



GRUPPO  
donna med

Leaders in infertility

# IL BAMBINO NON ARRIVA

Cause e possibili  
soluzioni al problema  
della sterilità





Dott. Angelo Tocci

# IL BAMBINO NON ARRIVA



Cause e possibili  
soluzioni al problema  
della sterilità



# SOMMARIO

## FATTORI CHE INFLUENZANO LA FERTILITÀ 5

Riserva ovarica	7
<i>Il caso particolare della cosiddetta menopausa precoce</i>	7
Età della donna	8
Durata della sterilità	8

## CAUSE DI STERILITÀ 9

Sterilità inspiegata	9
Sterilità maschile	9
<i>L'esposizione a sostanze chimiche</i>	10
<i>Stress ossidativo</i>	11
<i>Il fumo di sigaretta</i>	11
<i>L'alcool (etanolo)</i>	12
<i>L'obesità</i>	12
<i>Il criptorchidismo</i>	13
<i>Infertilità ed infezioni</i>	14
<i>Le cause genetiche</i>	14
<i>La frammentazione del DNA degli spermatozoi</i>	16
STERILITÀ FEMMINILE	17
<i>Il problema della età femminile e della riserva ovarica</i>	17
<i>Cattiva ovulazione</i>	18
<i>Disfunzioni tubariche</i>	19
<i>Le infezioni sessualmente trasmesse</i>	20
<i>L'endometriosi</i>	20
<i>Fattori uterini</i>	21
<i>Fattori genetici</i>	22

## GLI ESAMI DIAGNOSTICI MASCHILI 23

Lo spermogramma	23
<i>Valutazione macroscopica</i>	23
<i>Valutazione microscopica</i>	25
Il MAR test	26
Test di frammentazione del DNA	26
Il tampone uretrale e la spermiocoltura	27
Ecografia scrotale	27
Ecocolordoppler scrotale e dei vasi spermatici	28

Dosaggi ormonali	28
Screening genetico	28
<i>Cariotipo</i>	28
<i>Fibrosi cistica</i>	29
<i>Microdelezioni del cromosoma Y</i>	30

## **GLI ESAMI DIAGNOSTICI FEMMINILI** **31**

Ecografia pelvica per valutare la riserva ovarica	31
L'ormone antimulleriano (AMH)	31
Screening ormonale	31
Screening genetico	32
Elettroforesi emoglobine patologiche	33
I tamponi cervico-vaginali	33
Test di pervietà delle tube (isterosalpingografia o isterosonosalpingografia)	34
L'isteroscopia	34
La laparoscopia	35

## **TECNICHE DI PROCREAZIONE MEDICALMENTE ASSISTITA** **36**

L'inseminazione artificiale intrauterina (IUI)	36
La FIVET	37
La ICSI	39
La blastocisti	39
<i>Approfondimento sul trasferimento a blastocisti</i>	39
<i>I risultati del trasferimento embrionale a blastocisti</i>	40
La ICSI TESE	40
L'Assisted hatching	41
Lo screening genetico pre-impianto (PGD PGS)	41
<i>La tecnica della PGD-PGS</i>	41
<i>Perché la diagnosi genetica preimpianto PGD-PGS?</i>	42
<i>Critiche alla PGD-PGS</i>	42
<i>La posizione del Gruppo Donnamed</i>	43
Il congelamento degli ovociti e degli embrioni	43
<i>La tecnica del congelamento degli ovuli</i>	43
<i>I risultati della vitrificazione</i>	44
La IMSI	44
<i>La tecnica IMSI</i>	44
<i>Critiche alla IMSI</i>	44

L'embryoscope	44
La fecondazione eterologa	44
<i>Il problema dei donatori in Italia</i>	45
<i>La legge in Italia</i>	45
La preservazione della fertilità femminile	46
La preservazione della fertilità maschile	46

## **LE TAPPE DELLA FECONDAZIONE IN PROVETTA** **48**

La stimolazione ovarica	48
<i>Step 1: sopprimere il ciclo naturale</i>	48
<i>Step 2: stimolare lo sviluppo dei follicoli ovarici</i>	49
<i>Step 3: controllare la tua stimolazione ovarica</i>	49
<i>Step 4: indurre la maturazione ovocitaria</i>	49
Il prelievo ovocitario (pick up)	49
<i>Preparazione al prelievo ovocitario</i>	49
<i>La degenza dopo il prelievo ovocitario</i>	50
<i>Il trattamento dopo il prelievo ovocitario (fase luteale)</i>	50
Le procedure di laboratorio	50
<i>La fecondazione degli ovociti</i>	50
<i>La crescita degli embrioni</i>	51
Il transfer embrionale	51
<i>Come si svolge il transfer embrionale</i>	51

## **COMPRENDERE I TASSI DI SUCCESSO DELLA FECONDAZIONE IN PROVETTA** **52**

## **BIBLIOGRAFIA** **53**





## FATTORI CHE INFLUENZANO LA FERTILITÀ

Nella nostra società motivazioni di ordine sociale, economico e culturale portano molte donne a rinviare oltre la terza decade di vita la ricerca di un concepimento. Dagli ultimi dati relativi alla natalità in Europa emerge, infatti, che l'età media in cui la donna italiana partorisce il primo figlio è 30 anni, dato aumentato rispetto al precedente rilievo del 1990 dove risultava essere di 29 anni.

I fattori principali che condizionano la capacità di concepire e di avere un bambino sono sostanzialmente 3:

- riserva ovarica;
- durata della sterilità;
- età della donna.

### Riserva ovarica

L'ovaio, diversamente dal testicolo, contiene un numero limitato e finito di ovociti (cellule ovo, cellule riproduttive femminili), che rappresentano un patrimonio predeterminato che nel corso degli anni diminuisce inevitabilmente.

Esiste una soglia critica di numero di ovociti, al di sotto di cui vi è una riduzione della potenzialità riproduttiva della donna.

La riduzione del numero, che si associa anche alla riduzione della qualità degli ovociti, può rappresentare l'unico elemento determinante la sub-fertilità e può essere dovuto a 3 fattori:

- età riproduttiva avanzata;
- ridotto patrimonio follicolare congenito (dissociazione tra età anagrafica e patrimonio follicolare). In questi casi, l'età anagrafica della donna è inferiore all'età biologica, cioè la donna, pur giovane, possiede un patrimonio di ovociti paragonabile a quello di una donna più anziana;
- interferenza di fattori quali infezioni, esiti di interventi chirurgici sull'ovaio, fattori ambientali, stili di vita, obesità, fumo di sigaretta, alcool, droghe, endometriosi etc che influenzano negativamente la consistenza e il consumo del patrimonio ovcitario.

### Il caso particolare della cosiddetta menopausa precoce

L'esaurimento ovarico prematuro (erroneamente definito menopausa precoce) è un difetto ovarico che si presenta con assenza del menarca (la prima mestruazione) detta anche amenorrea primaria, oppure la riduzione progressiva dei follicoli ovarici prima dei 40 anni con aumento notevole dei valori di FSH (> 40) ed assenza della mestruazione (amenorrea secondaria).

In molti casi la Premature Ovarian Failure (POF), oggi detta Premature Ovarian Insufficiency (POI), comporta la perdita del patrimonio follicolare ovarico. Interessa una minoranza di donne sotto i 40 anni ma ha attualmente conseguenze devastanti in quanto, quando i follicoli ovarici sono completamente esauriti, l'unica chance di gravidanza è

il ricorso alla fecondazione con ovociti di una donatrice sana. La POI interessa l'1% delle donne sotto i 40 anni, una donna su 10.000 intorno ai 20 anni e una donna su 1000 intorno ai 30 anni. Occasionalmente il 5-10% di queste pazienti riescono ad avere una gravidanza spontanea.

Come per la menopausa, la POF si presenta spesso come infertilità accompagnata da sintomi quali palpitazioni, intolleranza al caldo, vampate, ansia e depressione, stanchezza. Le gonadotropine prodotte dall'ipofisi, la ghiandola che si trova alla base del cervello e che governa l'attività ovarica, sono molto elevate, in particolare l'FSH.

L'assenza di estrogeni normalmente prodotti dalle ovaie grazie allo stimolo delle gonadotropine sui follicoli ovarici (che in questo caso possono essere esauriti) può condurre ad una comparsa precoce di osteoporosi, e sintomi cardiovascolari, neurologici, metabolici oltre che ginecologici (secchezza vaginale e delle mucose in genere, invecchiamento della pelle etc).

Le forme più severe della condizione si presentano con assenza dello sviluppo puberale e amenorrea primaria, la cui metà dei casi è dovuta a disgenesia ovarica; la causa più frequente di disgenesia ovarica è la sindrome di Turner, caratterizzata dalla assenza di un cromosoma X nelle cellule delle donne affette.

La correzione dell'infertilità è impossibile, se la diagnosi viene fatta quando già tutti i follicoli sono scomparsi; la diagnosi precoce può indicare l'opportunità di accelerare la gravidanza, o effettuare un prelievo ovocitario con congelamento degli ovuli per un uso successivo.

In caso di patrimonio follicolare completamente esaurito, l'unica soluzione è la fecondazione in vitro con ovodonazione, prendendo gli ovociti da una donatrice.

## **Età della donna**

È uno dei principali limiti posti alla fertilità umana. Con l'età, inoltre, aumenta il rischio di abortire spontaneamente.

Il rischio di aborto spontaneo risulta essere pari al:

- 10% circa per donne di età inferiore ai 30 anni;
- 18% per i soggetti con età compresa fra i 30 e i 39 anni;
- 34% per le donne intorno ai 40 anni.

Donne di età superiore ai 35 anni hanno una più elevata probabilità di avere difficoltà riproduttive in quanto la salute dell'embrione dipende dall'età della donna, in relazione alle anomalie cromosomiche embrionali, sostanzialmente determinate da malfunzionamento e invecchiamento degli ovociti, le cellule riproduttive femminili.

La capacità riproduttiva della coppia subisce un declino con l'età. Tale fenomeno si manifesta in maniera più sensibile nella donna.

L'aspettativa di avere un figlio per una coppia nella quale è presente una donna di età superiore ai 35 anni è ridotta del 50% rispetto alle coppie nelle quali le donne hanno un'età inferiore.

La riduzione della capacità riproduttiva nella partner femminile inizia intorno ai 35 anni con un progressivo e considerevole calo fino al completo esaurimento della funzionalità ovarica.

## **Durata della sterilità**

La durata della sterilità rappresenta il criterio che seleziona la prognosi riproduttiva della coppia a prescindere dalla diagnosi di sterilità. Coppie con una condizione di sterilità di lunga durata hanno una prognosi riproduttiva sfavorevole.

## CAUSE DI STERILITÀ

In circa un terzo dei casi, la sterilità è definita **inspiegata**, mentre in circa il 20% è **maschile** e si correla spesso con l'obesità. In poco meno di un quinto dei casi, l'infertilità dipende da **cattiva ovulazione**. In circa il 14% dipende da un **danno alle tube**. Problemi di **endometriosi** o di ostilità del muco cervicale colpiscono un decimo circa delle coppie. Il 5% di coppie ha problemi nei rapporti sessuali.

Un modo per capire come scoprire le cause della sterilità è fare degli esami diagnostici di qualità. Si inizia da quelli meno invasivi e utili a scoprire le cause di sterilità più frequenti.

### **Sterilità inspiegata**

La sterilità inspiegata o idiopatica o sine causa è una condizione della quale soffrono circa il 30% delle coppie infertili ed è definita come un'infertilità (assenza di gravidanza dopo 12-24 mesi di rapporti regolari e non protetti da contraccezione) senza alcuna causa apparente. Gli esami diagnostici di routine non mostrano alcuna anomalia nella coppia.

Un'indagine più accurata delle cause di sterilità inspiegata potrebbe evidenziare altre condizioni, come l'endometriosi, che spiegherebbero la mancata fertilità della coppia. La diagnosi di endometriosi richiede però un esame diagnostico chirurgico in anestesia generale, la laparoscopia, raramente necessario se lo scopo è avere un bambino.

Circa il 3% delle coppie con infertilità inspiegata riescono comunque a concepire un figlio naturalmente senza alcuna cura, ma spesso conviene ricorrere a diverse terapie per poter ridurre il tempo di attesa, specie se la donna ha oltre 35 anni.

Mentre nella donna il trattamento farmacologico è utile, in alcuni casi e sempre sotto il controllo del medico, nell'uomo la sua efficacia è, invece, dibattuta. Nella letteratura, infatti, non compare l'evidenza scientifica che somministrazioni all'uomo con infertilità idiopatica di farmaci ormonali e non, portino come risultato una gravidanza. La ricerca scientifica sta lavorando proprio per poter razionalizzare una possibile terapia nell'uomo con infertilità inspiegata.

La scelta del trattamento dipende quindi sostanzialmente dall'età della donna e dalla durata dell'infertilità.

### **Sterilità maschile**

È causata da molteplici fattori e li analizzeremo uno per uno.

La sterilità immunologica è caratterizzata dalla comparsa di alte concentrazioni di auto-anticorpi (anticorpi anti-spermatozoo) rivolti erroneamente verso i propri spermatozoi in assenza di sintomatologia specifica. Gli anticorpi anti-spermatozoo possono ridurre la fertilità di un soggetto ma raramente sono in grado di annullare completamente la fertilità della coppia. La ICSI FIVET sembra il trattamento di prima scelta nei casi di infertilità immunologica. Secondo il National Institute for Health and Clinical Excellence (NICE) questa condizione incide nel 3% delle infertilità maschili.

Dal 9 al 30% delle coppie presentano titoli anticorpali elevati, a seconda del-

le casistiche. Il dato è presumibilmente sovra-stimato per l'inadeguatezza dei test d'indagine.

### **L'esposizione a sostanze chimiche**

L'esposizione a sostanze chimiche nell'ambiente di vita e di lavoro e negli alimenti ha un posto di rilievo fra i fattori di rischio per la salute riproduttiva maschile.

Negli ultimi decenni si è assistito, soprattutto in alcuni paesi, ad un aumento dell'incidenza di tumori testicolari (tumori delle cellule germinali, seminomi) e ad un probabile aumento di alcune anomalie del tratto genitale maschile, come il criptorchidismo e l'ipospadia (anomalie del tratto genito-urinario che si determinano durante lo sviluppo fetale). Inoltre, sembrerebbe essersi verificato un declino nella qualità dello sperma e un decremento del numero medio di spermatozoi per eiaculato. Tutte queste variazioni sembrano distribuirsi in maniera diversa fra le varie aree geografiche.

Dall'esperienza clinica viene fuori una causa comune alla base di tutte le anomalie osservate, le quali sono spesso associate ad alterazioni della spermatogenesi.

Negli ultimi 20 anni numerosi studi su animali e clinici hanno fornito evidenze della varietà di sostanze chimiche, chiamate interferenti endocrini (IE) o endocrine disruptors (ED), caratterizzate dal potenziale di interferire con il sistema endocrino attraverso svariati meccanismi.

Queste sostanze portano alla alterazione del funzionamento dell'asse riproduttivo maschile (asse ipotalamo-ipofisi testicolo) agendo come antagonisti e/o agonisti estrogenici, disturbando così i processi biochimici che regolano la secrezione ormonale degli ormoni sessuali e la funzione spermatica.

Il risultato clinico dell'esposizione a tossici riproduttivi sembra essere ipogonadismo e/o infertilità, come pure un aumentato rischio di seminomi.

Molti inquinanti estrogenici includendo prodotti per agricoltura (fitoestrogeni), chimici industriali e metalli pesanti hanno significative conseguenze sull'apparato riproduttivo dovuto alla loro estesa presenza nell'ambiente, all'abilità a bioaccumularsi e di resistere alle biodegradazione, spesso rientrando nella catena alimentare. Inoltre molti agenti farmacologici e biologici, come terapie radianti, possono alterare e/o distruggere l'equilibrio ormonale.

### **Agenti ambientali (sostanze tossiche)**

- chimici organici e pesticidi: includono il dicloro difenil-tricloroetano (DDT), l'epicloridrina, diossina, cloruro di metile, dibromocloropropano (DBCP), idrocarburi aromatici policiclici (PAHs). Queste sostanze sono in grado di diminuire la fertilità, abbassando la qualità del seme. La presenza di questi agenti è stata associata a bassa concentrazione, motilità e ad anormale morfologia degli spermatozoi. Producono effetti estrogenici e diminuzione della libido, aumento del cancro e difetti alla nascita.
- metalli pesanti: includono piombo, mercurio, cadmio, cobalto, cromo, alluminio, litio, ecc. L'effetto di questi metalli è stato ampiamente studiato sugli animali, evidenziando come questi metalli agiscano a livello dell'asse ipotalamo-ipofisi-testicolo sopprimendo la spermatogenesi e il testosterone sierico (in alcuni casi in maniera dose-dipendente). Biopsie testicolari suggeriscono che questi metalli possono essere dei tossici diretti del testicolo. Il contaminante maggiormente studiato è il piombo.
- Radiazioni ionizzanti: raggi  $\alpha$  e  $\beta$ . Effetti diretti e indiretti alle gonadi.

## **Fattori biologici**

- ipertermia;
- radicali superossido;
- ossido nitrico;
- stress ossidativo prodotti dalla stessa esposizione a contaminanti ambientali oltre che da malattie croniche, invecchiamento, esposizione a tossine, danno fisico.

Gli effetti sono molteplici: diminuzione della produzione di testosterone, aumento dei radicali liberi e diminuzione degli antiossidanti (protettivi contro i radicali liberi), diminuzione della spermatogenesi e della funzione spermatica; si hanno danni testicolari.

## **Agenti radioterapici e farmacologici**

- terapia radiante: include i raggi X. Questi ultimi inducono danni testicolari molto severi. L'effetto dipende dalla dose, dal numero di dosi, dalla durata dell'irradiazione e dallo stadio di sviluppo delle cellule germinali nei testicoli al tempo dell'esposizione.
- farmaci e fitoestrogeni: includono steroidi anabolizzanti, nicotina, litio, narcotici, etanolo, ciclosporina, farmaci chemioterapici, ecc. Alterano l'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi, diminuiscono la produzione di ormoni sessuali, alterano la libido e alterano la spermatogenesi e la funzione spermatica.

## **Stress ossidativo**

A parte le convenzionali cause dell'infertilità maschile (varicocele, criptorchidismo, infezioni, fibrosi cistica, tumori), una nuova ed importante causa è stata identificata nello stress ossidativo. Lo stress ossidativo è determinato da uno squilibrio tra la produzione e l'eliminazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) da parte del nostro sistema di difesa antiossidante.

Lo stress ossidativo è associato a patologie umane come cancro, diabete, danni al fegato, artrite reumatoide, cataratta, AIDS, danni al sistema nervoso centrale. Un effetto non meno importante è quello esercitato sugli spermatozoi e sulla fertilità.

