

2. Valutazione di alcune funzioni spermatiche in aggiunta ai parametri dello spermogramma

Le funzioni spermatiche necessarie per una corretta fecondazione dell'ovocita sono numerose e vanno dalla motilità iperattivata, necessaria per la penetrazione del cumulo ooforo, al processo di fusione con l'olemma (Fig. 1)

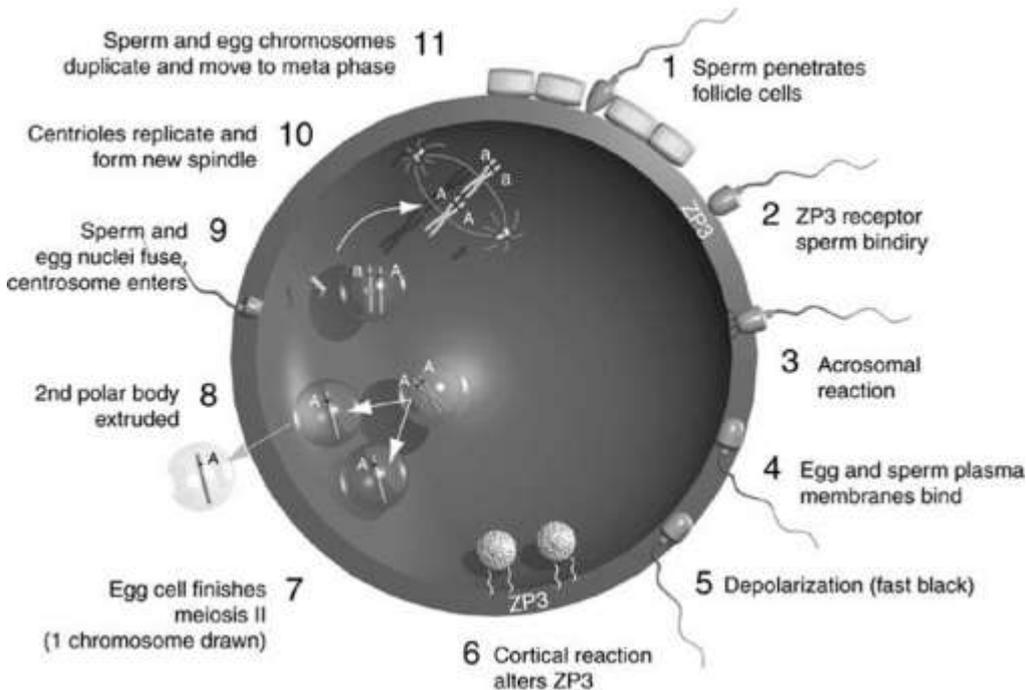


Figura 1: I vari step del processo di fecondazione

Difetti delle funzioni dello spermatozoo che impediscano la realizzazione di uno solo di questi step provocheranno la mancata fecondazione dell'ovocita. Negli anni sono stati sviluppati dei test in grado di studiare la capacità degli spermatozoi di oltrepassare ciascuno di questi step, al fine di identificare il o i difetti spermatici dei soggetti con bassa o nulla capacità fecondante. L'avvento della tecnica ICSI, che oltrepassa tutti gli step della fecondazione, ha fatto cadere in disuso questi test [EB1].

a. **motilità iperattivata (de santis)**

b. **Capacitazione**. Come è noto, lo spermatozoo appena eiaculato ha una limitata capacità fecondante in quanto deve andare incontro ad una serie di complesse modificazioni che riguardano l'assetto della membrana citoplasmatica e l'attivazione di vie di segnalazione intracitoplasmatiche note collettivamente come processo di capacitazione. Tale processo avviene durante l'attraversamento delle vie genitali femminili nel caso della fecondazione naturale ma può anche essere ottenuto in vitro in appositi mezzi di coltura ed è necessario per preparare lo spermatozoo a rispondere agli stimoli che inducono la reazione acrosomiale e per l'ottenimento della motilità iperattivata. Il processo di capacitazione avviene sotto una complicata regolazione di vari fattori (per una trattazione completa e aggiornata sul processo di capacitazione si veda Jin and Yang 2016). Gli studi in vitro hanno evidenziato l'attivazione di numerose vie di segnalazione ma certamente, tra queste, le più importanti riguardano l'incremento intracitoplasmatico della concentrazione dello ione calcio, la rimozione di colesterolo dalle membrane (che avviene grazie alla presenza di proteine nel mezzo di coltura quale l'albumina e che rende più fluida la membrana stessa

