie di crioconservazione riproduttiva rappresentano importanti strategie di conservazione della fertilità (8). Queste metodiche nascono da diverse esigenze in quanto danno la possibilità di preservare le caratteristiche del liquido seminale nei casi in cui una persona debba sottoporsi a terapie antineoplastiche o comunque terapie spermiotossiche, ad interventi di vasectomia ma anche nei casi in cui si presentino impedimenti dovuti a motivi psicologici derivanti dalla incapacità di effettuare la raccolta del liquido seminale nel modo e nel tempo richiesti. Se il campione da congelare risponde bene ai protocolli di congelamento può essere utilizzato per una delle tecniche di PMA, come ad esempio l'AIH. Essendo necessari due parametri per effettuare l'AIH, a seguito di congelamento ciò che si andrà ad analizzare è la concentrazione di spermatozoi mobili di tipo "a+b" rispetto al campione a fresco.

I passaggi di congelamento e scongelamento possono danneggiare gli spermatozoi. Infatti gli spermatozoi sono molto sensibili ai cambiamenti di temperatura, e si calcola che almeno il 50% di essi vada perso a causa della crioconservazione.

Gli spermatozoi che sopravvivono alla procedura di congelamento/scongelamento sono perfettamente normali: infatti da 50 anni ad oggi sono nati migliaia di bambini senza anomalie genetiche (12).

MATERIALI E METODI

ESAME DEL LIQUIDO SEMINALE

Lo studio e l'applicazione delle tecniche di fecondazione assistita di primo livello ruotano attorno ad un punto cardine dell'iter diagnostico di una coppia infertile: l'esame del liquido seminale.

Materiale utilizzato

- Vasetti di urinocoltura
- Guanti monouso
- Micropipette sterili
- Camera di Makler
- Provette da 5 ml
- Camera termica
- Pipette sterili da 5 ml
- Cartina indicatrice di pH
- Vetrini portaoggetti e coprioggetti
- Colorante *Diff-Quik*
- Soluzione ipotonica per lo *swelling test*

Iter analitico

Esame macroscopico iniziale

Il campione, per essere standardizzato, deve essere prelevato dopo un periodo di astinenza che va da 3 a 5 giorni. È anche molto importante che il campione sia completo in modo da ottenere tutte e tre le frazioni di liquido seminale eiaculato. Il campione deve essere raccolto in un contenitore sterile leggermente riscaldato, per non alterare la motilità degli spermatozoi è opportuno conservarlo in una camera termica ad una

temperatura di 35 °C. La prima osservazione deve essere eseguita nell'arco dei primi 15', al fine di osservare la coagulazione del L.S.

Si effettua una valutazione macroscopica del liquido seminale che comprende l'osservazione del:

- tempo e modalità di liquefazione,
- aspetto,
- volume,
- viscosità,
- pH.

Il processo di liquefazione si completa normalmente entro mezz'ora dall'emissione; se questo non avviene deve esserne registrato il tempo occorso. Il volume viene misurato con l'utilizzo di una pipetta di 5 ml. La viscosità viene valutata lasciando cadere, da una pipetta, per gravità una frazione di campione, se le gocce si separano, il campione non è viscoso, se invece il campione è viscoso, si osservano filamenti.

Il pH, deve essere valutato depositando una goccia di liquido seminale su una cartina indicatrice con range tra 5,5 e 9. Il colore di viraggio viene confrontato con la scala delle colorazioni standard.

Esame microscopico iniziale del liquido a fresco.

Sul vetrino portaoggetti, riscaldato nella camera termica, si deposita una goccia di campione di 10 µl e si copre con il vetrino coprioggetti, in questo modo lo spessore del preparato consente il movimento degli spermatozoi. Con l'obiettivo 10x si analizza la condizione generale del campione, cioè la presenza di agglutinazioni, la dispersione degli spermatozoi e la presenza di strie mucose. Successivamente si passa alla conta degli spermatozoi, la tecnica di conta cellulare utilizza la camera di Makler. Su vetrino portaoggetti di questa microcamera vengono depositati 10 µl di

campione e coperti con uno speciale vetrino coprioggetti dotato di griglia metallica. La griglia è divisa in 100 quadrati (10 righe x 10 colonne), e la lettura di 10 quadrati ci fornisce il valore della conta in milioni/ml.

Si osserva la motilità degli spermatozoi che viene classificata in:

- “a” motilità progressiva rapida
- “b” motilità progressiva lenta o irregolare,
- “c” motilità non progressiva
- “d” spermatozoi immobili

Vengono quindi calcolate le percentuali di spermatozoi per ogni classe.

