

Poliabortività – fattori maschili

Alberto Ferlin, Alessandro DaL Lago, Rocco Rago

Introduzione

L'aborto spontaneo è la più frequente complicanza della gravidanza. Due o tre consecutivi aborti costituiscono invece una condizione più rara (1-5%), di abortività ripetuta che può riconoscere cause distinte. L'aborto ripetuto infatti riconosce diverse eziologie, spesso anche non identificabili, riconducibili a fattori embrionari, materni o paterni, quali anomalie cromosomiche, disordini trombofilici materni, disfunzioni immunitarie ed endocrinopatie. L'etiologia dell'aborto ripetuto è determinata solamente nel 30% dei casi: nella maggior parte delle condizioni, l'iter diagnostico è focalizzato sulla donna mentre per il maschio il percorso diagnostico è spesso limitato ad un semplice spermioγραμμα.

Negli ultimi anni si è affermata l'idea che l'aborto ripetuto sia il risultato di un background genetico sfavorevole sul quale intervengono fattori immunitari, ambientali legati anche allo spermatozoo. Per quanto riguarda i possibili fattori maschili responsabili, o in gioco come con-causa, di aborto ripetuto sicuramente l'integrità del DNA dello spermatozoo rappresenta un determinante maggiore. Non è sufficiente indagare il cariotipo maschile, poiché alcune anomalie cromosomiche, genetiche e in generale del DNA dello spermatozoo possono essere presenti anche in soggetti con corredo cromosomico normale e che quindi possono derivare da alterazioni intrinseche della spermatogenesi. In questo capitolo tratteremo pertanto di fattori maschili in senso di alterazioni genetiche classiche, aneuploidie spermatiche e frammentazione del DNA. Inoltre, recenti evidenze suggeriscono che anche l'infezione da HPV e l'adesione di HPV allo spermatozoo possano contribuire all'abortività.

Cause genetiche

Le conoscenze attuali relative all'eziologia dell'aborto ripetuto includono un piccolo numero di fattori eziologici noti come certamente causativi e altri fattori implicati solo come possibili agenti causali. Al primo gruppo appartengono le cause genetiche, rappresentate in maniera preponderante dalle anomalie cromosomiche parentali (anomalie cromosomiche che possono essere presenti indistintamente in ambo i membri della coppia) (1). I riarrangiamenti cromosomici bilanciati (sia citogeneticamente che molecolarmente bilanciati) non determinano in genere effetti fenotipici in termini malformativi o di compromissione dello sviluppo fisico e mentale del soggetto che ne è portatore, poiché il corredo cromosomico è presente in maniera completa, sebbene sia organizzato in modo diverso (fatto salvo per i casi in cui il punto di rottura cromosomica interrompa, inattivandolo, uno specifico gene responsabile di malattia genetica). I riarrangiamenti cromosomici bilanciati sono però rilevanti nei confronti del rischio riproduttivo del soggetto portatore, in quanto possono causare la formazione di gameti con corredo genetico sbilanciato, e quindi abortività ricorrente e/o prole con sindrome cromosomica. A seconda dello specifico riarrangiamento tale rischio può variare ampiamente.

Si stima che il 2- 4% degli aborti ripetuti sia associato alla presenza di un riarrangiamento cromosomico strutturale bilanciato parentale, e tale anomalia sembra essere meno frequente negli uomini rispetto alle donne. Le anomalie di più frequente riscontro sono rappresentate dalle traslocazioni reciproche bilanciate, che rappresentano la dislocazione di materiale cromosomico tra due cromosomi non omologhi, con una frequenza del 4-6%, più di 50 volte superiore rispetto alla popolazione generale. Seguono le traslocazioni robertsoniane, traslocazioni che si stabiliscono tra due cromosomi acrocentrici, omologhi o non omologhi, comportando la perdita delle braccia corte dei due cromosomi coinvolti per fusione centrica delle braccia lunghe (soprattutto la t(13q;14q) con frequenza 4 volte superiore rispetto alla popolazione generale). Di più raro riscontro sono le fusioni peri o paracentriche, le inversioni cromosomiche, le inserzioni, le anomalie dei cromosomi sessuali, i piccoli cromosomi sovranumerari e i microriarrangiamenti (2). I cromosomi 4, 7 e 10 sono i più comunemente coinvolti nei partner maschili di donne che hanno avuto esperienza di aborti ripetuti (3).

Anche le condizioni di mosaicismo somatico/gonadico (situazione in cui l'anomalia genetica non è omogeneamente presente nell'individuo ma coinvolge solo talune linee cellulari) per riarrangiamenti cromosomici strutturali degli autosomi, per quanto rare, possono determinare interruzioni spontanee ripetute di gravidanza nei soggetti portatori. L'identificazione del mosaicismo gonadico è molto problematica, essendo asintomatico e criptico per il portatore. Ad

oggi non sono stati pubblicati dati circa il profilo citogenetico dei riarrangiamenti cromosomici strutturali in mosaico e poco è noto in merito al timing, al meccanismo di formazione e di mantenimento degli stessi, né è stata stabilita la prevalenza dei pazienti che ne sono portatori. In letteratura sono stati identificati finora 103 casi di mosaicismo per riarrangiamenti non centromerici in cui sia stato specificato il sesso del portatore. Si osserva una leggera predominanza maschile tra i portatori di mosaicismo per riarrangiamenti bilanciati, mentre emerge una forte predominanza femminile tra i portatori di mosaicismo per riarrangiamenti sbilanciati, suggerendo una selezione specifica per l'uomo contro le cellule anomale piuttosto che la compromissione della gametogenesi maschile, e quindi una prognosi migliore per feto di sesso maschile. I portatori di mosaicismo per riarrangiamenti sbilanciati possono mostrare deficit riproduttivo, infertilità e storia di aborti ricorrenti con la partner.