Condizioni che favoriscono stress ossidativo per l'apparato riproduttivo maschile sono varicocele, prostatiti, epididimiti, vesciculiti. Comunque qualsiasi eiaculato presenta potenziali fonti di ROS rappresentati da differenti tipi di cellule, come spermatozoi maturi e immaturi, leucociti e cellule epiteliali. Tra questi differenti tipi di cellule, i leucociti e gli spermatozoi sono considerati le due principali fonti di ROS.

Piccole quantità di ROS sono necessarie per lo spermatozoo nell'acquisizione della capacità fecondante. L'incubazione degli spermatozoi con basse dosi di ROS, infatti, stimola la capacitazione, l'iperattivazione, la reazione acrosomiale e l'interazione con l'ovocita. Eccessivi livelli di ROS determinano bassa qualità del seme e generalmente uno stato di stress ossidativo spermatico che produce danni.

Se il danno è estensivo si può verificare una diminuzione della percentuale di fecondazione, una bassa qualità dell'embrione e rischio di abortività.

Il fumo aumenta i radicali liberi nel liquido seminale.

## **Il fumo di sigaretta**

Esso provoca una diminuzione della fertilità negli uomini, sebbene l'esatto meccanismo molecolare che regola tale alterazione non sia ancora noto.

In alcuni studi è descritto nei pazienti fumatori:

- una diminuzione della concentrazione, della motilità, della forme morfologicamente tipiche degli spermatozoi
- un aumento della percentuale di DNA frammentato di spermatozoi

Tuttavia, in altrettanti studi non si è arrivati a stabilire una associazione tra il fumo di sigaretta e l'alterazione di tali parametri.

### **L'alcool (etanolo)**

Può provocare nell'uomo impotenza, atrofia testicolare, ginecomastia (aumento delle mammelle nell'uomo) e perdita di stimolo sessuale, condizioni molto spesso associate al consumo di alcool nell'uomo. La condizione quindi di acuta e cronica somministrazione di alcool può influenzare le funzioni riproduttive maschili, anche perché spesso associata a cattive abitudini, come ad esempio il fumo, che hanno effetti negativi sull'apparato riproduttore.

Nel seme umano l'etanolo produce una significativa diminuzione della percentuale di motilità, una riduzione del volume del seme e della concentrazione spermatica totale, una riduzione della vitalità e un aumento di spermatozoi con morfologia anomala.

Assumendo alcool in dosi elevate giornaliere, più di 80 grammi al giorno (più di un litro di vino al giorno), si può arrivare all'arresto del processo di maturazione degli spermatozoi, quindi ad una azoospermia (assenza di spermatozoi nell'intero eiaculato).

Queste interferenze causano una riduzione della fertilità nell'uomo.

Nonostante non sia ancora stata dimostrata una correlazione tra assunzione di alcol in quantità non elevate e infertilità maschile, si ritiene comunque di non superare certe dosi per preservare la fertilità.

Gli uomini che si sottopongono a terapie di procreazione assistita dovrebbero astenersi dall'assunzione di alcolici visto alcuni recenti lavori che hanno mostrato un rapido miglioramento delle condizioni spermatiche di pazienti alcolizzati cronici dopo un breve periodo (circa tre mesi) dalla sospensione dal bere fino al ripristino di condizioni di normalità.

### **L'obesità**

Oltre a rappresentare un fattore di rischio per la salute, sembra essere una delle principali cause di infertilità. L'eccessiva quantità e distribuzione del grasso corporeo sono relazionati a perdita di fertilità sia nelle donne che negli uomini. La percentuale di grasso corporeo è espressa dall'indice di massa corporea (BMI; Kg/m<sup>2</sup>).

Generalmente distinguiamo soggetti:

- normali con BMI <25;
- sovrappeso con BMI tra 25 e 30;
- obesi BMI > di 30.

Possibili conseguenze dell'obesità sulla fertilità:

- per l'embrione: è bene documentato che un eccessivo peso può portare ad aborti spontanei e un incrementato rischio di difetti alla nascita.
- per le donne: quelle che hanno un BMI >25kg/m<sup>2</sup>, tipicamente, sono insulino-resistenti, hanno la sindrome dell' ovario policistico (PCOS) e una bassa fertilità
- pazienti infertili sovrappeso che ricorrono alle tecnologie di riproduzione assistita richiedono una terapia con più alte dosi di gonadotropine, producono meno follicoli ed embrioni di minore qualità

- per gli uomini è stata osservata una relazione inversa tra BMI e il numero totale di spermatozoi normali (cioè con messaggio genetico intatto) e motili. Quando BMI è  $>25\text{kgm}^2$  essi hanno meno spermatozoi normali e motili. È riportato anche un aumento dell'incidenza di oligozoospermia (ridotta concentrazione degli spermatozoi) all'aumentare del BMI: uomini normali= 5.32%, sovrappeso= 9.52% e obesi= 15.62%.

Soprattutto l'alto deposito di grasso nell'area sovra-pubica e nella parte interna della coscia risulta correlato a un'alterata produzione spermatica o integrità cromatinica.

### **Il criptorchidismo**

È la mancata discesa di uno o entrambi i testicoli nella sacca scrotale (sacca muscolare, morbida e dalle pareti sottili che contiene i testicoli). Nel 70-85% dei casi il testicolo maldisceso è uno solo, più frequentemente il destro e nel rimanente numero di casi sono entrambi i testicoli a non essere discesi correttamente.

Sebbene sia considerata una lieve malformazione, il criptorchidismo rappresenta il più caratterizzato fattore di rischio per l'infertilità e per il cancro al testicolo negli adulti. La mancata discesa dei testicoli avviene:

- bilateralmente (testicolo destro e sinistro) in un terzo dei casi
- unilateralmente (uno dei due testicoli) in due terzi dei casi.

In alcuni pazienti si può ritrovare l'assenza di uno o entrambi i testicoli, una condizione definita anorchia o sindrome dei testicoli scomparsi.

La incidenza di criptorchidismo sembra essere aumentata in questi ultimi 30 anni a causa di anormale esposizioni ambientali, soprattutto agli estrogeni, nella vita prenatale. Alti livelli di estrogeni placentari aumentano il rischio. Questo aumento sarebbe correlato anche ad un aumento di incidenza di cancro del testicolo, ad una riduzione della qualità seminale e ad un incremento dei casi di ipospadia (anomalia congenita dovuta ad un incompleto sviluppo dell'uretra).

In Italia la prevalenza del criptorchidismo nei nati a termine sembra essersi ridotto dal 4,3% negli anni 1978-1987 al 2,7% negli anni 1988-1997.

Il criptorchidismo può avvenire come disordine isolato o può essere associato con altre anomalie congenite. Rimane comunque incerta o parzialmente sconosciuta ad oggi la sua eziologia e il criptorchidismo può per questo motivo essere considerata una malattia complessa.

Una storia familiare di criptorchidismo rappresenta un fattore di rischio per testicoli non discesi.

Un contributo al criptorchidismo viene dato da fattori ambientali che agiscono come "interferenti endocrini della discesa testicolare". Per "interferenti endocrini" si intendono sostanze esogene (esterne) che hanno la capacità di disturbare l'equilibrio ormonale e la riproduzione. Questi includono xenoestrogeni (sostanze tossiche simil-estrogeniche) principalmente chimici industriali, ormoni sintetici e naturali, fito e micro-estrogeni e altre sostanze ancora.

Si ritiene che questi composti ambientali imitino l'azione degli ormoni coinvolti nella discesa testicolare comportandosi quindi come estrogeni o antiestrogeni.

Fondamentale è sicuramente l'interazione fra l'ambiente e i fattori genetici, per cui alcune persone risultano più suscettibili agli interferenti endocrini di altre.

A causa della eterogeneità del criptorchidismo, la funzione testicolare nell'adulto può

essere alterata a vari gradi, passando da un liquido seminale normozoospermico (valori normali) a completa azoospermia (assenza di spermatozoi).

Tuttavia sono più frequentemente sub-fertili, a causa di alterata spermatogenesi, adulti che hanno avuto una storia di criptorchidismo. La sub-fertilità del criptorchide sembra derivare da una riduzione del numero totale delle cellule germinali, dovuta ad un difetto della maturazione e della proliferazione. La trasformazione delle cellule staminali fetali (gonociti) in cellule staminali adulte (spermatogoni adulti) è uno step che avviene dai due ai tre mesi di età e i difetti di maturazione sono associati con una diminuzione delle gonadotropine e del testosterone.

Normalmente danni più gravi si osservano nelle forme bilaterali e in relazione all'altezza cui si è bloccato il testicolo maldisceso.

Una conta spermatica anormale si riscontra in circa il 50% dei maschi criptorchidi unilaterali e in circa l'80% dei bilaterali. Criptorchidismo si riscontra nel 20% di tutte le azoospermie secretorie.

Una permanenza del testicolo al di fuori della sacca scrotale oltre i 2 anni di vita comporta l'insorgenza di danni strutturali irreversibili, che possono compromettere la futura fertilità del soggetto e causare il cancro testicolare.

Quindi la diagnosi precoce ed una corretta gestione del testicolo non disceso sono necessari per preservare la fertilità e per migliorare le possibilità diagnostiche precoci di malignità testicolari.

Nonostante l'intervento chirurgico (orchidopessi), si ritiene che in almeno un terzo dei pazienti sia probabile l'infertilità.

### **Infertilità ed infezioni**

Le infezioni sessualmente trasmesse sono la principale causa di infertilità maschile e femminile. Sulla base dei microorganismi coinvolti, si distinguono in:

- batteriche;
- virali;
- protozoarie.

Le principali infezioni sono dovute a:

- *Neisseria gonorrhoeae* (gonococco);
- *Chlamydia trachomatis*;
- *Mycoplasma*;
- *Treponema pallidum* (sifilide);
- *Gardnerella vaginalis*;
- *Hemophilus ducreyi*;
- *Klebsiella granulomatis* (granuloma inguinale o Donovanosi).

### ***Chlamydia nel maschio infertile***

Nel maschio le infezioni sessualmente trasmesse possono provocare un danno alla fertilità, per esempio riducendo la qualità del liquido seminale. La *Chlamydia* nel maschio è responsabile del 50% delle uretriti non causate dal gonococco.

### **Le cause genetiche**

#### ***Anomalie dei cromosomi***

I cromosomi sono strutture presenti in tutte le cellule costituite da acido desossiribonucleico (DNA) e proteine. Il DNA contenuto nei cromosomi è suddiviso in parti dette



geni, atti al mantenimento e alla trasmissione dei caratteri ereditari dell'individuo. In ciascuna cellula sono contenute due copie di ciascun cromosoma per un totale di 22 coppie, più una coppia di cromosomi sessuali (XX per le femmine, XY per i maschi).

Le anomalie cromosomiche sono alterazioni del numero o della struttura dei cromosomi che si verificano all'incirca nel 7,5% dei concepimenti. Nella maggior parte dei casi però esse sono incompatibili con la vita e portano ad un aborto spontaneo precoce. Ne consegue che solo lo 0,6% dei nati vivi è affetto da malattie cromosomiche.

Le anomalie numeriche dei cromosomi vengono distinte in:

- monosomie: quando è presente una sola copia del cromosoma anziché due;
- trisomie: quando sono presenti tre copie di uno stesso cromosoma.

Quanto alle anomalie strutturali abbiamo invece:

- delezioni e microdelezioni: perdita più o meno estesa di un frammento di cromosoma;
- duplicazione e microduplicazione: esistenza di due copie di uno stesso frammento nello stesso cromosoma;
- inversione: riposizionamento di un frammento in posizione differente da quella originaria dopo una rotazione di 180°;
- traslocazione: trasferimento di materiale tra due o più cromosomi diversi.

L'origine dell'anomalia si colloca al momento della formazione delle cellule germinali dei genitori, ciascuna delle quali possiede solo la metà del corredo cromosomico normalmente presente nelle cellule.

È al momento della fecondazione che le cellule germinali dei genitori, incontrandosi, danno luogo al normale corredo cromosomico che risulterà quindi metà proveniente dalla madre e metà dal padre.

### **La fibrosi cistica (FC)**

È una malattia genetica che si manifesta se entrambe le copie del gene interessato risultano alterate (autosomica recessiva). Nella popolazione caucasica è la più diffusa, con una incidenza di 1 malato ogni 2500-2700 nati vivi.

La malattia si manifesta per disregolazione della proteina chiamata CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) che si trova nella membrana apicale delle cellule degli epitelii e regola gli scambi idroelettrolitici.

Il gene che codifica questa proteina è stato localizzato nel 1989 sul braccio lungo del cromosoma 7. La proteina mutata trasporta in modo alterato i sali portando alla produzione di secrezioni per così dire 'disidratate', con sudorazione molto ricca in sodio e cloro e muco molto denso che arriva ad ostruire i dotti nei quali viene a trovarsi.

La malattia ha come bersaglio diversi organi ed apparati: l'apparato respiratorio, il pancreas, il fegato, l'intestino e l'apparato riproduttivo, principalmente nei maschi. I quadri clinici possono variare in base al tipo di mutazione del gene.

Nei maschi, il 95% dei pazienti adulti con fibrosi cistica mostra azoospermia per atresia dei dotti deferenti. Alcuni studi hanno inoltre evidenziato che la frequenza delle mutazioni in eterozigosi (solo una delle due copie di un gene è alterata) del gene CFTR è due volte superiore negli uomini infertili rispetto alla popolazione generale. È noto che la proteina CFTR è espressa nel tratto riproduttivo maschile (epididimo, cellule del Sertoli), ed anche sullo spermatozoo, sebbene la sua funzione non sia completamente chiarita.

### **Le microdelezioni del cromosoma Y**

Tra le varie cause d'infertilità maschile ve n'è una genetica che riguarda le microdelezioni del cromosoma Y. Le microdelezioni sono perdite di piccole porzioni di DNA non visibili con l'analisi del cariotipo, ma che necessitano tecniche più mirate per la loro investigazione. Queste microdelezioni si ritrovano soprattutto in tre regioni del braccio lungo del cromosoma Y dette AZFa, AZFb e AZFc. La frequenza delle delezioni è maggiore nell'ultima regione e, tra tutte le diverse delezioni studiate, la più nota è quella gr/gr.

Il cromosoma Y è l'unico cromosoma presente solo nei maschi ed è relativamente povero di geni, ma, poiché sono solo i suoi geni che determinano il differenziamento maschile durante lo sviluppo, questi regolano fundamentalmente la spermatogenesi.

La presenza delle microdelezioni del cromosoma Y è nota da molto tempo ed è stata associata ad azoospermia (assenza di spermatozoi) e oligozoospermia severa (presenza di scarsissimi spermatozoi).

Sembra dimostrato ora, come si prevedeva, che le delezioni parziali del gene AZFc sono più frequenti nei maschi infertili che nei controlli, ma l'associazione tra questi due parametri è fortemente dipendente dall'etnia e dalla posizione geografica dei pazienti.

Le delezioni gr/gr sembrano così essere un importante fattore di rischio per l'infertilità maschile, soprattutto per l'oligozoospermia. Non si sono riscontrate evidenze che suggeriscono un ruolo di queste nell'azoospermia, quindi probabilmente in quest'ultima sono coinvolti anche altri fattori genetici che ancora non si conoscono.

### **La frammentazione del DNA degli spermatozoi**

Gli spermatozoi, come tutte le cellule dell'organismo, contengono il messaggio genetico nei cromosomi, sottoforma di "codice" nella forma di un acido: l'acido desossiribonucleico ovvero il DNA.

In caso di spermatozoi sofferenti, il DNA si può frammentare perdendo la sua integrità funzionale e dunque portando a difetti funzionali dello spermatozoo. La frammentazione del DNA spermatozoario indica una situazione di rottura dell'integrità del DNA dello spermatozoo. Tale indagine viene condotta in laboratori andrologici specializzati ed è normalmente richiesta in particolari condizioni anamnestiche (aborti ripetuti, insuccesso tecniche di procreazione assistita, infertilità inspiegata) o in particolari patologie del liquido seminale.

Cause di frammentazione del DNA includono:

- il fumo di sigaretta;
- malattie generali;
- ipertermia;
- inquinamento;
- varicocele.

Per ridurre il tasso di frammentazione degli spermatozoi è necessario evitare il contatto con sostanze tossiche (fumo, farmaci, droghe) e l'esposizione a fonti eccessive di calore.

Sicuramente osservare una dieta ricca in frutta e verdura e, in taluni casi, l'assunzione di vitamine, sebbene i dati in letteratura non confermino il loro benefico effetto in termini riproduttivi.

Il trattamento delle infezioni del liquido seminale può ridurre la frammentazione.

La frammentazione è legata ad un ridotta fertilità naturale ed anche ad un ridotto tasso di gravidanze ottenute in seguito a tecniche di IUI o FIVET. Al contrario il tasso di

gravidezze ottenute con la ICSI sembra non essere influenzato dalla frammentazione del DNA spermatico. Tuttavia il tasso di frammentazione è correlato sia nella FIVET che nella ICSI con un aumentato rischio di interruzione spontanea di gravidanza.

Gli spermatozoi con un danno al DNA riescono ugualmente a fertilizzare con efficienza gli ovociti. Normalmente l'ovocita ha la capacità di ripristinare alcuni danni del DNA dello spermatozoo; questa abilità è strettamente connessa alla qualità del citoplasma e del genoma dell'ovocita stesso, entrambi fattori legati all'età materna.

Secondo molti studi il danno del DNA spermatico, se non corretto, manifesta maggiormente la sua azione negativa durante o dopo l'impianto, fenomeno detto effetto paterno tardivo. Infatti la maggior parte degli studi affermano che l'effetto del danno al DNA si manifesta tardivamente, con aumentati tassi di aborto. Resta invece ancora da stabilire l'effetto della frammentazione del DNA degli spermatozoi sullo sviluppo embrionale e sul successivo impianto.

Tra tutte le metodiche di fecondazione assistita (IUI, FIVET, ICSI), la ICSI è quella meno influenzata dalla frammentazione del DNA spermatozoario e quindi quella di elezione in questi casi.

## **STERILITÀ FEMMINILE**

### **Il problema della età femminile e della riserva ovarica**

Il fattore età è importante nella donna, molto meno nell'uomo. La fertilità sia spontanea che indotta dalla fecondazione assistita si riduce con l'aumentare dell'età della donna. Soprattutto dopo i 40 anni la sterilità aumenta a causa della riduzione del numero e della qualità delle uova e all'aumento del tasso di aborto spontaneo.

