

# Deep In

**MEDICINA DELLA RIPRODUZIONE**



# Sperm count affects cumulative birth rate of assisted reproduction cycles in relation to ovarian response

---

Influenza del numero di spermatozoi sul tasso di natalità cumulativa nei cicli di riproduzione assistita in relazione alla risposta ovarica

---

## *Gli autori*

Carlotta Zacà, Giovanni Coticchio, Nicoletta Tarozzi, Marco Nadalini, Cristina Lagalla, Andrea Garolla, Andrea Borini

---

Publicato in *J Assist Reprod Genet.* 2020 Jul;37(7):1653-1659.

# Background 1/2

---



Gli esiti clinici dei trattamenti nell'ambito delle **tecniche di riproduzione assistita** (ART) sono influenzati da una molteplicità di fattori intrinseci ed estrinseci.

La competenza ovocitaria, ma non quella spermatica, è compromessa in maniera cruciale dall'a-neuploidia cromosomica. Per questo motivo, **il gamete femminile è riconosciuto come il fattore più importante** in grado di influire sulla **capacità di impianto dell'embrione** e sul suo svilupparsi a termine, *in vitro* e *in vivo*.

Tuttavia, **lo spermatozoo partecipa attivamente alla formazione dell'embrione**, sia dal punto di vista genetico ed epigenetico che cellulare.

L'estrema facilità con cui l'avvento dell'iniezione intracitoplasmatica di spermatozoi (ICSI, intra-cytoplasmic sperm injection) ha permesso di superare le disfunzioni spermatiche, altrimenti non trattabili, ha generato però un paradosso. Il gamete maschile è stato progressivamente percepito da molti specialisti della fertilità come un elemento essenziale per generare uno zigote biparentale, ma con poco o nessun coinvolgimento nei processi di sviluppo prima e dopo l'impianto.

# Background 2/2

---



In questo studio retrospettivo, gli autori hanno **esplorato la possibile influenza della qualità dello sperma sul tasso cumulativo di nati vivi (CLBR, cumulative live birth rate)**.

A tal fine, si sono concentrati sull'impatto specifico del **numero totale di spermatozoi (TSC) pre-trattamento**, un parametro adottato perché precedentemente descritto come elemento cruciale associato alla fertilità, all'infertilità e alla salute maschile.

È importante sottolineare che è stato osservato un **TSC dipendente dai diversi pattern di risposta ovarica** alla stimolazione ormonale nelle pazienti giovani.

Nel complesso, i dati di questo studio indicano che, mentre il **TSC è fondamentale per il successo clinico cumulativo, il suo impatto relativo dipende dalla risposta ovarica**, suggerendo nuove ipotesi sulle mutue interazioni tra la qualità dei gameti maschili e femminili nell'instaurazione di una gravidanza vitale.

# Obiettivo dello **studio**

---



Esplorare la possibile influenza della qualità del liquido seminale, valutata tramite il numero totale di spermatozoi (TSC) pre-trattamento, sul tasso di successo cumulativo nei cicli di riproduzione assistita.

# Disegno dello studio



- ▶ Studio di coorte retrospettivo.
- ▶ *Periodo*: gennaio 2009-dicembre 2013.
- ▶ *Popolazione*: **765 coppie sottoposte a cicli di ICSI** complete, ovvero quelle in cui tutti gli embrioni sono stati trasferiti o distrutti se non vitali.
- ▶ Tassi di gravidanza calcolati in relazione al numero di cicli avviati.

## *Criteria di inclusione*

Diagnosi di infertilità maschile ed età del partner femminile <36 anni.

## *Criteria di esclusione*

Combinazione di fattori di infertilità femminili e maschili.

# Materiali e metodi 1/4



Le coppie sono state suddivise in cinque gruppi, in base al TSC del partner maschile:

1.  $<0,1 \times 10^6$  (189/765 cicli, 24,7%);
2. da  $0,1 \times 10^6$  a  $1 \times 10^6$  (144/765 cicli, 18,8%);
3. da  $1 \times 10^6$  a  $5 \times 10^6$  (150/765 cicli, 19,6%);
4. da  $5 \times 10^6$  fino a  $10 \times 10^6$  (103/765 cicli, 13,5%);
5. da  $10 \times 10^6$  a  $39 \times 10^6$  (179/765 cicli, 23,4%).