Tramite la camera di Makler si calcola anche la concentrazione delle cellule rotonde, appartenenti alla linea germinale ed alla linea infiammatoria. In generale un eiaculato normale non deve contenere più di 5 milioni/ml di cellule rotonde.

Colorazione

Per la colorazione di uno striscio di campione, il vetrino deve essere pulito con etanolo e una goccia di campione viene strisciata sopra utilizzando il vetrino coprioggetti.

Colorazione *Diff-Quik*: il fissativo è il Fast Green in metanolo, le due soluzioni coloranti sono l'eosina G e la tiazina secca. Il vetrino viene ricoperto con la prima soluzione che si tiene per 5 secondi e poi si sciacqua, successivamente si fa la stessa cosa con la seconda colorazione e infine il vetrino viene fatto asciugare all'aria. Il vetrino viene poi osservato con l'obiettivo 100x a immersione a olio, si analizza la morfologia facendo attenzione alle diverse classi di anomalie.

Vitalità

Si osserva il rapporto tra spermatozoi vivi e morti, differenziando gli immobili vivi, dagli immobili morti mediante l'esecuzione dello *swelling test*. Si sospendono gli spermatozoi in una soluzione ipotonica che causa il loro rigonfiamento, nei casi in cui la membrana sia intatta, e vengono osservati al microscopio. La presenza di spermatozoi rigonfi è indice di spermatozoi vitali. La soluzione ipotonica è formata da acqua distillata contenente citrato di sodio bi-idrato ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e fruttosio. La soluzione e il campione vengono incubati a 37°C per trenta minuti e si osservano i rigonfiamenti, soprattutto flagellari, al microscopio.

Conservazione della motilità

Si osserva il campione a fresco al microscopio alla 1^a, 2^a e 4^a ora di produzione al fine di annotare il tipo di motilità ancora presente e valutarne l'idoneità (13).

INSEMINAZIONE OMOLOGA INTRAUTERINA

Materiale utilizzato

- Vasetti di urinocoltura
- Guanti monouso
- Micropipette sterili; Camera di Makler
- Provette da 5 ml
- Ham's F10 con albumina al 5%
- Provette Falcon da 15 ml sterili
- Centrifuga
- Pasteur in vetro sottile
- Cappucci in gomma sterilizzati
- Siringhe da 1 ml
- Catetere per inseminazione
- Isolate

L'inseminazione intrauterina è classificata come tecnica di primo livello per il minimo grado di invasività. Prevede la preparazione del liquido seminale e la sua introduzione nella cavità uterina tramite catetere.

I fattori secondo i quali è indicato l'utilizzo di tale tecnica comprendono:

- situazioni di modesto deficit seminale, quindi di lieve ipospermia, ma con buona risposta al trattamento di capacitazione. È essenziale sottolineare che se la conta totale di spermatozoi presenti nel liquido seminale dopo trattamento è minore di 5 milioni (concentrazione minima) le percentuali di successo sono significativamente basse, se è minore di 1 milione le percentuali di successo sono molto rare
- situazioni di dispermia o di disordini eiaculatori (eiaculazione retrograda)

- ambiente cervicale ostile agli spermatozoi
- casi di infertilità inspiegata

Le condizioni per eseguirla prevedono chiaramente la pervietà delle tube, la completa efficienza dell'utero e quindi la capacità d'impianto dell'embrione (9).

Tecniche di preparazione del Liquido Seminale

Lo swim up è la tecnica che permette di separare gli spermatozoi funzionali cioè quelli che mostrano buona motilità da quelli che presentano anomalie cinetiche al fine di ottenere una frazione di spermatozoi iniettabili, privi del plasma seminale, delle cellule di sfaldamento, delle cellule rotonde e detriti che spesso si dimostrano tossici. Altra tecnica che permette la selezione degli spermatozoi è la centrifugazione su gradiente di densità, questa tecnica permette di isolare il pool di spermatozoi ottimali, per l'inseminazione, in una frazione del gradiente (9,13)

Esistono due diverse procedure di swim up (11)

Swim up da strato

Un'aliquota di terreno di coltura (0,3-0,5ml) viene stratificata sopra 1 ml di liquido seminale contenuto in una provetta a fondo conico e sterile. Viene utilizzato il terreno di coltura Ham's F10 arricchito di albumina umana al 5% (7,14). La provetta è lasciata in incubazione per 45 minuti (gli spermatozoi mobili migrano verso il terreno di coltura). Si controlla la concentrazione di spermatozoi mobili sulla sommità del terreno stratificato e una aliquota di questo terreno, contenente spermatozoi così selezionati, viene caricata in catetere (9,13).