preparandola all'evento di fusione con la membrana acrosomiale durante la reazione acrosomiale) e l'attivazione, ad opera del bicarbonato, dell'adenilato ciclastasi solubile presente negli spermatozoi, che aumentando la concentrazione dell'AMPc favorisce una serie di processi che porta ad un incremento della fosforilazione di alcune proteine della coda. Appare chiaro che il completamento del processo di capacitazione è necessario per la fecondazione, in vivo ed in vitro, dell'ovocita.

La capacitazione può essere studiata in vitro con vari metodi, di cui il più usato è il test CTC (chlortetracycline), che prevede, dopo capacitazione degli spermatozoi in un mezzo capacitante a 37°C, una colorazione con CTC fluorescente (Green et al., 1994) e la rivelazione al microscopio a fluorescenza della percentuale di spermatozoi che presentano i tre diversi pattern di colorazione, ovvero pattern F (fluorescenza diffusa su tutta la testa dello spermatozoo) tipico degli spermatozoi appena eiaculati non capacitati, pattern B (fluorescenza limitata alla regione acrosomiale) tipica degli spermatozoi capacitati e pattern AR (fluorescenza limitata al segmento equatoriale) indicativo dell'avvenuta reazione acrosomiale. La percentuale di spermatozoi con pattern B sarà dunque indicativa degli spermatozoi in cui è avvenuta la capacitazione.

Da notare che la ditta Androvia Life Science sta sviluppando un test (Cap-Score™ Sperm Function Test, che dovrebbe essere in commercio a breve come kit) che valuta la capacitazione degli spermatozoi basandosi sul pattern di localizzazione del ganglioside GM1 mediante l'uso di anticorpi. Tale test è di facile uso e replicabile. I primi risultati sono stati presentati durante il congresso ASA 2016 (Travis et al, 2016a e b) e gli studi, ancora preliminari e in corso di pubblicazione, dimostrerebbero risultati anomali del test in circa il 50% dei pazienti infertili che presentano parametri seminali nella norma e che pertanto il test è di aiuto nella "decision making" riguardo il test PMA più appropriato da adottare. In particolare il test sembra essere particolarmente utile per evitare cicli IUI, in quanto predice il mancato successo con questa tecnica.

[EB2]

c. reazione acrosomiale. La reazione acrosomiale (RA) è l'evento che permette la liberazione all'esterno del contenuto della vescicola acrosomiale permettendo l'attraversamento dei rivestimenti oocitari. Si è discusso a lungo su quale possa essere la sede reale dove la reazione acrosomiale avvenga e su quale sia il reale stimolo, tra i tanti conosciuti, a indurre la RA nello spermatozoo che effettivamente fertilizza l'ovocita. Studi recenti effettuati in vivo ed in vitro utilizzando spermatozoi di topo ingegnerizzati in modo da poterli seguire nel loro percorso sia durante la fecondazione dell'ovocita in vitro che nelle vie genitali femminili, hanno dimostrato che la RA avviene comunque prima del raggiungimento della zona pellucida (Jin et al, 2011) e pertanto verosimilmente in risposta ad un induttore presente nel cumulo ooforo e comunque nel fluido tubarico in prossimità del sito di fecondazione. Il candidato più accreditato a svolgere quest'azione è il progesterone (Baldi et al, 2009), ormone femminile noto per la sua capacità di indurre la RA, le cui concentrazioni diventano elevatissime (circa micromolari) sia nel cumulo ooforo che nel fluido tubarico nel periodo ovulatorio. Poiché è noto dalla letteratura che solo gli spermatozoi reattivi riescono a fecondare l'ovocita in vitro (Jin et al, 2011) appare chiaro che la valutazione della RA rappresenta un possibile test di valutazione delle funzioni spermatiche. Infatti numerosi lavori dimostrano che la responsività al progesterone correla con la capacità fertilizzante in vitro (es: Krausz et al, 1996). Prima della ICSI, molti laboratori utilizzavano questo test di responsività al progesterone per valutare la capacità fertilizzante degli spermatozoi, che è poi caduto in disuso. Dopo la selezione degli spermatozoi mobili mediante swim up o gradiente di densità, gli spermatozoi vengono stimolati con il progesterone per circa un'ora. Oltre alla metodica sopra descritta che utilizza la CTC fluorescente, la RA può essere rivelata utilizzando lectina fluorescente (FITC-Peanut lectin) che si lega alla membrana degli spermatozoi e che quindi evidenzia l'acrosoma negli spermatozoi non reattivi e il solo segmento equatoriale in quelli reattivi, o con altri reagenti