Nelle coppie che sperimentano aborti ripetuti c'è una notevole predominanza femminile tra i portatori di traslocazioni reciproche, a differenza di una lieve predominanza maschile tra le coppie infertili. Sia nei maschi che nelle femmine la quota di traslocazioni reciproche negli individui infertili è più bassa rispetto alla quota di traslocazioni reciproche presenti nei pazienti con aborti ripetuti. Questi dati sono coerenti con la più bassa frequenza complessiva di portatori di anomalie cromosomiche omogenee tra i pazienti infertili rispetto ai pazienti con storia di aborti (5).

Pertanto, le anomalie cromosomiche strutturali, oltre ad essere un'importante causa di infertilità maschile poiché le rotture dei riarrangiamenti cromosomici possono localizzarsi in corrispondenza di geni per la spermatogenesi o possono determinare un "effetto posizione" su geni funzionalmente importanti per la spermatogenesi (6-8) aumentano il rischio di esiti avversi della gravidanza, rappresentando la più comune causa genetica di aborti spontanei ripetuti e aumentando il rischio di nati morti e di trasmissione di anomalie cromosomiche alla prole, a causa della produzione di un numero più alto di spermatozoi con corredo genetico sbilanciato (9).

Una valutazione completa della coppia che sperimenta l'aborto ripetuto dovrebbe pertanto includere lo studio del cariotipo parentale, ancor più se l'anamnesi genealogica estesa alla famiglia riveli la presenza di altre coppie con poliabortività o altri problemi riproduttivi (sterilità, nascita di bambini con difetti congeniti), in quanto avvalorare il sospetto di una traslocazione cromosomica che segrega in vari membri della famiglia. A fronte di accertamenti cromosomici apparentemente negativi, è eventualmente indicata anche l'analisi FISH di tutti i telomeri, tesa ad escludere una traslocazione subtelomerica criptica in un genitore, non rilevabile dalla capacità di risoluzione dell'esame cromosomico standard né dal cariotipo molecolare.

Il counselling genetico trova indicazione in tutti i casi di aborto ripetuto associato ad anomalie cromosomiche nei membri della coppia, e, sulla base della specifica diagnosi formulata, il percorso della coppia potrà prevedere la diagnosi genetica preimpianto o potranno essere fornite le informazioni circa il possibile ricorso a donatori di gameti nei casi in cui l'anomalia genetica parentale individuata provochi sempre aneuploidia dell'embrione, come nel caso delle traslocazioni robertsoniane tra cromosomi omologhi (1).

Le anomalie cromosomiche non sono le uniche responsabili degli aborti ripetuti. Nei casi di aborto ripetuto le anomalie cromosomiche nel prodotto del concepimento sono meno frequenti rispetto ai casi di aborto sporadico, con un'analogia distribuzione dei differenti tipi di anomalie (10). Mutazioni su singolo gene, come quelle associate alla fibrosi cistica o all'anemia falciforme, si associano solo raramente ad aborti ripetuti (1). È raro che sul DNA del materiale abortivo vengano eseguiti approfondimenti molecolari diversi rispetto al cariotipo standard. Esami genetici mirati, come la ricerca di CNV (copy number variation) e la ricerca di mutazioni puntiformi su singolo gene, vengono svolti solo in alcuni centri e su specifico sospetto clinico postulato in base alle notizie anamnestiche familiari e relative alla gravidanza e ad eventuali segni clinici embrio-fetali, inclusi quelli raccolti mediante lo studio dismorfologico del prodotto del concepimento svolto al momento dell'espulsione. Non sono pertanto disponibili dati relativi all'impatto che le malattie monogeniche e i disturbi genomici da microdelezione/microduplicazione cromosomica possano avere negli aborti ripetuti, né se esista una predominanza degli stessi nei gameti maschili o femminili. Tuttavia, per completezza e a livello più strettamente didattico, è possibile annoverare tra i fattori genetici maschili (ma non esclusivamente maschili) causativi di aborti ripetuti l'eventuale presenza di condizioni di mosaicismi germinale (ovvero mutazione genetica confinata unicamente al DNA degli spermatozoi) per specifiche malattie autosomiche dominanti e X-linked a fenotipo tanto grave da compromettere lo sviluppo embrio-fetale, condizionando l'interruzione spontanea e ripetuta della gravidanza. Nel caso invece di patologie genetiche a trasmissione autosomica recessiva, all'eventuale fattore maschile dato dallo stato di portatore sano eterozigote di mutazione recessiva (sia in forma omogenea che in forma di mosaico coinvolgente le cellule germinali) dovrà combinarsi un evento mutazionale sulla copia allelica materna, o come evento "de novo" generatosi al momento della generazione dell'embrione o come condizione ereditata dal genoma materno (partner femminile portatrice sana).

Aneuploidie spermatiche

Spermatozoi aneuploidi possono essere riscontrati sia in soggetti con alterazione cromosomica costitutiva, sia in soggetti con cariotipo normale. In caso di aborto ripetuto è pertanto pertinente studiare la costituzione cromosomica dello spermatozoo, espressione del contributo paterno allo sviluppo del futuro embrione (11-13).

I primi studi che analizzavano indirettamente la costituzione cromosomica dello spermatozoo risalgono agli anni '70 del secolo scorso ed utilizzavano la tecnica dell'iniezione spermatica negli ovociti di hamster. Ad oggi la metodica maggiormente utilizzata è l'applicazione della FISH (fluorescence in-situ hybridization) sui nuclei spermatici (12). In contrasto con il test di hamster in cui una serie di esperimenti sono spesso necessari per ottenere un numero di metafasi di studio relativamente basso (circa 100 se la penetrazione degli spermatozoi negli ovociti di criceto è buono), l'uso della FISH mediante sonde specifiche per i singoli cromosomi consente lo studio di migliaia di spermatozoi (in interfase) in un tempo relativamente breve anche nei pazienti con criptozoospermia/grave oligozoospermia.