Questi intervalli di TCS sono stati identificati sulla base delle informazioni o sull'esperienza. Come **valore massimo** è stato scelto il **cut-off di  $39 \times 10^6$  milioni di spermatozoi totali per eiaculato**.

Il manuale dell'**Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS)** per l'analisi dello sperma indica, infatti, **questo valore come cut-off al di sotto del quale il campione di sperma è definito oligospermico**.

# Materiali e metodi 2/4



Numero di embrioni, tasso cumulativo di gravidanze e di nati vivi in cicli selezionati per età femminile <36 anni e classificati in base al TSC

		TSC					<i>p</i>
		<0,1x10 <sup>6</sup>	>0,1x10 <sup>6</sup> -1x10 <sup>6</sup>	1x10 <sup>6</sup> -5x10 <sup>6</sup>	5x10 <sup>6</sup> -10x10 <sup>6</sup>	10x10 <sup>6</sup> -39x10 <sup>6</sup>	
N. di cicli	765	189	144	150	103	179	
Età paziente (anni), media ± DS	31,6±2,7	31,5±2,9	31,6±2,9	31,7±2,5	31,9±2,9	31,8±2,7	0,75
N. di ovociti recuperati, media ± DS	10,1±5,1	10,4±5,5	9,3±5,1	10,5±5,6	10,1±4,6	9,6±4,9	0,185
N. di embrioni vitali, media ± DS	3,1±1,9	3,0±1,6	2,8±1,7	3,4±2,2	3,1±1,8	3,2±1,9	0,066
N. di gravidanze cumulative (%)	288 (37,6)	56 (29,6)	48 (33,3)	61 (40,7)	45 (43,7)	78 (43,6)	0,025
N. di aborti spontanei (%)	51 (17,7)	14 (25)	9 (18,7)	9 (14,7)	7 (15,6)	12 (15,4)	0,5
N. cumulativo di nati vivi (%)	237 (31,0)	42 (22,2)	39 (27,1)	52 (34,7)	38 (36,9)	66 (36,9)	0,01

# Materiali e metodi 3/4



**I gruppi** sono stati **analizzati** anche in base al numero di ovociti recuperati e quindi, indirettamente, **in base alla risposta ovarica**.

Sono stati scelti, **per il numero di ovociti recuperati, gli intervalli 1-5, 6-10 e >10** perché, sulla base della letteratura, rappresentano casi di scarsa, media e buona/elevata risposta ovarica.

## *Analisi e preparazione degli spermatozoi*

I campioni di liquido seminale sono stati raccolti, dopo 3-5 giorni di astinenza sessuale, nel giorno del prelievo degli ovociti (OPU, oocyte pick-up) e analizzati una prima volta dopo la liquefazione.

In accordo con le linee guida dell'OMS, sono stati valutati prima della preparazione: volume, concentrazione, motilità, agglutinazione, presenza di cellule rotonde e morfologia.

Dopo la preparazione è stata eseguita una seconda valutazione della concentrazione, della morfologia e della motilità.

# Materiali e metodi 4/4



## *Stimolazione ovarica e procedure di manipolazione di ovociti ed embrioni*

La **stimolazione follicolare** è stata eseguita con una dose iniziale compresa tra **100 e 300 UI al giorno di FSH altamente purificato** (IBSA, Lodi, Italia). Il pick-up è stato eseguito 35-36 ore dopo l'induzione della maturazione finale degli ovociti tramite la somministrazione di hCG (Gonasi; Amsa, Roma, Italia).

Gli embrioni ottenuti al giorno 3 sono stati trasferiti e/o crioconservati. Il loro numero è stato deciso in base alle esigenze della paziente e alle linee guida nazionali.

La valutazione della **gravidanza clinica** è stata ottenuta mediante **rilevamento ecografico del sacco gestazionale** e visualizzazione del **battito cardiaco fetale**.

