

ESAME DEL LIQUIDO SEMINALE

L'esame standard del liquido seminale o spermioγραμμα, è un esame di primo livello che rappresenta il punto di partenza per l'impostazione diagnostica e per valutare la risposta alle terapie andrologiche. Per una corretta esecuzione laboratoristica dell'esame seminale è fondamentale standardizzare le procedure analitiche e pre-analitiche che comprendono precise norme di raccolta e consegna nonché di valutazione del campione seminale. Da alcuni anni viene considerato come punto di riferimento per l'analisi il manuale del WHO (Tabelle 1 e 2) che nell'ultima edizione (WHO 2010) ha stabilito i valori di riferimento basandosi su una coorte di uomini sani con un time-to-pregnancy inferiore ai 12 mesi.

Tabella 1. Esame del liquido seminale con indicazione del valore minimo (5° percentile) e medio (50° percentile) dei soggetti fertili (WHO 2010).

PARAMETRI SEMINALI	VALORI DI RIFERIMENTO	
	5° percentile	50°percentile
Volume seminale (ml)	≥ 1.5	≥ 3.7
pH	≥ 7.2	≥ 7.2
Concentrazione spermatozoi (milioni/ml)	≥ 15x 10 ⁶	≥ 73x 10 ⁶
Numero totale spermatozoi/eiaculato (milioni)	≥ 39x 10 ⁶	≥ 255x 10 ⁶
Motilità (%)	≥ 32% motilità	≥ 55% motilità
	progressiva (PR)	progressiva (PR)
	≥ 40% motilità totale (PR+NP)	≥ 61% motilità totale (PR+NP)
Morfologia (%)	≥ 4%	≥ 15%
Vitalità (%)	≥ 58%	≥ 79%
Leucociti	< 1x 10 ⁶ /ml	
Immunobead test o MAR test	< 50% spermatozoi	
	mobili con bead adese	
	< 50% spermatozoi con particelle adese	

Tabella 2. Terminologia utilizzata per la classificazione delle caratteristiche del liquido seminale.

Normozoospermia	Normalità dei parametri seminali
Oligozoospermia	Concentrazione spermatica < 15x 10 ⁶ /ml o numero totale di spermatozoi nell'eiaculato < 39x 10 ⁶
Astenozoospermia	< 32% di spermatozoi con motilità progressiva (PR) < 40% di spermatozoi con motilità totale (PR+NP)
Teratozoospermia	< 4% di spermatozoi con morfologia normale
Oligo-asteno-teratozoospermia	Alterazione del numero, della motilità e della morfologia degli spermatozoi
Oligo-teratozoospermia	Alterazione del numero e della morfologia degli spermatozoi
Oligo-astenozoospermia	Alterazione del numero e della motilità degli spermatozoi
Asteno-teratozoospermia	Alterazione della motilità e della morfologia degli spermatozoi
Criptozoospermia	Presenza di spermatozoi solo dopo centrifugazione
Necrozoospermia	< 58% di vitalità spermatica
Azoospermia	Assenza di spermatozoi nell'eiaculato anche dopo centrifugazione
Aspermia	Assenza di eiaculato

L'esame del liquido seminale comprende la valutazione di parametri macroscopici e microscopici dell'eiaculato. Per quanto riguarda i parametri macroscopici vanno considerate le caratteristiche reologiche del liquido seminale (aspetto, viscosità, fluidificazione) e vengono valutate il volume di eiaculato ed il pH seminale. Per quanto concerne l'esame microscopico, è necessario valutare sia la componente gametica che la non-gametica. Per quanto riguarda la prima, vanno distinti gli spermatozoi dalla presenza di cellule immature della spermatogenesi. In relazione agli spermatozoi vanno valutati la concentrazione (espressa come milioni per ml di liquido seminale), il numero totale di spermatozoi per eiaculato, la percentuale di motilità differenziata per tipo (progressivo o non progressivo) e infine la morfologia. Si passa quindi alla valutazione della componente cellulare non gametica, costituita da leucociti, cellule epiteliali, emazie, zone di spermioagglutinazione, corpuscoli prostatici.

Per una corretta interpretazione dell'esame seminale è necessario ricordare che non sempre alterazioni dei parametri seminali riflettono condizioni patologiche, ma possono esprimere una fisiologica variabilità intraindividuale, errori nella modalità di raccolta del campione, nel trasporto o nella valutazione del campione seminale. In particolare un periodo di astinenza troppo breve (<2 giorni) o eiaculazioni molto frequenti nel periodo precedente la raccolta seminale possono causare una riduzione del volume dell'eiaculato e del numero di spermatozoi e allo stesso tempo indurre la presenza di leucociti e/o di emazie. Al contrario, un periodo di astinenza eccessivo (>7 giorni) può alterare la morfologia e la motilità degli spermatozoi. Analoghe alterazioni seminali possono riscontrarsi anche in campioni raccolti in una sede diversa da quella dell'analisi, a causa di possibili contaminazioni batteriche, dell'esposizione allo shock termico e dell'allungamento dei tempi per la consegna del campione. Va inoltre sempre indagata la presenza nei tre mesi precedenti l'esame seminale di condizioni che possono influire negativamente sulla spermatogenesi come febbre elevata, terapie antibiotiche, eventi particolarmente stressanti, o di altre situazioni in grado di alterare transitoriamente i parametri seminali. Infine è necessario affidarsi ad operatori capaci e rigorosi, poiché l'esame seminale è un'indagine che non essendo automatizzata è strettamente operatore-dipendente.

Una corretta esecuzione dell'esame del liquido seminale prevede un'opportuna successione di passaggi che sono state suddivisi in varie fasi e che di seguito analizzeremo nel dettaglio.

Fase 1: Accettazione e preparazione del campione seminale

La fase di accettazione consiste nel controllo dei dati anagrafici del paziente, che deve fornire all'operatore un documento di riconoscimento, permettendo così la corretta compilazione del modulo di lavoro. Al paziente vengono richiesti oltre al nome e cognome, la data di nascita ed i giorni di astinenza dall'ultimo rapporto sessuale o dall'ultima eiaculazione. Quest'ultimo dato va segnato con precisione e dovrebbe, quanto più possibile, rientrare in un intervallo compreso tra 2 e 7 giorni.

Su un contenitore dall'apertura larga e rigorosamente sterile che verrà utilizzato per la raccolta viene attaccata una etichetta sulla quale sono riportati i dati del paziente. La raccolta dovrebbe avvenire mediante masturbazione in una stanza riservata vicino al laboratorio. Il campione deve essere consegnato entro 30 minuti dall'eiaculazione e conservato a temperatura costante tra 20°C e 37° C per evitare escursioni termiche che potrebbero deteriorare la motilità e la motilità degli spermatozoi. È necessario accertarsi che il paziente non abbia perso parte dell'eiaculato, che per le sue caratteristiche intrinseche risulta suddivisibile in più frazioni, caratterizzate dalla presenza di differenti quantità di secrezioni prostatiche o vescicolari. Inoltre, poiché la maggior quantità di spermatozoi è presente nella prima porzione dell'eiaculato, è fondamentale segnalare l'eventuale perdita di tale frazione.

Fase 2: Analisi

La fase analitica viene suddivisa in 2 momenti distinti: valutazione macroscopica e microscopica. Tutte queste valutazioni devono essere eseguite preferibilmente dopo 30 minuti dall'eiaculazione ma non oltre 1 ora. L'analisi macroscopica prevede la valutazione e la registrazione di parametri macroscopici, quali volume, aspetto, viscosità, liquefazione/fluidificazione e pH.

L'analisi del **volume** offre importanti informazioni sullo status fisiologico dell'apparato urogenitale, dal momento che permette una valutazione dell'attività funzionale delle ghiandole accessorie (prostata e vescicole seminali). Il valore di riferimento inferiore del volume seminale è di 1.5 ml, al di sotto del quale si parla di ipospia. La valutazione del volume viene effettuata tramite pesatura del contenitore prima e dopo la raccolta del campione. La differenza tra il peso del contenitore prima e dopo la raccolta del liquido seminale rappresenta il volume di eiaculato prodotto dal paziente (densità del liquido seminale assunta come pari a 1g/ml). La valutazione più comune rimane comunque quella di utilizzare una pasteur graduata sterile e una provetta conica graduata nella quale verrà trasferito il campione seminale. La quantificazione del volume offre anche un'idea della funzionalità delle ghiandole accessorie e della pervietà delle vie genitali. Le alterazioni del volume del liquido seminale possono essere caratterizzate dalla completa assenza di liquido seminale nell'eiaculato o dall'aumento o dalla riduzione della sua quantità:

- **ASPERMIA:** con tale termine si indica genericamente l'assenza di eiaculato. Tale fenomeno può essere conseguente ad anorgasmia (aneiaculazione anorgasmica), ad eiaculazione retrograda o a mancata fase di emissione del liquido seminale in uretra (aspermia vera). Nella prima forma la causa può essere psicogena o più raramente neurogena (da lesione neurologica centrale o da neuropatia sensitiva periferica); in tali casi l'eiaculazione può essere indotta mediante vibrostimolazione del pene con un apposito strumento (Ferticare) o mediante elettrostimolazione. L'eiaculazione retrograda è dovuta invece ad inefficace chiusura del collo vescicale e riconosce molteplici cause: anatomiche, congenite o più frequentemente acquisite come gli interventi chirurgici sulla prostata, sul collo vescicale o sull'uretra posteriore; cause farmacologiche (terapie con alfa-bloccanti, antidepressivi, antipsicotici); infine cause neurologiche, come nelle lesioni midollari toraco-lombari, nelle resezioni rettali o sigmoidee allargate e nel diabete mellito.
- **IPOPOSIA:** con il termine di ipospia si intende un volume di eiaculato inferiore a 1.5 ml. Tale alterazione può essere dovuta ad una ridotta astinenza da rapporti sessuali o eiaculazioni, ad una raccolta seminale incompleta (pertanto deve essere sempre indagata un'eventuale perdita di eiaculato al momento della raccolta), a flogosi prostatico-vescicolari (associate a pH alto) che possono determinare una alterata funzionalità secretoria ghiandola, ad un quadro di ipogonadismo, ad assenza o ostruzione delle vie escrettrici (associata a pH basso) o a forme cosiddette idiopatiche quando non è possibile riscontrare cause ben documentabili.