Swim up da pellet

Il campione viene diluito con il terreno di coltura 1: 2 o 1 : 3 e le due frazioni si miscelano con l'uso di una pipetta. La provetta così preparata si centrifuga a 21 g per dieci minuti. Si elimina poi il surnatante, si aggiunge una aliquota di terreno fino ad arrivare ad un volume finale di 0,6-0,8 ml e si lascia in incubazione per 45 minuti.

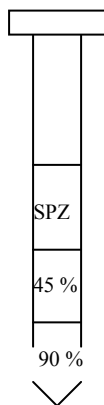
Si controlla la concentrazione di spermatozoi mobili sulla sommità del terreno stratificato e una aliquota di questo terreno, contenente spermatozoi così selezionati, viene caricata in catetere (9,13) .

Centrifugazione da gradiente

Si preparano delle soluzioni stock del terreno di coltura per la centrifugazione da gradiente di densità (Isolate) al 90 % e al 45 % con largo anticipo e si conservano in provette Falcon da 15 ml in frigo.

Il giorno prima della preparazione del campione (DAY -1) si prelevano adeguati volumi delle due soluzioni e si riscaldano a 36°C.

Il giorno del trattamento si stratificano 1 ml di ciascuna delle due soluzioni in fondo a provette Falcon da 15 ml (la porzione di densità maggiore sul fondo) e sopra si stratifica 1 ml di seme liquefatto, si centrifuga a 1500 rpm (21 g) per 10 minuti.



A seguito della centrifugazione si forma un pellet, contenente gli spermatozoi migliori.

In seguito si allontana il surnatante con una pasteur in vetro sterile e si stratificano 1-2 ml di terreno di lavaggio, si rompe il pellet, si agita leggermente e si centrifuga a 1500 rpm per 10 minuti. Quindi si elimina il surnatante con una pasteur sterile, si stratificano 300 µl di terreno di coltura (FERT) e si pone in incubatore per 45'. Si controlla infine la concentrazione degli spermatozoi mobili alla sommità del terreno stratificato e si trasferisce un'aliquota di questo terreno (0,5-0,6 ml), contenente gli spermatozoi selezionati, in una provetta da 5 ml che si pone in incubatore per il successivo utilizzo (13).

Inseminazione

Ottenuto il pool di spermatozoi iniettabili, si collega il catetere ad una siringa, si aspira dalla punta del catetere 1 ml di aria e successivamente un'aliquota del terreno. La paziente nel frattempo è pronta sul lettino ginecologico, si inserisce il catetere in utero, tramite la cervice ed infine si inocula la frazione di spermatozoi selezionati. Questo trattamento non comporta l'esecuzione di anestesia; è completamente indolore e si deve eseguire nel periodo ovulatorio della donna (9).

PROCEDURA DI CRIOCONSERVAZIONE

(metodo di Sherman):

Materiale utilizzato

- Paillettes per il liquido seminale (0.25-0.5 ml) o cryovials
- Pipetman
- Pipette monouso sterili
- Puntali sterili
- Siringa da 1 ml
- LN₂
- Terreno di congelamento (TYB)

Si diluisce in rapporto 1:1 con terreno crioprotettivo, Freezing Medium Test Yolk Buffer (TYB), il campione di liquido seminale, al termine della fluidificazione e dopo averne osservato a microscopio le caratteristiche generali, e si miscela delicatamente con l'utilizzo di una pipetta. Successivamente si lascia la sospensione così ottenuta a 37°C per 15 minuti in provette da congelamento: paillettes o cryovials. Si sigillano le paillettes e si etichettano con il nome e cognome del paziente.

