

# **Giornale Italiano di MEDICINA SESSUALE e RIPRODUTTIVA** *Italian Journal of Sexual and Reproductive Medicine*

*Organo Ufficiale di Educazione Continua in Medicina della Società Italiana di Andrologia*

*Già Giornale Italiano di Andrologia, fondato nel 1994 da G. Fabrizio Menchini Fabris*

[www.andrologiaitaliana.it](http://www.andrologiaitaliana.it)

**Direttori Scientifici / Editors in Chief**

Edoardo S. Pescatori (Modena), Paolo Turchi (Prato)

**Direttore Responsabile / Managing Editor**

Vincenzo Gentile (Roma)

**Board Editoriale / Editorial Board**

Antonio Aversa (Roma)

Mauro Costa (Genova)

Giorgio Franco (Roma)

Ignacio Moncada Ibarren (Madrid)

Furio Pirozzi Farina (Sassari)

Andrea Salonia (Milano)

**Collaborazione Editoriale / Editorial Assistant**

Paolo Rossi (Pisa)

**Consulenza in Medical Writing / Medical Writing Advisor**

Giuse Cavallotti (Milano)

**Consulenza Statistica / Statistical Advisor**

Elena Ricci (Milano)

**Copyright**

SIAS S.r.l. • via D. Chelini 7 • 00197 Roma

**Ufficio Editoriale / Editorial Office**

Lucia Castelli • Pacini Editore S.p.A.  
Via A. Gherardesca • 56121 Ospedaletto • Pisa  
Tel. 050 3130224 • Fax 050 3130300  
[lcastelli@pacinieditore.it](mailto:lcastelli@pacinieditore.it)

**Editore / Publisher**

Pacini Editore S.p.A.  
Via A. Gherardesca • 56121 Ospedaletto • Pisa  
Tel. 050 313011 • Fax 050 3130300  
[Pacini.Editore@pacinieditore.it](mailto:Pacini.Editore@pacinieditore.it) • [www.pacinimedica.it](http://www.pacinimedica.it)



# Informazioni per gli Autori, comprese le norme per la preparazione dei manoscritti

Il Giornale Italiano di Medicina Sessuale e Riproduttiva – *Italian Journal of Sexual and Reproductive Medicine* – è l'organo ufficiale di formazione della Società Italiana di Andrologia, che pubblica, in lingua italiana o inglese, lavori redatti in forma di editoriali, articoli originali, articoli di aggiornamento, articoli finalizzati alla formazione in tema di *evidence-based medicine*, casi clinici, lettere al Direttore. Ogni contributo in linea con le norme editoriali generali e specifiche per le singole rubriche viene sottoposto a processo di *peer-review* in doppio cieco, ed è valutato alla luce delle più recenti linee guida – *Consensus Conferences* internazionali. L'accettazione per pubblicazione è subordinata all'esecuzione di eventuali modifiche richieste dai *reviewers* ed al parere conclusivo dei Direttori.

Le seguenti indicazioni sono state redatte secondo gli *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals* (Br Med J 1988;296:6/2).

## Invio dei manoscritti

L'invio può essere effettuato per posta elettronica all'indirizzo [icastelli@pacinieditore.it](mailto:icastelli@pacinieditore.it) (modalità preferita) o per posta al seguente indirizzo: **Lucia Castelli, redazione del Giornale Italiano di Medicina Sessuale e Riproduttiva, Pacini Editore S.p.A., Via Gherardesca 1, 56121 Ospedaletto (PI)** (Tel. 050 3130224 - Fax 050 3130300). Nella lettera di accompagnamento dell'articolo, firmata da tutti gli Autori, deve essere specificato che i contributi sono inediti, non sottoposti contemporaneamente ad altra rivista, ed il loro contenuto conforme alla legislazione vigente in materia di etica della ricerca.

In caso di sperimentazioni su umani, gli Autori devono attestare che tali sperimentazioni sono state svolte secondo i principi riportati nella Dichiarazione di Helsinki (1983); gli Autori sono tenuti a dichiarare di aver ottenuto il consenso informato per la sperimentazione e per l'eventuale riproduzione di immagini. Per studi su cavie animali, gli Autori sono invitati a dichiarare che sono state rispettate le relative leggi nazionali e le linee guida istituzionali. Inoltre tutti i lavori devono contenere in allegato la seguente dichiarazione sottoscritta dagli Autori: "I sottoscritti autori del lavoro ... trasferiscono, nel caso della pubblicazione nel Giornale Italiano di Medicina Sessuale e Riproduttiva, tutti i diritti d'Autore all'Editore e garantiscono l'originalità del contenuto e la non contemporanea valutazione del lavoro presso altre Riviste".

## Conflitto di interessi

Gli Autori devono dichiarare se hanno ricevuto finanziamenti o se hanno in atto contratti o altre forme di finanziamento, personali o istituzionali, con Aziende i cui prodotti sono citati nel testo. *Questa dichiarazione verrà trattata dai Direttori come una informazione riservata*. I lavori accettati verranno pubblicati con l'accompagnamento di una dichiarazione ad hoc, allo scopo di rendere nota la fonte e la natura del finanziamento.

## Responsabilità dei testi pubblicati

Gli Autori sono gli unici responsabili delle affermazioni contenute nell'articolo.

## Esame dei manoscritti

La Redazione accoglie solo i testi conformi alle norme editoriali generali e specifiche per le singole rubriche. La loro accettazione è subordinata alla revisione critica di esperti, all'esecuzione di eventuali modifiche richieste ed al parere conclusivo dei Direttori scientifici. Gli Autori verranno informati dell'eventuale accettazione o meno dei manoscritti entro 60 giorni, salvo eventuali imprevedibili ritardi. Agli Autori è riservata la correzione ed il rinvio (entro e non oltre 72 ore dal ricevimento) delle sole prime bozze del lavoro. Le eventuali modifiche e correzioni devono essere ridotte al minimo e apportate esclusivamente sulle bozze di stampa. Un

modulo per la richiesta ed il pagamento degli estratti verrà inviato unitamente alle bozze a cura dell'Editore.

