

Deep In

MEDICINA DELLA RIPRODUZIONE



Short-term FSH treatment and sperm maturation: a prospective study in idiopathic infertile men

Trattamento a breve termine con FSH e maturazione spermatica:
uno studio prospettico sull'infertilità idiopatica maschile

Gli autori

E. Casamonti, S. Vinci, E. Serra, M. G. Fino, S. Brilli, F. Lotti,
M. Maggi, M. E. Coccia, G. Forti, C. Krausz

Publicato in *Andrology*. 2017 May;5(3):414-422.

Background 1/3



L'infertilità colpisce circa il 15% delle coppie e il fattore maschile è presente più o meno nel 50% dei casi. Nonostante i notevoli progressi nella diagnosi delle cause di infertilità, nel 30-50% dei casi l'eziologia rimane sconosciuta e viene definita come «idiopatica». Per questa categoria di pazienti sono stati proposti numerosi trattamenti empirici, dagli antiossidanti alle terapie ormonali, con risultati estremamente controversi.

Una recente metanalisi su 15 studi clinici controllati, in cui l'FSH veniva somministrato a uomini infertili idiopatici (rispetto al placebo o a nessun trattamento), ha mostrato che la somministrazione di FSH al partner maschile migliora significativamente la concentrazione spermatica e il tasso di gravidanza, sia spontanea sia con tecniche di procreazione medicalmente assistita (ART). Tuttavia, a causa dell'eterogeneità degli studi, la qualità dei dati non è stata considerata ottimale; di conseguenza, il trattamento con FSH nell'infertilità idiopatica resta una questione ancora aperta.

Inoltre, gli studi sugli effetti della terapia con FSH sui parametri seminali hanno chiaramente dimostrato che solo il 50% circa dei soggetti trattati risponde in termini di miglioramento quantitativo e qualitativo della spermatogenesi.

L'impossibilità di poter prevedere la risposta al trattamento rappresenta un grande limite a questo approccio terapeutico e ha spinto alcuni autori a cercare dei parametri predittivi.

Background 2/3



Per definire se il trattamento con FSH possa influenzare positivamente la maturazione spermatica che porta allo sviluppo finale degli spermatozoi maturi (spermiogenesi), in questo lavoro è stato selezionato un test funzionale, il **saggio di legame spermatozoi-acido ialuronico (HBA)**: la capacità degli spermatozoi di legare l'acido ialuronico (HA) sembra essere correlato, infatti, con la maturità cellulare e cromatinica, con l'integrità del DNA, con la frequenza dell'aneuploidia cromosomica e la funzione spermatica.

Durante la fecondazione solo gli spermatozoi maturi raggiungono la superficie esterna dell'ovocita, aderiscono a essa legandosi all'HA, che rappresenta il principale componente della matrice del cumulo ooforo, e penetrano all'interno: **il legame con l'HA è indice, pertanto, di uno spermatozoo maturo, capace di fecondare**; la proporzione di spermatozoi maturi indica la maturità in un campione di liquido seminale.

L'HA sembra svolgere un ruolo fondamentale nella selezione fisiologica degli spermatozoi durante il processo naturale della fecondazione umana. L'esposizione dei recettori per l'HA sulla superficie delle cellule spermatiche indica che queste hanno completato il rimodellamento della membrana plasmatica. Infatti, solo gli spermatozoi maturi che hanno completato correttamente la spermiogenesi espongono sulla loro superficie un elevato numero di recettori per l'HA. Di conseguenza, **la capacità di legarsi all'HA può essere considerata pienamente un biomarker**.

Background 3/3



Test HBA

Il test è utilizzato per verificare la capacità fecondante di un determinato liquido seminale, visualizzando quali spermatozoi si legano all'HA che riveste dei particolari vetrini che fungono da supporto. Al microscopio gli spermatozoi legati al supporto di HA (maturi) si distinguono chiaramente da quelli non legati (immaturi).