In tutte le pazienti infertili e soprattutto nelle donne che vanno incontro a stimolazione ovarica ha assunto grande importanza la valutazione della riserva ovarica. Per riserva ovarica si intende la quantità di follicoli ovarici (misurata ecograficamente) e di conseguenza le uova residue nelle ovaie; i follicoli contengono i precursori delle uova che maturando possono essere fecondate e dare origine all'embrione.

È ben noto che gli ovociti vengono acquisiti in un numero fisso per ciascuna donna in epoca fetale, quindi prima della nascita.

Il numero di ovociti in epoca fetale è ritenuto il massimo numero disponibile ed è destinato a ridursi progressivamente nel corso della vita. Ogni donna riceve un numero ben definito di ovociti già prima di nascere: durante il periodo della vita fetale e dopo la nascita la maggior parte degli ovociti degenera.

Infatti, già alla nascita un gran numero di ovociti è stato perso (si passa da 7 milioni nella vita fetale a 2,5 milioni alla nascita) e al primo ciclo (menarca) il numero di ovociti residui è circa 250mila.

Dall'età di 31 anni questo numero si riduce a velocità accelerata e la fertilità di una donna si riduce significativamente dopo i 31 anni, anche per l'"invecchiamento" degli ovociti che riducono progressivamente la loro qualità genetico-cromosomica.

Per alcune donne il patrimonio ovcitario può essere eccessivo (ovaio policistico), per altre 'normale', per altre insufficiente (ridotta riserva ovarica), per altre molto insufficiente e portare a un prematuro esaurimento ovarico.

Tale patrimonio è appunto la riserva ovarica.

Mediamente, in una donna sopra i 40 anni, la riserva ovarica è già ridotta; inoltre si osserva una ridotta qualità biologica degli ovociti.

## Cattiva ovulazione

La cattiva ovulazione si associa ad irregolarità mestruali. La mestruazione che si osserva ad intervalli regolari tra il 21° ed il 35° giorno, in particolare in presenza di sintomi pre-mestruali quali la tensione mammaria, il gonfiore addominale e alterazione del tono dell'umore, suggerisce una normale attività ovulatoria. Perdite mestruali che occorrono ad intervalli più lunghi, più corti ed irregolari suggeriscono una disfunzione ovulatoria.

La classificazione delle cause di disordini ovulatori prevede la distinzione in base al livello delle gonadotropine (FSH ed LH), le sostanze che, prodotte dall'ipofisi (una ghiandola alla base del cervello), sono responsabili della normale attività ovarica ed ovulatoria.

- in caso di *livelli bassi di gonadotropine* (ipogonadotropismo con FSH-ormone follicolo stimolante-basso o normale e basso estradiolo, l'ormone estrogeno), si sospetta una severa disfunzione della funzionalità ipotalamico-ipofisaria. Esempi di questa forma di anovulatorietà sono la sindrome di Kallman e l'anorexia nervosa.
- in caso di *livelli normali di gonadotropine* con FSH ed estradiolo normali, in presenza o assenza di iperandrogenismo (aumento degli ormoni maschili), è presente una disfunzione dell'asse ipotalamo-ipofisario; esempi sono la sindrome dell'ovaio policistico e le disfunzioni legate allo stress o al peso corporeo.
- in caso di *livelli aumentati di gonadotropine* (elevazione dell'FSH con bassi livelli di estradiolo, ipergonadotropismo) si sospetta l'esaurimento ovarico: esempi di questa condizione sono l'esaurimento ovarico prematuro (POF) e la perimenopausa.
- *altre cause* di disfunzione ovulatoria sono l'aumento dei livelli di prolattina, le malattie tiroidee, l'iperplasia surrenalica congenita e alcuni tipi di tumore.

## L'ovaio policistico (PCOS)

La causa più comune di difetti ovulatori è la sindrome dell'ovaio policistico (polycystic ovarian syndrome PCOS), la cui incidenza si aggira intorno al 6-10% delle donne. I sintomi sono vari e si osservano:

- assenti mestruazioni (amenorrea);
- mestruazioni frequenti ed irregolari;
- cicli abbondanti e ritardanti (oligomenorrea);
- infertilità, o meglio sub fertilità;
- altri sintomi da disfunzione ormonale, come l'irsutismo, cioè l'eccessiva crescita dei peli;
- obesità.

Numerose irregolarità metaboliche possono essere associate alla PCOS, come la resistenza all'insulina, il diabete di tipo 2, la dislipidemia (alterata concentrazione dei grassi nel sangue) e le malattie cardiovascolari.

La resistenza all'insulina sembra essere il meccanismo centrale della disfunzione riproduttiva e anche delle conseguenze negative sulla salute generale della donna.

Per porre la diagnosi di PCOS devono essere presenti due dei seguenti 3 criteri, secondo il consenso di Rotterdam (cioè un accordo formulato tra diversi esperti della materia):

- ovulazione difettosa o assente;
- segni clinici e/o biochimici di iperandrogenismo (aumento dell'effetto degli ormoni maschili nella donna);
- ovaie policistiche, cioè caratterizzate dalla presenza di almeno 12 follicoli in cia-

scun ovaio del diametro di 2-9 mm e/o del volume di almeno 10 millilitri.

### **L'esaurimento ovarico prematuro**

È un difetto ovarico che si presenta con assenza del menarca (la prima mestruazione) detta anche "amenorrea primaria", oppure la riduzione progressiva dei follicoli ovarici prima dei 40 anni con aumento notevole dei valori di FSH ( $> 40$ ) ed assenza della mestruazione (amenorrea secondaria).

In molti casi la Premature Ovarian Failure (POF) oggi detta Premature Ovarian Insufficiency (POI) comporta la perdita del patrimonio follicolare ovarico. Interessa una minoranza di donne sotto i 40 anni ma ha attualmente conseguenze devastanti in quanto, quando i follicoli ovarici sono completamente esauriti, l'unica chance di gravidanza è il ricorso alla fecondazione con ovociti di una donatrice sana (pratica consentita da qualche anno in Italia). Interessa l'1% delle donne sotto i 40 anni, una donna su 10.000 intorno ai 20 anni e una donna su 1000 intorno ai 30 anni. Occasionalmente il 5-10% di queste pazienti riescono ad avere una gravidanza spontanea.

Come per la menopausa, la POF si presenta spesso come infertilità accompagnata da sintomi quali palpitazioni, intolleranza al caldo, vampate, ansia e depressione, stanchezza. Le gonadotropine prodotte dall'ipofisi, la ghiandola che si trova alla base del cervello e che governa l'attività ovarica, sono molto elevate, in particolare l'FSH.

L'assenza di estrogeni normalmente prodotti dalle ovaie grazie allo stimolo delle gonadotropine sui follicoli ovarici (che in questo caso possono essere esauriti) può condurre a una comparsa precoce di osteoporosi e sintomi cardiovascolari, neurologici, metabolici.

Le forme più severe della condizione si presentano con assenza dello sviluppo puberale e amenorrea primaria, e la metà di questi casi sono dovuti a disgenesia ovarica; la causa più frequente di disgenesia ovarica è la sindrome di Turner, caratterizzata dalla assenza di un cromosoma X nelle cellule delle donne affette.

### **Disfunzioni tubariche**

La causa più frequente di danno tubarico è la malattia infiammatoria pelvica (pelvic inflammatory disease PID), cioè una forma di peritonite blanda sul piano dei sintomi, che possono anche essere assenti o poco avvertiti dalla paziente. Una causa frequente è l'infezione da Chlamydia. Insieme all'infezione da gonococco, essa costituisce l'80% delle cause di malattia infiammatoria pelvica associata a danno tubarico. L'incidenza di malattia infiammatoria pelvica è proporzionale al numero di episodi di infezione cui la paziente va incontro.

Un'altra causa di malattia tubarica è la gravidanza extrauterina; una causa ulteriore è la sterilizzazione chirurgica.

Raramente la tuba può essere sede di un fenomeno malformativo indotto da farmaci (esposizione al dietilstilbestrolo) o congenito.

Le tube possono essere danneggiate in vari distretti, più o meno in vicinanza dell'utero (occlusione prossimale) o dell'ovaio (occlusione distale); un'occlusione intermedia è anche possibile. La severità del danno tubarico in termini di infertilità dipende dal tratto danneggiato e dall'entità del danno. Donne con danni estesi hanno una bassissima possibilità di concepire spontaneamente e la soluzione può essere trovata nella procreazione assistita (fecondazione in provetta) o nella microchirurgia tubarica.

## Le infezioni sessualmente trasmesse

La Chlamydia è il principale agente infettivo che riduce o annulla la fertilità di una donna. Essa colpisce prevalentemente la cervice uterina causando una condizione indistinguibile clinicamente dalla cervicite da gonococco. I sintomi possono essere le perdite vaginali, il sanguinamento intermestruale, il bruciore a urinare, e il dolore nei rapporti sessuali. Tuttavia è spesso non sintomatica e può danneggiare permanentemente l'apparato riproduttivo della donna senza che se ne accorga. Si può estendere alla parte interna dell'utero, causando endometrite, quindi alle tube di Falloppio, causando una reazione infiammatoria acuta (Pelvic Inflammatory Disease, PID) che, se non trattata, si cronicizza provocando aderenze, distruzione dell'epitelio ciliato delle tube e della mucosa interna. Il tutto risulta in infertilità.

## L'endometriosi

L'endometriosi è definita come la presenza di endometrio in sedi anomale. L'endometrio è la mucosa che riveste l'interno dell'utero, e viene espulso all'esterno con ogni flusso mestruale per poi rigenerarsi sotto lo stimolo degli ormoni femminili. Quando questo endometrio, per ragioni ancora non ben definite, si impianta e cresce al di fuori dell'utero, si parla di endometriosi. Le sedi più frequenti di endometriosi sono le ovaie ed il peritoneo, la mucosa che riveste la cavità addominale.

L'endometriosi può essere causa di dismenorrea (mestruazioni dolorose), coliche addomino-pelviche, dispareunia (dolore ai rapporti sessuali) e infertilità. L'endometriosi è presente in circa il 2-5% della popolazione femminile in età riproduttiva, senza necessariamente provocare sintomi, mentre è ovviamente più frequente in pazienti con infertilità (25-50% delle donne con infertilità hanno endometriosi) o con dolore pelvico cronico (dal 20 al 70% in diverse casistiche).

Essa rappresenta una patologia frequente tra le donne in età riproduttiva venendo infatti riscontrata in una percentuale variabile dal 20 al 90% delle donne con dolore pelvico e/o infertilità. L'endometriosi rappresenta una delle patologie ginecologiche più controverse: particolarmente complessa e dibattuta risulta la pur inequivocabile relazione esistente fra endometriosi ed infertilità.

Se infatti è plausibile che nelle forme moderate/severe di endometriosi (stadio III e IV) la sterilità sia primariamente dovuta ad un fattore meccanico ovvero alla sovversione della normale anatomia pelvica (es. alterazioni del rapporto tubo-ovarico, distorsione/ostruzione tubarica), non è ancora ben chiarito il perché dell'infertilità/sub-fertilità nelle donne affette da endometriosi minima/lieve (stadio I e II), ovvero in assenza di aderenze e di lesioni endometriosiche gravi.

Sono state comunque dimostrate:

- alterazioni della maturazione e/o dello sviluppo dell'ovocita;
- alterazioni della fecondazione;
- alterazioni dell'impianto dell'embrione;
- alterazioni immunologiche;
- alterazioni genetiche dell'ovocita.

Alcuni autori hanno mostrato ridotti tassi di fertilizzazione nelle donne con endometriosi, mentre altri non hanno rilevato tale associazione negativa.

I risultati hanno evidenziato che complessivamente le donne con endometriosi che si sottopongono alla FIVET avrebbero un 19% in meno di probabilità di concepimento rispetto ai controlli.

## Fattori uterini

L'utero è costituito da una parete muscolare (miometrio), da una sierosa che la riveste e una mucosa che ne riveste la cavità interna (endometrio). La parte interna dell'utero è sede di movimenti che variano durante le varie fasi del ciclo (peristalsi uterina), mediati da fibre muscolari presenti sotto l'endometrio. Questi movimenti sono importanti in fase ovulatoria, in quanto dirigono il seme verso l'ovocita.

Nell'utero l'embrione arriva intorno al 5° giorno dopo la fecondazione, sospinto dai movimenti tubarici ciliari e peristaltici.

Se l'embrione si è formato segnala a ciò che rimane del follicolo da cui è stato emesso l'ovocita, trasformato in corpo luteo, di produrre sostanze ormonali (progesterone) a beneficio della parte interna dell'utero, l'endometrio, per prepararlo all'accoglienza dell'embrione. Se la fecondazione non avviene l'endometrio non si trasforma di conseguenza e quindi 'sfalda' uscendo all'esterno insieme al sangue mestruale (mestruazione). In caso di gravidanza, l'embrione aderisce all'endometrio attraverso meccanismi biochimici e la mediazione di molteplici e in gran parte ignoti meccanismi. Alcune molecole di adesione sono incaricate tra l'altro di mediare questo legame. Il legame avviene in conseguenza di un riconoscimento dell'embrione come qualitativamente adeguato a proseguire la sua crescita. L'attecchimento avviene in maniera in gran parte tuttora ignota: se non avviene, l'embrione è destinato ad essere espulso insieme al sangue mestruale.

Su 100 donne in età fertile che cercano la gravidanza e che effettuano il test beta hCG in fase mestruale, 60 avranno un test beta-hCG positivo, ma solo una piccola parte di esse proseguirà la gravidanza. Ciò avviene sostanzialmente per la presenza di severi meccanismi di selezione embrionale, attraverso i quali solo circa la metà degli embrioni prodotti nelle tube in effetti attecchirà.

Sono gli embrioni 'adeguati' sul piano genetico e cromosomico, mentre la maggior parte degli embrioni inadeguati sono destinati ad essere eliminati. Pur tuttavia questi ultimi rendono temporaneamente positivo il test beta hCG. Solo una piccolissima parte di embrioni difettosi proseguirà, in genere affetti dalla sindrome di Down. La sindrome di Down può essere sottoposta a screening (translucenza nucale) ed è diagnosticabile tramite biopsia dei villi coriali o amniocentesi. Test di screening ma non diagnostici per la sindrome di Down possono essere effettuati mediante ecografia (translucenza nucale) o analisi del DNA fetale sul sangue materno.

L'attecchimento può essere reso difficoltoso se a livello uterino si riscontrano difetti di tipo anatomico (malconformazioni), presenza di formazioni endouterine (polipi e fibromi endocavitari diagnosticabili con l'isteroscopia), presenza di alterazione dei meccanismi di peristalsi uterina dovuta a molteplici fattori anatomici e funzionali.

La patologia uterina più diffusa è la *fibromatosi uterina*, cioè la presenza di uno o più tumori benigni derivanti dalla proliferazione di una singola cellula di tipo fibromioma, tipica della parete uterina, che subisce un danno genetico cromosomico e comincia a moltiplicarsi con una velocità superiore a quella delle sue vicine. I fibromi sono in sostanza tumori benigni costituiti da una componente fibrosa e da una componente muscolare, che insorgono a partire da una singola cellula a livello dell'utero.

In linea generale, non è stato mai dimostrato inequivocabilmente che la fibromatosi uterina si correla all'infertilità femminile. Tuttavia la fibromatosi uterina può correlarsi a sintomi anche gravi (perdite di sangue, mestruazioni abbondanti e dolorose, degenerazione maligna) e complicanze della gravidanza e abortività.

Tuttavia i miomi, modificando la normale contrattilità uterina, possono interferire con la migrazione degli spermatozoi e con il trasporto dell'embrione; inoltre possono de-

terminare cambiamenti nell'architettura vascolare uterina influenzando così il trofismo endometriale e di conseguenza l'impianto dell'embrione.

Sono i grossi miomi intramurali e i miomi sottomucosi (all'interno della cavità) ad avere un effetto negativo sulla fertilità; la grandezza del mioma può rappresentare un altro importante fattore prognostico e un diametro di 5 cm rappresenta la misura limite che giustifica un intervento di miomectomia. Diversi studi clinici hanno dimostrato una ripresa della fertilità dopo l'intervento di miomectomia con tassi di gravidanza variabili tra il 44 ed il 62% e con l'80% dei concepimenti nel primo anno dopo l'intervento chirurgico.

### **Fattori genetici**

Il rischio di trisomia (es. sindrome di Down) nel nascituro aumenta con l'aumentare dell'età materna. Per questo la diagnosi prenatale è consigliata alle donne che avranno 35 anni al momento del parto. Questo tipo di accertamento è inoltre consigliato, indipendentemente dall'età femminile, quando la coppia ha già avuto precedenti figli affetti da anomalie cromosomiche o quando uno dei genitori o uno dei loro parenti stretti ne è affetto.



## GLI ESAMI DIAGNOSTICI MASCHILI

### Lo spermioγραμμα

La prima tappa per scoprire le cause della sterilità è eseguire lo spermioγραμμα. Lo spermioγραμμα dice subito se la causa di sterilità è maschile o prevalentemente maschile. Il test va eseguito presso un centro che si occupa di riproduzione umana. Non va eseguito per nessuna ragione presso un comune laboratorio di analisi. In questo caso la qualità dello spermioγραμμα sarà cattiva e non servirà a capire come scoprire le cause della sterilità. Inoltre lo spermioγραμμα va ripetuto almeno una o due volte, perchè un solo esame non fa diagnosi correttamente.

Lo spermioγραμμα o esame del liquido seminale consiste nella valutazione dei parametri fisico-chimici e biologici di un campione di eiaculato e consta di 2 fasi:

- valutazione macroscopica;
- valutazione microscopica.

### Valutazione macroscopica

- caratteristiche reologiche (aspetto, fluidificazione e viscosità);
- volume;
- pH.

### Caratteristiche reologiche

La parte liquida di un eiaculato è data dalla somma delle quote di liquido secrete dalle diverse ghiandole dell'apparato riproduttore maschile e la valutazione dell'aspetto macroscopico di questa parte può dare indicazione della funzionalità, sulla presenza di fattori infiammatori e alterazioni patologiche delle ghiandole stesse.

Le caratteristiche chimico-fisiche dell'eiaculato differiscono da un individuo ad un altro e per lo stesso individuo al variare delle condizioni delle vie seminali.

### Aspetto

A liquefazione avvenuta, l'aspetto normale del liquido seminale appare grigio-opalescente.

Può comunque apparire:

- limpido: a vari gradi, se la concentrazione della parte cellulare è diminuita o assente;
- torbido: dovuto ad una elevata presenza di elementi cellulari e non sempre di spermatozoi ma anche di altre cellule, detriti o batteri;
- lattescente: in cui l'aspetto bianco latte può dipendere dall'eccessiva presenza di secreto di origine prostatico;
- giallastro: che può essere causato dalla presenza di granulociti in gran quantità, contaminazione di urine, prevalenza di secreto delle vesciche seminali e raramente presenza di bilirubina;

- rosato o rosso o rosso scuro: se c'è una modesta presenza di sangue o una massiccia presenza di sangue oppure se il sanguinamento è avvenuto nelle vie genitali qualche giorno prima il colore rosso tende allo scuro.