Gli studi di letteratura che hanno analizzato il ruolo delle alterazioni cromosomiche spermatiche negli aborti ripetuti sono scarsi ed estremamente variabili fra loro in relazione al disegno ed al tipo di cromosomi studiati. Rubio *et al.* (1999) in un lavoro prospettico su 12 coppie con due o più aborti spontanei nel primo trimestre, studiando le aneuploidie spermatiche per i cromosomi 13, 18, 21, X e Y, hanno documentato un incremento significativo delle alterazioni per i cromosomi sessuali in questi maschi rispetto ad un gruppo di controllo interno (0.84% vs 0.37%), dato confermato dagli stessi autori in un successivo studio su 40 coppie con le stesse caratteristiche (14, 15). Carrell *et al.*, studiando gli stessi cromosomi spermatici in 24 partner di donne con abortività ripetuta idiopatica, hanno anch'essi riscontrato un significativo incremento delle aneuploidie spermatiche ($2.77\% \pm 0.22\%$) rispetto alla popolazione generale con le stesse caratteristiche ($1.48 \pm 0.12\%$) e ad un gruppo di controllo fertile ($1.19 \pm 0.11\%$) (16). In un altro studio, privo però di gruppi di controllo, su un totale di 14 coppie con normale mappa cromosomica ed assenza di cause anatomiche, immunologiche ed endocrine di aborto ripetuto, è stata riscontrata una percentuale aumentata di aneuploidie spermatiche (16.5%) rispetto al dato pre-concezionale (4.6%) (17). Ancora, in un elegante studio di Bernardini *et al.* (18) su 20 maschi di coppie con aborto ripetuto nel primo trimestre, sono stati valutati separatamente i cromosomi 1-17, 8-18 ed i cromosomi sessuali; inoltre in un sottogruppo è stata eseguita FISH aggiuntiva per i cromosomi 4, 7, 12, 13,

15,1 8, 21 e 22 sulla base dei dati disponibili inerenti il cariotipo del prodotto del concepimento abortivo. Ebbene un tasso marcatamente aumentato di disomie spermatiche (14.5-15.5%) è stato riscontrato in due casi; per altri tre pazienti il tasso cumulativo di disomie per i cromosomi 1, 17, 8, 18, X e Y risultava aumentato ma in maniera meno marcata (7.8-9.5%); infine per i rimanenti 15 casi la frequenza delle aneuploidie spermatiche risultava moderatamente aumentata o normale. Gli autori evidenziavano che maschi di coppie con abortività ripetuta ed alterazioni numeriche e/o qualitative seminali presentavano un tasso di aneuploidie ed in particolare diploidie maggiore dei maschi con normali parametri seminali (con o senza aborto ripetuto). Questa evidenza è stata confermata da un più recente studio retrospettivo su una vasta popolazione di maschi di coppie con aborto ripetuto (140 uomini) su gravidanza spontanea e/o dopo cicli di procreazione medicalmente assistita (PMA). Il 40% di tali soggetti con normale concentrazione/motilità spermatica presentava alterazione dei cromosomi spermatici (13, 18, 21, X e Y) rispetto a soggetti di controllo; inoltre all'interno del gruppo di coppie con aborto ripetuto, maschi con oligoastenoteratozoospermia manifestavano una più alta percentuale di aneuploidie spermatiche rispetto ai soggetti normozoospermici (19). Infine, uno studio caso-controllo evidenzia come in 11 partner di coppie con abortività ricorrente più del 60% dei soggetti presenta errori meiotici coinvolgenti il cromosoma 16 suggerendo che le disomie paterne di tale cromosoma possano avere un peso paritario alle disomie materne sul corredo cromosomico fetale (20).

I dati di letteratura, sebbene scarsi, sembrano concordi pertanto nell'evidenziare che maschi di coppie con abortività ricorrente presentino un aumento delle alterazioni dei cromosomi spermatici studiate mediante FISH che possono tradursi in un aumentato rischio di aneuploidie nel prodotto del concepimento. È pertanto ipotizzabile che tali coppie possano beneficiare della diagnostica genetica pre-impianto (PGD) anche se i dati finora disponibili sembrano documentare che la FISH prima della PGD non migliori l'outcome in coppie con prognosi riproduttiva sfavorevole in particolare con abortività ripetuta (21).

Come sottolineato da una recente review sull'argomento (22), ancor oggi le indicazioni per eseguire l'analisi delle aneuploidie spermatiche mediante FISH nella pratica clinica ed il beneficio che tale indagine può avere in coppie con outcome riproduttivo sfavorevole (in particolare con aborti ricorrenti) rimangono dibattute e controverse.

Frammentazione del DNA spermatico

Negli ultimi anni un sempre maggior numero di studi ha riportato che la valutazione della frammentazione del DNA spermatico può rappresentare un parametro diagnostico per l'infertilità maschile in associazione all'esame del liquido seminale. Sebbene uno spermatozoo con DNA frammentato possa comunque fertilizzare l'ovocita (23), eventuali frammentazioni nel DNA paterno che non vengono riparate dalla cellula uovo (soprattutto quelle a doppia elica di DNA) avranno conseguenze sullo sviluppo embrionale e fetale e quindi sul successo della gravidanza. Non è infrequente che coppie senza un evidente fattore di infertilità femminile o maschile non riescano a concepire: è probabile che in queste coppie sia presente un fattore genetico maschile di infertilità, che comprende danni al DNA, alterazioni meiotiche o aneuploidie spermatiche.

Come accennato in precedenza, in seguito a fertilizzazione da spermatozoo con DNA frammentato, l'ovocita possiede i necessari meccanismi di riparazione del DNA, i quali però sono altamente influenzati dalla qualità genomica e citoplasmatica della cellula uovo, a loro volta fortemente età-dipendente. Anche la qualità del DNA spermatico dipende dall'età paterna (24), andando ulteriormente ad aggravare le probabilità di gravidanza in coppie di età avanzata (25).