## Preparazione dei manoscritti

Il testo deve essere scritto preferibilmente con il programma Microsoft Word versione 6.0 o successive oppure salvato in formato .rtf (Rich Text Format) con interlinea 2, margine di 2,5 cm, 25 righe per pagina, carattere Times, corpo 12. Non utilizzare in nessun caso programmi di impaginazione grafica quali Publisher, Aldus Pagemaker o Quark Xpress. Non formattare il testo in alcun modo (evitare stili, bordi, ombreggiature ...).

Le immagini devono essere salvate in uno dei seguenti formati: JPEG-GFIF compliant (.jpg); Power Point (.ppt); Tagged Image File (.tif). I supporti devono essere etichettati con il nome del primo autore, il titolo del lavoro, il nome e la versione del programma utilizzato.

Nel caso di invio per posta, gli articoli in versione cartacea devono essere accompagnati dal relativo dischetto (3 1/2" in formato MS-DOS, Windows o Macintosh) o CD su cui è registrata l'ultima versione corretta del testo, corrispondente alla copia dattiloscritta. I dischetti devono riportare sull'apposita etichetta il nome del primo Autore, il titolo abbreviato dell'articolo, il tipo di sistema operativo (Dos o Macintosh), il programma di scrittura e la versione, il nome del/i file/s del/i documento/i. Ogni file deve obbligatoriamente essere accompagnato dalla relativa copia cartacea.

## Norme generali per gli Autori

Il testo deve essere in lingua italiana o inglese. Qualora in italiano, gli Autori dovranno comunque fornire traduzione in Inglese di: titolo del lavoro, parole chiave, riassunto, didascalie delle tabelle e delle figure, delle domande di valutazione e delle relative risposte. Nel testo dell'elaborato non deve essere compreso il nome di nessuno degli Autori, né dell'Istituto di appartenenza, per permettere un processo di *peer revision* con modalità che permettono una valutazione da parte dei revisori senza conoscere l'identità degli Autori (revisione in doppio cieco).

Nella *prima pagina* devono comparire: il titolo, in italiano ed inglese; il nome per esteso e il cognome degli Autori e l'Istituto o ente di appartenenza; le parole chiave, in italiano ed inglese (una lista di 3-10 parole chiave, conformi alle norme dell'*Index Medicus*) ai fini di un inserimento negli elenchi delle banche dati internazionali; la rubrica cui si intende destinare il lavoro (decisione che è comunque subordinata al giudizio della Direzione); il nome, l'indirizzo, il recapito telefonico e l'e-mail dell'Autore cui sono destinate la corrispondenza e le bozze.

Nella *seconda pagina* comparirà il riassunto (breve, non deve superare le 250 parole, ed adeguato all'estensione del testo) in Italiano ed Inglese (*summary*). Il riassunto, che, non dovrà essere semplicemente descrittivo, bensì indicare con precisione lo scopo dello studio, i principali risultati, riportando, se possibile i dati specifici, ed infine le conclusioni essenziali, secondo il seguente schema: Premessa, Scopo, Metodi, Risultati, Conclusioni. Si richiede di utilizzare solamente le abbreviazioni riconosciute a livello internazionale. Nella sezione Scopo va sintetizzato con chiarezza l'obiettivo (o gli obiettivi) del lavoro, vale a dire l'ipotesi che si è inteso verificare; nei Metodi va riportato il contesto in cui si è svolto lo studio, il numero e il tipo di soggetti analizzati, il disegno dello studio (randomizzato, in doppio cieco ...), il tipo di trattamento e il tipo di analisi statistica impiegata. Nella sezione Risultati vanno riportati i risultati dello studio e dell'analisi statistica. Nella sezione Conclusioni va riportato il significato dei risultati soprattutto in funzione delle implicazioni cliniche.

A seguire il testo che potrà essere scritto in italiano o in inglese e suddiviso nelle seguenti sezioni: Introduzione, Metodi, Risultati e Discussione. Le note esplicative, i ringraziamenti, la bibliografia, le

legende e le tabelle dovranno essere riportate nelle ultime pagine su fogli separati, con i testi dattiloscritti come sopra.

La *bibliografia* va limitata alle voci essenziali identificate nel testo con numeri arabi ed elencate al termine del manoscritto nell'ordine in cui sono state citate. Devono essere riportati i primi sei Autori, eventualmente seguiti da et al. Le riviste devono essere citate secondo le abbreviazioni riportate su *Index Medicus*.

#### Esempi di corretta citazione bibliografica per:

Articoli e riviste:

Bisset WM, Watt JB, Rivers RPA, Milla PJ. *Postprandial motor response of the small intestine to enteral feeds in preterm infants*. Arch Dis Child 1989;64:1356-61.

Libri:

Smith DW. *Recognizable patterns of human malformation*. Third Edition. Philadelphia: WB Saunders Co. 1982.

Capitoli di libri o Atti di Congressi:

Milla PJ. *Electrogastrography in childhood: an Overview*. In: Chen JDZ, McCallum RW, eds. *Electrogastrography Principles and Applications*. New York: Raven Press Ltd 1994, p. 379-96.