All'odore forte, che può essere derivato da tempi lunghi di astinenza, viene data poca importanza clinica tranne quando potrebbe essere causato da infezione batterica.

Immediatamente dopo l'eiaculazione, lo sperma va incontro ad un processo di coagulazione, assumendo l'aspetto caratteristico semi-solido che lo fa aderire alle pareti dell'apposito contenitore di raccolta, dovuto all'azione di proteine provenienti dalle ghiandole accessorie. Pochi minuti dopo l'eiaculazione, sia a temperatura ambiente che in un incubatore a 37°C, il seme comincia a liquefare.

### **Fluidificazione**

Normalmente la liquefazione si completa entro i primi 15 minuti, durante i quali il seme diventa sempre più omogeneo. In in questo caso verrà registrata nel referto come "fisiologica"; questa raramente avviene entro i 60 minuti o più.

I casi di incompleta liquefazione verranno registrati nel referto come 'incompleta' o 'ritardata'. Normalmente il campione liquefatto può contenere dei granuli, detti corpi gelatinosi, che sembrano non avere nessun significato clinico.

Il completamento della liquefazione viene valutato facendo scorrere mediante una pipetta il seme lungo le pareti del contenitore e osservando in controluce se il campione è omogeneo o meno oppure presenta ammassi semi-solidi.

### **Viscosità**

La viscosità è una condizione diversa e indipendente dalla liquefazione. Infatti mentre la liquefazione è un processo transitorio di dissolvimento del coagulo, la viscosità è una caratteristica permanente di un determinato seme.

La viscosità viene valutata in maniera semi-quantitativa prelevando il seme attraverso una pipetta di plastica e facendo 'gocciolare' il seme per gravità e osservandone la lunghezza di ogni tratto che si stacca dalla punta della pipetta.

Un seme normale lascia la pipetta in piccole e singole gocce, in questo caso la viscosità viene definita normale o fisiologica.

Un seme anomalo presenta una viscosità aumentata se le gocce sono costituite da un unico filo che supera i 2 cm di lunghezza e a seconda della severità dell'aumento della viscosità verrà segnalata come:

- + (lieve aumento);
- ++ (medio aumento);
- +++ (forte aumento).

Incompleta fluidificazione e aumentata viscosità possono interferire con la determinazione della motilità e della concentrazione degli spermatozoi, nella ricerca degli anticorpi legati allo spermatozoo e nella misura dei markers biochimici; a causa dell'interferenza sulla capacità di movimento dello spermatozoo sono da considerare come fattori che possono incidere sulla fertilità.

### **Il volume**

Viene calcolato dopo la completa fluidificazione attraverso una pipetta o una provetta graduata o pesando il liquido seminale. Il volume dipende dalle secrezioni principalmente delle vescicole seminali (responsabili della produzione del 46-80% dell'intero eiaculato) e della prostata (responsabile della produzione del 13-33% dell'intero eiacu-

lato) e in misura minore da epididimo e dalle ghiandole bulbo-uretrali.

È veramente importante la precisa valutazione del volume poiché da esso si ricava il numero totale degli spermatozoi e il numero delle cellule non spermatiche.

Il volume è un parametro che ha una certa variabilità anche all'interno degli stessi soggetti poiché può dipendere dall'astinenza sessuale e dalla disposizione psicologica al momento della raccolta. Inoltre può dipendere dalle capacità funzionali delle ghiandole produttrici del plasma.

In presenza di un'adeguata astinenza (2-7 giorni), intesa come mancata eiaculazione per rapporto, masturbazione o polluzione notturna, e in buone condizioni psicologiche:

- un *basso volume* può dipendere da problemi alla raccolta (perdita di parte dell'eiaculato), da ostruzione dei dotti eiaculatori o da assenza bilaterale congenita dei vasi deferenti, da parziale eiaculazione retrograda (una parte dell'eiaculato viene emesso nel dotto urinario ed è possibile diagnosticarlo facendo la ricerca degli spermatozoi nelle urine) o da una deficienza androgenica (squilibri ormonali). Questa condizione è definita ipospoia;
- un *valore alto* del volume può essere causato da infiammazione degli organi accessori. Questa condizione è definita iperposia.

### **Il pH**

Il pH del liquido seminale è dovuto all'equilibrio fra la secrezione basica delle vescicole seminali e la secrezione acida della prostata.

La misura, che viene effettuata tramite cartine che una volta a contatto con il seme virano il colore in base al pH, deve avvenire entro la mezz'ora e non più tardi di un'ora dalla raccolta poiché il valore è influenzato dalla perdita dell'anidride carbonica (CO<sub>2</sub>) che avviene naturalmente dopo la produzione portando ad un aumento naturale del pH.

Le infiammazioni delle ghiandole accessorie possono avere come conseguenza un'alterata produzione delle parti basiche ed acide e quindi ad uno squilibrio del pH.

- un *basso valore* di pH, insieme ad un basso volume e ad un basso numero di spermatozoi, può essere un'indicazione di ostruzione dei dotti secretori o di assenza bilaterale congenita dei vasi deferenti
- un *alto valore* di pH, invece, non fornisce utili informazioni cliniche.

### **Valutazione microscopica**

- componente gametica (spermatozoi);
- componente cellulare non gametica.

### **La nuova classificazione OMS 2010**

È disponibile attualmente la quinta edizione del manuale di seminologia dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS).

I parametri presi in considerazione dalla nuova classificazione OMS 2010 sono stati pubblicati precedentemente dalla rivista Human Reproduction Update, nel quale si considerano su 4500 uomini di 4 differenti continenti.

I dati estrapolati si basano sull'analisi del liquido seminale di uomini la cui partner mostra un Time To Pregnancy (TTP) inferiore ai 12 mesi. I maschi pertanto fertili presentano i seguenti dati di riferimento, descritti dal quinto percentile:

- volume: almeno 1,5 mL;
- concentrazione: almeno 15 milioni/mL;
- motilità progressiva: 32%;
- motilità progressiva + non progressiva: 40%;
- forme morfologicamente normali: almeno 4%;
- vitalità: almeno 58%.

## Il MAR test

Il MAR test viene effettuato per valutare la presenza di anticorpi adesi agli spermatozoi. Normalmente gli spermatozoi sono separati dalle cellule immunocompetenti da una barriera emato-testicolare; tuttavia in seguito a diversi fattori come infezioni o traumi, la resistenza di questa barriera può essere alterata, dando origine ad una reazione autoimmunitaria nei confronti degli spermatozoi contenuti nel testicolo, con produzione di auto-anticorpi rivolti contro gli spermatozoi del paziente.

L'anticorpo che lega lo spermatozoo ne induce un effetto immobilizzante e promuove la comparsa di agglutinazioni (adesione testa-testa coda-coda o testa-coda degli spermatozoi mobili).

Gli anticorpi anti-spermatozoo nel liquido seminale appartengono quasi esclusivamente a due classi immunologiche: IgA ed IgG; poiché gli anticorpi IgA quasi mai sono presenti in assenza degli anticorpi IgG, la ricerca di questi ultimi è sufficiente per lo screening routinario. Si tratta di anticorpi che l'organismo produce contro una componente di sé stesso, gli spermatozoi, considerandoli un corpo estraneo. Gli anticorpi che si legano agli spermatozoi possono impedire la penetrazione dello spermatozoo nell'ovocita, legandosi alla testa dello spermatozoo o la loro motilità legandosi alla coda dello spermatozoo. Il dosaggio degli anticorpi antispermatozoi è indicato quando lo spermogramma rivela la presenza di agglutinazioni, quando c'è una riduzione di motilità degli spermatozoi (astenozoospermia) non associata a riduzione del numero, quando esiste un rischio di malattia autoimmunitaria (pregressa torsione o trauma testicolare), o nei casi di infertilità inspiegata, cioè una condizione maschile e femminile apparentemente normale. Tecnicamente si effettua con sfere di poliacrilamide legate ad anticorpo, e in caso di spermatozoi legati con anticorpi nella misura almeno del 50%, il test si considera alterato. Questo problema si riscontra fino al 10% dei maschi infertili.

Con il MAR-test gli spermatozoi vengono incubati con particelle in lattice ricoperte da IgG e antisiero verso le IgG umane. Nel caso di presenza di anticorpi adesi alla superficie degli spermatozoi, le cellule legheranno le particelle in lattice.

Un'infertilità immunologica è ipotizzabile se oltre il 50% degli spermatozoi motili presenta particelle adese.

## Test di frammentazione del DNA

L'analisi del DNA spermatico serve a stabilire il grado di frammentazione del DNA degli spermatozoi, che si riscontra nel 5% dei maschi con liquidi seminali normali e nel 25% dei maschi con analisi del liquido seminale anormali.

Si possono considerare due tipi di test differenti.

Test che misurano direttamente il danno agli spermatozoi:

- TUNEL , TdT-mediated-dUTP Nick End Labeling;
- COMET Assay.

Test che misurano il danno agli spermatozoi dopo denaturazione:

- SCSA , Sperm Chromatin Structure Assay;
- SCD test, Sperm Chromatin Dispersion test.

Non esiste una metodica migliore delle altre sebbene le diverse metodiche si basino su principi e protocolli differenti. Ciò premesso, la scelta può essere indirizzata verso le metodiche che non utilizzano grandi strumenti e quindi più economiche per il paziente.

## Il tampone uretrale e la spermiocoltura

Sono esami colturali che se correttamente eseguiti ci danno notevoli informazioni e possibilità di trattamento del seme. Devono essere possibilmente associati ad antibiogramma, per determinare a quali antibiotici-antimicotici sono sensibili specificamente i germi coinvolti.

Le principali infezioni batteriche sono dovute a:

- *Neisseria gonorrhoeae* (gonococco);
- *Chlamydia trachomatis*;
- *Mycoplasma*;
- *Treponema pallidum* (sifilide);
- *Gardnerella vaginalis*;
- *Hemophilus ducreyi*;
- *Klebsiella granulomatis* (granuloma inguinale o Donovanosi);
- *Candida* (funghi).

Il Gonococco causa uretrite purulenta ed è stato dimostrato che può legarsi agli spermatozoi nel liquido seminale attraverso recettori.

Il ruolo della *Chlamydia* nel liquido seminale è controverso. Alcuni lavori suggeriscono che essa possa ridurre la motilità degli spermatozoi e causare morte degli spermatozoi.

Alcuni lavori suggeriscono che il *Mycoplasma* essa possa legarsi agli spermatozoi bloccandone la motilità ed altri che il *Treponema* della Sifilide si possa localizzare a livello intratesticolare.

La *Gardnerella* è stata trovata in alcuni lavori nel 22% di uomini infertili e in nessun uomo fertile. Non c'è differenza in termini di qualità del liquido seminale tra soggetti infertili con infezione o senza infezione. Tuttavia rispetto ai controlli normali, i soggetti con infezione da *Gardnerella* presentano una riduzione della vitalità, della motilità e della morfologia normale.

L'*Hemophilus Ducreyi* (ulcera molle o cancroide) provoca lesioni particolarmente tipiche che compaiono 3-5 giorni dopo il contatto sessuale e lo stadio vescicolare è così leggero che spesso non è riconosciuto. Poi compare una sola ulcera visibile in un qualsiasi punto del pene, anche se il più delle volte si trova nel glande. Non ci sono lavori che riportano infertilità in maschi con ulcera molle.

La *Klebsiella granulomatis* provoca il granuloma inguinale o Donovanosi. È un nodulo indolore rosso-carne che si trasforma in una placca arrotondata, maleodorante, rilevata e vellutata. Le sedi dell'infezione sono il pene, lo scroto, l'inguine e le cosce, il volto; nei maschi omosessuali, l'ano e le natiche.

## Ecografia scrotale

L'indagine richiede un'apparecchiatura ecografica di moderna concezione, dotata di sonda lineare e possibilità di osservare sotto forma di immagini colorate i flussi sanguigni, sfruttando il fenomeno fisico detto 'effetto Doppler'. L'esame prevede la valutazione degli involucri scrotali, dei testicoli, degli epididimi, dei dotti deferenti e della vasco-

larizzazione testicolare. Valuta le dimensioni dei testicoli, l'omogeneità, la presenza di cisti dell'epididimo, il grado di varicocele e la presenza di idrocele.

È importante insegnare la prevenzione oncologica eseguendo l'autopalpazione. Quando il paziente avvertisse la presenza di noduli, di gonfiore o qualsiasi cambiamento si deve rivolgere all'urologo e si deve sottoporre ad un controllo ecografico.

L'indagine è importante anche nella valutazione dell'infertilità maschile dandoci informazioni importanti su patologie 'dormienti' che il paziente non si accorgeva di avere, ma che possono influire negativamente col tempo sulla sua infertilità.

## **Ecocolordoppler scrotale e dei vasi spermatici**

L'ecocolordoppler scrotale rappresenta la tecnica diagnostica strumentale principale per lo studio delle strutture vascolari scrotali. L'indagine richiede una apparecchiatura da ecografia di moderna concezione, dotata di sonda lineare e possibilità di osservare sotto forma di immagini colorate i flussi sanguigni, sfruttando il fenomeno fisico detto 'effetto Doppler'. L'ecografia scrotale è eseguita in due fasi: la prima con il paziente in posizione supina a cui viene chiesto di mantenere il pene appoggiato alla regione sovrapubica e la seconda in ortostatismo per meglio valutare la presenza di eventuali reflussi lungo il plesso pampiniforme, mal posizioni testicolari o l'entità di eventuali raccolte liquide. L'esame prevede inoltre la valutazione degli involucri scrotali, dei testicoli, degli epididimi e dei dotti deferenti e della vascolarizzazione testicolare. L'ecocolordoppler dei vasi spermatici rappresenta la tecnica di imaging principale per lo studio del varicocele. Lo studio viene effettuato dapprima in clinostatismo e successivamente in ortostatismo. La valutazione B-Mode ci permette di rilevare la presenza di vasi venosi ectasici (diametro > 3mm) lungo il canale inguinale o all'interno della sacca scrotale, mentre l'indagine ecocolordoppler (ECD) ci dà informazioni sulla presenza o meno di un reflusso e se quest'ultimo è presente in condizioni basali e/o dopo aumento della pressione endoaddominale (manovra di Valsalva). La classificazione del varicocele è clinica ed ecografica.

## **Dosaggi ormonali**

Attualmente i dosaggi ormonali sono indicati nel maschio infertile quando la concentrazione degli spermatozoi è inferiore a 10 milioni per millilitro, quando coesiste una disfunzione erettile, quando sono presenti altri segni o sintomi che suggeriscono un basso tasso di testosterone nel sangue o una disfunzione ormonale di altro tipo. La valutazione può comprendere il dosaggio di FSH, LH e prolattina.

Il dosaggio dell'FSH si fa mediante un semplice prelievo di sangue. Alti valori di FSH indicano un danno testicolare. Bassi valori di FSH associati a ridottissimo numero di spermatozoi sono sospetti per un problema della ghiandola ipofisi, che sta alla base del cervello. Valori normali di FSH associati a problemi di liquido seminale sono in genere presenti in forme ostruttive che causano deficit di spermatozoi.

Una disfunzione endocrina è riscontrata nel 10% dei maschi infertili, tuttavia endocrinopatie di valore clinico si riscontrano in meno del 2% degli infertili.

## **Screening genetico**

### **Cariotipo**

Generalmente si presume che la prevalenza di anomalie cromosomiche, aberrazioni sia numeriche che strutturali, sia aumentata negli uomini sterili e che il rischio di anomalie sia inversamente correlato con la concentrazione degli spermatozoi; non sono state trovate correlazioni con la motilità e la morfologia degli spermatozoi.

Dai dati della letteratura si evince che la prevalenza di anomalie negli uomini sterili varia tra il 3 e il 19%.

Con l'introduzione della ICSI, sono insorte delle perplessità sulla possibilità di trasmettere queste anomalie ai neonati; si è visto però che la possibilità di avere riarrangiamenti cromosomici è molto bassa (circa 1%) negli uomini con oligozoospermia.

Si presume che maschi con una bassa concentrazione di spermatozoi presentano un alto rischio di anomalie cromosomiche ma la prevalenza di anomalie non differisce significativamente a concentrazioni spermatiche diverse; si ha invece un'alta prevalenza nel gruppo dei pazienti azoospermici.

Da qui si assume che la concentrazione degli spermatozoi è l'unico parametro per identificare una popolazione a rischio di anomalie cromosomiche.

Per quanto riguarda i pazienti con azoospermia ostruttiva, non è risultata una prevalenza maggiore di rischio di anomalie nei pazienti con azoospermia non ostruttiva.

Vi è poi un'alta prevalenza di anomalie (4,1%) anche nelle donne di coppie destinate alla ICSI, cosa inaspettata, in quanto in queste coppie i fattori maschili predominano come causa di infertilità e le donne sono considerate rappresentanti di una popolazione normale.

Non c'è una differenza sostanziale di cariotipo anormale in uomini con oligozoospermia e normale concentrazione di spermatozoi ma che richiedono una ICSI.

Ad oggi non ci sono delle linee guida consistenti riguardanti la cariotipizzazione in uomini che devono affrontare un trattamento di ICSI. Le principali linee guida, ASRM, NICE e Dutch Society of Obstetrics and Gynecology attestano un'alta prevalenza di anomalie negli azoospermici e negli oligospermici.

In conclusione la cariotipizzazione può identificare la causa di infertilità maschile ed è consigliata a tutte le coppie sterili con azoospermia non ostruttiva.

### **Fibrosi cistica**

Il test per individuare i portatori delle mutazioni a carico del gene CFTR è un test genetico eseguibile a partire da un prelievo di sangue.

Ad oggi sono state ritrovate più di 1500 mutazioni a carico del gene della fibrosi cistica. Alcune mutazioni sono più diffuse in alcune popolazioni piuttosto che in altre e variano anche tra le diverse regioni italiane.

Esistono vari tipi di test genetici per identificare nel DNA le mutazioni del gene della fibrosi cistica:

- test di 1° livello: identificano un certo numero di mutazioni (da 31 a 200) che sono le più frequenti;
- test di 2° e 3° livello: studiano l'intero gene osservando anche le mutazioni più rare.

Allo stato attuale si può stimare che in Italia un test di 1° livello sia in grado di diagnosticare circa dal 75 al 90% delle mutazioni del gene FC.