L'**aspetto** viene valutato avvicinando la provetta con il liquido seminale ad una fonte luminosa. È possibile definire una scala categoriale, da trasparente a lattescente, scegliendo come valore di normalità il colore grigio-opalescente. Un liquido seminale trasparente può indicare una riduzione della componente nemaspermica, mentre liquidi giallastri o ematici indicano, rispettivamente, un'elevata concentrazione di leucociti o emazie segno di flogosi o infezione delle vie seminali. Infine, un liquido seminale lattescente indica la presenza di una forte componente prostatica (Fig. 1).

Fig. 1

Valutazione dell'aspetto				
GRIGIO OPALESCENTE	TRASPARENTE	EMATICO	LATTESCENTE	GIALLASTRO
Colore Opaco	Colore Acquoso	Colore Rosato Rosso	Colore Biancastro	Colore Giallo
Proprio	Mancata presenza componente cellulare	Presenza Erazie	Costituito solo da secreto Prostatico	Ittero, Assunzione di vitamine
				

La **viscosità** può essere normale, aumentata o diminuita. Una viscosità aumentata può a sua volta avere diversa gradazione, riportata nel referto con una gradazione qualitativa (----diminuita; ++++ aumentata), e può essere associata ad uno stato di flogosi. La misurazione avviene facendo gocciolare il liquido da una pipetta e la normale viscosità è rappresentata da gocce che si staccano in maniera ritmica una dopo l'altra. La formazione di filamenti è un segnale di aumentata viscosità.

Anche la **liquefazione/fluidificazione** va valutata attentamente, dal momento che, nei primi minuti successivi all'eiaculazione, il liquido, per effetto dell'azione di enzimi prodotti dalle vescichette seminali, forma un coagulo che arriva a sciogliersi dopo circa 15 minuti dalla consegna ad opera delle proteinasi del secreto prostatico, permettendo la scomparsa di strie di muco che potrebbero interferire con la motilità degli spermatozoi. In questa fase possono essere presenti nel liquido granuli che, vanno prontamente sottratti e quantificati. L'assenza del coagulo in condizioni basali indica una possibile agenesia delle vescichette seminali o un'agenesia dei dotti eiaculatori. Se dopo 60 minuti la liquefazione non è completa, si parla di liquefazione ritardata. La misurazione viene effettuata tramite percolamento del liquido lungo le pareti della provetta ed osservazione della qualità del liquido contro una sorgente luminosa.

Il **pH** del liquido seminale, misurato con apposite cartine indicatrici dopo 30 minuti dall'eiaculazione, deve essere ≥ 7.2 per poter essere definito normale; alterazioni del pH riflettono possibili alterazioni a livello prostatico o vescicolare. Livelli di pH acidi (< 7.2), in associazione ad una ipospia, indicano la prevalenza della componente prostatica per compromissione delle vescichette seminali, pertanto possono essere segno di ostruzione o agenesia dei dotti eiaculatori.

La seconda parte dell'analisi consiste nella valutazione dei **parametri microscopici**.

In primo luogo l'operatore verifica la **concentrazione spermatica** attraverso una valutazione a fresco su vetrino con copri oggetto 22x22. In base al numero di spermatozoi che si rilevano (Fig. 1) si scelgono le due diluizioni più opportune per eseguire la valutazione con la camera di conta di Neubauer (Fig. 2). Il valore ottenuto con l'apposita formula (es: Diluizione 1+4 (1:5) $C = (N/n) \times 0.25$; $C =$ concentrazione sp.zoi mil/ml, $N =$ numero totale di spermatozoi contati, $n =$ numero di righe contate) viene poi moltiplicato per il volume totale, così da ottenere il numero totale di spermatozoi nell'eiaculato indicando il grado di attività della spermatogenesi. La camera di conta più comunemente utilizzata rimane la camera di conta di Makler (Fig. 3). Nel vetrino copri oggetto di tale camera è presente una griglia 10x10 che consente di determinare la concentrazione

spermatica (milioni di spermatozoi/ml) attraverso il conteggio e la lettura del numero di spermatozoi nelle singole righe, o per una più corretta valutazione la somma di tutti gli spermatozoi presenti all'interno della griglia della camera da dividere per 10. Tale valore viene poi moltiplicato per il volume totale di eiaculato, così da ottenere il **numero totale di spermatozoi** presenti nell'eiaculato. In caso di assenza di spermatozoi il campione deve essere centrifugato per poter distinguere tra **azoospermia** (assenza di spermatozoi anche dopo centrifugazione) e **criptozoospermia** (presenza di spermatozoi dopo centrifugazione). Concentrazioni inferiori a 15 milioni/ml e/o 39 milioni/eiaculato definiscono la **oligozoospermia**. Valori superiori a 15 milioni/ml e 39 milioni/eiaculato stabiliscono la **normozoospermia**. Anche nel caso in cui la valutazione a fresco indichi una presenza molto bassa di spermatozoi si ricorre alla centrifugazione del campione.

Figura 1. Diluizioni per camera di Neubauer.

Table 2.3 Semen dilutions required, how to make them, chambers to use and potential areas to assess

Spermatozoa per $\times 400$ field	Spermatozoa per $\times 200$ field	Dilution required	μ l of semen	μ l of fixative	Chamber	Area to be assessed
>101	>404	1:20 (1+19)	50	950	Improved Neubauer	grids 5, 4, 6
16-100	64-400	1:5 (1+4)	50	200	Improved Neubauer	grids 5, 4, 6
2-15	8-60	1:2 (1+1)	50	50	Improved Neubauer	grids 5, 4, 6
<2	<8	1:2 (1+1)	50	50	Improved Neubauer or large volume	all 9 grids entire slide

Figura 2. Camera di Neubauer.

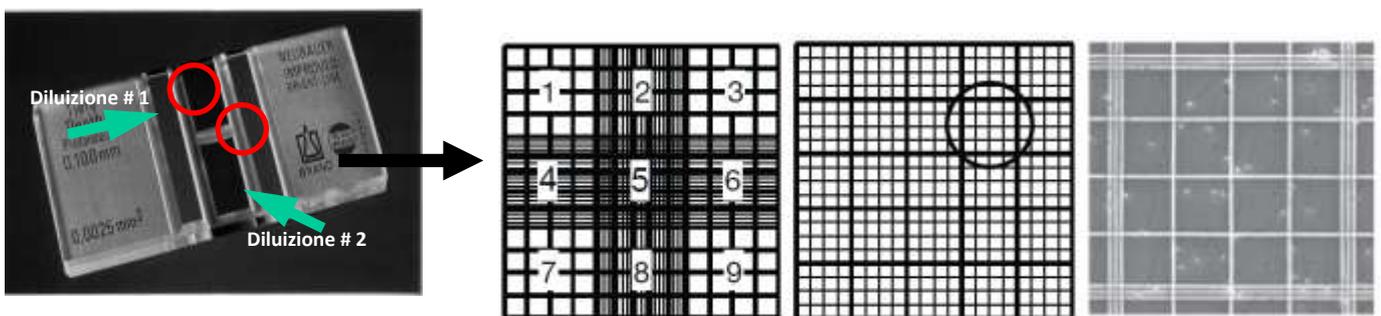
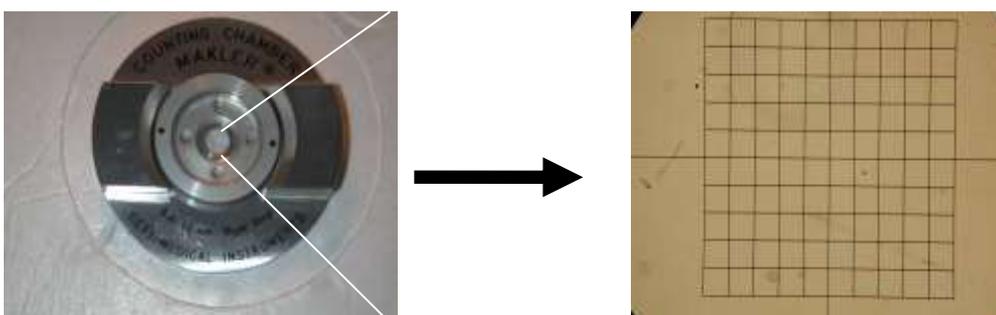


Figura 3. Camera di Makler.



L'osservazione in camera di Neubauer è utilizzata inoltre per valutare la componente non gametica, rappresentata da cellule di sfaldamento, round cells, emazie, leucociti (v.n. < 1.0 milioni/ml) e spermatici.

La **motilità** spermatica viene valutata preferibilmente dopo mezzora dalla raccolta o al massimo entro 1 ora dall'eiaculazione. Si valuta generalmente a fresco su un vetrino con coprioggetto 22x22. Il preparato così ottenuto viene esaminato con ottica in contrasto di fase a 200x o 400x ingrandimenti e si contano 200 spermatozoi intatti (non contare code mobili senza la testa)

Le classi di motilità sono:

- **PROGRESSIVA (PR)**: spermatozoi che si muovono rapidamente sia con moto rettilineo che in grossi cerchi senza considerare la velocità, ma valutando la loro progressione.
- **NON PROGRESSIVA (NP)**: spermatozoi che si muovono senza progressione, movimento in situ.
- **ASSENTE (IM)**: spermatozoi immobili.

Una motilità normale è definita da una percentuale di spermatozoi con motilità progressiva (PR) superiore al 32% e/o da una percentuale di spermatozoi mobili totali (PR+NP) superiore al 40%. Per valori inferiori si parla di astenozoospermia.

In caso di astenozoospermia è importante valutare la modalità della raccolta del liquido seminale, la sua conservazione/trasporto al laboratorio analisi, il pH, la viscosità seminale e la eventuale presenza di spermioagglutinazioni ed anticorpi antispermatozoo. Il dosaggio di alcuni indicatori biochimici di funzionalità prostatica, vescicolare, epididimaria quali la fosfatasi acida, zinco, fruttosio, alfa-glucosidasi, anche se poco indicativi e poco utilizzati, possono in taluni casi indirizzare verso un'alterazione delle ghiandole accessorie quale possibile causa dell'astenozoospermia. È necessario pertanto eseguire accertamenti di approfondimento con una spermicoltura e/o urino-coltura del primo mitto, per escludere la presenza di infezioni del tratto riproduttivo e delle vie urogenitali, responsabili di un danno sugli spermatozoi diretto o indiretto tramite la produzione di citochine o altri prodotti da parte delle cellule della risposta infiammatoria. In caso di infezione batterica la terapia antibiotica mirata dovrà essere seguita da una spermicoltura di controllo almeno 2-3 settimane dopo la fine del trattamento e da nuova analisi del liquido seminale da eseguire almeno tre mesi dopo l'eradicazione dell'infezione.