È stato proposto (Huszar *et al.*, 2007) che un **valore del legame con l'HA >60%** (score) sia indicativo di **assenza di particolari problematiche di infertilità**. Di conseguenza, le coppie possono ricorrere al concepimento naturale o a una tecnica di riproduzione assistita non invasiva, come la IUI.

Nei soggetti che mostrano, invece, un **legame con l'HA $\leq 65\%$** , è necessario **ricorrere a una ICSI** per poter selezionare gli spermatozoi maturi. È stato infatti dimostrato che, utilizzando per la ICSI gli spermatozoi selezionati attraverso il legame all'HA, si ha una riduzione statisticamente significativa del tasso di interruzione di gravidanza, rispetto a una ICSI eseguita con una selezione degli spermatozoi basata esclusivamente sull'esame morfologico e sulla motilità.

Rispetto ai classici parametri seminali, quindi, la **capacità degli spermatozoi di legare l'HA** potrebbe rappresentare un **marker predittivo** non solo per la maturità degli spermatozoi, ma anche per la probabilità di concepimento.

Obiettivo dello studio



Valutare l'efficacia della terapia con FSH nel migliorare la capacità degli spermatozoi di legare l'HA in uomini infertili idiopatici e se tale effetto è presente già dopo 1 mese di terapia (durante la spermiogenesi).

Endpoint secondari

- ▶ Analizzare due parametri spermatici (TSN, numero totale di spermatozoi, e TMSC, numero totale di spermatozoi mobili) dopo 3 mesi di trattamento con FSH.
- ▶ Analizzare tre polimorfismi (SNP, Single Nucleotide Polymorphism) dei geni FSH β e FSHR (FSH β 211 G>T; FSHR 2039 A>G; FSHR 29 G>A) per definire il loro potenziale valore predittivo.

Disegno dello studio



- ▶ Selezione iniziale di **107** pazienti con infertilità idiopatica (riduzione successiva dei partecipanti per drop-out volontario, infezioni urogenitali, FSH > 8 UI/L ecc.).
- ▶ **40** pazienti hanno completato lo studio.

Criteria di inclusione

- ▶ **Infertilità primaria** (assenza di precedenti paternità) con:
 - ridotta concentrazione degli spermatozoi nel liquido seminale (**oligozoospermia**);
 - ridotta motilità (**astenozoospermia**);
 - alterata morfologia (**teratozoospermia**);
 - combinazione delle suddette anomalie (**oligoastenoteratozoospermia**).
- ▶ Valori di **FSH nella norma** (<8 IU/L).
- ▶ Valori **HBA basali <60%**.

Caratteristiche dei pazienti al basale

HBA (%) (media±SD)	TSN (x106) (media±SD)	TMSC (x106) (media±SD)	Volume seminale (ml) (media±SD)	Morfologia spermatocitaria (%) (media±SD)	FSH (UI/L) (media±SD)	LH (UI/L) (media±SD)	T (nmol/L) (media±SD)	Volume testicolare bilaterale (cc) (media±SD)
29,97±15,86	46,46±37,68	17,05±18,05	4,45±1,97	1,96±1,21	4,09±1,87	3,29±1,10	15,60±5,68	35,66±9,28

HBA, saggio di legame spermatozoi-acido ialuronico; T, testosterone; TSN, numero totale di spermatozoi; TMSC, numero totale di spermatozoi mobili.