L'**aborto** è stato definito come **interruzione della gravidanza** dopo la conferma ecografica e il mancato rilevamento del battito cardiaco fetale.

Con **nato vivo** è stata identificata la nascita di un **neonato con segni di vitalità dopo almeno 24 settimane di gestazione**.

# Risultati 1/7



- ▶ I dati sono stati raccolti da **765 cicli di stimolazione completati**, ovvero quelli in cui tutti gli embrioni sono stati trasferiti a fresco o da congelato, oppure distrutti se ritenuti non vitali.
- ▶ **35 cicli** (4,6%) sono stati **interrotti** poiché non era stato ottenuto nessun embrione per il trasferimento o per la crioconservazione.
- ▶ L'**età media** e il **numero degli ovociti recuperati** erano **sovrapponibili** tra i diversi gruppi, così come il numero medio degli embrioni nei diversi gruppi TSC.
- ▶ I **tassi cumulativi di gravidanza** (CPR, cumulative pregnancy rate) erano **progressivamente più elevati all'aumentare del valore del TSC**, raggiungendo un livello stabile nei gruppi con TSC più elevato ( $p = 0,025$ ).
- ▶ Lo **stesso andamento** è stato osservato **per il tasso cumulativo di nati vivi** (CLBR) ( $p = 0,01$ ), mentre i tassi di aborto spontaneo erano sovrapponibili.

# Risultati 2/7



---

## *Singoli gruppi TSC*

I tassi cumulativi sono stati analizzati nei singoli gruppi TSC in relazione al diverso numero di ovociti recuperati (da 1 a 5; da 6 a 10; >10).

Come previsto, nella condizione TSC più grave ( $\leq 0,1 \times 10^6$ ), il numero medio di embrioni era progressivamente maggiore ( $p < 0,01$ ) all'aumentare del numero di ovociti recuperati.

# Risultati 3/7



Percentuali di esito dei cicli classificati secondo il TSC e analizzati in base al numero di ovociti recuperati