Sulla base di queste evidenze, diventa quindi fondamentale comprendere la patogenesi della frammentazione del DNA spermatico. Si possono classificare cinque meccanismi di danno al DNA nella cellula spermatica: 1) alterata apoptosi durante la spermatogenesi; 2) rotture del filamento di DNA durante il rimodellamento cromatinico nella spermiogenesi; 3) frammentazione post-testicolare del DNA indotta da radicali liberi dell'ossigeno (ROS) durante la fase di trasporto degli spermatozoi lungo i tubuli seminiferi e l'epididimo; 4) frammentazione indotta da caspasi e endonucleasi endogene; 5) danno al DNA indotto da fattori esogeni quali: radioterapia, chemioterapia, inquinanti ambientali. Tra questi cinque meccanismi, quello che gioca un ruolo preponderante è la frammentazione post-testicolare durante il viaggio dello spermatozoo lungo l'epididimo: le cellule spermatiche nell'eiaculato o nella cauda epididimale mostrano infatti livelli di frammentazione del DNA maggiori rispetto a spermatozoi testicolari (26). Studi recenti hanno dimostrato come spermatozoi immaturi, attraverso l'elevata produzione di ROS, possano indurre danni al DNA in spermatozoi maturi in seguito alla spermiiazione, durante la quale si verifica una co-migrazione di cellule spermatiche mature e immature dai tubuli seminiferi alla cauda dell'epididimo (27). Inoltre, anche le cellule epiteliali dell'epididimo possono avere un ruolo nella frammentazione del DNA spermatico indotta da ROS in maniera diretta, oppure indirettamente

attraverso l'attivazione di caspasi e endonucleasi, in seguito a fattori esogeni come elevate temperature o fattori ambientali. Se il danno è causato in maniera diretta da ROS, l'uso di antiossidanti è in grado di limitare il danno al DNA (26). In particolare, il danno diretto da ROS induce principalmente rotture a singolo filamento della doppia elica di DNA, mentre danni di tipo indiretto (attivazione caspasi e endonucleasi, fattori esogeni) generano principalmente rotture a doppio filamento. Mentre il primo tipo di danno può essere riparato dall'ovocita o dall'embrione, il secondo è nella maggior parte dei casi impossibile da riparare ed è quindi incompatibile con un corretto sviluppo embrionale e fetale.

Diventa quindi di fondamentale importanza saper individuare e riconoscere le frammentazioni del DNA spermatico. A questo scopo, diversi tests sono stati introdotti nel corso degli ultimi anni e includono: TUNEL, comet test, SCSA, SCD e γ -H2AX. Diversi studi hanno mostrato come la frammentazione del DNA spermatico possa influenzare significativamente il successo di gravidanza, tuttavia la maggior parte dei tests utilizzati non è in grado di distinguere danni a singolo filamento da quelli a doppio filamento, né esistono valori di riferimento universalmente riconosciuti per questi test. Molto recentemente è stato dimostrato che la fosforilazione dell'istone H2AX è un valido indicatore del danno a doppio filamento del DNA spermatico e questo test si è dimostrato infatti più sensibile rispetto al test TUNEL nel predire il successo di gravidanza dopo ICSI in coppie infertili (28).

Indipendentemente dalla metodica utilizzata, numerosi studi hanno evidenziato un'associazione tra frammentazione del DNA ed outcome riproduttivo, sulla base dei quali una recente meta-analisi ha infatti confermato come un'elevata percentuale di frammentazione del DNA spermatico si associ a elevata frequenza di aborto e ridotta probabilità di gravidanza (29).

Già Carrel et al (56), in uno studio condotto su partners maschi di donne con abortività spontanea, avevano osservato che la percentuale di frammentazione del DNA (DFI) era statisticamente aumentata rispetto al gruppo di controllo, in assenza di evidenti differenze significative dei parametri seminali. Al contrario Brahem (57) aveva notato un'associazione tra conta nemespermica e indice di frammentazione.

Carlini et al (58), in uno studio condotto su 112 maschi di coppie che riportavano nella storia riproduttiva due o più aborti ricorrenti dopo concepimento naturale, hanno evidenziato che il DFI era statisticamente più alto rispetto al gruppo di controllo ma sovrapponibile al gruppo di uomini con infertilità idiopatica. Allo stesso tempo il DFI correlava positivamente con il fattore età, in accordo con quanto già descritto da Cohen-Bacrie et al (59). Gli Aa non hanno osservato nessuna differenza per quanto riguarda i parametri seminali.

L'effetto del DFI differisce a seconda della tecnica di PMA utilizzata: l'associazione tra frammentazione del DNA e ridotto tasso di gravidanza risulta significativa solo dopo IVF e non ICSI (30). Questa discordanza può essere giustificata dalla selezione spermatica durante ICSI, che permette di rimuovere gli spermatozoi con morfologia anormale, che è il principale parametro seminale correlato all'aumentata frammentazione del DNA (31). Tuttavia attraverso ICSI si va ad annullare l'effetto delle barriere di selezione naturale durante il processo di fertilizzazione, e infatti nella stessa meta-analisi si evidenzia come il tasso di aborto in presenza di elevata frammentazione del DNA sia significativamente aumentato solo dopo ICSI ma non IVF (30). Tuttavia, l'elevato tasso di aborto spontaneo riportato in diversi lavori dopo ICSI/IVF (29) in uomini con elevata frequenza di frammentazione del DNA spermatico suggerisce che gli effetti deleteri del danno al DNA persistano ugualmente a prescindere dalla tecnica utilizzata, lasciando aperto quindi il dibattito sul miglior approccio clinico per la PMA in presenza di elevata frammentazione del DNA spermatico.