A questo punto si inseriscono le paillettes nella rastrelliera dove vengono lasciate per 10 minuti a contatto con i vapori di azoto (-150°C), in questa fase si ha il passaggio del campione dallo stato liquido allo stato solido. Poi si immergono lentamente le paillettes nell'azoto liquido (-196°C). Il Test Yolk Buffer un tipo di terreno di congelamento che è formato da: tuorlo d'uovo al 20% sterilizzato, 10 µg/ml di antibiotico gentamicina solfato, TES, tris, citrato di sodio e fruttosio arricchito con glicerolo al 12%. Il **glicerolo**, crioprotettore permeante, agisce sulla permeabilità e stabilità del doppio strato lipidico, sull'associazione della proteine di superficie e soprattutto previene i danni dovuti alla formazione di cristalli

nel citoplasma; il **fruttosio**, come tutti gli zuccheri, favorisce la disidratazione cellulare durante il raffreddamento; il **tuorlo d'uovo** è presente in tutti i terreni di congelamento ma, pur non essendo un crioprotettore, con la sua componente fosfolipidica conferisce fluidità alla membrana plasmatica, ripara la membrana scambiando con essa acidi grassi, con la sua componente lipoproteica protegge la cellula dallo shock termico durante la prima fase di congelamento e in fine controlla l'aumento della concentrazione di calcio intracellulare dovuto allo shock termico (8).

PROCEDURA DI SCONGELAMENTO

Materiale utilizzato

- Pipetman
- Pipette monouso sterili
- Forbici sterilizzate
- Tubi falcon da 15 ml monouso sterili

Il campione deve essere scongelato a temperatura ambiente per 10 minuti e in seguito in termostato a 37°C per altri 10 minuti al fine di evitare bruschi sbalzi termici. Si tagliano le estremità delle paillettes e si fa fuoriuscire il liquido dentro i tubi Falcon preriscaldati a 37°C. Successivamente il liquido seminale viene separato dal terreno di congelamento tramite lavaggi con un qualsiasi terreno di coltura e ne vengono osservate le caratteristiche di vitalità e motilità (12).

RISULTATI

Le consolidate conoscenze delle tecniche di preparazione del liquido seminale in uso, ci consentono di mettere in atto la più idonea tra esse in funzione delle caratteristiche del campione da trattare, al fine di massimizzare la percentuale di spermatozoi mobili recuperati iniettabili. Secondo le caratteristiche che presenta, il campione può essere classificato nelle seguenti categorie:

- a) L.S. ottimale o subottimale
- b) L.S. che manifesta motilità alterata
- c) L.S. con una presenza elevata di cellule rotonde

Per ogni singola categoria, le procedure convenzionali standardizzate dal centro prevedono i seguenti tipi di trattamenti:

- Categoria “a” ➡ swim up da strato
- Categoria “b” ➡ swim up da pellet
- Categoria “c” ➡ gradiente di densità

Nel corso del trimestre da Febbraio ad Aprile dell'anno 2006, periodo preso in considerazione da questo lavoro, presso il centro ASTER di Diagnosi e Cura della Sterilità, sono stati trattati i casi di 28 coppie. I campioni di liquido seminale prelevati per le diagnosi hanno permesso la suddivisione nelle categorie sotto riportate:

- 7 coppie presentavano un campione di liquido seminale assimilabile alla categoria “a”
- 17 coppie alla categoria “b”
- 4 coppie alla categoria “c”

Nella tabella sottostante sono riassunti i risultati ottenuti dall'applicazione delle tecniche convenzionali sui campioni forniti dalle 28 coppie trattate.

N° DI COPPIE	CATEGORIA	TECNICA convenzionale adottata	* % spz mobili di tipo "a+b" recuperati
7	a	Swim up da strato	60%
17	b	Swim up da pellet	45%
4	c	Gradiente di densità	35%

**i risultati sono espressi come media percentuale di spermatozoi mobili di tipo "a+b" recuperati dal totale di spermatozoi mobili "a+b" del campione di partenza, inoltre la percentuale di spermatozoi mobili di tipo "a+b" recuperati è funzione del tempo di incubazione in terreno di coltura, in questo caso è stato pari a 45 minuti*

Parallelamente alle procedure convenzionali sono stati realizzati degli abbinamenti, categoria di campione-tecnica di preparazione, diversi, al fine di valutare la reale efficienza di quelle che sono state normalmente adottate per l'analisi delle 28 coppie in esame. Ciò è stato possibile in quanto è stata conservata una uguale frazione di liquido seminale da trattare, da ognuna delle 28 coppie, e su tale frazione sono state applicate le metodiche non convenzionali. Si è cioè operato nel seguente modo:

- a) Il L.S. ottimale o subottimale è stato trattato con gradiente di densità invece dello swim up da strato (procedura convenzionale)
- b) Il L.S. con motilità alterata è stato trattato con swim up da strato invece dello swim up da pellet (procedura convenzionale)
- c) Il L.S. con elevata presenza di cellule rotonde è stato trattato con swim up da pellet invece del gradiente di densità (procedura convenzionale).