Nei maschi, il 95% dei pazienti adulti con fibrosi cistica mostra azoospermia per atresia dei dotti deferenti. Alcuni studi hanno inoltre evidenziato che la frequenza delle mutazioni in eterozigosi (solo una delle due copie di un gene è alterata) del gene CFTR è due volte superiore negli uomini infertili rispetto alla popolazione generale.

Questo esame dovrebbe essere eseguito solo in presenza di fattori di rischio familiare, o in caso di ostruzione congenita del canale deferente, nel maschio. Lo stato di portatore sano interessa 1 su 25 soggetti, in maniera analoga nei fertili e negli infertili, ma la patologia si verifica in solo 1 caso su 2.500, e questa bassa incidenza non giustifica l'esecuzione di questo screening di routine. Nei maschi di coppie che fanno l'ovodo-

nazione questo esame è ancor meno indicato, in quanto la donatrice è scrinata per le stesse mutazioni che si scrinerebbero nel partner maschile. In ogni caso, pur volendo effettuare lo screening, del tutto fuori luogo in coppie infertili al di fuori di quanto sopra elencato, occorre scrinare un solo membro della coppia e l'altro solo se il primo risultasse anomalo (portatore sano).

### **Microdelezioni del cromosoma Y**

Tra le varie cause di infertilità maschile ve ne è una genetica che riguarda le microdelezioni del cromosoma Y. Le microdelezioni sono perdite di piccole porzioni di DNA non visibili con l'analisi del cariotipo ma che necessitano tecniche più mirate per la loro investigazione. Queste microdelezioni si ritrovano soprattutto in tre regioni del braccio lungo del cromosoma Y dette AZFa, AZFb e AZFc. La frequenza delle delezioni è maggiore nell'ultima regione e, tra tutte le diverse delezioni studiate, la più nota è quella gr/gr.

Il cromosoma Y è l'unico cromosoma presente solo nei maschi ed è relativamente povero di geni, ma, poiché sono solo i suoi geni che determinano il differenziamento maschile durante lo sviluppo, questi regolano fundamentalmente la spermatogenesi.

La presenza delle microdelezioni del cromosoma Y è nota da molto tempo ed è stata associata ad azoospermia (assenza di spermatozoi) e oligozoospermia severa (presenza di scarsissimi spermatozoi).

Nella delezione gr/gr manca una porzione di circa 1,6 milioni di basi che risultano nell'assenza dei geni che codificano per DAZ e CDY1, proteine che sembrano essere responsabili dell'infertilità maschile.

La difficoltà che risiede nello studio di questi geni è l'alto tasso di polimorfismo che essi hanno nella popolazione. La sequenza del DNA di queste regioni è molto diversa da persona a persona e soprattutto tra persone di razze diverse; ciò crea non pochi problemi nel confrontare i risultati tra i casi ed i controlli.

Una meta-analisi su oltre 12.000 pazienti è riuscita a chiarire i vari dubbi che risiedono nella questione tra infertilità e delezioni gr/gr.

Sembra dimostrato ora che le delezioni parziali del gene AZFc sono più frequenti nei maschi infertili che nei controlli, ma l'associazione tra questi due parametri è fortemente dipendente dall'etnia e dalla posizione geografica dei pazienti.

Le delezioni gr/gr sembrano così essere un importante fattore di rischio per l'infertilità maschile, soprattutto per l'oligozoospermia. Non si sono riscontrate evidenze che suggeriscono un ruolo di queste nell'azoospermia, quindi probabilmente in quest'ultima sono coinvolti anche altri fattori genetici che ancora non si conoscono.

Un'ulteriore difficoltà dello studio è rappresentata dalla percentuale di maschi fertili e normozoospermici che però presentano queste delezioni, ma apparentemente non creano problemi. Come si può spiegare questo fenomeno? La risposta ancora non si sa, ma si pensa comunque che questi geni lavorino insieme ad altri fattori ancora sconosciuti e che sia questa collaborazione a dare l'effetto, piuttosto che un singolo gene.

Alla luce di tutti questi problemi, è chiaro come ancora non si può dare rilevanza diagnostica alla presenza delle delezioni gr/gr. Questi risultati, però, sono comunque importanti perché danno la base a nuove linee di ricerca che possano spiegare le cause genetiche univoche dell'infertilità maschile, correggendo i risultati anche per etnie e posizione geografica, visto il tasso di polimorfismo del cromosoma Y.



## GLI ESAMI DIAGNOSTICI FEMMINILI

### **Ecografia pelvica per valutare la riserva ovarica**

Un esame importante è l'ecografia femminile per la riserva ovarica. Se la tua riserva ovarica è buona (il numero dei follicoli antrali nelle due ovaie deve essere almeno 12), la tua età è inferiore a 35 anni e non c'è traccia di altre possibili cause di sterilità come l'endometriosi, allora si passa alla valutazione della pervietà delle tube, che serve a verificare se ci sono disfunzioni tubariche. Questo sempre che il liquido seminale del partner non presenti anomalie severe; in qual caso l'esame delle tube non è indicato perché si procede direttamente alla fecondazione in provetta tipo ICSI. L'esame si chiama isterosonosalpingografia se effettuato con l'ecografia e isterosalpingografia se effettuato con i raggi X.

L'ostilità del muco cervicale viene ormai tralasciato perché i test che servono a determinarlo sono ormai considerati privi di valore.

È fondamentale capire, se hai meno di 35 anni, se i vostri rapporti intimi sono sufficienti in numero e qualità. Almeno 2-3 rapporti a settimana sono considerati ideali, sotto questo numero c'è oggettivamente più difficoltà a rimanere incinta.

### **L'ormone antimulleriano (AMH)**

L'ormone antimulleriano (AMH) è una glicoproteina dimerica circolante nel sangue costituita da due unità monomeriche di 72 kilodalton legate da ponti disolfuro; chimicamente, appartiene alla famiglia del Transforming Growth Factor beta family. L'ormone, per la fertilità, si dosa nella donna.

Più è alto il valore dell'AMH e più ovociti si ottengono mediante una stimolazione ovarica. Più è alto il numero di ovociti ottenuti e più aumenta la probabilità di nati nelle tecniche di fecondazione in vitro.

I Pazienti con basso valore di AMH costituiscono casi complessi, perché si rischia di ottenere pochi ovociti alla stimolazione, e di conseguenza un basso numero di embrioni, e una ridotta probabilità di gravidanza. Un basso valore di AMH è stato posto da alcuni studi in relazione ad una ridotta possibilità di gravidanza e di nascita.

Tuttavia, la nostra esperienza indica che non esiste un valore minimo al di sotto del quale non sia possibile ottenere un successo.

In un caso pubblicato dal Gruppo Donnamed® (Tocci 2009) in una donna di 34 anni con valori di AMH molto bassi (inferiori a 3,6 pmol/L) è stato possibile ottenere con la ICSI 3 embrioni di ottima qualità ed una gravidanza evolutiva con nascita di un bimbo a termine di 3280 grammi. Questo sta ad indicare che anche con valori bassi di AMH si possono ottenere, utilizzando un adeguato protocollo di trattamento, embrioni di ottima qualità e buone possibilità di gravidanza, soprattutto se la donna è giovane.

### **Screening ormonale**

Ogni test ormonale è ovviamente un prelievo di sangue. Disturbi ormonali possono insorgere a livello di:

- base del cervello (ipotalamo e ipofisi);
- organi riproduttivi (ovaie);
- tiroide;
- ghiandole surrenali.

Se i disturbi ormonali si verificano nel cervello, gli ormoni coinvolti sono l'FSH, l'LH e la prolattina: questo può influire sull'attività ovulatoria

Se i disturbi ormonali si verificano negli organi riproduttivi, gli ormoni coinvolti sono principalmente gli estrogeni ed il progesterone. Quest'ultimo può influire sull'attecchimento embrionale.

## Screening genetico

Tipo di test:

- cariotipo (mappa cromosomica);
- esami sul DNA (screening molecolare).

### ***Cariotipo (mappa cromosomica)***

Si tratta di un test di screening genetico femminile in cui, dopo il prelievo di sangue, si separano i linfociti dal resto del sangue e si mettono in coltura per farli crescere. In una fase precisa del ciclo di mitosi (replicazione cellulare) le cellule vengono bloccate e sono visibili i cromosomi, che possono essere pertanto studiati.

Questo esame risulta utile solo in presenza di fattori di rischio familiare (es. precedenti casi in famiglia di patologie cromosomiche tipo sindrome di Down o malformazioni etc), personale (es. abortività ripetuta) oppure se il partner maschile ha un liquido seminale compromesso, con una concentrazione di spermatozoi inferiore a 10 milioni per millilitro. In tutti gli altri casi è un esame inutile nei soggetti infertili poiché la probabilità di anomalie del carotipo è la stessa dei soggetti fertili.

Dei cromosomi si valuta:

- il numero;
- la lunghezza;
- il contenuto.

In alcune situazioni può mancare un cromosoma sessuale X (sindrome di Turner) ed il soggetto pertanto non ovula. Inoltre andrà incontro ad una menopausa precoce.

### ***Screening molecolare***

Rispetto all'esame del cariotipo, lo screening molecolare va più in profondità nell'indagine. Serve a valutare se manca del tutto un gene, oppure esso possiede una mutazione, che ne compromette la funzione.

I test più frequenti richiesti nella donna sterile sono:

- screening per la fibrosi cistica: per determinare il rischio di generare un bimbo con questa gravissima malattia;
- X-fragile: per determinare se la donna è a rischio di menopausa precoce e se il figlio maschio è a rischio di ritardo mentale.

### ***Fibrosi cistica***

Nella donna la fibrosi cistica può influenzare la viscosità del muco cervicale o, nelle condizioni cliniche più gravi, interferire con i cicli mestruali. Recentemente nuovi studi

stanno ipotizzando che la fibrosi cistica possa alterare l'ambiente uterino e tubarico andando ad impedire il corretto trasporto degli spermatozoi, il loro processo di capacitazione e quindi la fecondazione in vivo. La proteina CFTR si ritrova, infatti, nella maggior parte dei distretti del tratto riproduttivo femminile (vagina, cervice, utero, tube) e la sua espressione è modulata dal ciclo ormonale (aumenta con gli estrogeni e diminuisce con il progesterone).

L'overespressione della proteina nella prima fase del ciclo è necessaria per massimizzare la secrezione dei fluidi che trasportano gli spermatozoi nelle tube e per incrementare i livelli di HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, necessari per il processo di capacitazione. Nella seconda fase del ciclo, al contrario, i fluidi devono ridursi per permettere l'impianto della blastocisti.

## **Elettroforesi emoglobine patologiche**

Questo esame per lo screening dell'anemia mediterranea (talassemia) dovrebbe essere di 2° livello, cioè effettuato solo se l'emocromo di uno dei membri della coppia risultasse anomalo (basso volume corpuscolare medio, ovvero in caso di riduzione del volume cellulare medio e di alterazioni morfologiche degli eritrociti). Solo in questi casi, andrebbe effettuato al membro della coppia con queste anomalie l'elettroforesi delle emoglobine e solo in caso di anomalia di un partner, occorre scrinare l'altro partner. Come la fibrosi cistica, l'anemia mediterranea è una malattia recessiva e si manifesta solo se entrambi i genitori sono portatori sani. Solo nel 25% dei casi si avrà un soggetto malato.

## **I tamponi cervico-vaginali**

Le infezioni sessualmente trasmesse sono la principale causa di infertilità maschile e femminile.

Le principali sono dovute a:

- *Neisseria gonorrhoeae* (gonococco);
- *Chlamydia trachomatis*;
- *Mycoplasma*;
- *Treponema pallidum* (sifilide);
- *Gardnerella vaginalis*;
- *Hemophilus ducreyi*;
- *Klebsiella granulomatis* (granuloma inguinale o Donovanosi).

### ***Neisseria gonorrhoeae* (gonococco)**

Il Gonococco si diffonde nella donna generalmente seguendo i piani superficiali, tendendo a non penetrare in profondità. Dall'endocervice si può estendere alla parte interna dell'utero, causando endometrite, quindi alle tube di Falloppio, causando una reazione infiammatoria acuta (pelvic inflammatory disease, PID), che, se non trattata, si cronicizza provocando aderenze, distruzione dell'epitelio ciliato delle tube e della mucosa interna. Può superare l'ostio tubarico ed estendersi alla cavità addominale, con un quadro di peri-epatite (sindrome di Fitz-Hugh-Curtis).

### ***Chlamydia trachomatis***

La chlamydia nella donna colpisce prevalentemente la cervice uterina, causando una condizione indistinguibile clinicamente dalla cervicite da gonococco. I sintomi possono essere le perdite vaginali, il sanguinamento intermestruale, il bruciore a urinare e il dolore nei rapporti sessuali. Tuttavia è spesso non sintomatica e può danneggiare permanentemente l'apparato riproduttivo della donna senza che se ne accorga. Si può estendere alla parte interna dell'utero, causando endometrite, quindi alle tube di Falloppio, causando una reazione infiammatoria acuta (pelvic inflammatory disease, PID),

che, se non trattata, si cronicizza provocando aderenze, distruzione dell'epitelio ciliato delle tube e della mucosa interna.

### **Micoplasm**

Il micoplasma nella donna è stato isolato in 2/3 delle donne con leucorrea (secrezione vaginale) patologica e solo in 1/10 donne senza leucorrea patologica. È stato inoltre isolato da 10% delle donne con infezione tubarica diagnosticata alla laparoscopia. Il suo ruolo nella patologia tubarica è tuttavia poco chiaro, perché si ritrova spessissimo associato ad altri microrganismi.

### **Treponema pallidum (sifilide)**

La sifilide nella donna si trasmette per via sessuale e si manifesta con lo sviluppo di un'ulcera sulla parete vaginale o la cervice uterina, di difficile visualizzazione, dopo 3 settimane dall'infezione (sifilide primaria). Dopo 6 settimane dall'infezione, si verifica un'eruzione cutanea (sui palmi e le piante del piede), e con lesioni genitali verrucose, o perdita di capelli (alopecia) (sifilide secondaria). Questo stadio, se non trattato, è seguito da un lungo stadio asintomatico detto stadio latente, in cui decadono i sintomi e la contagiosità. Tuttavia in 1/3 dei pazienti la malattia progredisce allo stadio successivo (sifilide terziaria), che può portare al virtuale danneggiamento di tutti gli organi e può durare decenni portando al decadimento di molte funzioni organiche. Può causare aborti, morti neonatali, prematurità e sifilide congenita nel neonato.

### **Gardnerella vaginalis**

È stata trovata nel tratto genitale alto di donne con malattia infiammatoria pelvica.

### **Hemophilus ducreyi (ulcera molle o cancroide)**

L'ulcera molle nella donna è dolorosa, soprattutto a contatto con l'urina, e si associa a suppurazione mono-laterale dei linfonodi inguinali. Non è implicato in casi di infertilità.

### **Klebsiella granulomatis (granuloma inguinale o Donovanosi)**

Il granuloma inguinale è un nodulo indolore rosso-carne che si trasforma in una placca arrotondata, maleodorante, rilevata e vellutata. Le sedi dell'infezione sono la vulva, la vagina e il perineo, il volto.

## **Test di pervietà delle tube (isterosalpingografia o isterosonosalpingografia)**

La isterosonosalpingografia è una indagine ecografica che serve per visualizzare la cavità uterina e verificare la pervietà tubarica (apertura o chiusura delle tube). Se la tecnica si effettua mediante raggi X, si chiama isterosalpingografia.

Non è una tecnica per determinare la funzionalità tubarica, che può essere compromessa anche in presenza di normale pervietà. È un test che pertanto può essere definito 'idraulico' e serve solo a verificare la chiusura ma particolarmente l'apertura (pervietà) delle tube.

È una tecnica:

- semplice, eseguibile in ambulatorio;
- innocua;
- ha una buona accuratezza diagnostica (la diagnosi viene mediamente confermata, da successivi eventuali controlli endoscopici, nell'80% dei casi).

## **L'isteroscopia**

L'isteroscopia è un esame endoscopico che serve a valutare la parte interna della cavità

dell'utero. Dura circa 2 minuti in mani esperte e si esegue ambulatorialmente senza anestesia. Va eseguito tra il 7° ed il 14° giorno del ciclo mestruale.

Nella fecondazione in provetta l'isteroscopia può essere importante, perché gli embrioni vengono posizionati in utero. Tuttavia, l'isteroscopia è sempre importante prima di una fecondazione in provetta? No, almeno non c'è evidenza scientifica che sia sempre importante eseguire una isteroscopia.

Quello che si sa con certezza è riassunto qui di seguito:

- la rimozione isteroscopica di polipi endometriali con un diametro medio 16 mm rilevati in ecografia raddoppia il tasso di gravidanza in pazienti che si sottopongono a inseminazione intrauterina;
- in pazienti con un mioma (fibroma) di meno di 4 cm di diametro, la sua rimozione conferisce un vantaggio marginale rispetto alla non rimozione;
- la metroplastica isteroscopica (rimozione delle anomalie di forma dell'utero) produce un minor tasso di gravidanza in pazienti subfertili rispetto a pazienti poliabortive;
- la rimozione di aderenze intrauterine non è stata studiata in nessuno studio randomizzato;
- l'isteroscopia effettuata in pazienti con due tentativi falliti di fecondazione in vitro si associa ad un raddoppio del tasso di gravidanza.

## La laparoscopia

La laparoscopia è un intervento chirurgico mini-invasivo ed esplorativo effettuato sotto anestesia generale che dà la possibilità al ginecologo di esaminare gli organi pelvici (l'utero, le ovaie e le tube di Falloppio).

La laparoscopia può essere consigliata per la presenza di dolori pelvici, infertilità femminile, sospetto clinico o ecografico di cisti alle ovaie, sospetto di gravidanza extrauterina, endometriosi, sospetto di disfunzione tubarica.

La preparazione preoperatoria consueta per questo tipo d'intervento implica il digiuno e l'astensione dal fumo. Per alcuni interventi chirurgici potrebbe essere necessario l'uso di medicine per coadiuvare lo svuotamento dell'intestino. La laparoscopia viene effettuata sotto anestesia generale. Per quest'intervento è necessario fare un'incisione al di sotto dell'ombelico. Attraverso questo taglio verrà inserito un ago e l'addome verrà disteso con del gas di anidride carbonica. Questo renderà più facile al ginecologo vedere gli organi pelvici. Quindi verrà inserito un telescopio (laparoscopio) collegato ad un video. Altri strumenti potrebbero essere inseriti attraverso piccole incisioni appena al di sopra del bordo del pelo pubico. Al termine dell'intervento tutti gli strumenti vengono rimossi, il gas è rilasciato e le incisioni sulla pelle sono richiuse con del nastro, suture o delle clips.