Dai dati di letteratura si deduce che un aumento del DFI si associa ad una diminuita capacità riproduttiva sia in termini di fertilizzazione che di outcome della gravidanza. Sebbene l'indice di frammentazione del DNA si presenta aumentato nei maschi di coppie affette da abortività ricorrente e pertanto proporsi come marker di fattore maschile, non può però essere considerato come predittivo per il rischio di abortività ricorrente.

Se la frammentazione del DNA spermatico risulta come uno dei fattori limitanti in una coppia infertile, allora una strategia volta a ridurre i livelli di frammentazione del DNA dovrebbe portare a un aumento di probabilità di successo della gravidanza in coppie senza causa apparente di infertilità, suggerendo quindi la necessità di diagnosi del danno al DNA con le metodologie più opportune. Soprattutto l'identificazione e selezione di una popolazione, o di un singolo spermatozoo con DNA integro diventa un punto cruciale nel contesto della PMA.

Ruolo dell'HPV

Il Papillomavirus umano o HPV (acronimo di Human Papilloma Virus) è un adenovirus, che appartiene ad una famiglia di più di 150 genotipi (32). Gli HPV sono virus nudi (senza pericapside), possiedono un capsidico icosaedrico con un diametro attorno a 50 nm, formato da 72 capsomeri che possono essere pentameri o esameri. Ciascun capsomero dà origine a una protuberanza che ha una forma simile a una stella a cinque punte con un canale al centro. Il capsidico contiene un genoma costituito da DNA circolare a doppio filamento lungo 8 Kb che codifica per otto geni precoci (early, da E1 a E8) e due geni tardivi (late, L1 e L2) (33).

HPV è un virus ubiquitario che colpisce sia uomini che donne, sessualmente trasmissibile (34). Dei genotipi completamente sequenziati, 12 (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59) sono stati definiti come ad alto rischio a causa della loro forte associazione con diverse neoplasie (35); mentre la maggior parte sono molto raramente associati a neoplasie e sono quindi classificati come a basso rischio, potendo per lo più causare infezioni subcliniche o papillomi benigni, e che possono persistere per mesi o anni, fino a quando non sono debellati dal sistema immunitario dell'ospite (34).

Le proteine precoci del virus hanno lo scopo di favorire la crescita e la divisione della cellula; l'HPV può infatti replicare solo nelle cellule in replicazione, in quanto non codifica per una DNA polimerasi propria, ma ha bisogno della polimerasi della cellula ospite, che viene sintetizzata nelle cellule in attiva divisione. Le cellule bersaglio del virus sono la cute e le mucose, due tessuti che si rigenerano in continuazione. Il virus induce la crescita degli strati basale e spinoso dell'epidermide (acantosi) o dello strato superficiale della mucosa (36).

Considerando l'infezione da HPV nel sesso maschile sono disponibili pochi dati, anche se negli ultimi anni l'interesse scientifico è cresciuto e ha dato luogo a diversi recenti lavori. Generalmente la sintomatologia HPV-correlata nel maschio può manifestarsi con lesioni delle mucose rilevate all'esame clinico oppure con patologie più complesse causate da genotipi ad elevato indice oncogeno. Nella maggior parte dei casi, l'infezione da HPV è asintomatica, mentre le manifestazioni sintomatiche più frequenti sono i condilomi acuminati, i papillomi laringei e le forme neoplastiche della regione anogenitale e localizzate all'ano ed al pene. (37).

Recentemente ha suscitato grande interesse il rilevamento di HPV DNA nell'uretra, nei dotti deferenti, nell'epididimo e nel testicolo: dati recenti di letteratura hanno documentato la presenza del virus nel liquido seminale richiamando perciò maggiore attenzione al problema. Ancora infezione da HPV è stata dimostrata non solo in maschi con fattori di rischio per il virus ma anche in soggetti sessualmente attivi asintomatici ed in soggetti con storia di infertilità. In presenza di infezione da HPV è stata anche riscontrata una alterazione dei parametri seminiologici, in particolare modo la motilità. La presenza di glicosaminoglicani o altri fattori solubili sulla superficie dello spermatozoo si ritiene possano mediare l'interazione e il legame tra HPV e spermatozoo (38), ipotesi confermata dalla presenza della proteina del capsido L1 e del glicosaminoglicano syndecan-1 nella regione equatoriale del testa dello spermatozoo (39). Un recente lavoro di Laprise ha stimato la prevalenza di HPV nel liquido seminale in circa il 10% (95% CI: 7-14%) degli uomini nella popolazione generale e addirittura nel 16% (95% CI: 10-23%) degli uomini affetti da inspiegabile infertilità (40). Infatti, evidenze recenti dimostrano una possibile correlazione tra infezione da HPV nel liquido seminale e casi di astenozoospermia idiopatica (39, 41, 42). Il gruppo di Lee fu uno dei primi a dimostrare che spermatozoi incubati per 24 ore con frammenti di DNA di HPV tipo 6,11,16,18 o 31, mostravano una diminuzione della motilità progressiva e una ridotta capacità di spostamento laterale della testa (43). Questi risultati sono stati successivamente confermati in differenti studi in vivo (39, 44) nei quali gli autori, utilizzando il Mar-Test, segnalavano una percentuale significativamente più alta di ASA nei soggetti HPV positivi rispetto ai soggetti non infetti, sottolineando come in quei soggetti con spermatozoi in cui HPV-DNA era adeso alla superficie e con Mar-Test positivo, la motilità degli spermatozoi era ulteriormente compromessa e che la prevalenza di HPV era in accordo con la presenza di ASA (45).