I risultati di questo lavoro sono esposti nella tabella:

N° DI COPPIE	CATEGORIA	TECNICA non Convenzionale adottata	% spz mobili recuperati
7	a	Gradiente di densità	40%
17	b	Swim up da strato	20%
4	c	Swim up da pellet	25%

Il confronto dei dati è esposto nella seguente tabella

CATEGORIA	PROCEDURA convenzionale	% di spz mobili di tipo a+b”recuperati	PROCEDURA non convenzionale	% di spz mobili di tipo a+b” recuperati
a	Swim up da strato	60%	Gradiente di densità	40%
b	Swim up da pellet	45%	Swim up da strato	20%
c	Gradiente di densità	35%	Swim up da pellet	25%

Discussioni:

Dal confronto tra i risultati ottenuti applicando le procedure normalmente adottate e le tecniche utilizzate per realizzare questo tipo di prova ha rivelato che effettivamente esiste una necessità di scegliere accuratamente la tecnica da adottare in funzione del campione iniziale. Le tecniche di preparazione del liquido seminale, pur essendo finalizzate al medesimo scopo, cioè di selezionare gli spermatozoi migliori per effettuare l'AIH, devono essere utilizzate con criterio al fine di recuperare la percentuale media massima di spermatozoi mobili iniettabili.

Come è esposto dalle tabelle nella sezione risultati, le percentuali medie di spermatozoi recuperati utilizzando le procedure non convenzionali si abbassano notevolmente mettendo seriamente a rischio la possibilità che ha una coppia "border line" di realizzare l'inseminazione intrauterina perché, come precedentemente descritto, per effettuarla bisogna partire da una concentrazione minima di spermatozoi mobili di tipo "a+b", recuperati, pari a 5 milioni/ml. È proprio a causa di ciò che è essenziale che il tipo di trattamento messo in atto sia consono al tipo di campione presente. Le basse percentuali di recupero mostrate in tabella sono spiegate di seguito:

- nel caso "a" il campione presentava una condizione ottimale o subottimale e quindi normale in termini di concentrazione nemaspermica e di motilità di tipo "a+b". Solitamente in questi casi qualsiasi tipo di tecnica utilizzata per la selezione porta ad una percentuale media di recupero alta, però si è riscontrata una perdita notevole se trattato in maniera non opportuna. Utilizzando la procedura non convenzionale quale è il gradiente di densità, si è riscontrato che la serie di lavaggi richiesti per pulire il campione, determinano una perdita di una frazione di spermatozoi non trascurabile abbassando quindi la percentuale di recupero.

- nel caso “b” il campione presenta una motilità alterata per cui è necessario procedere cercando di recuperare la massima percentuale di spermatozoi che manifestano motilità di tipo “a+b”. Normalmente l’operazione da effettuare è concentrare la frazione cellulare presente in tutto il campione in un volume piccolo tramite il passaggio di centrifugazione e risospendere il pellet in terreno di coltura che risulta essere formato da una alta concentrazione spermatozoaria (proveniente dall’intero campione), cioè quanto previsto dallo swim up da pellet. Applicando invece la procedura non consona, quale è lo swim up da strato la percentuale di recupero di spermatozoi è significativamente più bassa, sia perché gli spermatozoi mostrano motilità alterata per cui fanno fatica a migrare verso le superficie del terreno di coltura, sia perché il quantitativo di campione trattato è di 1 ml a provetta per cui la superficie di scambio tra seme e terreno di coltura è abbastanza limitata, causando un ulteriore abbassamento del n° di spermatozoi con motilità di tipo “a+b”. Il processo di centrifuga a cui è sottoposto il campione applicando lo swim up da pellet danneggia in parte la motilità degli spermatozoi, però bisogna comunque scegliere, tra le procedure, quella che ci permette la minor perdita in termini di concentrazione di spermatozoi mobili “a+b”.
- nel caso “c” il campione presenta una elevata concentrazione di cellule rotonde ed, al fine di recuperare la maggior concentrazione di spermatozoi mobili, ma liberi da cellule infiammatorie, è necessario separarli secondo il loro peso specifico, principio sfruttato dal gradiente di densità. Grazie alla separazione, gli spermatozoi mobili migrano verso la frazione del gradiente che si trova in basso nella provetta per cui possono essere facilmente recuperati. Invece se si procede effettuando lo swim up da pellet, il

processo di centrifugazione concentra tutte le cellule presenti nel campione senza discriminazione e gli spermatozoi si trovano intrappolati nel pellet. In entrambi i casi è importante sottolineare che i processi di centrifugazione causano il rilascio, da parte delle cellule, delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) che vanno ad intaccare l'integrità di membrana degli spermatozoi, attaccando il DNA e consumando la quota di glutathione presente nel citoplasma, causando così alterazioni nel processo di cariogamia (6).