Un'altra importante valutazione è rappresentata dal test della **vitalità**, che valuta l'integrità cellulare dello spermatozoo, ovvero la sua capacità di non accettare sostanze dall'esterno. La valutazione va eseguita preferibilmente entro 30 minuti. La sostanza usata per questo test è l'eosina Y 5% che va mescolata con un uguale volume di campione seminale. Sarà necessario distinguere le forme vive da quelle morte (200 spermatozoi contati), osservando, in un campo, quanti spermatozoi risultano colorati di rosso (spermatozoi morti) e quanti di bianco (spermatozoi vivi). Si parla di necrozoospermia quando la percentuale di forme vitali è inferiore al 58% (Fig. 4). Associato al test dell'eosina si esegue il test di rigonfiamento osmotico (Swelling test), un ulteriore test di vitalità nemaspermica, che stabilisce la capacità osmoregolatrice degli spermatozoi in funzione dell'integrità funzionale di membrana. Si esegue mescolando 0.1 ml di liquido seminale con 1 ml di soluzione di swelling ed incubando il tutto per almeno 30 minuti a 37° C (non più di 45 minuti). La lettura si effettua contando 200 spermatozoi, individuando la percentuale di spermatozoi rigonfi (vivi) sugli spermatozoi non rigonfi (morti) (Fig. 5).

Figura 4. Eosina test.

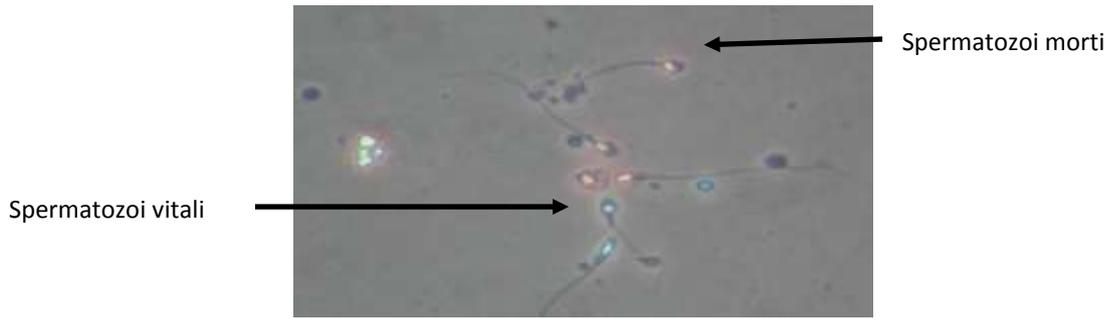
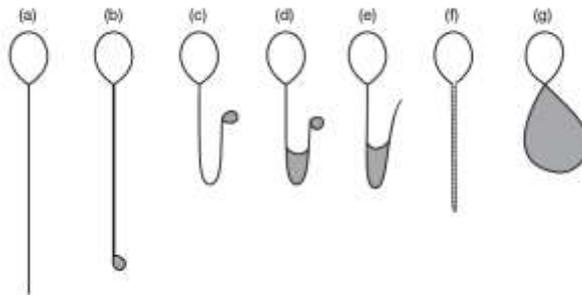


Figura 5. Swelling test.

(a) no change, (b)-(g) various types of tail changes. Swelling in tail is indicated by the grey area.



Reproduced from Jayendran RS, Van der Van HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zanzavald LJ. (1984) Journal of Reproduction and Fertility, 70: 219-228. © Society for Reproduction and Fertility (1984). Reproduced by permission.

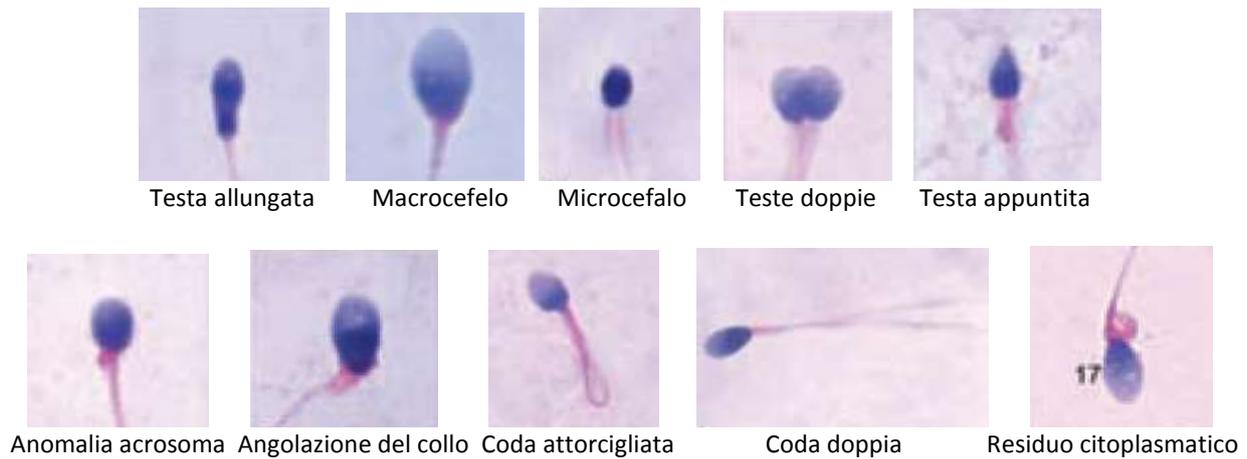
La **valutazione morfologica** si basa sulla distinzione tra forme tipiche (Fig. 6) (v.n. $\geq 4\%$) e forme atipiche (Fig. 6). La colorazione utilizzata è quella di papanicolau e la valutazione viene eseguita contando 200 spermatozoi dopo aver strisciato e colorato il preparato su vetrino.

Figura 6. Spermatozoi con normale morfologia.



Le atipie possono interessare la testa, il collo e la coda (Fig. 7) e generalmente comprendono: macrocefali, microcefali, anomalie dell'acrosoma, teste allungate, teste appuntite, teste doppie, angolazioni del collo, immaturi, code attorcigliate, code doppie, altre forme.

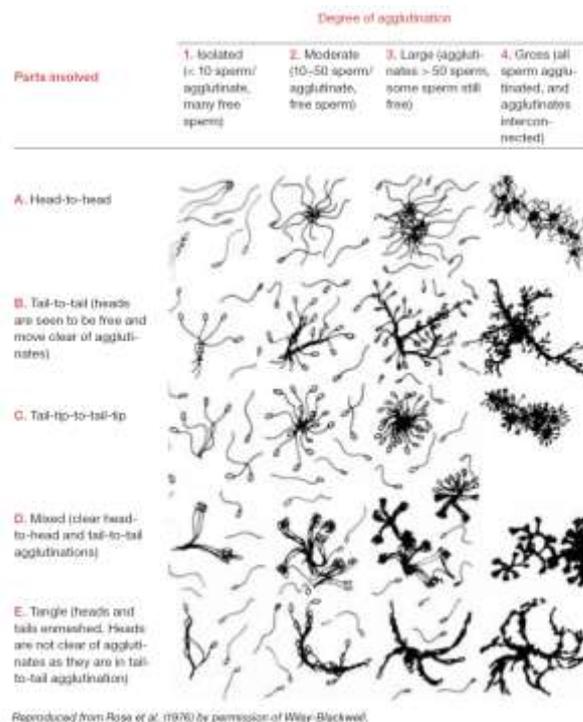
Figura 7.



Nel caso in cui la percentuale di forme atipiche superi il 96 %, si parla di teratozoospermia. Lo studio della morfologia può essere di aiuto talvolta anche per indirizzare la diagnosi: in caso di alterazioni testicolari può essere presente un aumento delle forme allungate e anomalie della testa; in caso di alterazioni a livello epididimario, dove avviene la maturazione finale dello spermatozoo, ci sarà una prevalenza delle forme immature caratterizzate dalla presenza di residui citoplasmatici; nelle flogosi genitali possono essere incrementate le anomalie del collo (presenza di spermatozoi angolati o con deconnessione testa-flagello).

Nell'esame del liquido seminale va tenuta in considerazione anche la presenza di eventuali **agglutinazioni**, che possono coinvolgere testa, tratto intermedio e coda. Nel referto viene utilizzata una gradazione semiquantitativa che va da ---- (assenza) a ++++ (agglutinazioni massive) (Fig. 8).

Figura 8. Gradi di agglutinazione.



Inoltre, è importante valutare l'eventuale presenza di **anticorpi IgG** sulla superficie della membrana plasmatica. Il test utilizzato è il MAR test o Immunobead che risulta patologico quando più del 50% degli spermatozoi presenta le particelle adese alla testa, al collo o alla coda degli stessi.

Bibliografia

World Health Organization (2010) WHO Laboratory Manual for the Examination and processing of human semen. Fifth edition. WHO Press, World, Health Organization, Geneva, Switzerland.

Diapositive e dispense del Master in Medicina della Riproduzione, Università di Padova, anno accademico 2009-2010

Disposizioni della Società Italiana di Andrologia e Medicina della Sessualità (SIAMS) gennaio 2010

ANALISI MORFO-FUNZIONALE DEGLI SPERMATOZOI

L'infertilità maschile è comunemente definita in relazione all'analisi standard del liquido seminale, che fornisce informazioni sul numero e sulla qualità in termini di motilità e morfologia degli spermatozoi presenti nell'eiaculato. Tuttavia è noto che la relazione tra questi parametri convenzionali e la fertilità non è diretta e in molti casi l'analisi del seme non è in grado di spiegare la causa dell'infertilità. Per tale motivo negli ultimi anni sono stati sviluppati nuovi test che valutano anche la competenza funzionale e forniscono informazioni sul potenziale di fertilizzazione dello spermatozoo umano. Le metodiche attualmente più utilizzate prevedono lo studio dell'integrità e della maturità della cromatina dello spermatozoo (sostituzione istoni-protamine) l'analisi dei fenomeni di apoptosi (modificazione strutturale della membrana cellulare, perdita della funzionalità mitocondriale, integrità cromatinica e frammentazione del DNA nucleare), e la valutazione delle aneuploidie spermatiche (Tabella 1). Una riduzione della condensazione nucleare espressione di immaturità spermatica, è stata riportata più frequentemente in campioni seminali di pazienti infertili e viene considerata un fattore prognostico negativo per la fertilità naturale (1, 2). Inoltre, la valutazione del danno del DNA spermatico (come ad esempio lo studio della frammentazione e dell'integrità cromatinica) è considerata particolarmente importante in quei casi in cui si ricorra all'utilizzo di tecniche avanzate di fecondazione assistita (3-5). Infine, lo studio delle aneuploidie spermatiche rappresenta una valutazione estremamente importante nei pazienti affetti da severa testicolopatia.