## TECNICHE DI PROCREAZIONE MEDICALMENTE ASSISTITA

Secondo la legge 40 che regola la materia, il ricorso alle tecniche di procreazione medicalmente assistita è consentito solo quando sia accertata l'impossibilità di rimuovere altrimenti le cause che impediscono la procreazione ed è comunque circoscritto ai casi di sterilità o di infertilità inspiegate documentate da atto medico, nonché ai casi di sterilità o di infertilità da causa accertata e certificata da atto medico.

### **L'inseminazione artificiale intrauterina (IUI)**

L'inseminazione artificiale intrauterina omologa (con seme del partner detta IUI o AIH) è una tecnica di inseminazione artificiale di primo livello per il trattamento della sterilità di coppia di grado lieve.

La tecnica dell'inseminazione intrauterina viene eseguita:

- su ciclo naturale, cioè col semplice monitoraggio dell'ovulazione spontanea;
- con stimolazione ovarica, producendo più di un follicolo e in genere più ovociti (ovuli).

L'inseminazione artificiale intrauterina può essere effettuata sotto guida ecografica, procedura però non sempre necessaria. Questa metodica d'inseminazione artificiale viene effettuata nel giorno di maggiore fertilità, con un catetere, cioè un sottile tubicino inserito all'interno della cavità uterina o nel collo uterino attraverso il quale vengono rilasciati nell'utero gli spermatozoi migliori, che raggiungono le tube, per fecondare l'ovulo.

Questa tecnica non prevede anestesia né locale né generale e si può paragonare come grado di invasività all'esecuzione di un pap test.

Secondo la legge italiana 40/2004 (varata nel marzo del 2004) l'inseminazione intrauterina è una tecnica di procreazione assistita la cui esecuzione è strettamente regolata e deve avvenire in ambienti idonei ed autorizzati. In particolare, la IUI non può essere effettuata all'interno di uno studio medico ma la legge richiede che la struttura sia autorizzata come ambulatorio specialistico, che richiede un'idonea autorizzazione da parte dell'Azienda Sanitaria Locale e/o dalla Regione di competenza. Purtroppo in molti casi in Italia la IUI viene ancora effettuata in ambienti inadeguati e senza autorizzazione (ad esempio studi medici privati).

Alle coppie con un problema di infertilità maschile lieve, sterilità inspiegata o endometriosi minima o moderata possono essere offerti fino a sei cicli monitorizzati di inseminazioni intrauterine perché questo protocollo aumenta le possibilità di ottenere una gravidanza.

Le indicazioni mediche alla inseminazione intrauterina sono:

- sterilità inspiegata;
- infertilità maschile di grado lieve – moderato;
- endometriosi I-II stadio e casi selezionati di III-IV stadio della

classificazione American Fertility Society (AFS) in particolare dopo intervento chirurgico;

- ripetuti insuccessi di induzione della gravidanza con stimolazione dell'ovulazione e rapporti mirati;
- patologie sessuali e coitali che non hanno trovato giovamento dall'inseminazione intracervicale semplice;
- fattore cervicale.

In caso di induzione della crescita follicolare multipla è obbligatorio un monitoraggio ecografico e/o ormonale al fine di ridurre il rischio di gravidanze multiple e di sindrome dell'iperstimolazione ovarica severa.

## La FIVET

La FIVET (fecondazione artificiale in provetta con embryo transfer ) è una metodica di fecondazione artificiale in provetta di secondo livello che serve per il trattamento dell'infertilità di coppia di grado moderato-severo. In questa tecnica di fecondazione assistita, l'incontro tra spermatozoi e ovuli avviene in provetta. A differenza della ICSI, la penetrazione dello spermatozoo migliore avviene spontaneamente nell'ovulo ed il gamete maschile di migliore qualità supera da solo una serie di barriere (cellule della granulosa, zona pellucida) presenti intorno all'ovocita. Lo spermatozoo entra nell'uovo dopo aver superato da solo queste barriere che la natura ha previsto per far penetrare nell'ovocita lo spermatozoo migliore.

Gli steps di questo trattamento in Gruppo Donnamed® sono:

- la stimolazione ovarica: non sempre è necessaria o opportuna. Potrai infatti effettuare questa tecnica anche su ciclo naturale senza stimolazione;
- il monitoraggio ecografico: è finalizzato a verificare la corretta crescita dei follicoli e degli ovuli;
- la maturazione ovocitaria: ti verrà detto quando effettuare una singola iniezione sottocute di Ovitrelle o intramuscolo di Gonasi;
- il prelievo ovocitario: ti presenterai la mattina presto in clinica, verrà compilata la cartella clinica e sarai inviata al piano di degenza, per la preparazione all'intervento. Qui l'anestesista ti valuterà prima dell'intervento. All'orario stabilito, un membro del personale ti porterà in sala operatoria dove potrai eseguire il prelievo in anestesia locale o in sedazione, un breve sonno piacevole dal quale ti risveglierai dopo pochi minuti durante i quali il Responsabile aspirerà tutti i follicoli dalle ovaie
- dopo il prelievo ovocitario, al risveglio, l'anestesista autorizzerà il tuo trasferimento nella stanza di degenza dove rimarrai circa 2 ore;
- la raccolta del seme: il tuo compagno verrà invitato ad effettuare la raccolta del seme;
- dopo il nulla osta del Responsabile e dell'anestesista, potrai rivestirti e andare a fare colazione; riceverai tutte le istruzioni per il prosieguo del trattamento, incluso il foglio di dimissione, che dovrai seguire scrupolosamente.

Potrai rientrare a casa, osservando un breve riposo. In mattinata, ti verrà comunicato il numero e la maturità degli ovuli prelevati che saranno sottoposti ad inseminazione.

## La ICSI

La fecondazione assistita ICSI (iniezione intracitoplasmatica di spermatozoo, in inglese Intracytoplasmic Sperm Injection) è una metodica di fecondazione artificiale in vitro eseguibile per i casi di sterilità e infertilità severa di tipo maschile e per altre specifiche

indicazioni indicate nella legge 40 e nelle sue linee guida.

La ICSI dovrebbe essere effettuata solo in casi particolari, non sempre di routine. Purtroppo, soprattutto in Italia, c'è la tendenza a usare sempre la ICSI al posto della FIVET.

Le indicazioni della ICSI sono da LINEE GUIDA CONTENENTI LE INDICAZIONI DELLE PROCEDURE E DELLE TECNICHE DI PROCREAZIONE MEDICALMENTE ASSISTITA Art. 7 – Legge n. 40/2004 le seguenti:

- infertilità maschile di grado severo;
- azoospermia ostruttiva e secretiva (spermatozoi testicolari o epididimari);
- mancata o ridotta fertilizzazione in precedenti cicli di FIVET;
- ovociti scongelati;
- ridotto numero di ovociti;
- seme congelato in relazione alla qualità seminale successiva allo scongelamento.

Occorre aggiungere a questo elenco il caso della diagnosi pre-impianto dove per ragioni tecniche, occorre procedere alla ICSI invece che alla FIVET.

Gli steps previsti per la ICSI sono gli stessi previsti per la FIVET, salvo la procedura di laboratorio che nella tecnica ICSI differisce da quella della FIVET.

Nella fecondazione assistita ICSI, a differenza che nella FIVET, si eliminano gli ostacoli che si pongono tra l'ovocita e lo spermatozoo, in particolare vengono tolte le cellule della granulosa che si trovano intorno all'ovocita con una procedura detta decumulazione.

In seguito, si effettua la microiniezione di un singolo spermatozoo o di una forma più immatura (ad es. lo spermatide allungata o altre forme) direttamente dentro l'uovo e precisamente nel citoplasma ovocitario, utilizzando una micro-pipetta (injecting), mentre l'ovocita viene mantenuto fermo con un'altra pipetta (holding).

Nel caso della fecondazione assistita ICSI, a differenza della FIVET, sappiamo quali ovociti sono maturi. Solo gli ovuli maturi possono essere iniettati con lo spermatozoo; di conseguenza, il tasso di fertilizzazione sarà superiore rispetto alla FIVET. Tuttavia, una volta che si saranno formati gli embrioni, il tasso di successo di gravidanza sarà identico. La fertilizzazione verrà confermata il giorno dopo.

Questa tecnica di fecondazione assistita è quindi sempre effettuata in provetta, mentre per la donna si seguono gli usuali step previsti per la FIVET: stimolazione ovarica (non sempre necessaria), prelievo ovocitario, fertilizzazione, trasferimento degli embrioni nell'utero.

La fecondazione assistita ICSI è una tecnica meno naturale rispetto alla FIVET, con tassi di malformazioni che in alcune casistiche risultano superiori alla FIVET. Questo sembra dipendere dalla sottostante sterilità (in particolare maschile) più che dalla ICSI di per sé e dalla qualità del laboratorio di embriologia. In ogni caso se non c'è una chiara indicazione ad eseguire la ICSI, dovrebbe essere eseguita preferenzialmente la FIVET.

I successi della ICSI sono variabili da centro a centro e da coppia a coppia.

## La blastocisti

La fecondazione assistita di secondo livello di tipo FIVET o ICSI con transfer di blastocisti è una tecnica di fecondazione artificiale che viene eseguita nei casi di media-severa sterilità maschile o femminile. La fecondazione assistita con transfer di blastocisti aumenta il tasso di bambini effettivamente nati.

Con questa metodica di fecondazione artificiale in provetta, vengono trasferite in ute-



ro blastocisti cioè embrioni al 5°-6° giorno di sviluppo invece che embrioni al 2° o 3° giorno. Ciò perché in natura gli embrioni arrivano nell'utero dopo 5 giorni dalla fecondazione delle uova e non prima. Anche grazie a questo, la probabilità di gravidanza è maggiore e il tasso di gemellarità (una grave complicanza dei trattamenti di fecondazione artificiale) è ridotto.

In una recente analisi della letteratura medica riguardante la blastocisti, sono stati inseriti 18 studi che dimostrano un vantaggio in termini di tasso di gravidanza clinica e nascita del transfer della blastocisti rispetto al transfer embrionale standard al giorno 2°-3°.

### **Approfondimento sul trasferimento a blastocisti**

Ritieni ancora troppo confuso in Internet e nei centri di procreazione assistita il dibattito su cosa sia meglio tra il trasferimento embrionale a blastocisti e il transfer embrioni al secondo o terzo giorno di sviluppo (embrioni cleavage) ? Bisogna sapere che esistono ancora molti centri anche a Roma che applicano con difficoltà le tecniche di procreazione assistita più avanzate e quindi continuano a infondere dubbi sullo stadio al quale conviene fare il trasferimento embrionale.

Che vuol dire 'infondere dubbi' ? Di certo i centri che applicano le tecniche di procreazione assistita non sconsigliano apertamente il trasferimento embrionale a blastocisti ma piuttosto fanno credere che questa metodica (che è tra le più delicate tecniche di procreazione assistita) si possa fare solo ad alcune condizioni, come per esempio in modo 'selettivo', cioè solo quando si ottengono con tecnica FIVET o ICSI un gran numero di ottimi embrioni al giorno 3 di sviluppo, oppure esclusivamente in donne giovani. In questo modo il transfer di blastocisti diventa, senza alcuna ragione scientifica, molto raro; in realtà questo atteggiamento in genere maschera la difficoltà di alcuni laboratori di applicare i principi di base della fecondazione umana. Ci sono ancora centri di procreazione assistita, che considerano l'utero come 'il migliore incubatore' per gli embrioni al secondo o terzo giorno di sviluppo !!!! Un mito da sfatare. Infatti:

- molti embrioni (almeno il 50% in ottimi laboratori) possono crescere tranquillamente fino al giorno 5-6 di sviluppo, consentendo in molti casi il trasferimento embrionale a blastocisti. Se un laboratorio riporta 20-30% di probabilità di 'blastulazione', cioè di arrivare a blastocisti, non conosce bene la metodica ed è meglio che trasferisca al giorno 2-3 senza tante chiacchiere !!!
- i mezzi di coltura sequenziali in cui vengono cresciuti gli embrioni sono molto migliorati e sostengono la crescita embrionale a lungo termine (si intende per crescita embrionale a lungo termine quella che va oltre i 3 giorni)
- il miglioramento delle condizioni di coltura ha aumentato notevolmente il numero di blastocisti disponibili per il congelamento embrioni che nel caso della blastocisti funziona benissimo con tassi di sopravvivenza molto vicini al 100%. Di conseguenza, il transfer blastocisti congelate è una pratica comune in ottimi laboratori e consente tassi di successo in termini di gravidanza maggiori rispetto al transfer embrioni "a fresco"
- è bene sfatare un mito assolutamente falso: l'utero non contiene un mezzo di coltura idoneo a sostenere embrioni al giorno 2-3 di sviluppo e non è neanche il 'migliore incubatore'. Di sicuro però l'utero è meglio di molti laboratori scadenti. In realtà, embrioni cleavage, nella fecondazione umana, non si trovano nell'utero, ma nella tuba di Falloppio che ha al suo interno un mezzo di coltura completamente diverso da quello presente nell'utero, ha una concentrazione di ossigeno e temperatura diversa rispetto all'utero.

- il trasferimento embrionale a blastocisti è un mezzo di selezione degli embrioni a maggior potenziale di impianto, in modo del tutto simile a quello che avviene nella fecondazione naturale
- il trasferimento embrionale a blastocisti viene effettuato quando le contrazioni uterine, che sono molto frequenti fino al giorno 3-4 dopo il prelievo ovocitario e riducono l'impianto embrionale, si sono ridotte fino quasi ad annullarsi
- il tasso di nati vivi è migliore trasferendo embrioni blastocisti rispetto a embrioni cleavage

### **I risultati del trasferimento embrionale a blastocisti**

- il tasso di nati vivi per coppia è aumentato rispetto al transfer di embrioni cleavage (per tasso di nati vivi si intende la percentuale dei nati vivi rispetto al numero di cicli di FIVET o ICSI e corrisponde al tasso di gravidanza da cui si sottraggono gli aborti e i nati morti)
- il tasso di gravidanza clinica per coppia è aumentato rispetto al transfer di embrioni cleavage (per tasso gravidanza clinica si intende la percentuale delle gravidanze con battito fetale rispetto al numero di cicli di FIVET o ICSI)
- il tasso di impianto embrionale è aumentato rispetto al transfer di embrioni cleavage (per tasso di impianto si intende la percentuale di embrioni che danno origine ad una camera gestazionale rispetto al numero di embrioni trasferiti in utero-ad esempio quando trasferisco 2 embrioni e uno solo dà origine ad una camera gestazionale, il tasso di impianto è del 50% cioè uno su 2)
- il tasso di gravidanza evolutiva è aumentato rispetto al transfer di embrioni cleavage
- il tasso di gravidanza gemellare è diminuito rispetto al transfer di embrioni cleavage perchè in molti casi si possono trasferire meno embrioni blastocisti rispetto al numero di embrioni cleavage che occorre trasferire per mantenere lo stesso tasso di gravidanza
- il tasso di aborto del primo trimestre è diminuito rispetto al transfer di embrioni cleavage

### **La ICSI TESE**

Questa metodica di fecondazione assistita in provetta viene eseguita nei casi di gravissima sterilità maschile, quando nel liquido seminale non si riescono a reperire spermatozoi (azoospermia) che invece potrebbero trovarsi nel testicolo. Questa tecnica di fecondazione artificiale prevede 2 steps:

- prelievo testicolare e congelamento degli spermatozoi trovati nel testicolo;
- ICSI.

Il primo step viene eseguito chirurgicamente dagli Urologi, che in accordo e in presenza dei biologi, prelevano piccoli frammenti testicolari, consegnandoli al Laboratorio.

I biologi studieranno i campioni testicolari e se ritroveranno spermatozoi vitali, li congeleranno in diverse provettine, che vengono immerse in azoto liquido a circa -200 gradi sotto zero, dove possono rimanere intatti per anni.

Successivamente, la partner femminile inizierà il trattamento ICSI.

Il giorno del prelievo degli ovuli, verranno scongelate una o più provettine contenenti gli spermatozoi testicolari e verrà eseguita la ICSI scegliendo i migliori spermatozoi decongelati.

Il successivo iter è simile a quello della ICSI.

## L'Assisted hatching

Si tratta di una metodica che attraverso l'uso del laser o di una soluzione chimica (Tyrode) consente di bucare la zona pellucida che circonda l'embrione. Questa operazione faciliterebbe secondo alcuni la fuoriuscita dell'embrione dal suo involucro, migliorandone l'attecchimento.

In un lavoro di metanalisi sono stati recentemente (2009) analizzati 28 studi su 1228 gravidanze cliniche in 3646 pazienti. Nei 7 lavori che riportano il tasso di nascite ("bambino in braccio") non è stata notata differenza né nel tasso di nascite né di gravidanze cliniche (battito cardiaco fetale) nel gruppo di donne che hanno effettuato l'assisted hatching rispetto a quelle che non lo hanno fatto.

Prendendo in considerazione invece gli studi statisticamente più solidi, il tasso di gravidanza clinica (battito cardiaco fetale) risulta marcatamente aumentato nel gruppo che effettua l'assisted hatching, con un tasso di aborto simile, ma con un tasso di gravidanze gemellari (la principale complicanza della fecondazione in vitro) aumentato.

Prendendo invece in considerazione tutti i 28 studi riportati nella metanalisi, si registra un aumento moderato delle sole gravidanze cliniche (battito cardiaco fetale) nel gruppo che effettua assisted hatching, ma senza aumento dei nati vivi.

I dati a nostra disposizione suggeriscono che l'uso generalizzato di tale tecnica non abbia un reale vantaggio.

Infatti l'assisted hatching:

- non migliora il tasso di nati a termine
- può aumentare il tasso di gravidanze cliniche, in particolare in donne che si sono già sottoposte senza successo a uno o più cicli di fecondazione in vitro

Gli studi presenti in letteratura, tuttavia, non vengono considerati di buona qualità, tanto che non se ne possono dedurre conclusioni certe circa l'efficacia della metodica.

## Lo screening genetico pre-impianto (PGS)

Trasferire in utero l'embrione geneticamente perfetto è un sogno di molte persone e di molti centri di fecondazione assistita. Permetterebbe di ottenere tassi di gravidanza maggiori di quanto attualmente ottenuto dai centri di qualità media (20-30% per tentativo). Secondo alcune casistiche con lo screening genetico pre-impianto si arriverebbe anche al 70% di gravidanza evolutiva con 'bambino in braccio' per transfer embrionale.

Ciò permetterebbe alle donne di sorpassare il problema dell'età cronologica. Una donna di 40 anni ed oltre potrebbe ottenere con lo screening genetico pre-impianto embrioni sani e tassi di gravidanza comparabili a quelli di una ragazza giovane. Il tasso di gravidanza nella FIVET dipende infatti dalla qualità genetica dell'embrione, sulla quale incide per l'80% circa la qualità genetica dell'ovulo, dipendente a sua volta dall'età cronologica della donna.