CONCLUSIONI

Il confronto tra l'applicazione delle tecniche consone e quelle non convenzionali ha dimostrato prima di tutto che le prime sono le più qualificate per avere conseguito, in percentuale, un numero maggiore di spermatozoi mobili iniettabili per effettuare l'inseminazione in vivo (A.I.H.). A tal fine è assolutamente necessario, per poter aumentare in modo significativo la probabilità di successo delle tecniche di PMA, che le tecniche siano applicate con razionalità. Infatti se non fosse così si potrebbe rischiare di spingere erroneamente una coppia a sottoporsi a tecniche di PMA di livelli superiori che comportano una maggiore invasività, sicuramente un maggior costo e una maggior complessità nelle procedure, quando, invece la tecnica più idonea per la loro condizione poteva risultare la A.I.H. E' sempre preferibile, quando esistono le indicazioni, ricorrere ad una A.I.H. rispetto alle tecniche superiori perché essa si avvicina maggiormente alla condizione fisiologica; infatti la fecondazione avviene nel luogo naturalmente predestinato, cioè nell'ampolla tubarica e lo spermatozoo che penetra l'ovocita subisce il processo di selezione naturale lungo le vie genitali femminili.

Bibliografia

Leggi e Decreti Ministeriali

- (1) Linee guida legge 40: allegato n° 7.
- (2) Analisi dell'evento nascita anno 2003 (CeDAP).
- (3) Istituto Superiore di Sanità: comunicato stampa n° 6/2006.
- (4) decreto legge 7 Ottobre 2005: istituzione del registro nazionale delle strutture autorizzate all'applicazione delle tecniche di PMA, degli embrioni e dei nati a seguito dell'applicazione delle tecniche medesime.
- (5) Istituto Superiore di Sanità: rapporto sulla riproduzione assistita in Italia nel 2004.

Testi e Articoli

- (6) Baker MA, Aitken RJ.
Reactive oxygen species in spermatozoa: methods for monitoring and significance for the origins of genetic disease and infertility.
Reprod Biol Endocrinol. 2005; 3: 67.
- (7) Davis BK, Byrne R, Bedigian K.
Studies on the mechanism of capacitation: albumin-mediated changes in plasma membrane lipids during in vitro incubation of rat sperm cells.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1980 Mar; 77(3): 1546-1550.
- (8) Fabbri R., Ciotti P.M., DiTommaso B., Magrini O., Nostrangelo L., Porcu E., Contro E., Venturi S.
Tecniche di crioconservazione riproduttiva.
Riv.It.Ost.Gin vol.3; 33-40
- (9) Prof. Giammanco, Valenti G., Magro D., Amodeo G.
Guida alla Valutazione e al Trattamento della Coppia in Cerca di Prole.
Edizione 2004.

(10) Scott F. Gilbert

Biologia dello Sviluppo.

2° edizione Zanichelli 4: 129-172.

(11) Henkel R.R., Schill W.B.

Sperm preparation for ART.

Reprod Biol Endocrinol. 2003; 1: 108.

(12) Lombardo F., Gandini L., Lenzi A., Tsamatropoulos P., Dondero F.

La crioconservazione del seme e del tessuto testicolare.

UOC di Andrologia, Fisiopatologia della Riproduzione e Diagnostica

Endocrinologica. Dipartimento di Fisiopatologia Medica. Maggio 2005.

(13) Menchini G.F., Violani S. (edizione italiana)

Manuale di laboratorio della WHO per l'esame del liquido seminale umano e dell'interazione tra spermatozoi e muco cervicale.

4° edizione 2001.

(14) Naz R.K., Rajesh P.B.

Role of tyrosine phosphorylation in sperm capacitation / acrosome reaction.

Reprod Biol Endocrinol. 2004; 2: 75.

(15) Rindi G., Manni E.

Fisiologia Umana.

(9° edizione UTET) , tomo 1; 30: 503-532.

(16) Rowell P., Braude P.

Assisted conception. I—General principles.

BMJ. 2003 Oct 4; 327(7418): 799-801.

(17) Rosati P.

Embriologia Generale dell'Uomo.

(3° edizione) 8: 89-122; 5: 47-72.