Tabella 1. Alcuni dei test più usati per lo studio funzionale degli spermatozoi.

Test	Oggetto di valutazione	Significato clinico
Annessina V	Esternalizzazione fosfatidilserina	Apoptosi fasi iniziali
JC-1	Potenziale di membrana mitocondriale	Apoptosi fasi iniziali
Arancio di acridina	Integrità cromatinica	Stress ossidativo e alterazione dei meccanismi di riparazione del DNA
TUNEL	Frammentazione del DNA nucleare	Necrosi e apoptosi in fase avanzata
Anilina	Protaminazione del DNA nucleare	Alterazione dei processi di maturazione nucleare
Decondensazione nucleare	Condensazione nucleare	Alterazione dei processi di condensazione nucleare
FISH	Aneuploidie spermatiche	Alterazione del numero dei cromosomi spermatici

È noto che i soggetti infertili, soprattutto quelli con severa oligozoospermia da testicolopatia primaria, presentano frequentemente un elevato numero di alterazioni strutturali e numeriche a carico dei cromosomi spermatici rispetto ai soggetti fertili (1, 2, 4, 5). Inoltre è stato riportato che il ricorso a tecniche di procreazione medicalmente assistita (PMA) da parte di questi soggetti, esita frequentemente in basse percentuali di fertilizzazione, in una riduzione dei nati vivi e in una aumentata probabilità di anomalie fenotipiche e aberrazioni cromosomiche nei nati (6-10). La maggior parte dei problemi nell'utilizzo degli spermatozoi di questi soggetti per tecniche di

fecondazione assistita mediante microiniezione intracitoplasmatica (ICSI), è legata al fatto che la selezione viene eseguita basandosi quasi esclusivamente sulla morfologia e sulla mobilità cellulari. È stato ipotizzato che questi criteri di selezione possano comportare un maggior rischio di utilizzare spermatozoi con alterazioni cromosomiche. Questa ipotesi giustificherebbe i peggiori risultati ottenuti con tecniche di PMA quando si utilizzano spermatozoi di soggetti con gradi estremi di oligoastenoteratozoospermia (OAT) da severo danno testicolare (6). Inoltre tali considerazioni sollevano importanti riflessioni circa la possibilità di trasmettere alterazioni genetiche alla prole (11-14).

Ad oggi, tutti i test per la valutazione cromosomica e funzionale degli spermatozoi allo scopo di predire l'esito e per migliorare i risultati delle tecniche di PMA si sono rivelati altamente citotossici, e non consentono pertanto il successivo utilizzo dei gameti a scopo riproduttivo. Per questo motivo, recentemente sono state proposte varie tecniche non invasive per la valutazione e la selezione degli spermatozoi allo scopo di migliorare la percentuale di successo delle tecniche di fecondazione assistita nei soggetti con importanti alterazioni seminali (15-18).

Acido ialuronico

Alcuni autori hanno ipotizzato che la selezione degli spermatozoi con maggiore potenziale di fertilità potrebbe essere eseguita sfruttando la loro capacità chemiotattica di migrare verso l'Acido ialuronico (AI) e di legarsi allo stesso (19). Il razionale di questa metodica presuppone che gli spermatozoi normali dal punto di vista genetico e funzionale siano quelli che esprimono elevati livelli della proteina HSPA2 (20, 21), la chaperonina che prende parte al complesso sinaptonemale che dirige e controlla i processi meiotici (22, 23). Sarebbero questi gli spermatozoi che hanno completato correttamente il processo spermiogenetico (transizione da spermatide rotondo, a spermatide allungato, a spermatozoo maturo), che prevede vari processi maturativi: rimodellamento della membrana plasmatica, estrusione del citoplasma e sostituzione delle proteine nucleari degli istoni con le protammine. Solo questi gameti possiederebbero i recettori per l'AI. Questa sostanza, che è normalmente presente nel tratto riproduttivo femminile e ad alte concentrazioni nella matrice extracellulare del cumulo ooforo che avvolge l'ovocita, parteciperebbe del processo di fertilizzazione. In accordo con tale ipotesi, l'analisi degli spermatozoi che si legano all'AI hanno mostrato un minor grado di frammentazione nucleare (25, 25) e una minor percentuale di aneuploidie rispetto ai campioni seminali pre-trattamento (19, 26). Nonostante questo metodo riduca ma non sia in grado di escludere la possibilità di selezionare spermatozoi con alterazioni cromosomiche, è stato ipotizzato che la sua associazione alla ICSI potesse migliorare i risultati di questa tecnica. Sfortunatamente ad oggi esiste solo uno studio di confronto tra ICSI standard e ICSI con selezione mediante AI (27). Inoltre, sebbene questo lavoro riporti una percentuale di fertilizzazione significativamente migliore nei campioni selezionati con AI, nessuna differenza significativa è stata osservata in termini di sviluppo embrionale e di percentuale di gravidanze ottenute.

MACS

Un'altra possibile tecnica di selezione è rappresentata dal sorting degli spermatozoi che utilizza la citofluorimetria con attivazione magnetica (*MACS: magnetic activated cell sorting*). Numerosi autori hanno dimostrato uno stretto legame tra la presenza di markers apoptotici negli spermatozoi umani e il fallimento delle tecniche di fertilizzazione sia in vivo che in vitro (28, 29). Uno dei quadri più precoci di apoptosi prevede l'esternalizzazione dei residui della fosfatidilserina (FS), un fosfolipide normalmente presente nella porzione interna della membrana citoplasmatica

degli spermatozoi. L'Annessina V (AV) è una proteina in grado di legare i fosfolipidi, con alta affinità per la FS, che non possiede la capacità di attraversare le membrane citoplasmatiche intatte. Pertanto negli spermatozoi vitali, il legame tra AV e FS può avvenire solamente sulla superficie esterna della membrana citoplasmatica e indica una compromissione dell'integrità di membrana, espressione iniziale di apoptosi. Mediante un sorting magnetico che preveda l'utilizzo di microbiglie supermagnetiche coniugate all'AV, è possibile isolare i gameti in necrosi e quelli in fase di apoptosi. Infatti, le cellule AV positive ovvero quelle che legano le biglie, vengono deviate nel loro percorso e trattenute da un campo magnetico, mentre le cellule non legate continuano il loro percorso. Secondo alcuni autori, gli spermatozoi AV negativi selezionati con questa metodica, mostrerebbero migliori qualità in termini di parametri seminali e una ridotta attivazione degli altri markers di apoptosi (30). Inoltre tali cellule, sopravviverebbero meglio alle metodiche di crioconservazione e in condizioni sperimentali mostrerebbero una migliore capacità di penetrare l'ovocita di hamster. Su questa base è stata proposta la selezione spermatica che prevede l'individuazione e l'isolamento di cellule non apoptotiche da poter utilizzare per tecniche di PMA. Un recente lavoro che ha utilizzato questa metodica di selezione abbinata alla ICSI in coppie con fattore maschile di infertilità, ha confrontato i risultati ottenuti con spermatozoi AV negativi rispetto a quelli ottenuti con spermatozoi selezionati attraverso metodi classici (31). Gli autori riportano migliori tassi di gravidanze nelle coppie in cui è stato utilizzato il sorting magnetico. Tuttavia, guardando attentamente i risultati è possibile osservare che si tratta solo di una tendenza al miglioramento delle gravidanze, poiché se da questi si sottraggono le gravidanze biochimiche, la percentuale di gravidanze cliniche non è statisticamente diversa dal gruppo di controllo. Inoltre, se da un lato vi sono esperienze ancora molto limitate che richiedono ulteriori studi comparativi randomizzati, dall'altro si pongono dubbi di natura applicativa sul metodo. Infatti, alterazioni del doppio strato fosfolipidico della membrana citoplasmatica degli spermatozoi sono state riportate anche in situazioni fisiologiche. Ad esempio durante il fenomeno di capacitazione, vengono espresse protein-kinasi che mediano il segnale di attivazione per l'esternalizzazione della PS (32, 33).

Birifrangenza

Una recente proposta si basa sulle caratteristiche di birifrangenza della testa dello spermatozoo osservato con un particolare microscopio invertito con luce polarizzata. Questa tecnica è fondata sull'idea di valutare l'organizzazione strutturale dello spermatozoo con particolare attenzione alle porzioni della testa e dell'acrosoma (34). Lo spermatozoo osservato con microscopio a luce polarizzata presenta delle caratteristiche di birifrangenza legate alle proprietà anisotropiche della sua tessitura protoplasmatica. Il nucleo dello spermatozoo maturo possiederebbe una forte birifrangenza intrinseca dovuta all'orientamento dei filamenti nucleoproteici disposti su assi longitudinali. Inoltre i filamenti proteici della porzione subacrosomiale, anch'essi disposti longitudinalmente sarebbero responsabili di una analoga birifrangenza a carico della regione acrosomiale. La presenza o meno della birifrangenza sarebbe espressione della rifrazione della luce che attraversa le diverse strutture cellulari con diverse velocità. Quando la luce attraversa una struttura anisotropica, essa viene rifratta in due raggi polarizzati con differente velocità. Questo fenomeno è noto come ritardanza e appare al microscopio polarizzato come una luce molto scintillante (birifrangente). È stato riportato che nei campioni seminali di soggetti normozoospermici la porzione di spermatozoi birifrangenti è significativamente maggiore rispetto a quella che si osserva in pazienti affetti da severa alterazione dei parametri seminali (35). L'ipotesi su cui si fonda questo metodo è che gli spermatozoi immaturi o con alterazioni nucleari posseggano filamenti nucleoproteici disorganizzati e quindi una struttura isotropica. Il fascio di

luce attraversando questo tipo di struttura non verrebbe rifratto, e quindi l'immagine della testa dello spermatozoo esposto alla luce polarizzata non appare birifrangente. Per lo stesso motivo, sarebbe possibile distinguere anche gli spermatozoi intatti da quelli che hanno subito il processo di reazione acrosomiale (36). L'applicazione di questo metodo di selezione alla ICSI ha evidenziato un incremento significativo dei tassi di impianto e di gravidanze cliniche nonostante siano riportate percentuali non diverse di fertilizzazione e qualità embrionaria. Inoltre è stata riportata una migliore percentuale di impianto e di gravidanze quando venivano utilizzati spermatozoi che avevano subito la reazione acrosomiale rispetto ai non reattati (35). Tuttavia, le esperienze legate a questa metodica non possono essere considerate conclusive, poiché tutti i dati riportati in letteratura circa la messa a punto del metodo di selezione e la sua applicazione clinica fanno capo ad un solo gruppo.