Materiali e metodi



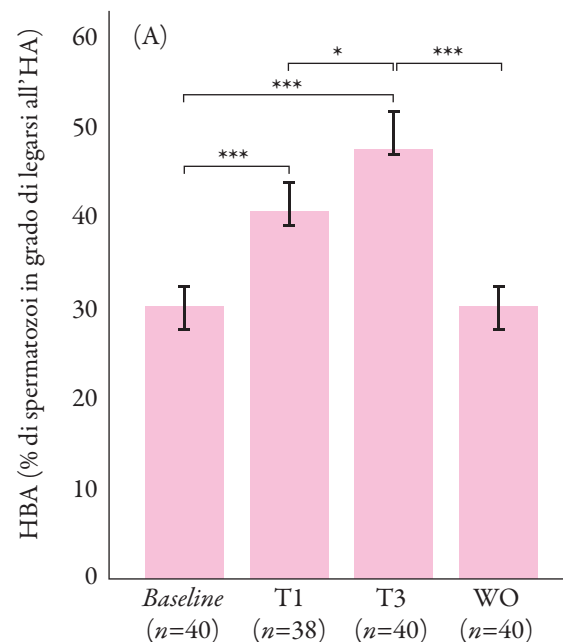
- ▶ Trattamento con **75 UI/L di FSH** (Fostimon), a giorni alterni per 3 mesi.
- ▶ Valutazione dei **valori di HBA, TSN e TMSC** in quattro diversi intervalli temporali:
 - al basale (**T0**);
 - dopo 1 mese di terapia con FSH (**T1**);
 - dopo 3 mesi di terapia con FSH (**T3**);
 - 4-6 mesi dopo la fine della terapia (**WO**, wash-out o secondo valore basale).
- ▶ Analisi genetica di 3 SNP (**polimorfismo rs10835638** del gene FSH β ; **polimorfismi rs6166 e rs1394205** del gene FSHR). Per ciascun paziente è stato raccolto un campione di sangue a **T0**.

Risultati 1/9



- ▶ **Dopo 1 mese di terapia (T1) con FSH** i valori dell'**HBA** hanno mostrato un **significativo miglioramento della percentuale di spermatozoi in grado di legarsi all'HA**, da T0 ($30,04 \pm 2,23\%$) a T1 ($41,22 \pm 3,26\%$; $p < 0,001$), con un **incremento medio del 37%**.
- ▶ **Dopo 3 mesi (T3) di terapia**, la **capacità legante risulta ulteriormente aumentata** e significativamente più alta rispetto al basale ($47,25 \pm 3,79\%$, $p < 0,001$) con un **aumento medio del 57%**. Il valore a T3 è significativamente più alto rispetto al valore T1 ($p = 0,042$)
- ▶ **Dopo il periodo di wash-out (WO) di 4-6 mesi si osserva un ritorno al valore basale.**

Effetto del trattamento con FSH sulla capacità degli spermatozoi di legare l'HA (HBA) riportato come percentuale: le barre mostrano i valori medi HBA



Risultati 2/9



- ▶ Sulla base dei valori percentuali del legame all'HA al tempo T0, i pazienti sono stati divisi in due gruppi (considerando il cut-off del 30% come valore medio nei pazienti con oligoasteno-zoospermia, come stabilito da Mokansky *et al.*, 2012):
 - pazienti con una percentuale di legame HA basale <30% (21/40; 53%);
 - pazienti con una percentuale di legame HA basale ≥30% (19/40; 47%).
- ▶ **Dopo il trattamento con FSH** entrambi i gruppi hanno mostrato un **miglioramento significativo dei valori HBA**:
 - i pazienti con valori basali di HBA <30% mostrano un incremento dei valori dell'89%;
 - i pazienti con valori basali di HBA ≥30% mostrano un incremento del 42%.

Nonostante il miglioramento più pronunciato nel gruppo di pazienti con HBA basale <30%, l'aumento medio non è statisticamente diverso tra i due gruppi.

Confronto tra la percentuale HBA prima e dopo la terapia con FSH nei due sottogruppi

	Basale (media % ±SD)	T1 (media % ±SD)	T3 (media % ±SD)
AT (n = 19)	29,46 ± 17,74	41,75 ± 23,24**	50,05 ± 26,38***
OAT (n = 21)	30,11 ± 13,08	40,75 ± 17,32***	44,73 ± 21,93**
TMSC < 10 x 10 ⁶ (n = 19)	30,40 ± 13,35	41,04 ± 17,20**	45,88 ± 21,34**
TMSC ≥ 10 x 10 ⁶ (n = 21)	29,72 ± 15,08	41,39 ± 22,79**	48,50 ± 26,61***
HBA basale < 30% (n = 21)	18,45 ± 6,66	28,79 ± 16,11**	34,78 ± 21,48***
HBA basale ≥ 30% (n = 19)	42,85 ± 7,21	53,66 ± 15,54*	61,04 ± 18,73**