Con la diagnosi genetica reimpianto, diversa dallo screening genetico e per questo definito PGD invece che PGS, potrete escludere la presenza di anomalie dell'embrione (es. anemia mediterranea), ad esempio in caso voi siate entrambi portatori sani di una malattia genetica.

## La tecnica della PGD PGS

Al 5°-6° giorno di sviluppo embrionale, viene effettuata una biopsia del tessuto (trofoblasto, trofoectoderma) che circonda l'embrione e che darà origine alla placenta, da cui vengono rimosse delicatamente circa 3-5 cellule. La massa cellulare interna al polo embrionario che dà origine all'embrione non viene quindi toccata e pertanto non viene

compromessa la funzionalità dell'embrione.

La tecnica si può effettuare con 2 modalità:

- il giorno dopo con embrioni freschi (è una modalità non consigliata, in quanto l'embrione viene trasferito in un ambiente non idoneo, dato l'endometrio (la parte interna dell'utero che dovrebbe accogliere l'embrione) è stato stimolato dai farmaci e quindi non è naturale;
- in modo differito, al ciclo successivo, anche naturale (senza farmaci) per sfruttare la presenza di un endometrio (parte interna dell'utero) più ricettivo all'impianto dell'embrione sano.

### **Perché la diagnosi genetica preimpianto PGD-PGS?**

Il concetto fondamentale alla base della possibile utilità di determinare lo stato di salute dell'embrione è il seguente: è impossibile distinguere, sulla base della forma (morfologia) e della cinetica di crescita (velocità di sviluppo) degli embrioni quale di questi generati in provetta sia sano per tutti i cromosomi.

La diagnosi genetica preimpianto (PGD Preimplantation Genetic Diagnosis) consente di analizzare gli embrioni dal punto di vista genetico e cromosomico prima che essi vengano trasferiti nell'utero.

Rispetto alla diagnosi prenatale (amniocentesi e villocentesi) consente di sapere prima dello sviluppo fetale la presenza di una patologia genetico-cromosomica, senza dover ricorrere alla interruzione cosiddetta terapeutica di gravidanza ma semplicemente evitando di trasferire embrioni malati.

### **Critiche alla PGD-PGS**

Un articolo appena pubblicato da due autori newyorkesi di grande spessore critica l'attuale tendenza all'uso universale della metodica.

Gleicher e Orvieto mettono in discussione le ragioni principali sulle quali si basa la tecnologia dello screening genetico pre-impianto che sono le seguenti:

- la maggior parte dei cicli di fecondazione assistita falliscono a causa della generazione di embrioni geneticamente malati;
- scartare gli embrioni geneticamente malati migliora i risultati della fecondazione assistita;
- una singola biopsia dell'embrione (come si fa con lo screening genetico pre-impianto) è rappresentativa della genetica dell'intero embrione;
- la genetica della biopsia embrionale corrisponde a quella dell'embrione;
- la genetica dell'embrione non cambia nel corso della crescita embrionale.

Secondo gli autori:

- l'associazione tra trasferimento di embrioni considerati geneticamente malati e il fallimento della FIVET deve essere rivalutato;
- Scartare embrioni geneticamente malati tramite lo screening genetico pre-impianto appare irrealistico;
- una singola biopsia, secondo precisi modelli matematici, non è in grado di diagnosticare correttamente la genetica dell'intero embrione;
- il tessuto embrionale prelevato con la biopsia non riflette correttamente la genetica del futuro bambino.

Secondo i due autori, lo screening genetico pre-impianto non è più quindi applicabile clinicamente.

L'applicazione dello screening genetico pre-impianto deve essere limitato alla ricerca scientifica, e non più essere proposto come una soluzione ai bassi tassi di successo della fecondazione assistita.

### **La posizione del Gruppo Donnamed\***

Il nostro Gruppo ha proposto lo screening genetico pre-impianto solo in casi selezionati. Ci siamo sempre opposti all'utilizzo di questa metodica in modo universale. Abbiamo indicato le proposte d'applicazione universale (a tutte le coppie) come un mero fatto commerciale.

Le indicazioni utilizzate dal nostro Gruppo sono state quelle dettate dalla letteratura scientifica. Nel corso degli anni abbiamo inoltre constatato, per esperienza, le seguenti problematiche:

- eccessiva manipolazione degli embrioni (biopsie, congelamenti, scongelamenti);
- tassi di gravidanza non sempre corrispondenti a quelli attesi;
- difficile applicazione della metodica alle coppie che più ne beneficerebbero (donne con età superiore a 35 anni) ciò a causa del ridotto numero di uova ed embrioni ottenibili;
- stimolazioni ormonali più massicce, con dosi di farmaco maggiori, per la necessità di ottenere un gran numero di ovuli e di embrioni;
- risultati a volte difficilmente interpretabili con scarto di embrioni "mosaico" diagnosticati come anomali che invece potrebbero risultare sani;

### **Alternative allo screening genetico pre-impianto**

L'unica attuale misura alternativa allo screening genetico pre-impianto è il trasferimento sequenziale di tutti gli embrioni disponibili. In questo modo, si eviterebbe la eccessiva manipolazione degli embrioni e si otterrebbero tassi di gravidanza cumulativi identici a quelli dello screening genetico pre-impianto.

### **Il congelamento degli ovociti e degli embrioni**

La tecnica di congelamento più efficace è attualmente la "vitrificazione" o 'vetrificazione'.

Essa basa il suo principio sul fatto che, essendo il congelamento rapidissimo, l'acqua non fa in tempo a formare cristalli di ghiaccio che danneggerebbero le strutture cellulari. La cellula o l'embrione vitrificati assumono l'aspetto del vetro e le strutture interne rimangono pressoché inalterate.

La sopravvivenza dell'ovocita e degli embrioni è molto alta, con l'uso di opportuni aggiustamenti tecnici e può essere dell'ordine del 75-90%.

Il tasso di fecondazione degli ovuli congelati può arrivare al 75-90% e lo sviluppo embrionale fino allo stadio di blastocisti è del 50%.

La letteratura scientifica si divide in relazione all'efficacia della metodica, ma stato suggerito che la vitrificazione possa essere meno traumatica per l'ovulo (ovocita) rispetto al congelamento "lento".

### **La tecnica del congelamento degli ovuli**

L'ovocita è una cellula molto grande, e per questa ragione molto complessa da congelare. Ciò comporta il rischio che alcune parti dell'uovo possano formare cristalli di ghiaccio durante il processo di congelamento. La formazione di cristalli di ghiaccio danneggia le strutture cellulari più di ogni altra cosa.

## **I risultati della vitrificazione**

Il primo bambino generato da ovocita vitrificato è nato nel 1999. In Italia nel 2011 il 74,6% degli ovociti congelati è stato crioconservato tramite questa tecnica.

Il successo della fecondazione in provetta con ovociti vitrificati si attesta intorno al 60% (come gli ovociti 'freschi'). Per ottenere questi risultati, occorre utilizzare ovociti 'giovani' come accade nel caso dell'ovodonazione. Ovviamente questi successi non si registrano in pazienti già arruolate in un percorso di fecondazione assistita e quindi ipo-fertili.

## **La IMSI**

La IMSI è una fecondazione in provetta con Iniezione intracitoplasmatica di spermatozoi selezionati al microscopio ad alto ingrandimento.

Si effettua una selezione preliminare degli spermatozoi sotto un microscopio 15 volte più potente rispetto al solito. Sembrava una tecnica promettente nei casi di aborto ripetuto, come pure in seguito a ripetuti insuccessi della fecondazione in provetta.

## **La tecnica IMSI**

La IMSI consiste in una selezione degli spermatozoi da inserire nell'ovulo mediante uno speciale microscopio che consente di ingrandire lo spermatozoo. Con questo microscopio si può vedere la forma interna degli spermatozoi. In questo modo si eliminerebbero quelli che contengono dei 'vacuoli' che porterebbero ad anomalie nella crescita dell'embrione.

## **Critiche alla IMSI**

In un recente studio, sono stati analizzati 9 studi che comprendono 2014 coppie, 1002 trattate con IMSI e 1012 trattate con la classica ICSI.

Le conclusioni dicono che l'analisi non supporta in alcun modo l'uso della IMSI nella pratica clinica. La metodica non migliora infatti i risultati della semplice ICSI.

## **L'Embryoscope**

L'Embryoscope è un incubatore che fotografa gli embrioni nel corso della loro crescita per seguirne tutte le fasi di sviluppo. Sebbene alcuni Centri abbiano fatto ingenti investimenti su questo macchinario, gli studi a nostra disposizione non hanno mostrato alcun vantaggio rispetto alla coltura embrionale classica.

## **La fecondazione eterologa**

La fecondazione eterologa è una tecnica di procreazione medicalmente assistita che consiste nell'unione di gameti non tutti provenienti dalla coppia, ma da un soggetto donatore (sia esso maschile o femminile). Si parla quindi di donazione maschile (del seme) o donazione femminile (ovodonazione).

Molte donne in età avanzata sono costrette a rivolgersi all'ovodonazione. In questa tecnica, l'uovo non appartiene alla donna che desidera la gravidanza ma è di una donatrice giovane, sotto i 35 anni.

Secondo i registri della società europea di riproduzione assistita (ESHRE) nel 2009 oltre 20.000 pazienti hanno ricevuto una donazione di gameti da parte di donatrici, un numero quasi raddoppiato rispetto al 2005.

L'ovodonazione comporta la necessità di effettuare una fecondazione in provetta. L'embrione generato in provetta è il risultato dell'unione del gamete maschile del proprio partner (spermatozoo) con un ovocita ottenuto da una donatrice sconosciuta. Il bambino quindi appartiene geneticamente alla donatrice e al compagno della donna che riceve la donazione.

I test di screening cui vengono sottoposte, ad esempio, le donatrici per ovodonazione e i donatori per donazione del seme sono i seguenti:

- anamnesi (storia clinica);
- valutazione psicologica con lo Psicologo clinico;
- valutazione clinica ginecologica e andrologica;
- counseling genetico e report scritto per;
- Fibrosi cistica (fino a 50 mutazioni);
- X fragile (donna);
- cariotipo (analisi cromosomica);
- Talassemia alfa;
- atrofia muscolare spinale;
- esami Generali (ABO RH, CBC with Diff se indicato);
- Epatite B (antigene di superficie);
- Epatite B anticorpi anti-Core;
- Epatite C anticorpi;
- Sifilide RPR (rapid plasma reagin);
- HIV 1/2 Ab;
- CMV (citomegalovirus);
- screening malattie trasmissibili sessualmente.

### **Il problema dei donatori in Italia**

In Italia i donatori di sperma e di ovociti scarseggiano. Questo principalmente per un fatto culturale, essendo pacifico che una donna o un uomo italiani non hanno desiderio di "disseminare" i propri caratteri genetici.

Inoltre non è possibile pagare i donatori e le donatrici per le terapie alle quali si sottopongono che nel caso delle donne consistono, esattamente come nel caso della fecondazione omologa, nella effettuazione di una serie di esami di screening, nella stimolazione ovarica, nel prelievo chirurgico degli ovociti.

È previsto dalla legge italiana un 'rimborso spese' per i donatori italiani, ma il confine tra pagamento di un donatore e rimborso spese è molto sottile.

Alcuni Centri italiani parlano incredibilmente di 'donazioni spontanee di pazienti in terapia per infertilità'. Il che vuol dire che i donatori e le donatrici sono pazienti che appartengono a coppie sterili.

In questo caso, i risultati in termini di gravidanza sono veramente pessimi perché in Italia i pazienti che sono sottoposti a terapie per infertilità spesso hanno una età avanzata ben superiore ai 30 anni. È chiaro infatti che:

- il tasso di gravidanza dipende dall'età della donatrice e anche dei donatori maschi, poiché con l'età vi è una riduzione della qualità delle uova e del liquido seminale;
- i pazienti appartenenti a coppie sterili hanno un potenziale di gravidanza ridotto, per sé stessi e quindi per i riceventi dei propri gameti, per definizione;

### **La legge in Italia**

Questa tecnica è stata vietata in Italia con la Legge 40 del 2004, negando così alle coppie in cui uno dei due partners fosse sterile la possibilità di esaudire il loro desiderio di dare alla luce un figlio, anche se non identico geneticamente. Questo divieto ha creato una discriminazione, portando le coppie che potevano permetterselo economicamente a viaggiare all'estero, e condannando le altre alla rinuncia.

Dopo 10 anni, il 9 aprile 2014, la Corte costituzionale ha finalmente dichiarato incostituzionale il divieto alla fecondazione eterologa, spiegando che la scelta di 'diventare genitori e di formare una famiglia che abbia anche dei figli costituisce espressione della fondamentale e generale libertà di autodeterminarsi'.

Dopo questa sentenza anche in Italia diventa legale la donazione di ovociti e spermatozoi: è possibile quindi ricorrere a tecniche di fecondazione assistita utilizzando gameti provenienti al di fuori della coppia.

## **La preservazione della fertilità femminile**

Congelare i propri ovuli per anni permetterebbe alle donne in età fertile di posticipare di qualche anno la loro maternità. Congelare 'in banca' (a 200 gradi sotto zero circa) i propri gameti è un procedimento efficace.

'Ibernare' le ovaie per preservare la fertilità femminile è un sogno di molte persone. Consentirebbe di bloccare le uova allo stadio in cui sono state congelate. Se congelasse da giovane, la donna avrebbe una riserva e una qualità genetica delle uova ottimali.

La fertilità femminile si riduce con l'avanzare dell'età. La riserva ovarica (quantità di ovociti) si riduce e con essa la qualità genetica delle uova. Pertanto, una donna di età superiore già ai 31 anni ha più difficoltà a generare embrioni sani, sia in natura che con la fecondazione assistita. Questo risulta in una riduzione drastica della possibilità di rimanere incinta, problema che non si risolve, è bene dirlo subito, con la fecondazione in provetta. Il successo della fecondazione assistita dipende infatti dal numero di ovociti recuperati e dalla loro qualità genetica e quindi dall'età della donna.

Tuttavia, in più del 50% di tutte le prestazioni di fecondazione assistita effettuate in Europa, l'età delle pazienti supera i 35 anni.

Di conseguenza, molte Coppie non riescono purtroppo ad avere un bambino neanche con le più avanzate tecniche di fecondazione assistita. Le loro uova sono sempre meno e di minore qualità con l'avanzare dell'età.

Il numero ideale di ovociti idoneo a massimizzare il tasso di successo della fecondazione assistita è di 10-15 uova. Molte donne, purtroppo, riescono a recuperare non più di 9 uova, un numero che si lega ad una riduzione del tasso di successo della fecondazione in provetta.

La migliore alternativa all'ovodonazione è tentare una gravidanza in età giovanile, quando in genere la riserva ovarica è idonea e la qualità genetica delle proprie uova è ottimale.

L'unica attuale misura alternativa all'ovodonazione è preservare la fertilità femminile. La crioconservazione dei propri gameti prima dei 30 anni, la cosiddetta crioconservazione ovocitaria per motivi sociali, offre questa possibilità.

I risultati della vitrificazione sono molto buoni. Quindi, se una donna congela da giovane, le sue uova saranno efficaci quando la donna sarà in età più avanzata.

## **La preservazione della fertilità maschile**

Congelare i tuoi spermatozoi ti consente di preservare il tuo potenziale riproduttivo e poter avere nel futuro, con le moderne tecniche di fecondazione assistita, un figlio geneticamente tuo.

Gli spermatozoi col tempo peggiorano la loro qualità. Ad esempio, con l'età aumenta il tasso di frammentazione del DNA spermatozoario che riduce la possibilità di nascita.

La preservazione della fertilità maschile è vantaggiosa quando:



- ci sono delle ragioni di ordine medico a procedere con il congelamento spermatozoi o del tessuto testicolare, per proteggere i propri spermatozoi dalla degenerazione o scomparsa;
- si desidera contrastare l'effetto dell'invecchiamento sugli spermatozoi;
- per ragioni di ordine medico: quando un uomo è colpito ad esempio da tumore, spesso deve ricorrere a chemio o radioterapie; molte di queste terapie danneggiano irrimediabilmente gli spermatozoi con perdita definitiva della fertilità. Infatti, i testicoli sono molto suscettibili ai danni della chemioterapia e della radioterapia, che sono spesso necessarie per trattare le patologie che colpiscono il maschio. La spermatogenesi, cioè il processo che porta alla produzione delle cellule riproduttive maschili, è spesso severamente compromessa a seguito di queste terapie. I parametri del liquido seminale e a volte l'attività sessuale peggiorano in modo drastico, anche in caso di interventi chirurgici minori sul testicolo o sui suoi vasi sanguigni (varicocele), impedendo il meccanismo della riproduzione naturale. Congelare i propri spermatozoi consente di preservare la tua fertilità in questi casi;
- ci sono poi casi in cui il congelamento è fortemente indicato come nel caso di prelievo di spermatozoi testicolari tramite biopsia (TESE).

## LE TAPPE DELLA FECONDAZIONE IN PROVETTA

### La stimolazione ovarica

La tecnica delle fecondazioni in provetta (in vitro) è stata sviluppata negli anni '70 del secolo scorso. Può differire lievemente da clinica a clinica, ma il primo step consiste nella stimolazione ovarica (detta tecnicamente iperstimolazione ovarica controllata), salvo i rari casi in cui, per controindicazione alla stimolazione ormonale (ad esempio precedente tumore mammario o altri tumori ormono-sensibili), si procede semplicemente al monitoraggio ecografico dell'ovulazione naturale (ciclo spontaneo e minimamente stimolato).

La stimolazione ormonale delle ovaie serve ad aumentare la possibilità di successo del trattamento; è noto che il successo dei trattamenti di fecondazione assistita aumenta con l'aumentare del numero di ovociti (uova) prelevate.

Il monitoraggio ecografico, obbligatorio in caso di stimolazione ovarica, è una procedura mediante la quale si effettuano ecografie transvaginali a vari intervalli durante la crescita del follicolo oppure durante la stimolazione farmacologica delle ovaie. Il monitoraggio ecografico della stimolazione ovarica controllata è attualmente considerato il cardine del trattamento: consente infatti di valutare l'adeguatezza della crescita follicolare e effettuare il calcolo dell'ovulazione temporizzando la somministrazione dello stimolo ovulatorio (Gonasi o Ovitrelle).

Secondo le linee guida della legge 40 del 2004 sulla procreazione medicalmente assistita, il monitoraggio di un ciclo di trattamento si effettua tramite il dosaggio del livello di estradiolo e l'ecografia. Tuttavia il monitoraggio dell'estradiolo non si correla sempre con la crescita follicolare, quindi il suo utilizzo non è considerato oggi obbligatorio in tutti i casi.