La più alta prevalenza di ASA nel liquido seminale di uomini HPV positivi portano a ipotizzare che la motilità degli spermatozoi possa essere compromessa attraverso un meccanismo immunitario che non è ancora ben compreso. In particolare, non è del tutto chiaro se ASA reagiscono direttamente con la superficie dello spermatozoo o, in caso contrario, se si legano ad HPV ancorato alla cellula spermatica (38). Ad oggi, sulla base delle prove in vitro, il meccanismo molecolare putativo che possa giustificare le alterazioni dei parametri seminali relative all' HPV è l'aumento del tasso di frammentazione del DNA degli spermatozoi e di apoptosi (46, 47).

Alcuni lavori hanno dimostrato come lo spermatozoo possa trasportare il DNA di HPV esogeno e potenzialmente agire come un vettore che trasmette HPV al partner sessuale, nonché ad un feto attraverso l'ovocita fecondato (48). In modelli murini, spermatozoi infettati da HPV riuscivano a fecondare ovociti con successo, cui seguiva successiva espressione genica nella massa cellulare interna e nel trofoectoderma della blastocisti primordiale (49).

Utilizzando il test di penetrazione degli spermatozoi nella cellula uovo di criceto, Foresta e collaboratori hanno dimostrato in modo simile che lo spermatozoo umano può trasferire i geni E6 / E7 ed L1 all'ovocita, con conseguente espressione genica nella blastocisti in via di sviluppo (50). L'espressione dei geni E6 / E7 è stata correlata all'aumento della frammentazione del DNA e alla morte del trofoblasto nella blastocisti (51). Oltre al suo impatto sulla crescita del trofoblasto, HPV sembra ridurre l'impianto endometriale delle cellule trofoblastiche, aumentando così la teoria di rischio di aborto spontaneo HPV correlato (52).

Queste osservazioni suggeriscono il possibile effetto negativo di HPV sulle prime fasi di sviluppo embrionale, confermate da diversi lavori. In uno studio condotto su 108 i pazienti con aborti spontanei, il DNA di HPV 16 e 18, era rilevato nel 7,4% di tutti i feti testati (53). In un altro studio confrontando 25 aborti spontanei con 15 interruzioni volontarie di gravidanza, le sequenze di HPV E6 / E7 erano rilevate nel 60 % e nel 20 % rispettivamente (54). Lo studio di Garolla e collaboratori (55) ha valutato l'esito riproduttivo di 226 coppie infertili sottoposte a tecniche di riproduzione assistita (ART) con o senza papillomavirus umano nello sperma. In cinquantaquattro partner di sesso maschile (23,9%) era stata riscontrata l'infezione da HPV confinata alla superficie dello spermatozoo, sulle cellule di esfoliazione o in entrambe. Durante il periodo di diagnosi, le coppie con partner maschile non infetto avevano ottenuto gravidanze spontanee. ART erano state eseguite in 158 coppie HPV negative e 54 coppie HPV positive, con il 38,4% e il 14,2% di tassi di gravidanza cumulativo, rispettivamente. Il follow-up delle gravidanze mostrava un tasso di aborto spontaneo più elevato nelle coppie infette (62,5% vs 16,7%), e le gravidanze in corso di quest'ultimo gruppo erano caratterizzate dalla presenza di HPV confinata solo sulle cellule di esfoliazione.

Conclusioni

Nonostante la cause di abortività ripetuta rimangano spesso inspiegate, negli ultimi anni si sono chiariti alcuni meccanismi, o fattori di rischio, legati al contributo paterno e in particolar modo allo spermatozoo. La coppia con abortività ripetuta deve perciò intraprendere un percorso andrologico sottoponendo il maschio ad approfondimenti diagnostici. In ottica PMA tale percorso potrebbe essere di ausilio laddove vengano sperimentati insuccessi terapeutici. In questo senso, le indagini genetiche, le analisi sul DNA dello spermatozoo e la ricerca di HPV nel liquido seminale dovrebbero essere eseguite in tutte le coppie che affrontano un percorso di PMA, dal momento che tali indagini hanno anche un ruolo prognostico e quindi non andrebbero riservate solo alle coppie che sperimentano aborti ripetuti.

Bibliografia

1. Ford HB, Schust DJ. Recurrent pregnancy loss: etiology, diagnosis, and therapy. *Rev Obstet Gynecol*. 2009 Spring;2(2):76-83.
2. Lejeune V. Early recurrent spontaneous abortion: How to take care in 2006?. *Gynecol Obstet Fertil*. 2006 Oct;34(10):927-37.
3. Zhang M, Fan HT, Zhang QS, Wang XY, Yang X, Tian WJ, Li RW. Genetic screening and evaluation for chromosomal abnormalities of infertile males in Jilin Province, China. *Genet Mol Res*. 2015 Dec 8;14(4):16178-84.
4. Kochhar PK, Ghosh P. Reproductive outcome of couples with recurrent miscarriage and balanced chromosomal abnormalities. *J Obstet Gynaecol Res*. 2013 Jan;39(1):113-20.
5. Kovaleva NV, Cotter PD. Somatic/gonadal mosaicism for structural autosomal rearrangements: female predominance among carriers of gonadal mosaicism for unbalanced rearrangements. *Mol Cytogenet*. 2016 Jan 28;9:8.
6. Harton GL, Tempest HG. Chromosomal disorders and male infertility. *Asian J Androl*. 2012 Jan;14(1):32-9.
7. Ching CB, Ko E, Hecht B, Smith M, Sabanegh E. Presentation and treatment of subfertile men with balanced translocations: the cleveland clinic experience. *Curr Urol*. 2012 May;6(1):37-42.
8. Olesen C, Hansen C, Bendtsen E, Byskov AG, Schwinger E, Lopez-Pajares I, Jensen PK, Kristoffersson U, Schubert R, Van Assche E, Wahlstroem J, Lespinasse J, Tommerup N. Identification of human candidate genes for male infertility by digital differential display. *Mol Hum Reprod*. 2001 Jan;7(1):11-20.
9. Godo A, Blanco J, Vidal F, Anton E. Accumulation of numerical and structural chromosome imbalances in spermatozoa from reciprocal translocation carriers. *Hum Reprod*. 2013 Mar;28(3):840-9.
10. Stephenson MD, Awartani KA, Robinson WP. Cytogenetic analysis of miscarriages from couples with recurrent miscarriage: a case-control study. *Hum Reprod*. 2002 Feb;17(2):446-51.
11. Nicolaidis P and Petersen MB. Origin and mechanisms of non-.disjunction in human autosomal trisomies. *Hum Reprod* 1998; 13: 313-319.
12. Egozcue J, Blanco J, Vidal F. Chromosome studies in human sperm nuclei using fluorescence in-situ hybridization (FISH). *Hum Reprod Update* 1997; 3: 441-452.
13. Egozcue S, Blanco J, Vendrell J, Garcia F, Veiga A, Aran B, Barri PN, Vidal F, Egozcue J. Human male infertility: chromosome anomalies meiotic disorders, abnormal spermatozoa and recurrent abortion. *Hum Reprod Update* 2000; 6: 93-105.