- Le *unità di misura*. Tutte le misurazioni dovranno essere espresse in unità SI (*Système International*), riportando eventualmente di seguito, tra parentesi i medesimi dati in unità convenzionali.
- Le *abbreviazioni*. Ad eccezione che per le unità di misura riconosciute, le abbreviazioni sono sconsigliate. La prima comparsa di una abbreviazione deve sempre essere preceduta dal termine completo che la stessa sostituisce.
- I *nomi di farmaci*. Si deve impiegare il nome generico. Se gli autori lo desiderano il nome commerciale può essere indicato in calce.
- I *permessi*. Il materiale desunto da altre fonti dovrà sempre essere accompagnato dal permesso scritto sia dell'Autore che dell'Editore per la riproduzione sulla rivista.
- Il *Copyright*. La rivista è protetta da copyright. Una dichiarazione per il trasferimento alla rivista dei diritti d'autore, verrà apposta tramite timbro, sulle prime bozze di stampa e dovrà essere firmata dall'autore.
- I *ringraziamenti, indicazioni di grants o borse di studio*, vanno citati al termine della bibliografia.
- Le *note*, contraddistinte da asterischi o simboli equivalenti, compariranno nel testo, a piè di pagina.
- I *termini matematici*, formule, abbreviazioni, unità e misure devono conformarsi agli standards riportati in Science 1954;120:1078.
- Le *Tabelle* devono essere pienamente comprensibili e completare il testo, evitando ripetizioni dello stesso. Devono essere contenute nel numero (evitando di presentare lo stesso dato in più forme), dattiloscritte una per pagina e numerate progressivamente con numerazione romana e contraddistinte da una didascalia precisa (in italiano e in inglese) riprodotte con interlinea 2 su fogli separati. Si consiglia di compilare le tabelle con un numero di colonne compreso fra 6 e 12. Nel testo della tabella e nella legenda utilizzare, nell'ordine di seguito riportato, i seguenti simboli: \*, †, ‡, §, ¶, \*\*, ††, ‡‡, ...
- Le *Figure*, per gli invii per posta, vanno riprodotte in foto. I grafici e i disegni possono essere in fotocopia purché di buona qualità. Le figure devono essere numerate e devono riportare sul retro, su un'apposita etichetta, il nome dell'Autore, il titolo dell'articolo, il verso (alto). Ogni figura dovrà essere corredata da didascalia in italiano e inglese. Gli Autori sono invitati ad inviare le illustrazioni su dischetto, secondo le seguenti norme: salvare le immagini in files separati dal testo e dalle tabelle. È possibile utilizzare dischetti da 3 1/2", Iomega Zip o CD. Inviare immagini esclusivamente in formato TIFF o EPS, oppure in formato JPEG. Inserire nel nome del file un'estensione che identifichi il formato del file (esempio: .tif; .eps; .jpeg; .ppt).
- Le *domande*: per il numero di domande da allegare si faccia riferimento alla sezione delle norme specifiche per le singole rubriche.

#### Norme specifiche per le singole rubriche

1. *Editoriali*: sono intesi come brevi considerazioni generali e pratiche su temi d'attualità o di commento ad articoli originali, in lingua ita-

liana o inglese, sollecitati dai Direttori o dai componenti il Comitato di redazione. È omesso il riassunto.

2. *Articoli originali*: comprendono lavori che offrono un contributo nuovo o frutto di una consistente esperienza, anche se non del tutto originale, in un determinato settore. Nell'ottica del carattere educativo della rivista, anche gli articoli originali devono dedicare una parte significativa delle sezioni "Introduzione" e "Discussione" allo stato dell'arte dell'argomento. Devono anche essere allegate 3-5 domande a scelta multipla (ognuna con almeno 3 possibili risposte, e quella corretta evidenziata in grassetto). È prevista la seguente strutturazione: introduzione, materiale e metodi, risultati, discussione e conclusioni. Il testo non dovrebbe superare le 15 pagine dattiloscritte comprese iconografia, bibliografia e riassunto (che deve essere strutturato, max. 250 parole, v. "Norme generali per gli Autori"). Legenda di tabelle e figure a parte.
3. *Articoli di aggiornamento*: possono anche essere commissionate dai Direttori. Di regola non devono superare le 20 pagine dattiloscritte, comprese tabelle, figure e voci bibliografiche. Legenda di tabelle e figure sono a parte. Il riassunto deve essere di max 200 parole. Devono essere allegati 3 gruppi di 3-5 domande a scelta multipla (ognuna con almeno 3 possibili risposte, e quella corretta evidenziata in grassetto): il primo gruppo ad 1/3 del manoscritto, il secondo a metà, ed il terzo alla fine.
4. *Articoli finalizzati alla formazione in tema di Evidence-Based Medicine*: in genere vengono commissionati dai Direttori. Sono da allegare 3 gruppi di 3-5 domande a scelta multipla (ognuna con almeno 3 possibili risposte, e quella corretta evidenziata in grassetto): il primo gruppo ad 1/3 del manoscritto, il secondo a metà, ed il terzo alla fine.
5. *Casi clinici*: il caso clinico dovrebbe essere di interesse generale ed illustrare l'applicazione di recenti Linee Guida internazionali al caso in esame tenendo conto delle indicazioni riportate nella letteratura scientifica per quanto attiene diagnosi, prognosi e terapia. Sono desiderabili casi clinici che descrivono le principali difficoltà che si incontrano nella pratica clinica o che hanno come oggetto problemi ancora irrisolti o inusuali nei processi decisionali che riguardano le patologie più comuni. Il caso clinico dovrebbe avere una lunghezza di circa tre pagine. Devono essere allegate 3-5 domande a scelta multipla (ognuna con almeno 3 possibili risposte, e quella corretta evidenziata in grassetto).
6. *Lettere al Direttore*: possono far riferimento anche ad articoli già pubblicati. In questo caso la lettera verrà preventivamente inviata agli Autori dell'articolo e l'eventuale risposta degli stessi pubblicata in contemporanea. La loro estensione non dovrebbe superare le due pagine dattiloscritte, precedute dal titolo.

#### Promemoria per gli Autori

Lettera di accompagnamento dell'articolo con dichiarazione di originalità e di cessione dei diritti all'editore e, se del caso, che gli Autori sono in possesso del consenso informato dei pazienti alla sperimentazione e/o alla riproduzione delle immagini.