T1, dopo 1 mese di terapia; T3, dopo 3 mesi di terapia; AT, astenozoospermia; OAT, oligoastenoteratozoospermia; TMSC, numero totale di spermatozoi mobili; HBA, saggio di legame spermatozoi-acido ialuronico. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

Risultati 3/9



- ▶ In base al valore percentuale del legame all'HA i pazienti responder sono stati suddivisi in due sottogruppi:
 - **responder A:** aumento uguale o maggiore del doppio della variazione intra-individuale dell'HBA (**46%**);
 - **responder B:** percentuale HBA \geq del valore assoluto (**60%**).
- ▶ Nel sottogruppo responder B una percentuale significativamente maggiore di soggetti con HBA $\geq 30\%$ al basale ha raggiunto il valore soglia sia dopo 1 mese sia dopo 3 mesi di trattamento con FSH, rispetto ai soggetti che al basale avevano valori di HBA $< 30\%$.

Confronto tra la percentuale HBA prima e dopo la terapia con FSH nei due sottogruppi

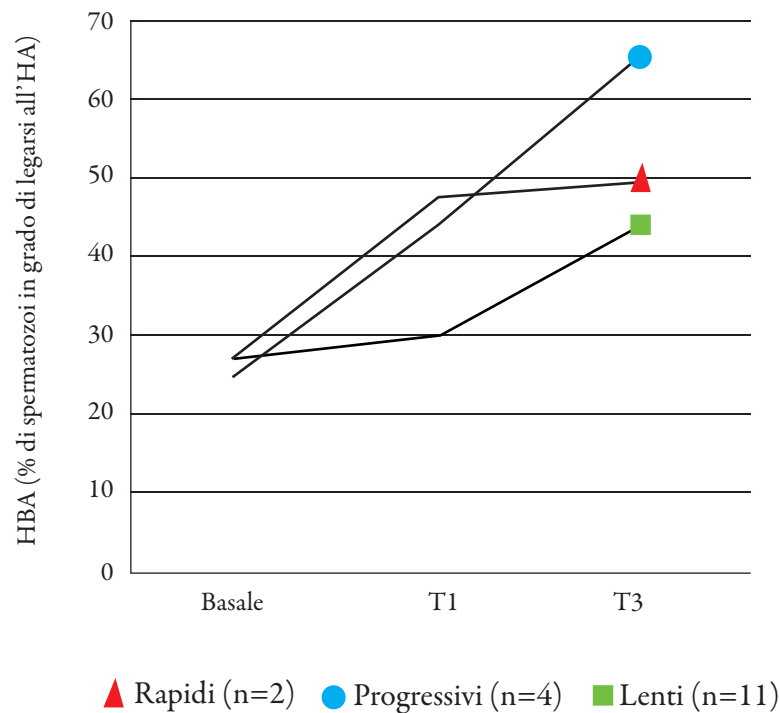
Responder	AT vs. OAT	TMSC $< 10 \times 10^6$ vs. TMSC $\geq 10 \times 10^6$	HBA $< 30\%$ vs. HBA $\geq 30\%$
A			
Basale-T1	44% (8/18) vs. 40% (8/20)	39% (7/18) vs. 45% (9/20)	47% (9/19) vs. 37% (7/19)
Basale-T3	68% (13/19) vs. 57% (12/21)	58% (11/19) vs. 67% (14/21)	67% (14/21) vs. 58% (11/19)
B			
Basale-T1	28% (5/18) vs. 20% (4/20)	22% (4/18) vs. 25% (5/20)	5% (1/19) vs. 42% (8/19)*
Basale-T3	42% (8/19) vs. 29% (6/21)	26% (5/19) vs. 43% (9/21)	14% (3/21) vs. 58% (11/19)**

T1, dopo 1 mese di terapia; T3, dopo 3 mesi di terapia; AT, astenozoospermia; OAT, oligoastenoteratozoospermia; TMSC, numero totale di spermatozoi mobili; HBA, saggio di legame spermatozoi-acido ialuronico; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$.