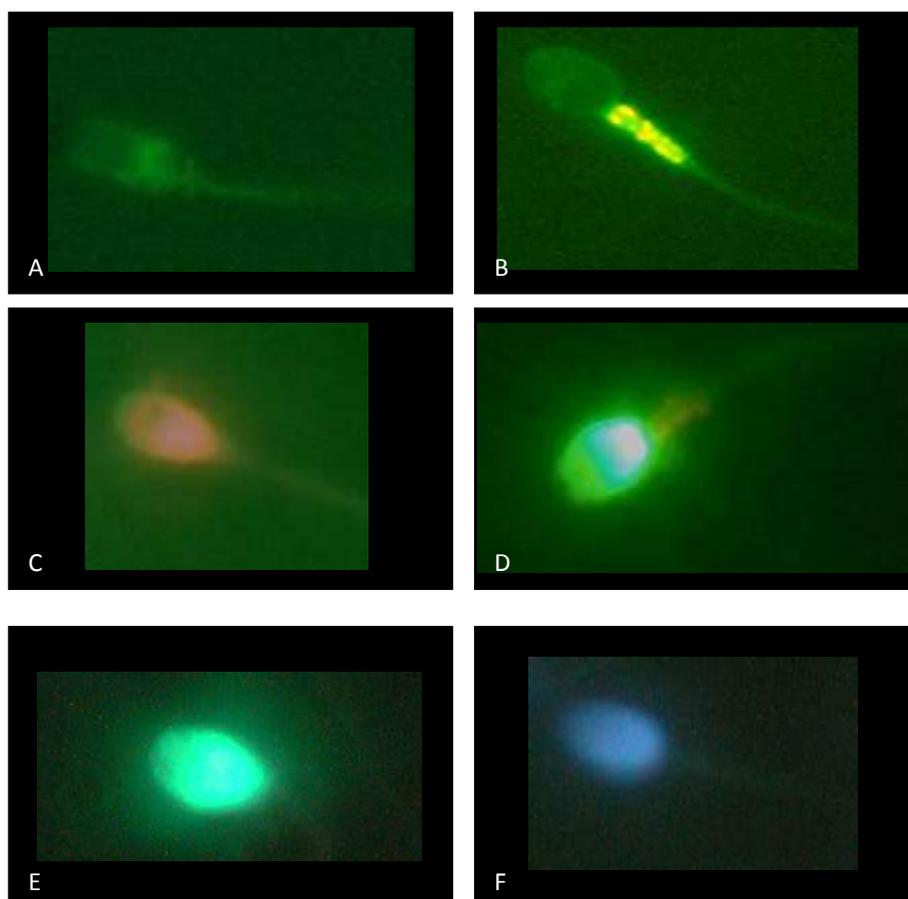
IMSI

Come già detto, i soggetti infertili presentano frequentemente alterazioni a carico dei parametri seminali. Tuttavia la letteratura non riporta alcuna correlazione tra successo delle tecnica ICSI e morfologia spermatica, anche confrontando campioni con morfologia normale rispetto a quelli con severa teratozoospermia (37-39). Tutti questi studi sono stati condotti utilizzando una selezione spermatica che si avvaleva di microscopi ottici e bassi ingrandimenti, in grado di svelare solo i difetti cellulari più marcati. Dal 2002 è stata proposta una selezione morfologica degli spermatozoi ad alto ingrandimento che si avvale di invertoscopi dotati di ottica Normarsky ad immersione, che associati a sistemi ottici digitali sono in grado di raggiungere 6300x di ingrandimento (40-42). Attraverso questa metodica chiamata MSOME (*motile sperm organelle morphology examination*) e mediante una attenta valutazione dei soli spermatozoi mobili, è possibile riconoscere anche anomalie morfologiche molto lievi a carico di ogni singola porzione cellulare. In particolare è stato riportato che la normalità della testa e l'assenza di vacuoli citoplasmatici sarebbe peculiare di gameti con miglior capacità fecondante e consentirebbe di garantire migliori probabilità di successo alle procedure di fecondazione assistita (43). L'associazione di questa tecnica alla ICSI prende il nome di IMSI (*intracytoplasmic morphologically-selected sperm injection*). Ad oggi sono disponibili alcuni dati circa i risultati di questa metodica. Il primo studio riporta che quando l'analisi degli spermatozoi ad alto ingrandimento mostra una morfologia normale inferiore al 20%, mediante ICSI non sarebbe possibile ottenere gravidanze (42). Studi successivi riferiscono un incremento nelle percentuali di fertilizzazione, nonostante vi siano ancora esperienze discordanti circa i risultati in termini di qualità embrionaria (42-44). Tuttavia sembra che tutti gli autori siano concordi nel riportare che nella popolazione di soggetti trattati con IMSI vi sono migliori tassi di impianto e di gravidanze cliniche e una riduzione della percentuale di aborti (42-46). Inoltre, gli studi più recenti indicano che nei soggetti che non presentano spermatozoi normali all'analisi ad alto ingrandimento i risultati della ICSI sarebbero molto scarsi (43, 44).

Nonostante tutte le metodiche citate sembrano portare ad un incremento della percentuale di bambini nati, la IMSI attualmente sembra essere la tecnica che ha riscosso più consensi e sulla quale sono state acquisite le maggiori esperienze applicative. Tuttavia questa metodica di selezione non prende in considerazione la possibilità che il campione seminale sia privo di spermatozoi mobili, evenienza non impossibile nei soggetti affetti da gradi molto severi di testicolopatia. Inoltre, essa non consente di valutare la funzionalità e la struttura di queste cellule dopo la selezione e prima del loro utilizzo. A questo scopo un nostro recente studio ha cercato di valutare dopo selezione ad altissimo ingrandimento, la funzionalità spermatica e la percentuale di aneuploidie in spermatozoi di soggetti con criptozoospermia e assenza di motilità per severa testicolopatia primaria (45). In questo studio, l'isolamento e la valutazione di singoli spermatozoi

caratterizzati in base alla morfologia ad altissimo ingrandimento (oltre 13000x) è stata ottenuta con un invertoscio (Nikon Eclipse TE2000-U) mediante obiettivo planare Apo X100/1.40 ad immersione, e una lente condensatore a 0.52 NA con l'ottica Normarski. Tale ingrandimento era determinato da 5 parametri: a) ingrandimento dell'obiettivo 100X; b) selettore d'ingrandimento 1.5X; c) passo C 2X; d) diagonale del chip CCD di 11mm; e) dimensione della diagonale del monitor di 482.6mm, pari ad un ingrandimento ottenuto a video (b/a) di 43.87. L'ingrandimento finale era pertanto di 13161X [ingrandimento del microscopio (150X)] x [passo C (2X)] x [ingrandimento video (43.87X)]. Dal campione seminale di 10 pazienti dopo valutazione ad altissimo ingrandimento, sono stati isolati mediante l'utilizzo di un micromanipolatore 100 spermatozoi con normale morfologia e presenza di almeno un vacuolo nucleare e 100 con normale morfologia e assenza di vacuoli, per un totale di 200 cellule. Su ogni singolo spermatozoo sono stati effettuati i test di apoptosi che valutano l'esternalizzazione della fosfatidilserina, la funzionalità mitocondriale, l'integrità cromatinica, la frammentazione del DNA nucleare e la valutazione delle aneuploidie spermatiche (Figura 1).

Figura 1 Determinazione dello stato funzionale degli spermatozoi, valutato su singola cellula dopo selezione a 13000x: alterato (A) e normale (B) potenziale di membrana mitocondriale (MitoSensor test); alterata (C) e normale (D) integrità cromatinica (test con Arancio di Acridina); alterata (E) e normale (F) integrità cromatinica (test di TUNEL).



I risultati ottenuti hanno confermato che la funzionalità mitocondriale, lo stato di frammentazione e l'integrità del DNA spermatico sono alterate nei pazienti con severo danno testicolare e che in questi soggetti è presente un'elevata percentuale di spermatozoi aneuploidi. L'analisi delle singole cellule ad altissimo ingrandimento ha messo in luce che gli spermatozoi con normale morfologia

hanno più frequentemente una normale funzione mitocondriale, una adeguata struttura cromatinica e basse percentuali di aneuploidie. Inoltre, è stato documentato che questi parametri migliorano ulteriormente considerando solo gli spermatozoi senza vacuoli nucleari. Infine, è di estrema importanza il dato che gli spermatozoi con normale morfologia e assenza di vacuoli non presentano aneuploidie.

In conclusione sembra che vi sia una stretta relazione tra i vari aspetti funzionali dello spermatozoo e le caratteristiche morfologiche valutate ad altissimo ingrandimento. Ciascuna delle tecniche descritte pur con indicazioni diverse (Tabella 2), sembra in grado di selezionare spermatozoi potenzialmente migliori, allo scopo di incrementare l'efficacia e la sicurezza del loro utilizzo con la ICSI. Pertanto ciascuna di esse da sola o in associazione con le altre, potrebbe trovare indicazione nelle seguenti condizioni cliniche: a) elevata percentuale di aneuploidie spermatiche; b) elevati tassi di frammentazione del DNA; c) ripetuti fallimenti di procedure ICSI; d) casi con alterazione molto marcata dei parametri seminali da severa testicolopatia. I dati della letteratura suggeriscono che la IMSI è attualmente la tecnica più utilizzata e sulla quale sono state acquisite le maggiori esperienze cliniche. Tuttavia, questa metodica richiede costi e tempi di esecuzione che ad oggi non possono essere sopportati da tutti i centri di medicina della riproduzione. Pertanto, la crioconservazione dei singoli spermatozoi selezionati ad altissimo ingrandimento in centri di elevata specializzazione, potrebbe permettere l'applicazione di questa tecnica a tutte le strutture che lo richiedano.