Titolo, parole chiave, riassunto e didascalie in italiano e in inglese.

Invio preferenziale per e-mail all'indirizzo [Pacini.Editore@pacineditore.it](mailto:Pacini.Editore@pacineditore.it)

Gli **estratti** sono addebitati agli Autori a prezzo di costo. Assegni e vaglia vanno inviati a:

**Giornale Italiano di Medicina Sessuale e Riproduttiva**  
**Pacini Editore S.p.A., via Gherardesca, 56121 Ospedaletto (PI).**

#### Abbonamenti

Il Giornale Italiano di Medicina Sessuale e Riproduttiva è trimestrale. I prezzi degli abbonamenti annuali per i non Soci sono i seguenti: Italia 61; estero 71. Questo fascicolo 21.

Le richieste di abbonamento e ogni altra corrispondenza relativa agli abbonamenti vanno indirizzate a:

**Giornale Italiano di Medicina Sessuale e Riproduttiva**  
**Pacini Editore S.p.A., via Gherardesca, 56121 Ospedaletto (PI)**  
**Tel. 050 313011 – Fax 050 3130300**  
**[abbonamenti@pacineditore.it](mailto:abbonamenti@pacineditore.it) • <http://www.pacineditore.it>**

Finito di stampare presso le Industrie Grafiche della Pacini Editore S.p.A. – Novembre 2006

# Informations for authors including editorial standards for the preparation of manuscripts

---

The *Giornale Italiano di Medicina Sessuale e Riproduttiva – Italian Journal of Sexual and Reproductive Medicine* – is the official journal of the Italian Society of Andrology in the field of Medical Education. It publishes both in Italian and English, contributions in the form of editorials, updates, original articles, Evidence-based Medicine articles, case reports, letters to the Editor.

Each contribution undergoes a double-blind peer-reviewing process and is evaluated on the basis of the most recent Guidelines and International Consensus Conferences.

The eventual acceptance of articles for publication is conditional upon the implementation of any changes requested by reviewers, and the final decision of the Editor.

Authors will be informed about acceptance of the manuscript within 60 days; they will be given 72 hours for proof-correction (only a set of proofs will be sent to Authors): corrections should be reduced to the minimum and must be made directly on the received proofs. A form for reprints order and payment will be sent together with the proofs.

## Manuscripts submission

The manuscript to be submitted for publication should be sent by regular mail or E-mail (preferred way) to:

**Lucia Castelli, Editorial Office – Giornale Italiano di Medicina Sessuale e Riproduttiva, Pacini Editore S.p.A., Via Gherardesca 1, 56121 Ospedaletto (PI) (Tel. 050 3130224 - Fax 050 3130300)**

**E-mail: [lcastelli@pacineditore.it](mailto:lcastelli@pacineditore.it)**

A separate covering letter, signed by every Author, must state that the material submitted has not been previously published, and is not under consideration (in whole or in part) elsewhere, and that it is conform with the regulations currently in force regarding research ethics. If an experiment on humans is described, a statement must be included that the work was performed in accordance with the principles of the 1983 Declaration of Helsinki. The Authors are solely responsible for the statements made in their paper, and must state that they have obtained the informed consent of patients for their participation in the experiments and for the reproduction of photographs. For studies performed on laboratory animals, the authors must state that the relevant national laws or institutional guidelines have been adhered to.

All papers should also include a separate covering letter undersigned by all Authors stating that, if and when the manuscript is accepted for publication, the authors hand over the transferable copyrights of the accepted manuscript to the publisher; and that the manuscript or parts thereof will thus not be published elsewhere, in any language, without the consent of the copyright holder. Copyrights include, without spatial or time limitation, the mechanical, electronic and visual reproduction and distribution; electronic storage and retrieval; and all other forms of electronic publication or any other types of publication including all subsidiary rights.

## Conflict of Interests

In the letter accompanying the article, Authors must declare if they got funds, or other forms of personal or institutional financing – or even if they are under contract – from Companies whose products are mentioned in the article. *This declaration will be treated by the Editor as confidential, and will not be sent to the referees.* Accepted works will be published accompanied by a suitable declaration, stating the source and nature of the financing.

The following indications are based on the *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals* (Br Med J 1988;296:6/2).

## Manuscript preparation

The text must be typewritten in either Italian or English. Word 6.0 or following versions are preferred (save files in DOC or .RTF format, 25 lines per page, double line spacing and 2,5 cm margins, font Times 12). Do not use desktop publishing programmes such as Aldus Pagemaker, Quark X-Press or Publisher. Retain from complex formatting.

Picture should be submitted as separate files from text files, on separate diskettes or cartridges. 3 1/2 diskettes, Iomega Zip, and CDs can be submitted. Submit only TIFF, JPEG or PPT files, with a minimum resolution of 300 dpi and 10 x 15 cm format.

Figures in the form of photographs must be provided in 3 original copies, labelled and numbered on the back, with the indication of the Author, of the title of the article and of the top of the picture.

Diskettes/CDs containing texts and/or figures should be labelled with the last name of the first author, an abbreviated title of the manuscript, computer type, word processing programme and version, and file name(s) of the document(s).

A typewritten copy must always be included.

## General instructions for Authors

Text must be written in Italian or English. If the text is in Italian, Authors should provide the English translation of:

- title;
- key words;
- an abstract;
- captions and legends for all tables and figures;
- questions and answers for the education section.

No name of Authors or Institutions should appear in the text in order to have a full double-blind peer-reviewing process.

On the *first page* of the manuscript should appear:

- title (in Italian and English);
- full name of Authors;
- institute or organisation to which each author is affiliated;
- a set of key-words (from 3 to 10, conforming to the *Index Medicus* rules);
- the category under which the authors intend the work to be published (although the final decision here rests with the Editor);
- the *name, mailing address, and telephone and fax numbers* of the author to whom correspondence and the galley proofs should be sent.