(come la concanavalina A e il soybean trypsin inhibitor) che marcano gli spermatozoi reatti (legandosi alla membrana acrosomiale interna). E' possibile anche utilizzare anticorpi in grado di legarsi alla membrana e rivelare gli spermatozoi reatti e non mediante microscopia a fluorescenza o citometria a flusso.

d. **hemizona assay**. E' il test che meglio correla e predice la capacità fertilizzante dello spermatozoo.

Tuttavia la sua esecuzione è fortemente dipendente dalla disponibilità di ovociti, che vengono tagliati in due emizone poi messe a contatto con gli spermatozoi di un soggetto di controllo e con quelli del soggetto di cui si vuole studiare la capacità fertilizzante (Franken et al, 1998). Recentemente un gruppo australiano (Liu et al, 2007) ha messo a punto una tecnica che permette di valutare il legame alla zona pellucida degli ovociti e "recuperare" gli ovociti per un nuovo test (vedi Figura 2) ovviando alla ridotta disponibilità di ovociti:

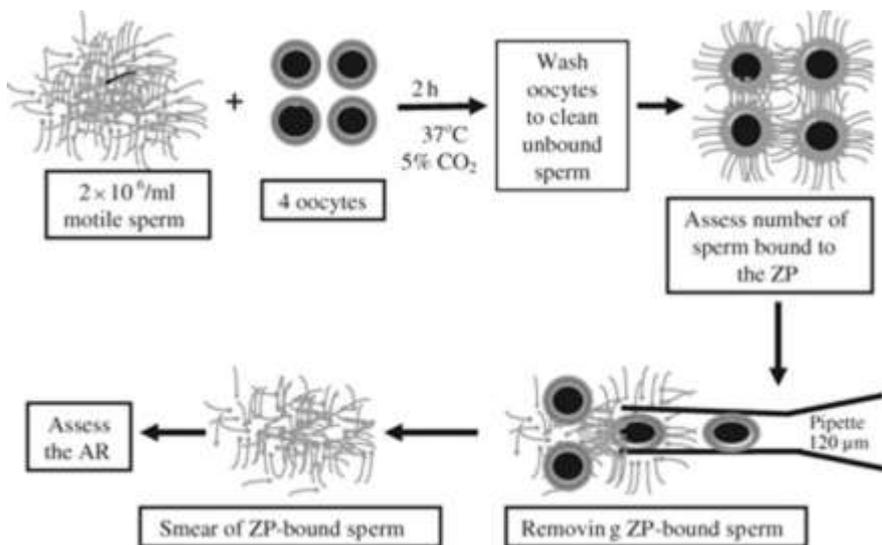


Figura 2: rappresentazione schematica del test di valutazione di interazione spermatozoi-ovociti sviluppata da Liu et al (2007).