Tabella 2. Indicazione alle tecniche di selezione in base alle caratteristiche seminali.

TECNICA	Caratteristiche seminali
Acido ialuronico	Oligoastenoteratozoospermia con ≥ 2 milioni di spermatozoi mobili
MACS	Oligoastenoteratozoospermia con ≥ 5 milioni di spermatozoi mobili
Birifrangenza	Oligoastenoteratozoospermia grave Criptozoospermia Spermatozoi recuperati da testicolo o epididimo
IMSI	Oligoastenoteratozoospermia grave solo se presenti spermatozoi mobili

Bibliografia

1. Shen H and Ong C. Detection of oxidative DNA damage in human sperm and its association with sperm function and male infertility. *Free Radic Biol Med* 2000;28:529-536.
2. Spano M, Bonde JP, Hjollund HI, Kolstad HA, Cordelli E and Leter G. Sperm chromatin damage impairs human fertility. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *Fertil Steril* 2000;73:43-50.
3. Zini A, Libman J. Sperm DNA damage: clinical significance in the era of assisted reproduction. *CMAJ* 2006;175:495-500.
4. Irvine DS, Twigg JP, Gordon EL, Fulton N, Milne PA and Aitken RJ. DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *J Androl* 2000 ;21:33-44.
5. Zini A, Bielecki R, Phang D and Zenzes MT. Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men. *Fertil Steril* 2001;75:674-677.
6. Bonduelle M, Camus M, De Vos A, Staessen C, Tournaye H, Van Assche E, Verheyen G, Devroey P, Liebaers I, Van Steirteghem A. Seven years of intracytoplasmic sperm injection and follow-up of 1987 subsequent children. *Hum Reprod* 1999;1:243-64.
7. Silver RI, Rodriguez R, Chang TS and Gearhart JP. In vitro fertilization is associated with an increased risk of hypospadias. *J Urol* 1999;161:1954-1957.
8. Hansen M, Kurinczuk JJ, Bower C and Webb S. The risk of major birth defects after intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization. *N Engl J Med* 2002;346:725-730.
9. Loutradi KE, Tarlatzis BC, Goulis DG, Zepiridis L, Pagou T, Chatziioannou E, Grimbizis GF, Papadimas I and Bontis I. The effects of sperm quality on embryo development after intracytoplasmic sperm injection. *J Assist Reprod Genet* 2006;23:69-74.
10. Verpoest W and Tournaye H. ICSI: hype or hazard? *Hum Fertil* 2006;9:81-92.

11. In't Veld P, Branderburg H, Verhoeff A, Dhont M, Los F. Sex chromosomal anomalies and intracytoplasmic sperm injection. *Lancet* 1995;346:773.
12. Liebaers J, Bonduelle M, Van Assche E, Devroey P, Van Steirteghem A. Sex chromosome abnormalities after intracytoplasmic sperm injection. *Lancet* 1995;346:1095.
13. Loft A, Petersen K, Erb K, Mikkelsen AL, Grinsted J, Hald F, Hindkjaer J, Nielsen KM, Lundstrom P, Gabrielsen A, Lenz S, Hornnes P, Ziebe S, Ejdrup HB, Lindhard A, Zhou Y, Nyboe Andersen A. Danish cohort of 730 infants born after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) 1994–1997. *Hum Reprod* 1999;14:2143–2148.
14. Foresta C, Garolla A, Bartoloni L, Bettella A, Ferlin A. Genetic abnormalities among severely oligospermic men who are candidates for intracytoplasmic sperm injection. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90:152-6.
15. Berkovitz A, Eltes F, Ellenbogen A, Peer S, Feldberg D, Bartoov B. Does the presence of nuclear vacuoles in human sperm selected for ICSI affect pregnancy outcome? *Hum Reprod* 2006;21,1787-1790.
16. Guthauser B, Vialard F, Dakouane M, Izard V, Albert M and Selva J. Chromosomal analysis of spermatozoa with normal-sized heads in two infertile patients with macrocephalic sperm head syndrome. *Fertil Steril* 2006;85,750.e5-750.e7.
17. Hazout A, Dumont-Hassan M, Junca AM, Cohen Bacrie P, Tesarik J. High-magnification ICSI overcomes paternal effect resistant to conventional ICSI. *Reprod Biomed Online* 2006;12:19-25.
18. Ubaldi F, Rienzi L. Morphological selection of gametes. *Placenta.* 2008;29,115-120.
19. Jakab A, Sakkas D, Delpiano E, Cayli S, Kovanci E, Ward D, Revelli A, Huszar G. Intracytoplasmic sperm injection: a novel selection method for sperm with normal frequency of chromosomal aneuploidies. *Fertil Steril* 2005;84:1665-1673.
20. Huszar G, Stone K, Dix D, Vigue L. Putative creatine kinase M-isoform in human sperm is identified as the 70-kilodalton heat shock protein HspA2. *Biol Reprod* 2000;63:925-932.
21. Huszar G, Ozenci CC, Cayli S, Zavaczki Z, Hansch E, Vigue L. Hyaluronic acid binding by human sperm indicates cellular maturity, viability, and unreacted acrosomal status. *Fertil Steril* 2003;79:1616-1624.
22. Dix DJ, Allen JW, Collins BW, Mori C, Nakamura N, Poorman-Allen P, Goulding EH, Eddy EM. Targeted gene disruption of Hsp70-2 results in failed meiosis, germ cell apoptosis, and male infertility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:3264-3268.
23. Allen JW, Dix DJ, Collins BW, Merrick BA, He C, Selkirk JK, Poorman-Allen P, Dresser ME, Eddy EM. HSP70-2 is part of the synaptonemal complex in mouse and hamster spermatocytes. *Chromosoma* 1996;104:414-421.
24. Cayli S, Sakkas D, Vigue L, Demir R, Huszar G. Cellular maturity and apoptosis in human sperm: creatine kinase, caspase-3 and Bcl-XL levels in mature and diminished maturity sperm. *Mol Hum Reprod* 2004;10:365-372.
25. Huszar G, Ozkavukcu S, Jakab A, Celik-Ozenci C, Sati GL, Cayli S. Hyaluronic acid binding ability of human sperm reflects cellular maturity and fertilizing potential: selection of sperm for intracytoplasmic sperm injection. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2006;18:260-267.
26. Huszar G, Jakab A, Sakkas D, Ozenci CC, Cayli S, Delpiano E, Ozkavukcu S. Fertility testing and ICSI sperm selection by hyaluronic acid binding: clinical and genetic aspects. *Reprod Biomed Online* 2007;14:650-663.
27. Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Vahdati AA, Fathi F, Tavalae M. Evaluation of sperm selection procedure based on hyaluronic acid binding ability on ICSI outcome. *J Assist Reprod Genet* 2008;25:197-203.
28. Tesarik J, Greco E, Mendoza C. Assisted reproduction with in-vitro-cultured testicular spermatozoa in cases of severe germ cell apoptosis: a pilot study. *Hum Reprod* 2001;16:2640-2645.
29. Barroso G, Taylor S, Morshedi M, Manzur F, Gaviño F, Oehninger S. Mitochondrial membrane potential integrity and plasma membrane translocation of phosphatidylserine as early apoptotic markers: a comparison of two different sperm subpopulations. *Fertil Steril* 2006;85:149-154.
30. Said TM, Agarwal A, Zborowski M, Grunewald S, Glander HJ, Paasch U. Utility of magnetic cell separation as a molecular sperm preparation technique. *J Androl* 2008;29:134-142.
31. Dirican EK, Ozgün OD, Akarsu S, Akin KO, Ercan O, Uğurlu M, Camsari C, Kanyilmaz O, Kaya A, Unsal A. Clinical outcome of magnetic activated cell sorting of non-apoptotic spermatozoa before density gradient centrifugation for assisted reproduction. *J Assist Reprod Genet.* 2008;25:375-381.
32. Gadella BM, Harrison RA. Capacitation induces cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent, but apoptosis-unrelated, exposure of aminophospholipids at the apical head plasma membrane of boar sperm cells. *Biol Reprod* 2002;67:340-350.
33. de Vries KJ, Wiedmer T, Sims PJ, Gadella BM. Caspase-independent exposure of aminophospholipids and tyrosine phosphorylation in bicarbonate responsive human sperm cells. *Biol Reprod* 2003;68:2122-2134.
34. Baccetti B. Microscopical advances in assisted reproduction. *J Submicrosc Cytol Pathol* 2004;36:333-339.
35. Gianaroli L, Magli MC, Collodel G, Moretti E, Ferraretti AP, Baccetti B. Sperm head's birefringence: a new criterion for sperm selection. *Fertil Steril* 2008;90:104-112.

36. Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Crippa A, Lappi M, Capitani S, Baccetti B. Birefringence characteristics in sperm heads allow for the selection of reacted spermatozoa for intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2008;Epub ahead of print.
37. Mansour RT, Aboulghar MA, Serour GI, Amin YM, Ramzi AM. The effect of sperm parameters on the outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1995;64:982-986.
38. Nagy ZP, Liu J, Joris H, Verheyen G, Tournaye H, Camus M, Derde MC, Devroey P, Van Steirteghem AC. The result of intracytoplasmic sperm injection is not related to any of the three basic sperm parameters. *Hum Reprod* 1995;10:1123-1129.
39. Küpker W, Schulze W, Diedrich K. Ultrastructure of gametes and intracytoplasmic sperm injection: the significance of sperm morphology. *Hum Reprod* 1998;13:99-106.
40. Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F, Kogosowski A, Menezo Y, Barak Y. Real-time fine morphology of motile human sperm cells is associated with IVF-ICSI outcome. *J Androl* 2002;23:1-8.
41. Berkovitz A, Eltes F, Yaari S, Katz N, Barr I, Fishman A, Bartoov B. The morphological normalcy of the sperm nucleus and pregnancy rate of intracytoplasmic injection with morphologically selected sperm. *Hum Reprod* 2005;20:185-190.
42. Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F, Kogosovsky A, Yagoda A, Lederman H, Artzi S, Gross M, Barak Y. Pregnancy rates are higher with intracytoplasmic morphologically selected sperm injection than with conventional intracytoplasmic injection. *Fertil Steril* 2003;80:1413-1419.
43. Berkovitz A, Eltes F, Lederman H, Peer S, Ellenbogen A, Feldberg B, Bartoov B. How to improve IVF-ICSI outcome by sperm selection. *Reprod Biomed Online* 2006;12:634-638.
44. Antinori M, Licata E, Dani G, Cerusico F, Versaci C, d'Angelo D, et al. Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection: a prospective randomized trial. *RBMOnline*. 2008;16:835-841.
45. Garolla A, Fortini D, Menegazzo M, De Toni L, Nicoletti V, Moretti A, Selice R, Engl B, Foresta C. High-power microscopy for selecting spermatozoa for ICSI by physiological status. *Reprod Biomed Online* 2008;17:610-616.

INDICAZIONI E METODI DI CONGELAMENTO DEGLI SPERMATOZOI

Introduzione

I primi tentativi di congelamento del seme, da parte di Spallanzani e Mantegazza, risalgono a circa 200 anni fa, anche se si può iniziare a parlare ufficialmente di crioconservazione solo a partire dal 1946 quando Polge scopre le proprietà crioprotettive del glicerolo mentre nel 1953 vengono ottenuti da Sherman i primi successi in termini di gravidanze (1). La crioconservazione del seme o del tessuto testicolare rappresenta una tecnica che permette di conservare i gameti maschili per un tempo indefinito a -196°C e rappresenta un formidabile strumento per i pazienti che si sottopongono a trattamenti medici o chirurgici potenzialmente in grado di indurre sterilità e per i pazienti affetti da azoospermia secretoria o escretoria che possono accedere alle tecniche di fecondazione assistita.

Aspetti metodologici

Il maggiore problema biologico della crioconservazione è rappresentato dal possibile danno sui meccanismi di controllo delle attività molecolari. Infatti, tutti i processi vitali si svolgono in seguito a modificazioni biochimiche che avvengono grazie a movimenti molecolari in ambiente acquoso; tali movimenti vengono bloccati quando l'acqua intra ed extra cellulare si trasforma in ghiaccio, creando uno stato di "animazione sospesa", che consente la conservazione delle cellule per periodi di tempo variabili. Perché ciò avvenga è necessario seguire specifiche procedure. Infatti, le cellule vitali esposte a basse temperature subiscono danni irreversibili che ne provocano la morte e per ovviare a tali danni si ricorre in criobiologia a specifiche metodologie che prevedono l'uso di crioprotettori e di procedure di congelamento e scongelamento idonee, al fine di proteggere il materiale biologico dallo shock termico.

In campo seminologico la possibilità di congelare la cellula nemaspermica è basata sull'impiego di terreni di crioconservazione, costituiti da specifiche sostanze che hanno lo scopo di preservare lo spermatozoo dalla disidratazione e dall'aumento della concentrazione di sali (glicerolo, glicina, saccarosio, ecc.), di proteggerlo dallo shock termico (tuorlo d'uovo, glicerolo, glicina), di salvaguardare l'integrità della membrana cellulare, soprattutto nella parte lipoproteica (tuorlo d'uovo, glicerolo) e di ottimizzare l'osmolarità nei fluidi extracellulari (zuccheri, sali, ecc) (2).

Metodiche di congelamento

Per quanto riguarda le metodiche di congelamento, le tecniche maggiormente utilizzate sono: 1) il metodo rapido, proposto per la prima volta da Sherman (1), in cui le paillettes vengono lasciate a contatto dei vapori di azoto per circa 8 min e, quindi, immerse in azoto liquido a -196°C ; 2) il metodo lento, proposto da Behrman e Sawada, in cui il campione seminale viene portato a 4°C in 20-30 min, quindi a -40°C in 5-10 min e, finalmente, immerso in azoto liquido a -196°C ; 3) il metodo lento automatizzato che impiega dei sistemi computerizzati nei quali il campione seminale viene gradualmente raffreddato ad una velocità di abbassamento della temperatura compresa fra 1°C e $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ sino ad arrivare all'immersione finale in azoto liquido a -196°C .

La tecnica di crioconservazione del seme più utilizzata è schematizzata nella Tabella 1.

Tabella 1. Tecnica di crioconservazione del seme (metodo di Sherman) (1).

-
- Diluire goccia a goccia, con terreno crioprotettivo, il campione di liquido seminale, al termine della fluidificazione alla diluizione 1:2 e miscelare delicatamente.
 - Lasciare la sospensione così ottenuta a T ambiente per 15 min.
 - Aspirare la sospensione nelle paillettes con la pompa a vuoto.
-

-
- Sigillare le paillettes con la sigillatrice e marcarle con specifico codice identificativo.
 - Inserire le paillettes nella rastrelliera.
 - Inserire il dispositivo di crioconservazione nel contenitore dell'azoto.
 - Far discendere lentamente le paillettes sino a raggiungere la superficie dell'azoto, quindi, sollevare lentamente la rastrelliera al di sopra del livello dell'azoto.
 - Lasciare nei vapori di azoto circa 8 min .
 - Immergere lentamente le paillettes nell'azoto liquido.
 - Estrarre lentamente le paillettes dall'azoto e trasferirle negli appositi cestelli.
-

Per quanto riguarda gli spermatozoi ottenuti mediante prelievo testicolare, il materiale bioptico, posto in una capsula di Petri contenente terreno di coltura, viene sminuzzato in piccoli frammenti con aghi o vetrini portaoggetti e poi osservato al microscopio invertito per evidenziare la presenza di spermatozoi. Tale terreno di coltura viene aspirato e trasferito in una provetta sterile e lasciato sedimentare, il surnatante viene lavato con lo stesso terreno di coltura e quindi diluito goccia a goccia con il terreno di crioconservazione alla diluizione 1:2. La sospensione viene miscelata delicatamente e poi aspirata nelle paillettes che vengono sigillate e poi congelate secondo il metodo rapido o lento. Il tessuto testicolare residuo viene ulteriormente sminuzzato mediante il passaggio ripetuto in speciali cateteri radiopachi e successivamente diluito e congelato secondo la metodologia descritta precedentemente.

La tecnica di scongelamento è un punto altrettanto importante perché deve consentire alle cellule di recuperare le normali attività biologiche limitando quanto più possibile rapide differenze di temperatura. Infatti, al fine di evitare bruschi sbalzi termici è necessario estrarre lentamente le paillettes dall'azoto liquido e consentire il raggiungimento dell'equilibrio termico tra materiale cellulare ed ambiente esterno. Attualmente vengono impiegate varie tecniche di scongelamento, tra cui ricordiamo: lo scongelamento a T ambiente per 10 min e il successivo passaggio in termostato a 37°C per altri 10 min; lo scongelamento in termostato a bagnomaria a 37°C per 10 min; lo scongelamento a T ambiente (22°C) per 15 min.

Il paziente che crioconserva il proprio seme deve essere sottoposto ad uno screening infettivologico (Tab. 2) al fine di evitare la potenziale dispersione di microorganismi nel contenitore di crioconservazione ed il potenziale inquinamento degli altri campioni seminali in esso contenuti (3).

La crioconservazione del liquido seminale può avvenire esclusivamente per spontanea volontà del soggetto depositante ed al solo scopo della futura utilizzazione personale, tramite il ricorso alla procreazione assistita, sulla propria partner consenziente. Al fine di evitare conseguenze giuridiche è indispensabile far sottoscrivere e firmare al paziente un consenso informato in cui sia precisato, fra l'altro, il periodo di scadenza al termine del quale il paziente, se lo desidera, può rinnovare il deposito, che il seme crioconservato è di proprietà esclusiva di colui che deposita e che può essere richiesto e ritirato solo dal legittimo proprietario.

Tabella 2. Analisi infettive da effettuare prima della crioconservazione del seme.

SCREENING EPATITE B

- HBsAg (Antigene Australia)
 - HBsAb (Anticorpi anti HBs)
 - HBeAg (Antigene Hbe)
 - HBeAb (Anticorpi anti Hbe)
 - HBcAg (Antigene HBc)
 - HBcAb (Anticorpi anti HBc)
 - HBc IgM (Anticorpi anti Core IgM)
-

SCREENING EPATITE C

- Anticorpi anti – HCV
- HCV-RNA Qualitativo (solo in caso di positività agli Ab)

SCREENING CITOMEGALOVIRUS

- Anticorpi anti IgG
- Anticorpi anti IgM

SCREENING HIV

- Anticorpi anti - HIV
-

Indicazione alla criconservazione del seme e del tessuto testicolare

La criconservazione nelle “banche del seme” può essere “omologa” se viene criconservato il seme del soggetto stesso che poi impiegherà gli spermatozoi o “eterologa” se un donatore deposita il seme che poi verrà utilizzato da una coppia estranea al donatore stesso. Peraltro quest’ultima forma di donazione non è più effettuabile nel nostro Paese, secondo quanto previsto dall’ art. 4, comma 3 della legge 40/2004 “Norme in Materia di Riproduzione Medicalmente Assistita”.

Le principali indicazioni alla criconservazione omologa del seme e del tessuto testicolare sono riportate nella tabella 3.

Tabella 3. Principali indicazioni alla criconservazione del seme.