14. Rubio C, Simon C, Blanco J, Vidal F, Minguez Y, Egozcue J, Crespo J, Remohí J, Pellicer A. Implications of sperm chromosome abnormalities in recurrent miscarriage. *J Ass Reprod Genet* 1999; 16(5): 253-258.
15. Rubio C, Gil-Salom M, Simon C, Vidal F, Rodrigo L, Minguez Y, Remohí J, Pellicer A. Incidence of sperm chromosomal abnormalities in a risk population: relationship with sperm quality and ICSI outcome. *Hum Reprod* 2001; 16(10): 2084-2092.
16. Carrell DT, Wilcox AL, Lowy L, Peterson CM, Jones KP, Erickson L, Campbell B, Branch DW, Hatasaka HH. Elevated sperm chromosome aneuploidy and apoptosis in patients with unexplained recurrent pregnancy loss. *Obstet Gynecol* 2003; 101(6): 1229-1235.
17. Al-Hassan S, Hellani A, Al-Shahrani A, Al-Deery M, Jaroudi K, Coskun S. Sperm chromosomal abnormalities in patients with unexplained recurrent abortions. *Arch Androl* 2005; 51(1): 69-76.
18. Bernardini LM, Costa M, Bottazzi C, Gianaroli L, Magli MC, Venturini PL, Francioso R, Conte N, Ragni N. Sperm aneuploidy and recurrent pregnancy loss. *Reprod Biomed Online* 2004; 9(3): 312-320.
19. Ramasamy R, Scovell JM, Kovac JR, Cook PJ, Lamb DJ, Lipshultz LI. Fluorescence in situ hybridization detects increased sperm aneuploidy in men with recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril* 2015; 103(4): 906-909.
20. Neusser M, Rogenhofer N, Durl S, Ochsenkuhn R, Trottmann M, Jurinovic V, Steinlein O, von Schonfeldt V, Muller S, Thaler CJ. Increased chromosome 16 disomy rates in human spermatozoa and recurrent spontaneous abortions. *Fertil Steril* 2015; 104(5): 1130-1137.
21. Kahraman S, Findikli N, Biricik A, Oncu N, Ogur C, Sertyel S, Karlikaya G, Karagozoglu H, Saglam Y. Preliminary FISH studies on spermatozoa and embryos in patients with variable degrees of teratozoospermia and a history of poor prognosis. *Reprod Biomed Online* 2006; 12(6): 752-761.
22. Caseiro AL, Regalo A, Pereira E, Esteves T, Fernandes F, Carvalho J. Implication of sperm chromosomal abnormalities in recurrent abortion and multiple implantation failure. *Reprod Biomed Online* 2015; 31: 481-485.
23. Gandini L, Lombardo F, Paoli D, Caruso F, Eleuteri P, Leter G, et al. Full-term pregnancies achieved with ICSI despite high levels of sperm chromatin damage. *Hum Reprod* 2004;19:1409–17.
24. Wyrobek AJ, Eskenazi B, Young S, Arnheim N, Tiemann-Boege I, Jabs EW, et al. Advancing age has differential effects on DNA damage, chromatin integrity, gene mutations, and aneuploidies in sperm. *PNAS* 2006;103:9601–6.

25. Belloc S, Cohen-Bacrie P, Benkhalifa M, CohenBacrie M, De MJ, Hazout A, et al. Effect of maternal and paternal age on pregnancy and miscarriage rates after intrauterine insemination. *Reprod Biomed Online* 2008;17:392–7.
26. Greco E, Scarselli F, Iacobelli M, Rienzi L, Ubaldi F, Ferrero S, et al. Efficient treatment of infertility due to sperm DNA damage by ICSI with testicular spermatozoa. *Hum Reprod* 2005;20: 226–30.
27. Ollero M, Gil-Guzman E, Lopez MC, Sharma RK, Agarwal A, Larson K, et al. Characterization of subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: implications in the diagnosis and treatment of male infertility. *Hum Reprod* 2001;16: 1912–21.
28. Garolla A, Cosci I, Bertoldo A, Sartini B, Boudjema E, Foresta C. DNA double strand breaks in human spermatozoa can be predictive for assisted reproductive outcome. *Reprod Biomed Online*. 2015;31(1):100-7. doi: 10.1016/j.rbmo.2015.03.009.
29. Osman A, Alsomait H, Seshadri S, El-Toukhy T, Khalaf Y. The effect of sperm DNA fragmentation on live birth rate after IVF or ICSI: a systematic review and meta-analysis. *Reprod Biomed Online*. 2015;30(2):120-7.
30. Zhao J, Zhang Q, Wang Y, Li Y. Whether sperm deoxyribonucleic acid fragmentation has an effect on pregnancy and miscarriage after in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*. 2014;102(4):998-1005.e8.
31. Sun JG, Jurisicova A, Casper RF. Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. *Biol Reprod* 1997;56:602–7.
32. Doorbar J et al. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine* 2012;30:F55–F70.
33. Stanley M. Pathology and epidemiology of HPV infection in females. *Gynecol Oncol* 2010; 117 (suppl 2):S5–S10.
34. Bosch FX et al. Comprehensive control of human papillomavirus infections and related diseases. *Vaccine* 2013;30:H1–H31.
35. Cid Arregui A, Gariglio P, Kanda T & Doorbar J. Oncogenic human papillomaviruses: high-risk human papillomaviruses: towards a better understanding of the mechanisms of viral transformation, latency and immune-escape. *Open Virol J* 2012;6:160–162.
36. Castellsagué X. Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. *Gynecol Oncol* 2008;110 (suppl 2):S4–S7.
37. Lenzi A. et al. Rome Consensus Conference – statement; human papilloma virus diseases in males. *BMC Public Health* 2013;13:117.