Risultati 4/9



- ▶ In base al valore percentuale del legame all'HA i pazienti responder sono stati suddivisi in due sottogruppi:
 - pazienti con una risposta alla terapia con FSH dopo 1 mese e un plateau successivo di valori HBA in T3 (**rapidi**);
 - pazienti con un miglioramento pronunciato dei valori di HBA solo dopo 3 mesi (**lenti**);
 - pazienti in cui i valori HBA migliorano progressivamente con la durata della terapia con FSH (**progressivi**).



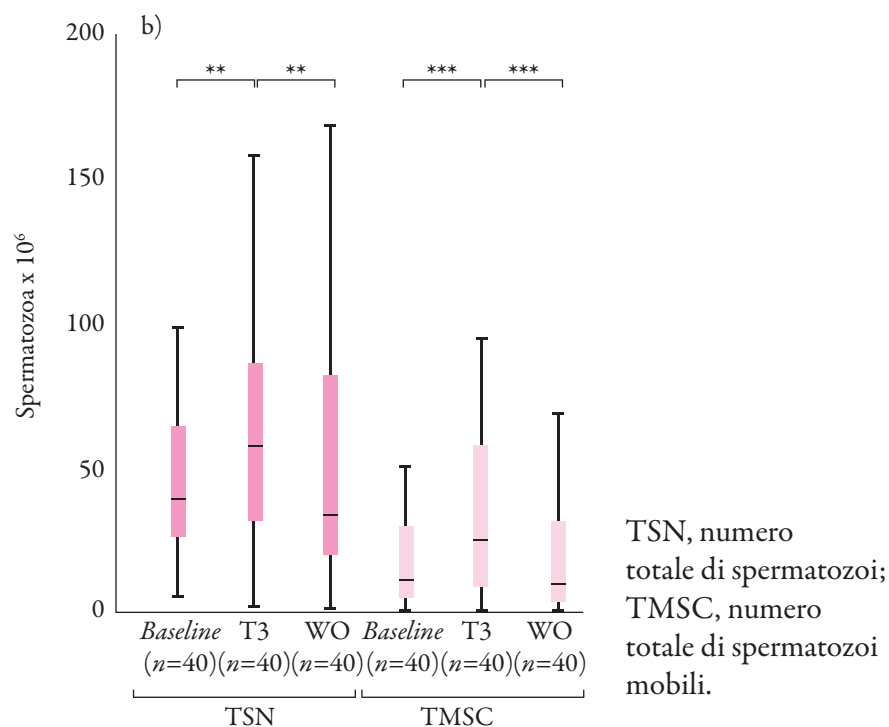
Risultati 5/9



► Dopo 3 mesi (T3) di trattamento con l'FSH è stato osservato un **miglioramento statisticamente significativo di TSN e TMSC**, con un ritorno ai valori vicini al basale dopo 4-6 mesi dalla fine della terapia (WO).

- **TSN:** T0-T3 mediana: $39,72 \times 10^6$, min-max: $6,13-221 \times 10^6$ vs. mediana: $58,38 \times 10^6$, min-max: $3,49-300,60 \times 10^6$.
- **TMSC:** mT0-T3 mediana: $11,59 \times 10^6$, min-max: $0,64-85,69 \times 10^6$ vs. mediana: $25,55 \times 10^6$ min-max: $0,37-95,04 \times 10^6$.

Effetto del trattamento con FSH sui valori di TSN e TMSC: il valore medio è indicato dalla linea che divide in due le barre verticali



Risultati 6/9



► I pazienti responder sono stati stratificati in base ai loro diversi polimorfismi (SNP):

- FSH β 211 G>T;
- FSHR 2039 A>G;
- FSHR 29 G>A.

Queste mutazioni sono considerate possibili marcatori in grado di predire i pazienti con risposta positiva alla terapia con FSH (responder).