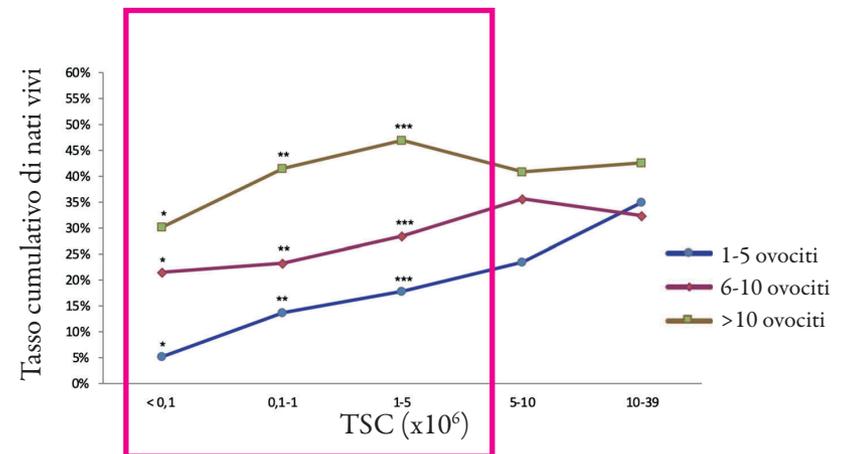
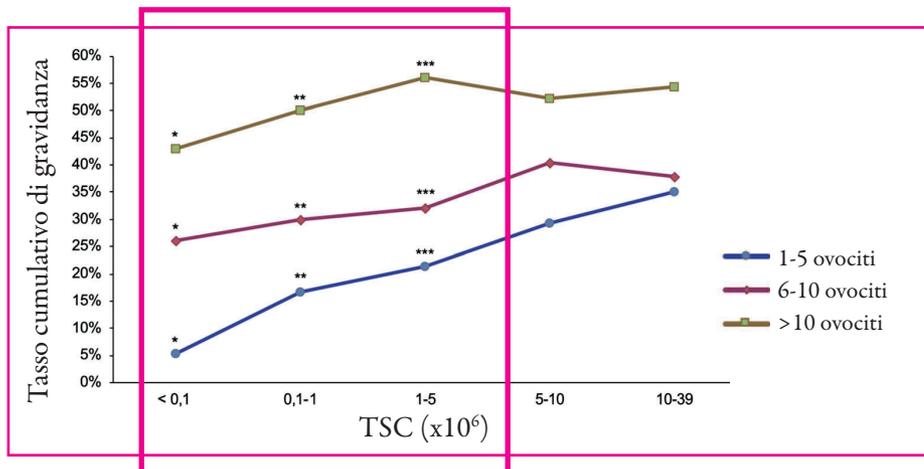
	TSC					p
	<0,1x10 <sup>6</sup>	>0,1x10 <sup>6</sup> -1x10 <sup>6</sup>	1x10 <sup>6</sup> -5x10 <sup>6</sup>	5x10 <sup>6</sup> -10x10 <sup>6</sup>	10x10 <sup>6</sup> -39x10 <sup>6</sup>	
N. di cicli	189	144	150	103	179	
Età paziente (anni), media ± DS	31,5±2,9	31,6±2,9	31,7±2,5	31,9±2,9	31,8±2,7	0,75
N. di ovociti recuperati, media ± DS	10,4±5,5	9,3±5,1	10,5±5,6	10,1±4,6	9,6±4,9	0,185
N. di embrioni vitali, media ± DS	3,0±1,6	2,8±1,7	3,4±2,2	3,1±1,8	3,2±1,9	0,066
1-5 ovociti	1,8±1,2	1,6±0,7	1,8±1,1	1,9±0,8	1,9±1,0	0,739
6-10 ovociti	2,8±1,7	2,7±1,4	3,1±1,6	3,0±1,5	3,0±1,6	0,629
>10 ovociti	3,8±2,2	4,0±1,9	4,4±2,5	3,8±2,0	4,0±2,3	0,57
N. di gravidanze cumulative (%)						
1-5 ovociti	2/38 (5,3) <sup>a</sup>	6/36 (16,7) <sup>c</sup>	6/28 (21,4) <sup>e</sup>	5/17 (29,4)	13/37 (35,1)	0,022
6-10 ovociti	17/65 (26,2) <sup>a</sup>	18/60 (30,0) <sup>c</sup>	18/56 (32,1) <sup>e</sup>	17/42 (40,5)	28/74 (37,8)	0,48
>10 ovociti	37/86 (43,0) <sup>a</sup>	24/48 (50,0) <sup>c</sup>	37/66 (56,1) <sup>e</sup>	23/44 (52,3)	37/68 (54,4)	0,522
N. cumulativo di nati vivi (%)						
1-5 ovociti	2/38 (5,3) <sup>b</sup>	5/36 (13,9) <sup>d</sup>	5/28 (17,9) <sup>f</sup>	4/17 (23,5)	13/37 (35,1)	0,017
6-10 ovociti	14/65 (21,5) <sup>b</sup>	14/60 (23,3) <sup>d</sup>	16/56 (28,6) <sup>f</sup>	15/42 (35,7)	24/74 (32,4)	0,41
>10 ovociti	26/86 (30,2) <sup>b</sup>	20/48 (41,7) <sup>d</sup>	31/66 (47,0) <sup>f</sup>	18/44 (40,9)	29/68 (42,6)	0,28

<sup>a</sup>p < 0,0001; <sup>b</sup>p = 0,0085; <sup>c</sup>p = 0,0045; <sup>d</sup>p = 0,012; <sup>e</sup>p = 0,0019; <sup>f</sup>p = 0,0121.

# Risultati 4/7



- ▶ Allo stesso modo, i **tassi cumulativi di gravidanza (CPR)** e il **tasso cumulativo di nati vivi (CLBR)** sono **aumentati in relazione al numero di ovociti**.
- ▶ **Andamenti simili** sono stati osservati nei risultati dei **gruppi con valori TSC da  $>0,1 \times 10^6$  a  $1 \times 10^6$  e da  $>1 \times 10^6$  a  $5 \times 10^6$** .
- ▶ Nei gruppi caratterizzati da TSC da  $>5 \times 10^6$  a  $10 \times 10^6$  e da  $>10 \times 10^6$  a  $39 \times 10^6$ , anche CPR e LBR sembravano aumentare in relazione al numero maggiore di ovociti recuperati, ma tali differenze non erano statisticamente significative.