The *second page* should contain the abstract (concise, less than 250 words) in Italian and English: the abstract must be subdivided into the following sections: Background, Objective(s), Method(s), Results, Conclusion(s). In the Aim section, the aim (or the aims) of the work must be clearly summarised (i.e., the hypothesis the Authors want to verify); in the Method(s) section, the Authors must report the context of the study, the number and the kind of subjects under analysis, the kind of treatment and of statistical analysis used. In the Results section are reported the results of the study and of the statistical analysis. In the Conclusions section is reported the significance of the results with regard to clinical implications.

Authors are asked to use only abbreviations internationally accepted.

The following pages should contain the text written in Italian or English: the text must be subdivided into the following sections: Introduction, Method(s), Results, Discussion.

At the end of the text should appear the *bibliography*, the legends to the tables and figures.

The bibliography must be limited to the most essential and relevant references, identified in the text by Arabic numbers and listed at the end of the manuscript in the order in which they are cited. The format of the

references in the bibliography section should conform with the examples provided in N Engl J Med 1997;336:309-15. The first six Authors must be indicated, followed by et al. Journals should be cited according to the abbreviations reported on Index Medicus.

#### Examples of the correct format for bibliographic citations:

Journal/articles:

Bisset WM, Watt JB, Rivers RPA, Milla PJ. *Postprandial motor response of the small intestine to enteral feeds in preterm infants*. Arch Dis Child 1989;64:1356-61.

Books:

Smith DW. *Recognizable patterns of human malformation*. Third Edition. Philadelphia: WB Saunders Co. 1982.

Chapters from books or material from conference proceedings:

Milla PJ. *Electrogastrography in childhood: an Overview*. In: Chen JDZ, McCallum RW, eds. *Electrogastrography Principles and Applications*. New York: Raven Press Ltd 1994:379-96.

- All *units of measurement* should be reported in the metric system in the terms of the International System of Units (SI), reporting in parentheses, if necessary, the same data in conventional units.
- *Abbreviations* should be avoided unless they are standard units of measurement. The full term for which an abbreviation stands should precede its first use in the text.
- *Drugs* should be referred to by their chemical name; the commercial name should be used only when absolutely unavoidable (capitalizing the first letter of the product name).
- If a figure or a text has been published, acknowledge the original source and submit written permission from the copyright holder to reproduce the material. *Permissions* are required irrespective of authorship or publisher, except for documents in public domain.
- A statement for *copyright assignment* to the journal will be included in the proofs and must be signed by the Author.
- *Acknowledgements* and the citation of any grants or other forms of financial support should be provided after the bibliography.
- Notes to the text, indicated by asterisks or similar symbols, should appear at the bottom of the relevant page.
- *Mathematical terms* and formulae, abbreviations, and units of measure should conform to the standards set out in *Science* 1954;120:1078.
- *Tables* (in 3 copies) must be limited in number (the same data should not be presented twice, in both the text and tables), typewritten one to a page, and numbered consecutively with Roman numbers. In the text and legend of the tables, Authors must use, in the exact order, the following symbols: \*, †, ‡, §, ¶, \*\*, ††, ‡‡ ...
- *Figures* in the form of photographs must be provided in 3 original copies, labelled and numbered on the back, with the indication of the Author, of the title of the article and of the top of the picture.
- Please check the section devoted to specific instructions for the number of *questions* to provide.

#### Specific instructions for the various categories of papers

1. *Editorials* (written on the invitation of the Editor or a member of the Editorial Board) are brief discussions of the general and practical aspects of topics of current interest. They should be written in Italian or English; no abstract is necessary.
2. *Original articles* represent reports of new and original work, or descriptions of a consolidated body of experience (even if not entirely original) in a given field. Due to the educational mission of the journal, original article should devote part of the Introduction and Discussion sections to the state-of-the-art on the subject. 3 multiple-choice questions should be included (each of them with 3 different answers, the right one in bold). The text must be sub-divided into the following sections: Introduction, Materials and methods, Results, Discussion, and Conclusions. The text must not exceed 15 typewritten

pages, pictures, bibliography and summary included (legend of figures and tables apart). The abstract, must be less than 250 words and must be subdivided into the following sections: *Objective(s), Method(s), Results, Conclusion(s)* (see "General instructions for Authors").

3. *Update articles* may be submitted for consideration by authors, or may be written on the invitation of the Editor. They should not exceed 20 typewritten pages, including the bibliography, tables, and figures (but not including the legends). Abstract must be less than 200 words. 3 groups of 3-5 multiple-choice questions should be included (each of them with 3 different answers, the right one in bold). The first group after 1/3 of the article; the second at the half of the article, the last at the end of the article.
4. *Evidence-based-medicine education articles*: written on the invitation of the Editor or a member of the Editorial Board. 3 groups of 3-5 multiple-choice questions should be included (each of them with 3 different answers, the right one in bold). The first group after 1/3 of the article; the second at the half of the article, the last at the end of the article.
5. *Case reports* will be considered for publication only if they describe very rare cases or are of particular didactic interest. The presentation should include a clear exposition of the case and a discussion of the differential diagnosis. The text must be concise (less than three pages), and furnished with no more than 1 or 2 figures or tables, and with a few essential bibliographic references. 3-5 multiple-choice questions should be included (each of them with 3 different answers, the right one in bold).
7. *Letters to the Editor* may address problems of current interest in the area of andrology, or may comment on articles that have recently appeared in the journal. In the latter case, the letter will be sent to the authors of the article in question and their eventual reply will be published together with the letter. Letters to the editor should be written in Italian, must not exceed 2 typewritten pages, and must be furnished with a title.
8. *Reviews of books*. The journal reserves the right to publish reviews (either unsolicited or written on the invitation of the Editor) of books. The text should be in Italian, and should not exceed 1 to 2 typewritten pages.