Caratteristiche di base dei pazienti con i diversi polimorfismi

Genotipo	HBA (%) (media \pm SD)	TSN ($\times 10^6$) (media \pm SD)	Volume seminale (ml) (media \pm SD)	Morfologia spermatocica (%) (media \pm SD)	TMSC ($\times 10^6$) (media \pm SD)	FSH (UI/L) (media \pm SD)	LH (UI/L) (media \pm SD)	Testosterone (nmol/L) (media \pm SD)	Volume testicolare bilaterale (cc) (media \pm SD)	
FSH β 211 G>T	<u>GG</u> (n=25)	31,55 \pm 15,41	58,68 \pm 56,30	4,40 \pm 1,67	1,80 \pm 1,10	19,61 \pm 22,56	4,54 \pm 1,93	3,41 \pm 1,24	15,13 \pm 5,46	35,50 \pm 8,72
	<u>GT-TT</u> (n=14)	27,92 \pm 12,02	46,10 \pm 35,75	4,70 \pm 2,46	2,32 \pm 1,38	18,33 \pm 14,09	3,23 \pm 1,55	3,05 \pm 0,77	16,43 \pm 6,11	36,68 \pm 10,30
FSHR 2039 A>G	<u>AA</u> (n=8)	27,74 \pm 12,07	28,64 \pm 20,17	4,23 \pm 1,33	2,13 \pm 1,25	10,10 8,59	3,87 \pm 2,20	3,56 \pm 1,08	17,75 \pm 4,59	39,63 \pm 6,57
	<u>AG-GG</u> (n=31)	30,90 \pm 14,84	60,75 \pm 52,60	4,58 \pm 2,11	1,95 \pm 1,23	21,49 \pm 21,19	4,12 \pm 1,84	3,21 \pm 1,11	15,04 \pm 5,84	34,93 \pm 9,68
FSHR 29 G>A	<u>GG</u> (n=21)	31,44 \pm 13,14	57,83 \pm 47,77	4,30 \pm 1,85	1,74 \pm 0,87	21,29 \pm 22,79	4,22 \pm 1,91	3,46 \pm 1,06	15,40 \pm 4,75	36,90 \pm 7,84
	<u>GA-AA</u> (n=18)	28,85 \pm 15,67	49,90 \pm 52,04	4,74 \pm 2,12	2,28 \pm 1,50	16,65 \pm 15,74	3,89 \pm 1,91	3,08 \pm 1,14	15,82 \pm 6,70	34,82 \pm 10,78

HBA, saggio di legame spermatozoi-acido ialuronico; TSN, numero totale di spermatozoi; TMSC, numero totale di spermatozoi mobili.

Risultati 7/9



Confrontando la distribuzione allelica dei tre SNP nella coorte dei pazienti arruolati rispetto a quella riportata nella popolazione generale emerge che:

- ▶ la frequenza dell'allele T mutato per FSH β 211 G>T è significativamente aumentata nei pazienti rispetto alla popolazione generale (15,2% *vs.* 8,4%, $p = 0,028$);
- ▶ la frequenza dell'allele G mutato per FSHR 2039 A>G è leggermente più alta (ma non statisticamente significativa) nei pazienti rispetto alla popolazione generale (53% *vs.* 41%).

Per entrambe queste mutazioni esistono dati funzionali a supporto di un loro effetto modulatore, rispettivamente sull'attività del promotore (l'allele T riduce la trascrizione della subunità β dell'FSH) e sull'attività recettoriale (l'allele G riduce la sensibilità dell'ormone al recettore).

- ▶ La distribuzione allelica per FSHR 29 G>A è simile nei due gruppi (21% *vs.* 34%).

Risultati 8/9



- ▶ Per il genotipo **FSH β 211 G>T**:

25 pazienti (64%) sono omozigoti GG (genotipo wild type);

14 pazienti (36%) sono eterozigoti GT o omozigoti TT (genotipo mutante).

In entrambi i gruppi c'era una **differenza significativa dei valori dell'HBA tra il basale e dopo 1 e 3 mesi di trattamento con FSH.**

- ▶ Per il genotipo **FSHR 2039 A>G**:

8 pazienti (21%) sono AA omozigoti (genotipo wild type);

31 pazienti (79%) sono eterozigoti AG o omozigoti GG (genotipo mutante).