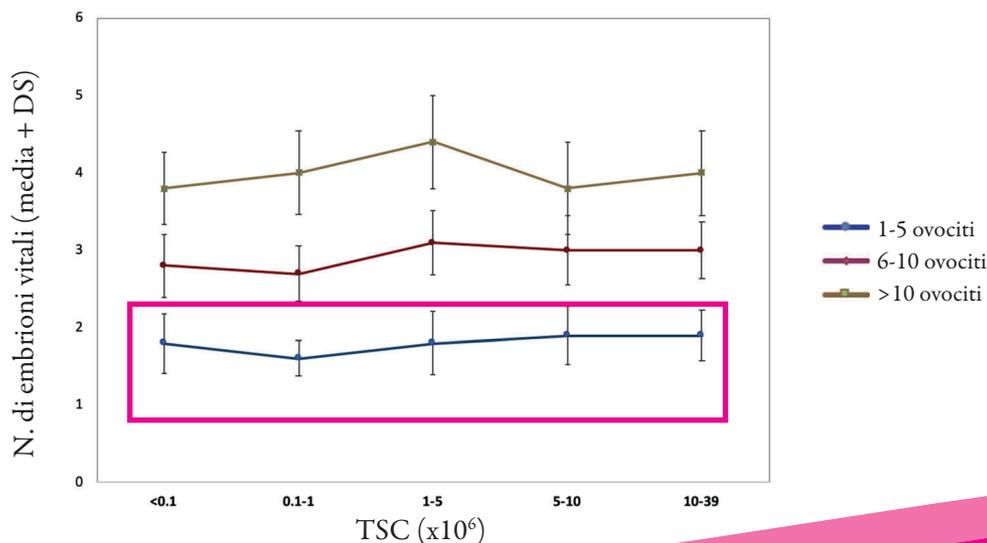


# Risultati 5/7



## *Cicli con diversa resa ovocitaria in funzione dei valori di TSC*

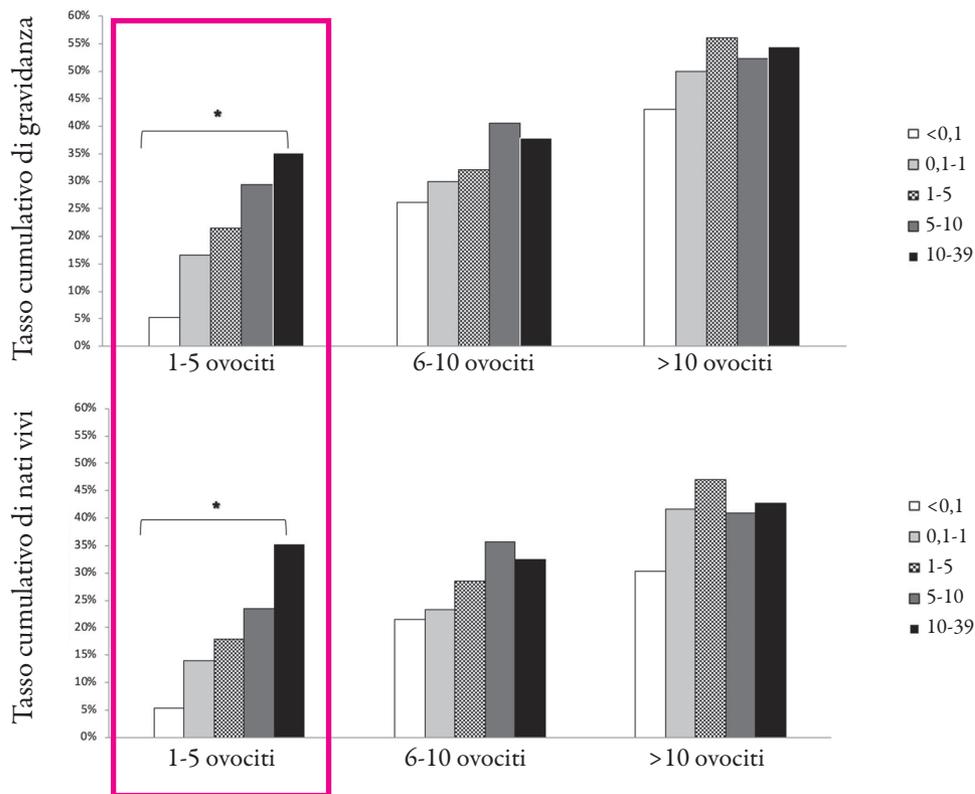
- ▶ Le percentuali cumulative sono state ulteriormente studiate attraverso analisi eseguite in gruppi di pazienti con differente resa ovocitaria (da 1 a 5; da 6 a 10, >10), e adottando il TSC come variabile indipendente.
- ▶ Nel **gruppo** in cui sono stati recuperati **da 1 a 5 ovociti**, il **numero medio di embrioni non era statisticamente diverso nelle categorie di spermatozoi  $\leq 0,1 \times 10^6$ , da  $> 0,1 \times 10^6$  a  $1 \times 10^6$ , da  $> 1 \times 10^6$  a  $5 \times 10^6$ , da  $> 5 \times 10^6$  a  $10 \times 10^6$ ; da  $> 10 \times 10^6$  a  $39 \times 10^6$ .**