1. Pazienti affetti da patologie neoplastiche o autoimmuni che si sottopongono a terapie in grado di causare sterilità transitoria o permanente
 2. Pazienti affetti da patologie urologiche che si devono sottoporre ad interventi chirurgici in grado di alterare i meccanismi dell’eiaculazione
 3. Pazienti con lesioni del midollo spinale
 4. Pazienti con OAT che presentano transitori miglioramenti della qualità del seme
 5. Pazienti che presentano una alterazione progressiva della qualità del seme
 6. Pazienti criptozoospermici
 7. Pazienti con patologie andrologiche rare (S. di Klinefelter, S. di Kennedy, ecc.)
 8. Pazienti che hanno difficoltà (psicologiche o logistiche) a raccogliere il liquido seminale il giorno della fecondazione assistita
 9. Soggetti che per motivi di lavoro sono esposti a sostanze genotossiche
 10. Soggetti che si sottopongono a vasectomia
-

Pazienti affetti da patologie neoplastiche

La criconservazione del seme è diventata una tappa fondamentale nella gestione dei pazienti neoplastici che si sottopongono a terapie potenzialmente in grado di indurre sterilità (4). I pazienti oncologici in età fertile, pur dovendo affrontare un problema molto grave, trovano nella criconservazione del seme non solo la speranza di una fertilità futura ma anche un sostegno psicologico per affrontare le varie fasi dei protocolli terapeutici. I progressi nella terapia anti-neoplastica e le sempre più sofisticate tecniche di Fecondazione Assistita hanno aperto nuove possibilità riproduttive per il maschio infertile e, quindi, la criconservazione del seme si impone anche nei casi di liquidi seminali gravemente alterati che non avrebbero avuto nessuna possibilità di fecondare in epoca pre-ICSI. È, pertanto, imperativo informare il paziente neoplastico di questa possibilità in caso di terapie che possono ledere in modo irreversibile la capacità fecondante ed è altrettanto imperativo eseguire la criconservazione prima dell’inizio di qualsiasi terapia.

In caso di patologie neoplastiche testicolari il “periodo finestra” utile per una corretta crioconservazione è quello fra l'intervento chirurgico di orchietomia e l'inizio della chemio o radioterapia. In caso di altre patologie tumorali, degenerative o autoimmuni il deposito del seme deve essere comunque eseguito prima di qualunque terapia che possa interferire con la spermatogenesi e con l'integrità del genoma (4).

Un problema che è stato sollevato ed a cui è difficile dare una risposta definitiva è quello legato alla possibilità che vi possa essere un rischio aumentato di alterazioni genetiche nella prole dei pazienti affetti da patologie neoplastiche. I dati provenienti dai centri di fecondazione assistita ad oggi disponibili indicano che non vi sarebbe un aumento del rischio e di malformazioni nei nati da ICSI con spermatozoi crioconservati. Tuttavia il numero dei casi valutati non è sufficiente per rispondere in maniera definitiva e tranquillizzante a tale questione (5).

Pazienti affetti da patologie urologiche che si devono sottoporre ad interventi chirurgici in grado di alterare i meccanismi dell'eiaculazione

La prostatectomia si associa spesso ad eiaculazione retrograda, cioè al passaggio dello sperma, al momento dell'eiaculazione, in vescica, piuttosto che all'esterno come di norma. Essa è dovuta alla perdita del meccanismo di chiusura del collo vescicale e comporta l'impossibilità di procreare mentre si mantiene normale l'erezione. Tale condizione si verifica nell'80-90% dei pazienti operati di adenomectomia transvescicale (6). Ovviamente, anche in questo caso, la crioconservazione preventiva del liquido seminale, può ovviare all'eventuale impotenza generandi a cui vanno incontro questi soggetti.

Pazienti che si sottopongono a vasectomia

La vasectomia rappresenta un metodo contraccettivo invasivo e spesso irreversibile ed, ad oggi, poco utilizzato. Anche se la coppia si trova nella necessità di fare una scelta definitiva sulla sua capacità procreativa, varie circostanze (morte di un figlio o della partner, separazione dalla partner e nuovo desiderio di paternità) possono portare ad un ripensamento con conseguente desiderio di ricanalizzazione mediante vaso-vasostomia o vaso-epididimostomia. La crioconservazione in questi casi può consentire la possibilità di fertilità nel caso l'intervento di ricanalizzazione non portasse ai risultati sperati (7).

Pazienti con lesioni del midollo spinale

Un gruppo di pazienti sicuramente meno rappresentato ed, a volte, trascurato è quello con lesioni del midollo spinale e conseguente perdita della capacità eiaculatoria. In questi casi è possibile raccogliere il seme mediante vibromassaggio applicando un intenso stimolo vibratorio a livello della superficie dorsale e ventrale del glande e sull'area peno scrotale oppure, in caso di fallimento, mediante elettrostimolazione per via rettale; quest'ultima tecnica richiede nel 25% dei casi un'anestesia generale in particolare nei pazienti con sensibilità conservata e/o lesioni incomplete. E' quindi una metodica complessa che richiede personale medico e paramedico adeguatamente addestrato e, non ultimo, risulta particolarmente costosa. Per tali motivi la crioconservazione del seme può offrire ai pazienti il grande vantaggio di non doversi sottoporre più volte a questi trattamenti e di potere usufruire di spermatozoi impiegabili in tecniche di fecondazione assistita (8).

Pazienti che si sottopongono a programmi di fecondazione assistita.

Da quando sono state introdotte le tecniche di fecondazione artificiale ed in particolare la ICSI (intra cytoplasmic sperm injection) (9) il trattamento della sterilità maschile si è andato modificando. Infatti in epoca pre-ICSI le forme di infertilità da grave fattore maschile (severa

oligoastenoteratozoospermia o azoospermia) avevano inevitabilmente una prognosi sfavorevole. Una autentica rivoluzione in questo campo è avvenuta quando è stato messo a punto il prelievo microchirurgico di spermatozoi epididimari con la conseguente possibilità di recuperare ed impiegare in una tecnica di fecondazione assistita spermatozoi provenienti da pazienti azoospermici. Oggi esistono varie tecniche che consentono il recupero degli spermatozoi sia dall'epididimo che direttamente dal testicolo (TESE, TESA, MESA, PESA). Tali tecniche di recupero degli spermatozoi sono applicate nei casi di azoospermia ostruttiva che non possono essere trattati con successo con la microchirurgia ricostruttiva o nei casi di severissima oligoastenoteratozoospermia o azoospermia ipergonodotropa da sindrome a sole cellule di Sertoli focale o da arresto incompleto della spermatogenesi; in questi ultimi casi la spermatogenesi è talmente compromessa da non consentire la presenza di spermatozoi nell'eiaculato ma, a volte, è possibile trovare piccoli focolai di spermatogenesi intratesticolare con possibile impiego nelle tecniche di fecondazione assistita (10). Ovviamente la crioconservazione degli spermatozoi non impiegati o dei frammenti di tessuto testicolare ottenuto da biopsie consente al paziente di evitare ulteriori trattamenti invasivi. In conclusione, la crioconservazione del tessuto testicolare può inserirsi in un programma di fecondazione assistita oppure nella biopsia testicolare, ultimo livello dell'iter diagnostico dell'azoospermia escretoria o secretoria. Infatti, nel primo caso consente di avere la certezza di poter utilizzare gli spermatozoi del partner al momento del prelievo ovocitario e, nel secondo caso, se affianca il prelievo bioptico eseguito a fini diagnostici, consente al paziente di non subire una seconda biopsia in sede di fecondazione assistita.

Conclusioni

In conclusione la crioconservazione del seme rappresenta uno dei più importanti presidi che abbiamo oggi a disposizione per garantire una possibile futura fertilità a pazienti che in passato sarebbero stati condannati alla sterilità. Come abbiamo visto questo è soprattutto vero nel caso dei pazienti affetti da patologie neoplastiche i quali si trovano ovviamente in un momento di grandissimo sconforto fisico e psicologico; poter garantire un futuro fertile a tali pazienti può rappresentare uno spiraglio di serenità e di incoraggiamento per affrontare le difficoltà del momento. A tal fine è assolutamente necessario sensibilizzare gli oncologi e gli ematologi che più spesso vengono a contatto con questa tipologia di pazienti affinché prospettino tale eventualità ed è indispensabile che ogni regione si fornisca di una efficiente banca del seme in modo da soddisfare nei tempi più brevi possibili e con il più alto grado di professionalità, le sempre maggiori richieste di crioconservazione. Proprio al fine di diffondere l'impiego della crioconservazione del seme e per aumentare più possibile gli standard di effettuazione di tale pratica è stata istituita la European Association of Tissue Bank (EATB) una associazione non profit che, come si legge nel suo statuto, si propone di promuovere la cooperazione, la ricerca e lo sviluppo delle "tissue banking" in Europa.

Bibliografia

1. Sherman JF. Cryopreservation of Human Semen. In Keel BA, Webster BW (Eds). Handbook of the Laboratory Diagnosis and Treatment of Infertility. CRC Press, Boca Raton, 1990, p. 229.
2. Shufaro Y, Schenker JG. Cryopreservation of human genetic material. Ann N Y Acad Sci. 2010 Sep;1205:220-4.
3. Bielanski A, Vajta G. Risk of contamination of germplasm during cryopreservation and cryobanking in IVF units. Hum Reprod. 2009 Oct;24(10):2457-67.
4. Gandini L, Lombardo F, Salacone P, Paoli D, Anselmo AP, Culasso F, Dondero F, Lenzi A. Testicular cancer and Hodgkin's disease: evaluation of semen quality. Hum Reprod 18(4):796, 2003.
5. Revel A, Haimov-Kochman R, Porat A, Lewin A, Simon A, Laufer N, Gino H, Meirou D. In vitro fertilization-intracytoplasmic sperm injection success rates with cryopreserved sperm from patients with malignant disease. Fertil Steril. 2005 Jul;84(1):118-22.

6. Johnson EK, Hedgepeth RC, He C, Wood DP. The Impact of Anterior Urethropexy During Robotic Prostatectomy on Urinary and Sexual Outcomes. *J Endourol.* 2010 Dec 2. [Epub ahead of print].
7. Pisipati S, Pearcy R. The role of urological surgery in male infertility. *Hum Fertil (Camb).* 2010 Dec;13(4):233-41.
8. Restelli AE, Bertolla RP, Spaine DM, Miotto A Jr, Borrelli M Jr, Cedenho AP. Quality and functional aspects of sperm retrieved through assisted ejaculation in men with spinal cord injury. *Fertil Steril.* 2009 Mar;91(3):819-25
9. Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 340(8810):17, 1992.
10. Semião-Francisco L, Braga DP, Figueira Rde C, Madaschi C, Pasqualotto FF, Iaconelli A Jr, Borges E Jr. Assisted reproductive technology outcomes in azoospermic men: 10 years of experience with surgical sperm retrieval. *Aging Male.* 2010 Mar;13(1):44-50.