Per il genotipo wild type è emersa una **differenza significativa per l'HBA solo dopo 3 mesi di trattamento con FSH, mentre nei genotipi mutati (AG e GG) vi è differenza sia a 1 che a 3 mesi rispetto al basale.**

- ▶ Per il genotipo **FSHR 29 G>A**:

21 pazienti (54%) sono omozigoti GG (genotipo wild type);

18 (46%) sono eterozigoti GA o omozigoti AA (genotipo mutante).

Vi è una **differenza significativa nel valore HBA in entrambi i gruppi tra il basale e dopo 1 e 3 mesi di trattamento con FSH.**

- ▶ L'**entità del miglioramento dei valori di HBA da T0 a T1 e a T3 sono simili nei diversi genotipi**, con l'eccezione di FSHR 2039 A>G a T1.

Risultati 9/9



Confronto tra la media percentuale di HBA a T0, T1 e T3 tra i pazienti stratificati in base ai tre polimorfismi

	HAB (media %±SD)		
	Basale	T1	T3
FSHβ 211 G>T			
GG (n = 25)	31,55 ± 15,41	41,45 ± 20,05***	47,30 ± 20,52***
GT-TT (n = 14)	27,92 ± 12,02	40,78 ± 20,91*	48,77 ± 30,12*
FSHR 2039 A>G			
AA (n = 8)	27,74 ± 12,07	37,64 ± 16,36	47,19 ± 16,14*
AG-GG (n = 31)	30,90 ± 14,84	42,03 ± 20,96***	47,99 ± 25,88***
FSHR 29 G>A			
GG (n = 21)	31,44 ± 13,14	41,20 ± 20,86*	48,84 ± 21,6**
GA-AA (n = 18)	28,85 ± 15,67	41,25 ± 19,7***	46,64 ± 27,15**

HBA, saggio di legame spermatozoi-acido ialuronico; T1, dopo 1 mese di terapia; T3, dopo 3 mesi di terapia; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

Entità del miglioramento dei valori di HBA da T0 a T1 e a T3

		Entità del miglioramento percentuale di HBA	
		Basale-T1	Basale-T3
FSHβ 211 G>T	<u>GG vs. GT-TT</u>	31% vs. 46%	50% vs. 75%
FSHR 2039 A>G	<u>AA vs. AG-GG</u>	36% vs. 36%	70% vs. 55%
FSHR 29 G>A	<u>GG vs. GA-AA</u>	31% vs. 43%	55% vs. 62%

HBA, saggio di legame spermatozoi-acido ialuronico; T1, dopo 1 mese di terapia; T3, dopo 3 mesi di terapia.

Conclusioni



Questo studio è il primo incentrato sull' **effetto del trattamento con FSH su un parametro spermatico di tipo funzionale**, ovvero la capacità di legare l'HA, che riflette un'adeguata maturazione e una corretta morfologia degli spermatozoi, un numero inferiore di aneuploidie cromosomiche, una minore frammentazione del DNA, una maggiore integrità della cromatina e, di conseguenza, una maggiore potenzialità fecondante.

È stata dimostrata l'efficacia della terapia con FSH negli uomini infertili idiopatici, in particolare nel migliorare il TSN e il TMSC dopo 3 mesi di trattamento (che corrispondono a un intero ciclo spermatogenico) e, così come per l'HBA, è stato osservato un ritorno ai valori basali dopo 4-6 mesi dalla fine della terapia, a supporto della potenziale relazione causale tra la somministrazione del farmaco e il miglioramento osservato dei parametri spermatici.

Sebbene questo studio non abbia una numerosità campionaria tale da riuscire a verificare pienamente l'effetto del genotipo sulla risposta al trattamento con FSH, i dati ottenuti suggeriscono che **non esiste un chiaro effetto del genotipo nel predire la risposta al trattamento, in relazione ai parametri seminali o alla capacità di legare l'HA.**