# Risultati 6/7



- Al contrario, i **tassi cumulativi di gravidanza (CPR)** e il **tasso cumulativo di nati vivi (CLBR)** erano aumentati significativamente con valori di TSC più alti.



# Risultati 7/7



- ▶ Negli altri gruppi con numero di ovociti recuperati 6-10 e >10, il numero medio di embrioni non variava in maniera dipendente dal TSC. Allo stesso modo, le differenze nel CPR e nel CLBR non erano significativamente differenti.

## Percentuali di esito dei cicli classificati secondo il TSC e analizzati in base al numero di ovociti recuperati

	TSC					p
	<0,1x10 <sup>6</sup>	>0,1x10 <sup>6</sup> -1x10 <sup>6</sup>	1x10 <sup>6</sup> -5x10 <sup>6</sup>	5x10 <sup>6</sup> -10x10 <sup>6</sup>	10x10 <sup>6</sup> -39x10 <sup>6</sup>	
N. di cicli	189	144	150	103	179	
Età paziente (anni), media ± DS	31,5±2,9	31,6±2,9	31,7±2,5	31,9±2,9	31,8±2,7	0,75
N. di ovociti recuperati, media ± DS	10,4±5,5	9,3±5,1	10,5±5,6	10,1±4,6	9,6±4,9	0,185
N. di embrioni vitali, media ± DS	3,0±1,6	2,8±1,7	3,4±2,2	3,1±1,8	3,2±1,9	0,066
1-5 ovociti	1,8±1,2	1,6±0,7	1,8±1,1	1,9±0,8	1,9±1,0	0,739
6-10 ovociti	2,8±1,7	2,7±1,4	3,1±1,6	3,0±1,5	3,0±1,6	0,629
>10 ovociti	3,8±2,2	4,0±1,9	4,4±2,5	3,8±2,0	4,0±2,3	0,57
N. di gravidanze cumulative (%)						
1-5 ovociti	2/38 (5,3) <sup>a</sup>	6/36 (16,7) <sup>c</sup>	6/28 (21,4) <sup>c</sup>	5/17 (29,4)	13/37 (35,1)	0,022
6-10 ovociti	17/65 (26,2) <sup>a</sup>	18/60 (30,0) <sup>c</sup>	18/56 (32,1) <sup>c</sup>	17/42 (40,5)	28/74 (37,8)	0,48
>10 ovociti	37/86 (43,0) <sup>a</sup>	24/48 (50,0) <sup>c</sup>	37/66 (56,1) <sup>c</sup>	23/44 (52,3)	37/68 (54,4)	0,522
N. cumulativo di nati vivi (%)						
1-5 ovociti	2/38 (5,3) <sup>b</sup>	5/36 (13,9) <sup>d</sup>	5/28 (17,9) <sup>f</sup>	4/17 (23,5)	13/37 (35,1)	0,017
6-10 ovociti	14/65 (21,5) <sup>b</sup>	14/60 (23,3) <sup>d</sup>	16/56 (28,6) <sup>f</sup>	15/42 (35,7)	24/74 (32,4)	0,41
>10 ovociti	26/86 (30,2) <sup>b</sup>	20/48 (41,7) <sup>d</sup>	31/66 (47,0) <sup>f</sup>	18/44 (40,9)	29/68 (42,6)	0,28