#### Memorandum for Authors

The Authors should send a letter accompanying their article containing a declaration to the effect that the work being submitted is original and that copyright is transferred to the publisher; moreover, if necessary, the Authors should state that informed consent on the part of the patients has been obtained for their participation in the experiments and/or for publication of photographs.

Title, key-words, summary, captions in Italian and English.

Preferably send article by e-mail to [pacini.editore@pacinieditore.it](mailto:pacini.editore@pacinieditore.it)

Authors are charged cost price for **off-prints**. Cheques and money orders should be sent to:

**Giornale Italiano di Medicina Sessuale e Riproducttiva**

**Pacini Editore S.p.A., via Gherardesca, 56121 Ospedaletto (PI), Italy.**

#### Subscriptions

The Giornale Italiano di Medicina Sessuale e Riproducttiva is published every three months. Subscriptions rates for non-members are the following: Italy 61; Abroad 71; Single issue 21.

Subscriptions form should be addressed to:

**Giornale Italiano di Medicina Sessuale e Riproducttiva**

**Pacini Editore S.p.A., via Gherardesca, 56121 Ospedaletto (PI), Italy – Tel. +39 050 313011 – Fax +39 050 3130300**

# Indice

## Articoli di aggiornamento

### *Reviews*

Nuove prospettive sulla sindrome di Klinefelter  
*New Perspectives in Klinefelter Syndrome*  
F. Ceccato, D. Zuccarello, R. Selice, C. Foresta **127**

Età paterna ed *outcome* riproduttivo  
*Paternal Age and Reproductive Outcome*  
M. Manno, F. Forzano **140**

Il ruolo dell'eco-color-Doppler peniena dinamica nello studio del paziente con deficit erettile  
*Role of Penile Dynamic Duplex Ultrasound in the Study of Male Erectile Dysfunction*  
L.M. Sarteschi, A. Aversa **149**

## Articolo originale

### *Original article*

Oligozoospermia e background genetico  
*Oligozoospermia and Genetic Background*  
G. Peluso, G. Morrone **159**

## Appunti di statistica

### *Statistics Notes*

L'odds ratio  
*The Odds Ratio*  
E. Ricci, S. Cipriani **166**

## Linee Guida

### *Guidelines*

Linee Guida per la diagnosi genetica della coppia infertile  
*Guidelines for the Genetic Diagnosis of Infertile Couple*  
C. Foresta, A. Ferlin **169**

## Futuri eventi congressuali di interesse andrologico

### *Future Congresses of Sexual and Reproductive Medicine Interest*

a cura di G. Maio **176**

## Sezione di autovalutazione

Risposte ai precedenti questionari, vol. 13, n. 2, giugno 2006 **180**

# Nuove prospettive sulla sindrome di Klinefelter

## *New Perspectives in Klinefelter Syndrome*

F. CECCATO, D. ZUCCARELLO, R. SELICE, C. FORESTA

Università di Padova, Dipartimento di Istologia, Microbiologia e Biotecnologie Mediche, Centro di Crioconservazione dei Gameti Maschili, Padova, Italia

**Parole chiave:** Sindrome di Klinefelter, Infertilità Maschile, Ipogonadismo Ipergonadotropo, Recettore degli Androgeni

**Key words:** *Klinefelter Syndrome, Male Infertility, Hypergonadotropic Hypogonadism, Androgen Receptor*

### Riassunto

La sindrome di Klinefelter costituisce la più frequente aneuploidia cromosomica maschile ed è causata dalla presenza sovrannumeraria di uno o più cromosomi X nel cariotipo maschile. Questa aneuploidia è secondaria ad una non disgiunzione meiotica nei gameti di uno dei genitori. Oltre che al cromosoma in eccedenza, il fenotipo clinico è direttamente correlato anche a un polimorfismo del recettore degli androgeni (esone 1), che causa un'elevata eterogeneità dei principali sintomi clinici, ovvero ipogonadismo, alterazioni endocrinologiche, infertilità, ginecomastia, ridotto sviluppo dei caratteri sessuali secondari maschili. Dal momento che i sintomi clinici sono molto variabili (senza considerare eventuali casi di mosaicismo) la diagnosi risulta particolarmente difficile, e molti casi non vengono rilevati o vengono scoperti in ritardo. In questo lavoro presentiamo la sintomatologia clinica classica del paziente Klinefelter e lo stato dell'arte delle più recenti scoperte di Biologia Molecolare, con particolare risalto alla possibilità di alcuni pazienti di avere figli mediante nuove tecniche di fecondazione assistita.

### Summary

*Klinefelter's Syndrome is the most common male chromosomal aneuploidy, caused by one or more supernumerary X chromosomes in male karyotype. The extra-X chromosome results from a meiotic non-disjunction in parental germ cells. The clinical phenotype is directly correlated with extra-X chromosome and to an androgen receptor polymorphism (in exon 1), causing marked heterogeneity of clinical symptoms, such as hypogonadism, endocrine disorders, infertility, gynecomastia and deficient development of secondary male sexual features. The diagnosis is sometimes very difficult because of this marked variation on phenotypical traits (without considering mosaicisms), and the clinical definition for lot of patients is tardy or missing. This article presents the classical clinical picture of the Klinefelter patient and it includes the state of art of the most recent molecular biology discoveries, with particular prominence to the procreation's chance get by new assisted reproduction's techniques.*

### Storia ed epidemiologia

La sindrome di Klinefelter (KS) fu descritta per la prima volta nel 1942 da Harry F. Klinefelter et al. come una patologia endocrina che si manifesta con un quadro clinico caratterizzato da: testicoli fibrosi di ridotte dimensioni, ginecomastia bilaterale, ipogonadismo ipergonadotropo e un alterato metabolismo degli steroidi sessuali, secondario alla scarsa concentrazione ematica di androgeni<sup>1</sup>. La sindrome fu caratterizzata dal punto di vista patogenetico 17 anni più tardi nel 1959, quando Jacobs e Strong dimostrarono che i maschi affetti da KS non possedevano un normale cariotipo 46,XY ma presentavano almeno un cromosoma X soprannumerario<sup>2</sup>. La sindrome è una delle più comuni forme di ipo-

gonadismo maschile e la sua prevalenza è di 1/660-1.000 maschi nati vivi. Tale intervallo di frequenza è così ampio perché ancora oggi ben 2/3 dei casi non viene diagnosticato. Il 10% dei soggetti viene individuato mediante diagnosi prenatale, mentre un altro 25% viene identificato solo tardivamente in età adulta<sup>3</sup>, mediante segni clinici caratteristici, quali l'infertilità e l'ipogonadismo.