Gli steps della stimolazione ovarica e del monitoraggio ecografico possono differire lievemente, ma sostanzialmente sono simili da clinica a clinica, anche se lievi differenze, dettate dall'esperienza dell'operatore, possono portare a variazioni in termini di successo.

### Step 1: sopprimere il ciclo naturale

Ti verrà prescritto un farmaco che sopprime il ciclo mestruale naturale e impedisce agli ormoni secreti nel tuo organismo di interferire con la stimolazione ovarica; inoltre, l'inibitore impedisce ai follicoli che contengono le uova di aprirsi prima del tempo, cioè prima del prelievo ovocitario (pick up).

La soppressione del ciclo ovulatorio è temporanea e reversibile e può avvenire mediante:

- farmaci agonisti del GnRh (esempio Decapeptyl; in alcune cliniche come la nostra viene usato spesso il Suprefact);
- farmaci antagonisti del GnRh (esempio Cetrotide o Orgalutran).

La differenza tra questi farmaci sta nel tempo necessario per sopprimere il ciclo che nel caso dei farmaci agonisti è lungo (almeno 10 giorni), mentre nel caso degli antagonisti è immediato. Per questo, inizierai a auto-somministrarti gli agonisti circa 10 giorni prima di cominciare la stimolazione ovarica, mentre con gli antagonisti inizierai la stimolazione ovarica dal 2°-3° giorno del ciclo mestruale e li prenderai solo intorno al 6°-7° giorno di stimolazione.

La somministrazione avviene per via sottocutanea intorno all'ombelico (ti verrà insegnato come fare).

### **Step 2: stimolare lo sviluppo dei follicoli ovarici**

Prenderai un farmaco composto da FSH (ormone follicolo-stimolante, nomi commerciali Gonal F o Puregon) che in natura viene secreto dalla tua ipofisi, una ghiandola che sta alla base del cervello e stimola le ovaie. Questo ormone è conosciuto come gonadotropina (cioè stimolatore delle gonadi). La somministrazione di FSH si può associare a quella di LH (ricombinante o meno).

L'FSH aumenta il numero di ovociti (uova) prodotte dalle tue ovaie. Questo significa che più ovociti possono essere prelevati e fertilizzati, con un aumento del numero di embrioni generati e una maggiore possibilità di gravidanza.

La somministrazione avviene sempre per via sottocutanea, intorno all'ombelico, e dura usualmente 9-12 giorni, ma può variare a seconda della tua risposta.

### **Step 3: controllare la tua stimolazione ovarica**

La tua stimolazione verrà controllata a tempi ben precisi mediante ecografia vaginale e dosaggi ormonali (questi ultimi non sempre necessari).

### **Step 4: indurre la maturazione ovocitaria**

Circa 34-36 ore prima del prelievo ovocitario, ti verrà somministrata una ultima iniezione di Gonasi (intramuscolare) o Ovitrelle (sottocutanea), per aiutare le tue uova a maturare cioè diventare **idonee ad essere fecondate**.

## **Il prelievo ovocitario (pick up)**

Il prelievo ovocitario (pick up) viene eseguito in anestesia locale o in sedazione praticata dall'anestesista, presente in sala operatoria durante l'intera procedura.

Il pick up ha una durata media di 10-15 minuti e viene effettuato inserendo in vagina una sonda ecografica simile a quella usata per i monitoraggi follicolari, ma dotata di una guida all'interno della quale scorre un ago. Con quest'ultimo il ginecologo aspirerà tutti i follicoli ovarici maturi presenti nelle tue ovaie sotto guida ecografica.

Il ginecologo buca con l'ago tutti i follicoli e aspira mediante una pompa il liquido follicolare, che viene raccolto in provette riscaldate. Le provette vengono consegnate agli embriologi per la successiva valutazione. Può anche verificarsi l'eventualità di follicoli 'vuoti', ovvero privi di ovocita all'interno.

Dopo la procedura, viene somministrato un anti-dolorifico. Potrai avvertire dei dolori ovarici o crampi ed osservare piccole perdite di sangue nel corso dei giorni successivi. Se queste perdite sono abbondanti (tipo ciclo mestruale) o se avrai la febbre (entrambi gli eventi sono molto rari) avvertirai il Medico responsabile del tuo trattamento.

### **Preparazione al prelievo ovocitario**

Astenersi dai rapporti.

La sera prima del prelievo ovocitario:

- cena semiliquida (minestrina, liquidi);
- prima di andare a letto, eseguire un clistere pediatrico (tipo Sorbiclis pediatrico) ed evacuare (se mancata evacuazione, ripetere);
- a partire dalla mezzanotte, non bere né mangiare nulla (inclusa l'acqua);
- non usare creme, deodoranti, profumi, smalti per unghie di nessun genere;
- effettuare una lavanda vaginale (esempio Betadine).

Il giorno della procedura di prelievo ovocitario:

- non fare colazione e rimanere a digiuno (né liquidi né solidi);
- effettuare una doccia accurata usando solo prodotti naturali;
- non usare creme, deodoranti, profumi, smalti per unghie di nessun genere;
- non effettuare lavande vaginali;
- arrivare in clinica all'orario che vi è stato comunicato;
- seguire le istruzioni del personale della Clinica.

### **La degenza dopo il prelievo ovocitario**

La degenza dura in genere un paio di ore ed è di tipo ambulatoriale nella maggior parte dei casi. In caso di perdita di sangue o eccessivi dolori, il medico potrà disporre un ricovero in Day Hospital, in genere fino alla sera.

Dopo circa 2 ore dal prelievo ovocitario potrai alzarti e fare colazione.

A casa:

- dovrai osservare riposo relativo 4 giorni, con tutto ciò che questo implica nei confronti della vita quotidiana e lavorativa; ed evitare movimenti bruschi;
- non devi guidare auto-motoveicoli per 24 ore dall'ora del risveglio, se hai effettuato il prelievo in sedazione;
- non devi assumere antibiotici, in quanto ti è stata somministrata durante l'intervento una dose di antibiotico adeguata;
- puoi prendere, se necessario, analgesici (Tachipirina 1000 mg una compressa al bisogno, massimo 3 compresse al giorno);
- dovrai ingerire abbondantemente liquidi, specialmente bevande isotoniche;
- non dovrai assumere anticoagulanti né aspirina se non diversamente indicato dal medico responsabile del trattamento. L'aspirina a basse dosi (Cardioaspirina) può essere assunta solo se indicato dal medico del Centro;
- dovrai seguire le indicazioni terapeutiche presenti nella apposita ricetta per la preparazione alla fase luteale, in preparazione all'impianto degli embrioni;
- non dovrete avere rapporti sessuali.

### **Il trattamento dopo il prelievo ovocitario (fase luteale)**

Ti verrà prescritto un trattamento di preparazione dell'utero all'accoglimento degli embrioni trasferiti; si basa su progesterone naturale, che rende l'utero ricettivo all'impianto embrionale. Questo trattamento va continuato fin quando il Medico lo consiglierà.

## **Le procedure di laboratorio**

### **La fertilizzazione degli ovociti**

Le uova prelevate vengono mescolate nella stessa provetta al seme trattato del tuo partner (FIVET). In caso di ICSI è invece il biologo a scegliere gli spermatozoi e a iniettarli all'interno dell'uovo mediante una micro-pipetta in vetro. La ICSI viene applicata quando gli spermatozoi sono pochi e lenti, perché questo ridurrebbe la possibilità di

fertilizzazione nella FIVET.

Nella ICSI, il tasso di fertilizzazione è maggiore, cioè si fertilizzano più ovociti rispetto alla FIVET. Tuttavia, quando le uova sono fecondate, che sia con FIVET o con ICSI, e si formano gli embrioni, la possibilità di gravidanza è la stessa.

In entrambe le tecniche, dopo 16-20 ore (il giorno dopo) le uova vengono controllate per verificare se è avvenuta la fertilizzazione.

### **La crescita degli embrioni**

Si consiglia, in tutti i casi in cui questo sia possibile, la crescita degli embrioni fino al 5° giorno di coltura ( fino allo stadio di blastocisti) perché questo aumenta la possibilità di successo.

### **Il transfer embrionale**

Il transfer viene consigliato al giorno 5 di sviluppo embrionale (stadio di blastocisti).

È questo lo stadio in cui la natura ha previsto che l'embrione impianti in utero, mentre nei giorni precedenti si trova nella tuba. Solo gli embrioni validi riescono a percorrere tutto il tragitto tubarico ed entrare in utero, cosa che avviene dopo circa 4 giorni e mezzo dalla fertilizzazione. Questo percorso serve proprio a determinare se l'embrione è valido per poter tentare l'impianto.

Una volta entrato in utero l'embrione, se valido, impianta. È pertanto falso che gli embrioni al giorno 1-3 stanno meglio in utero che in laboratorio. O meglio, dipende dal laboratorio.

I laboratori di scarsa qualità devono necessariamente trasferire gli embrioni in utero il prima possibile, in quanto una permanenza in condizioni non corrette per altri 2-3 giorni può determinare problemi di sviluppo embrionale causate dalla crescita in incubatori e ambienti non idonei.

### **Come si svolge il transfer embrionale**

Vi recherete in clinica all'orario stabilito e verrai condotta in sala transfer. La mattina si può fare tranquillamente colazione. A differenza del prelievo ovocitario per questa fase non occorre alcuna preparazione particolare salvo l'assunzione di progesterone e altri eventuali farmaci consigliati dal Medico.

Prima del transfer embrionale la coppia effettua un breve colloquio con il medico, che descrive le potenzialità in termini di gravidanza. Dopodiché la paziente viene preparata.

Il transfer embrionale avviene sotto la guida ecografica, per essere certi di depositare in utero l'embrione nel posto giusto. La procedura non prevede sedazione, salvo che in casi particolarissimi.

Il ginecologo effettua una accurata pulizia della vagina dopo aver applicato lo speculum. Inserisce quindi il catetere sotto guida ecografica, attraverso il quale verranno inseriti gli embrioni porti al ginecologo dal biologo incaricato del transfer.

Terminata la procedura, la paziente attende sdraiata per 10 minuti circa. Dopodiché può tornare a casa e osservare qualche giorno di riposo.

## COMPRENDERE I TASSI DI SUCCESSO DELLA FECONDAZIONE IN PROVETTA

Capire ed interpretare i tassi di successo dei trattamenti riportati dai vari centri di fecondazione è difficile. In Italia il Registro dell'Istituto Superiore di Sanità non riporta i dati relativi ai successi e alle probabilità di gravidanza dei vari Centri, a differenza di ciò che accade nei Paesi anglosassoni.

Pertanto ogni centro fornirà i propri risultati ma questi non sono realmente controllati da un agente esterno. Anche se si arrivasse alla pubblicazione presso il Registro Nazionale, mancherebbero poi i controlli su questi dati, come mancano attualmente i controlli sui numeri di cicli effettuati da ogni centro: al solito, l'Italia è il Paese dalle complesse regolamentazioni, in assenza totale di controlli.

In linea generale, percentuali di successo troppo buone devono indurci a sospettare della veridicità del dato, da sopravvalutazione o da errato calcolo. Percentuali del 60-70% di successo in fecondazione omologa (con le proprie uova) sono del tutto irrealistiche.

Inoltre, le percentuali medie non possono in nessun caso riguardare il tuo caso specifico. Ogni coppia è infatti diversa dall'altra e il reale tasso di successo nel tuo caso non è noto a nessuno, almeno prima di iniziare la stimolazione.

I risultati in termini di gravidanza non esprimono appieno la qualità del centro. Qualità nella fecondazione in vitro vuol dire attualmente la nascita di un singolo bambino sano per trattamento: il tasso di gemellarità deve essere quindi modesto in un centro di qualità. Tassi di gemellarità bigemina (2 gemelli) del 30-40% e trigemina del 6-7% esprimono in realtà cattiva qualità del centro, anche se i tassi di successo in termini di gravidanza sono ottimi.

Le percentuali di successo dipendono in ogni caso dall'età femminile: alcuni centri selezionano pazienti a buona prognosi ed età inferiori, in modo da avere tassi di successo migliori!!!

I migliori Centri italiani forniscono spesso buoni tassi di gravidanza, ma questi tassi sono semplicemente il risultato di un trasferimento di un numero eccessivo di embrioni in utero (più di 1-2 in Italia). Aumentare il numero di embrioni trasferiti determina un aumento del tasso di gravidanza, con un aumento consensuale del numero di gravidanze gemellari bigemine e trigemine.

L'età femminile è il maggior determinante del successo: più alto è, minori sono i tassi di successo. L'aumento dell'età femminile determina infatti 2 fenomeni: la riduzione del numero di ovociti e la diminuzione della loro qualità genetico-cromosomica. Dunque le percentuali di successo sono influenzate fortemente dalla selezione delle pazienti per età.

## BIBLIOGRAFIA

Andrade-Rocha FT. Colonization of *Gardnerella vaginalis* in semen of infertile men: prevalence, influence on sperm characteristics, relationship with leukocyte concentration and clinical significance. *Gynecol Obstet Invest.* 2009;68(2):134-6. Epub 2009 Jul 15.

ASRM. The clinical utility of sperm DNA integrity testing. *Fertil Steril* 2008;90:S178-S180.

Bosteels J et al. *Cochrane Database Syst Rev.* 2015 Feb 21

Collins JA, et al. Do sperm DNA integrity tests predict pregnancy with in vitro fertilization? *Fertil Steril* 2008;89:823-31.

Das S, Blake D, Farquhar C, Seif MM. Assisted hatching on assisted conception (IVF and ICSI). *Cochrane Database Syst Rev.* 2009 Apr 15;(2):CD001894.

De Vos M, Devroey P, Fauser BC. Primary ovarian insufficiency. *Lancet.* 2010 Aug 11. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 20708256.

Dohle et al. Guidelines on male infertility, 2007

Dondero et al., 1979; Marshburn & Kutteh, 1994

Dorota Sanocka and Maciej Kurpisz. Reactive oxygen species and sperm cells. *Reprod Biol Endocrinol* 2004; 2: 12

Dul EC, van Ravenswaaij-Arts CM, Groen H, van Echten-Arends J, Land JA. Who should be screened for chromosomal abnormalities before ICSI treatment? *Hum Reprod.* 2010 Nov;25(11):2673-7. Epub 2010 Sep 16.

Eley A, Pacey AA, Galdiero M, Galdiero M, Galdiero F. Can Chlamydia trachomatis directly damage your sperm? *Lancet Infect Dis.* 2005 Jan;5(1):53-7

Evenson D, Wixon R. Meta-analysis of sperm DNA fragmentation using the sperm chromatin structure assay. *Reprod Biomed Online* 2006;12:466-72.


Foresta C, Zuccarello D, Garolla A, Ferlin A. Role of hormones, genes, and environment in human cryptorchidism. *Endocr Rev.* 29:560-80, 2008

Gleicher N., Barad D., Unexplained infertility: does it really exist? *Hum Reprod.* 2006 Aug; 21(8): 1951-5.

Gleicher N, Orvieto R. Is the hypothesis of preimplantation genetic screening (PGS) still supportable? A review. *J Ovarian Res.* 2017 Mar 27;10(1):21. doi: 10.1186/s13048-017-0318-3. Review. PubMed PMID: 28347334; PubMed Central PMCID: PMC5368937.

Hammoud AO, Wilde N, Gibson M, Parks A, Carrell DT, Meikle AW. "Body mass index in relation to semen quality and reproductive hormones among 1,558 Danish men". *Fertil Steril.* 2004 Oct;82(4):863-70.

Harvey HA, Porat N, Campbell CA, Jennings M, Gibson BW, Phillips NJ, Apicella MA, Blake MS. Gonococcal lipooligosaccharide is a ligand for the asialoglycoprotein receptor on human sperm. *Mol Microbiol.* 2000 Jun;36(5):1059-70.



Hauser R, Sokol R. Science linking environmental contaminant exposures with fertility and reproductive health impacts in the adult male. *Fertil Steril.* 2008;89:59-65.

Kort HI, Massey JB, Elsner CW, Mitchell-Leef D, Shapiro DB, Witt MA, Roudebush WE. "Impact of body mass index values on sperm quantity and quality" *Fertil Steril.* 2008 Dec;90(6):2222-5. "Male obesity and alteration in sperm parameters. *Journal of Andrology*, 2006 May-Jun;27(3):450-2.

Jensen TK, Andersson AM, Jørgensen N, Andersen AG, Carlsen E, Petersen JH, Skakkebaek NE. Histone demethylase JHDM2A is involved in male infertility and obesity.' Okada Y, Tateishi K, Zhang Y. *J Androl.* 2010 Jan-Feb;31(1):75-8. Epub 2009 Oct 29.'

Muthusami KR, Chinnaswamy P. Effect of chronic alcoholism on male fertility hormones and semen quality. *Fertil Steril.*84:919-24, 2005.

Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, Effectiveness and treatment for unexplained infertility. *Fertil Steril.* 2006 Nov; 86(5 Suppl 1): S111-4.

Sermondade N, Elloumi H, Berthaut I, Mathieu E, et al. Progressive alcohol-induced sperm alterations leading to spermatogenic arrest, which was reversed after alcohol withdrawal. *Reprod Biomed Online.*20:324-327, 2010.

Sikka SC, Wang R. Endocrine disruptors and estrogenic effects on male reproductive axis. *Asian J Androl.* 2008;10:134-45.

Siristatidis C., Bhattacharya S., Unexplained infertility: does it really exist? Does it matter? *Hum Reprod.* 2007 Aug; 22(8): 2084-7.

Stouffs K, Lissens W, Tournaye H, Haentjens P. What about gr/gr deletions and male infertility? Systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update.* 2011 Mar-Apr;17(2):197-209.

Svenstrup HF, Fedder J, Abraham-Peskir J, Birkelund S, Christiansen G. *Mycoplasma genitalium* attaches to human spermatozoa. *Hum Reprod.* 2003 Oct;18(10):2103-9.

Terry t. Turner et al. Oxidative stress: a common factor in testicular dysfunction. *J Andr* 2008; 29: 5.

Teixeira DM et al. *Cochrane Database Syst Rev.* 2013

Tremellen K. Oxidative stress and male infertility—a clinical perspective. *Hum Reprod Update* 2008; 14: 243–258





**Studio Medico**

Via Giuseppe Silla 12,  
(Cassia Giustiniana) 00189 Roma

**Gruppo Donnamed®**

Centro Unico di Prenotazione  
t. 06 30367768  
c. 338 899 74 73 (per urgenze)  
email: [staffdonnamed@gmail.com](mailto:staffdonnamed@gmail.com)  
[www.donnamed.it](http://www.donnamed.it)