<sup>a</sup>p < 0,0001; <sup>b</sup>p = 0,0085; <sup>c</sup>p = 0,0045; <sup>d</sup>p = 0,012; <sup>e</sup>p = 0,0019; <sup>f</sup>p = 0,0121.

# Discussione 1/2

---



Il **numero totale di spermatozoi (TSC)** è stato descritto come **altamente predittivo della salute maschile in generale e della salute riproduttiva in particolare**. La sua importanza relativa nel determinare l'efficacia dei trattamenti nelle ART rimane incerta e richiede, quindi, approfondite valutazioni, soprattutto alla luce di un'allarmante tendenza verso la loro riduzione osservata negli ultimi decenni.

In questo studio, **gli autori hanno esaminato le implicazioni dei diversi valori del TSC negli esiti clinici dei trattamenti per la riproduzione assistita**.

A tal fine, sono stati analizzati 765 cicli di ICSI eseguiti in donne di età inferiore ai 36 anni (per ridurre al minimo l'impatto dell'età femminile sull'esito del ciclo). In particolare, il valore di TSC è stato sottoposto ad analisi incrociata con la resa ovocitaria (numero di ovociti recuperati).

In generale, l'analisi suggerisce che **gli spermatozoi di migliore qualità** (misurata dai valori TSC più elevati) hanno un **impatto positivo sui tassi cumulativi di successo nei cicli caratterizzati da pochi ovociti recuperati**, mentre non sembrano influenzare l'esito di cicli con un numero normale o elevato di ovociti. Questo evidenzia l'importanza del gamete maschile nei risultati dei trattamenti di riproduzione assistita e suggerisce anche una relazione tra risposta ovarica e capacità degli ovociti di compensare le carenze di derivazione paterna.

# Discussione 2/2

---



Nella percezione degli specialisti della riproduzione, **il ruolo preponderante dell'ovocita ha messo in ombra l'importanza del gamete maschile**. Questa visione è stata rafforzata dal successo della ICSI, in cui virtualmente tutte le problematiche legate ai fattori maschili, anche le più complesse, sono diventate risolvibili bypassando i primi step dell'interazione spermatozoo-ovocita durante la fecondazione.

Ciò nonostante, il contributo degli spermatozoi nella formazione di un embrione vitale e, dopo l'impianto, nell'instaurarsi di una gravidanza, va ben oltre la fecondazione. Infatti, se gli spermatozoi sono influenzati solo marginalmente dalle aneuploidie, essi non sono affatto immuni da altri fattori genetici, epigenetici e cellulari che intervengono nella fase di post-fecondazione e possono compromettere l'integrità genomica e lo sviluppo dell'embrione.

Diversi studi suggeriscono, inoltre, che il danno nel DNA paterno potrebbe non emergere con effetti rilevabili dai parametri pre-impianto o dai tassi di impianto, ma potrebbe determinare un aumento dei tassi di aborto spontaneo.

Ci sono, quindi, ragioni fondate per ampliare la conoscenza sulle implicazioni della qualità del liquido seminale nel processo riproduttivo e, in particolare, sugli esiti dei trattamenti per la fertilità.

# Conclusioni

---



**Lo studio ha evidenziato l'importanza del numero totale di spermatozoi (TSC) nell'efficacia dei trattamenti della fecondazione assistita.**

**Suggerisce, inoltre, che la conseguenza di un basso numero di spermatozoi può essere relativamente criptica sugli esiti clinici in associazione a una risposta ovarica normale o alta, ma può assumere un ruolo decisivo in caso di riduzione della risposta dell'ovaio.**