Secondo un recente studio<sup>4</sup>, la KS di per sé aumenta del 40% la mortalità dei pazienti, riducendone la vita media di circa 2,1 anni, principalmente a causa di tutte le patologie associate in varia maniera alla KS, quali il cancro, il diabete mellito, le infezioni e le patologie cardiovascolari in genere. I pazienti con KS presentano un rischio aumentato del 69% di venir ricoverati in ospe-

dale anche prima della diagnosi <sup>3</sup> e quindi non solo dopo la conferma di malattia.

## Patogenesi

Nell'80% dei casi il cariotipo responsabile della KS è 47,XXY. La quota rimanente di pazienti presenta aneuploidie più numerose, come 48,XXXY o 49,XXXXY, caratterizzate da forme cliniche più gravi, mentre una porzione più ristretta di pazienti presenta un mosaicismi cromosomico 46,XY/47,XXY con fenotipo altamente variabile in proporzione alla frazione di cellule che presentano un X soprannumerario. In questi ultimi la diagnosi clinica può essere ancora più difficoltosa, in quanto il mosaicismi può essere confinato ai soli testicoli ed escludere i linfociti, sui quali di routine si effettua la diagnosi citogenetica.

Il cromosoma sessuale soprannumerario deriva da un'errata disgiunzione nei gameti dei genitori durante la spermatogenesi o l'ovogenesi, mentre i mosaicismi sono frutto di errori di origine mitotica avvenuti ai primi stadi di divisione dell'embrione. Alterazioni numeriche dei cromosomi sono spesso frutto di diploidie dell'ovocita, nella maggior parte dei casi dovute ad età materna avanzata, e possono essere causa di KS <sup>5</sup>. D'altro canto, una quota rilevante dei casi di KS correla invece con una disomia dell'X presente negli spermatozoi e secondo altri Autori la quota di corre-

sponsabilità paterna si avvicina a quella materna <sup>6</sup>. Sebbene alcuni Autori considerino irrilevante l'età dei genitori come fattore di rischio per la KS <sup>6</sup>, alcuni recenti studi correlano l'aumento dell'età materna con l'aumentata incidenza della sindrome <sup>7</sup>.

Il meccanismo che durante la gametogenesi causa la presenza di due o più copie del cromosoma X differisce però di gran lunga tra i due genitori (Fig. 1).

Nella *madre* gli errori possono avvenire frequentemente durante la prima divisione meiotica (MI) e in numero minore nella seconda (MII). In una non-disgiunzione materna durante MI, l'ovocita primario diploide  $2n,XX$  si divide in un globulo polare  $n$  e un ovocita secondario  $n,XX$  che, una volta fecondato da uno spermatozoo con corretto corredo aploide, formerà uno zigote 47,XXY. In caso di non-disgiunzione materna durante MII, l'ovocita primario si divide correttamente durante MI in un globulo polare e un ovocita secondario; quest'ultimo in MII va incontro a non disgiunzione, dando origine a un ovocita maturo  $n,XX$  che, dopo la fecondazione, darà origine ad uno zigote 47,XXY.

Al contrario, nel *padre*, l'aneuploidia cromosomica può avere origine solo nella MI, nel passaggio da spermatocita di primo ordine a quello di secondo ordine. In questo stadio vengono prodotti spermatociti secondari ipoploidi  $n$  (senza cromosomi sessuali) e spermatociti aneuploidi  $n,XY$  che quando fecondano un ovocita normale creano uno zigote  $2n,XXY$ .