e. **fusione spermatozoo-olemma**. Il processo di fusione tra la membrana ovocitaria e quella dello spermatozoo rappresenta l'ultimo, importantissimo, step del processo di fecondazione. Oggi è noto che l'interazione tra le due membrane avviene mediante un meccanismo recettoriale che coinvolge la proteina izumo sullo spermatozoo e juno sull'ovocita (Aydin et al, 2016; Ohto et al, 2016). La capacità dello spermatozoo di fondersi e di penetrare gli ovociti può essere studiata mediante l'hamster egg penetration test (HEPT) che presenta un'elevata capacità predittiva (circa 80%) della capacità fertilizzante in IVF (Ford et al, 2001). Il test utilizza ovociti di hamster denudati della zona pellucida che vengono messi in contatto con gli spermatozoi e vengono poi contati quelli penetrati e decondensati all'interno del citoplasma degli ovociti.

f. **legame all'acido ialuronico** (selezione dei gameti maturi, che presentano il recettore per l'acido ialuronico vs gli immaturi che non lo possiedono) **Rienzi**

References:

Jin SK, Yang WX. Factors and pathways involved in capacitation: how are they regulated? *Oncotarget*. 2016 Sep 27. doi: 10.18632/oncotarget.12274. [Epub ahead of print]

Green CM, Cockle SM, Watson PF and Fraser LR (1994) Stimulating effect of pyroglutamyl-glutamylprolineamide, a prostatic, TRH-related tripeptide, on mouse sperm capacitation and fertilizing ability in vitro. *Mol Reprod Dev* 38,215–221.

Baldi E, Luconi M, Muratori M, Marchiani S, Tamburrino L, Forti G. Nongenomic activation of spermatozoa by steroid hormones: facts and fictions. *Mol Cell Endocrinol*. 2009 Sep 24;308(1-2):39-46.

Jin M, Fujiwara E, Kakiuchi Y, Okabe M, Satouh Y, Baba SA, Chiba K, Hirohashi N. Most fertilizing mouse spermatozoa begin their acrosome reaction before contact with the zona pellucida during in vitro fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Mar 22;108(12):4892-6.

Krausz C, Bonaccorsi L, Maggio P, Luconi M, Criscuoli L, Fuzzi B, Pellegrini S, Forti G, Baldi E. Two functional assays of sperm responsiveness to progesterone and their predictive values in in-vitro fertilization. *Hum Reprod*. 1996 Aug;11(8):1661-7.

Franken DR, Burkman LJ, Oehninger SC, Coddington CC, Veeck LL, Kruger TF, Rosenwaks Z, Hodgen GD. Hemizona assay using salt-stored human oocytes: evaluation of zona pellucida capacity for binding human spermatozoa. *Gamete Res*. 1989 Jan;22(1):15-26

Liu DY, Liu ML, Garrett C, Baker HW. Comparison of the frequency of defective sperm-zona pellucida (ZP) binding and the ZP-induced acrosome reaction between subfertile men with normal and abnormal semen. *Hum Reprod*. 2007 Jul;22(7):1878-84.

Ford WC, Williams KM, Harrison S, Rees JM, Ray BD, McLaughlin EA, Hull MG. Value of the hamster oocyte test and computerised measurements of sperm motility in predicting if four or more viable embryos will be obtained in an IVF cycle. *Int J Androl*. 2001 Apr;24(2):109-19

Aydin H, Sultana A, Li S, Thavalingam A, Lee JE. Molecular architecture of the human sperm IZUMO1 and egg JUNO fertilization complex. *Nature*. 2016 Jun 15;534(7608):562-5.

Ohto U, Ishida H, Krayukhina E, Uchiyama S, Inoue N, Shimizu T. Structure of IZUMO1-JUNO reveals sperm-oocyte recognition during mammalian fertilization. *Nature*. 2016 Jun 15;534(7608):566-9

Travis, AJ, Cardona C, Moody MA, Simpson AJ, Seaman EK, Ostermeier GC, Sperm from fertile men and those seeking fertility exams differ in their ability to capacitate. American Society of Andrology annual conference 2016a. Poster 140

Travis, AJ, Cardona C, Moody MA, Simpson AJ, Seaman EK, Ostermeier GC, Consistent Differences Among Men In Capacitation Timing Could Personalize IUI/ART. American Society of Andrology annual conference 2016b. Oral presentation 12.