38. Foresta C, Garolla A, Zuccarello D et al. Human papillomavirus found in sperm head of young adult males affects the progressive motility. *Fertil Steril* 2010;93:802–806.
39. Garolla A. et al. Association, prevalence, and clearance of human papillomavirus and antisperm antibodies in infected semen samples from infertile patients. *Fertil Steril* 2013;99:125–131.
40. Laprise C, Trottier H, Monnier P, Coutlee F & Mayrand MH. Prevalence of human papillomaviruses in semen: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod* 2014;29:640–651.
41. Schillaci R. et al. Detection of oncogenic human papillomavirus genotypes on spermatozoa from male partners of infertile couples. *Fertil Steril* 2013;100:1236–1240.
42. Gizzo S. et al. Male and couple fertility impairment due to HPV DNA sperm infection: update on molecular mechanism and clinical impact—systematic review. *Biomed Res Int*, Article ID 230263, doi:10.1155/2014/783598. (2014)
43. Lee CA, Huang CT, King A & Chan PJ. Differential effects of human papillomavirus DNA types on p53 tumor-suppressor gene apoptosis in sperm. *Gynecol Oncol* 2002;85:511–516.
44. Foresta C et al. Clinical and prognostic significance of human papillomavirus DNA in the sperm or exfoliated cells of infertile patients and subjects with risk factors. *Fertil Steril* 2010;94:1723–1727.
45. Garolla A et al. Testicular cancer and HPV semen infection. *Front Endocrinol* 2012;3:172.
46. Brossfield JE, Chan PJ, Patton WC & King A. Tenacity of exogenous human papillomavirus DNA in sperm washing. *J Assist Reprod Genet* 1999;16:325–328.
47. Connelly et al. Human sperm deoxyribonucleic acid fragmentation by specific types of papillomavirus. *Am J Obstet Gynecol* 2001;184:1068–1070.
48. Rombaldi RL, Serafini EP, Mandelli J, Zimmermann E, Losquiavo KP. Transplacental transmission of human papillomavirus. *Viol J* 2008;5:106.
49. Cabrera M, Chan PJ, Kalugdan TH, King A. Transfection of the inner cell mass and lack of a unique DNA sequence affecting the uptake of exogenous DNA by sperm as shown by dideoxy sequencing analogues. *J Assist Reprod Genet* 1997;14:120–124.
50. Foresta C, Patassini C, Bertoldo A et al. Mechanism of human papillomavirus binding to human spermatozoa and fertilizing ability of infected spermatozoa. *PLoS ONE* 2011;6:15036.
51. Henneberg AA, Patton WC, Jacobson JD, Chan PJ. Human papilloma virus DNA exposure and embryo survival is stage-specific. *J Assist Reprod Genet* 2006;23:255–259.
52. Noventa M, Andrisani A, Gizzo S, Nardelli GB, Ambrosini G. Is it time to shift the attention on early stages embryo development to avoid inconclusive evidence on HPV related infertility: debate and proposal. *Reprod Biol Endocrinol* 2014;(12):48.

53. Hong LJ, Oshiro BT, Chan PJ. HPV-16 exposed mouse embryos: a potential model for pregnancy wastage. *Arch Gynecol Obstet* 2013;287:1093–1097.
54. Hermonat PL, Han L, Wendel PJ et al. Human papillomavirus is more prevalent in first trimester spontaneously aborted products of conception compared to elective specimens. *Vir Gen* 1997;14:13–17.
55. Garolla A, Engl B, Pizzol D, Ghezzi M, Bertoldo A, Bottacin A, Noventa M, Foresta C. Spontaneous fertility and in vitro fertilization outcome: new evidence of human papillomavirus sperm infection. *Fertil Steril*. 2016 Jan;105(1):65-72. 16
56. Carrel DT, Liu L, Peterson CM, Jones KP, Hatasaka HH, Erickson L, Campbell B. Sperm DNA fragmentation is increased in couples with unexplained recurrent pregnancy loss. *Arch.Androl* 2003;49, 49-55
57. Brahem S, Mehdi M, Landolsi H, Mougou S, Elghezal H, Saad A. semen parameters and sperm DNA fragmentation as causes of recurrent pregnancy loss. *Urology* 2011;78:792-796
58. Carlini T, Paoli D, Pelloni M, Faja F, Dal Lago A, Lombardo F, Lenzi A, Gandini L. Sperm DNA fragmentation in Italian couples with recurrent pregnancy loss. *Reprod Biomed Online* 2016, in press
59. Cohen-Bacrie P, Belloc S, Ménézou YL, Clement P, Hamidi J, Benkhalifa M. Correlation between DNA damage and sperm parameters: a prospective study of 1,633 patients. *Fertil Steril* 2009; 91, 1801-1805.