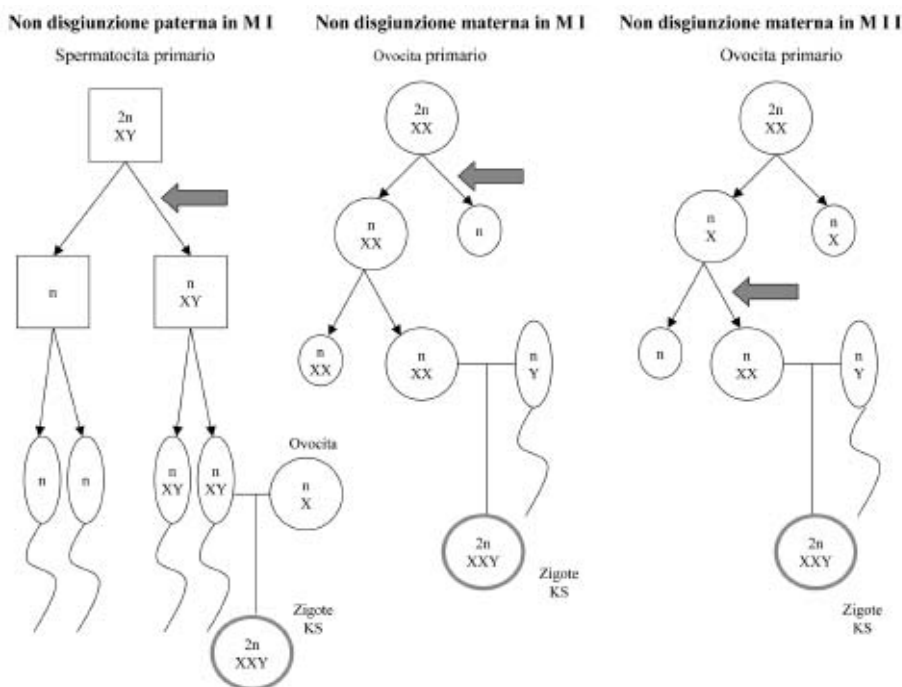


Fig. 1. Non-disgiunzione meiotica durante la gametogenesi negli spermatozoi (a sinistra) o negli ovociti (a destra): la freccia indica lo stadio in cui avviene la non-disgiunzione. MI = prima divisione meiotica; MII = seconda divisione meiotica. *Meiotic non-disjunction in germ-cells development in spermatozoa (on the left) or oocytes (on the right): arrow shows the non-disjunction. MI = first meiotic division; MII = second meiotic division.*



## Comportamento del cromosoma X soprannumerario

Nelle donne sono normalmente presenti due cromosomi X (46,XX), mentre nel maschio sono presenti un solo cromosoma X e un Y (46,XY). Quest'ultima condizione, definita emizigosi, comporta che il maschio possieda una sola copia dei geni veicolati dal cromosoma X. Per compensare il dosaggio genico, nelle donne uno dei due cromosomi X viene inattivato (silenziato) quando l'embrione femminile è ancora alle prime divisioni mitotiche, in uno stadio inferiore alle 100 cellule. Questo fenomeno si chiama Lyonizzazione in onore di Mary Lyon, che per prima descrisse questo pattern biologico nel 1961<sup>8</sup>. Il silenziamento di uno dei due cromosomi X avviene tramite metilazione di alcune sequenze di DNA con conseguente compattamento della cromatina, che di fatto diventa inaccessibile alla RNA-polimerasi, impedendo così la trascrizione dei geni. La scelta del cromosoma da inattivare è completamente casuale e possiede una certa "memoria", tanto che le cellule figlie possiedono tutte il medesimo pattern di "X inattivato" della cellula da cui derivano. Il gene deputato al controllo dell'inattivazione è XIST (*X inactive specific transcript*), che agisce sul centro di attivazione dell'X detto Xic (*X inactivation center*), un locus cis-attivo del cromosoma X che regola e gestisce l'eventuale inattivazione. Il gene XIST si trova nel braccio lungo dell'X e trascrive per un RNA che viene espresso solo dal cromosoma inattivato. Dato che tale RNA si trova nel nucleo e non codifica per alcuna proteina, sembra proprio che sia l'RNA stesso a regolare l'inattivazione epigenetica dell'X. XIST non viene normalmente espresso nei maschi con cariotipo normale (46,XY), in quanto la presenza di un unico cromosoma X impedisce la sua trascrizione. Ognuno dei due cromosomi X del maschio KS possiede una probabilità a priori di rimanere attivo del 50%: all'interno di Xic c'è una regione definita Xce (*X controlling element*), destinata alla scelta di quale cromosoma X inattivare. In caso di eterozigosi di Xce (che si configura nel maschio KS) uno dei due è più attivo e garantisce la trascrizione del cromosoma che lo veicola; viceversa, in caso di omozigosi per Xce non vi sono ipermetilazioni preferenziali e ognuno dei due cromosomi X ha la stessa probabilità di esser silenziato<sup>9</sup>.

Un ulteriore elemento di complessità è costituito dal fatto che non tutti i geni presenti sull'X ipermetilato vengono silenziati. Secondo studi recenti, il 15% dei geni X-linked sfugge all'inattivazione e quindi si

presenta in duplice copia biallelica nei pazienti con KS<sup>10,11</sup>. Curiosamente, i geni che sfuggono all'inattivazione sono principalmente localizzati in un *cluster* nella parte distale del braccio corto del cromosoma X (Xp), mentre altri studi indicano i geni localizzati nel braccio lungo (Xq) come principali responsabili della patogenesi della KS<sup>10</sup>. Qualunque sia la loro localizzazione, il fenotipo causato dalla sindrome deriva probabilmente proprio dalla presenza di un dosaggio genetico non compensato, perché doppio rispetto al normale.

Recenti studi sui topi hanno dimostrato che esistono almeno una decina di geni X-linked che vengono selettivamente espressi durante la spermatogenesi e sembrano implicati nello sviluppo dei gameti nella fase mitotica iniziale della spermatogenesi. Di questi, sei geni sono sicuramente espressi anche nel testicolo umano e, sebbene la loro funzione sia ancora sconosciuta, sembrano essere coinvolti nella mitosi dello spermatogonio. Un'alterazione di tali geni potrebbe essere implicata nella ridotta fertilità dei pazienti KS, poiché nella maggior parte di questi soggetti gli spermatogoni si bloccano proprio dopo la prima mitosi, incapaci di avanzare allo stadio di meiosi<sup>12</sup>.

## KS e polimorfismo del Recettore degli Androgeni

Il Recettore degli Androgeni (RA) è una proteina appartenente alla famiglia dei recettori nucleari, dotata di un dominio che riconosce selettivamente gli androgeni. RA è composto da 3 domini: un dominio TAD situato all'estremità N-terminale e dotato di attività trans-attivante, un dominio DBD che riconosce specifiche sequenze di DNA e un dominio LBD con residui specifici per il legame con gli androgeni. Quando arriva il segnale umorale l'ormone steroideo, altamente lipofilo, attraversa la membrana cellulare, si lega a RA costituendo il complesso dimerico ormone-recettore attivo che, tramite una modifica conformazionale, trasloca nel nucleo dove, mediante il dominio DBD, si lega a determinate sequenze di DNA, consentendone la trascrizione. Il gene RA mappa nel locus Xq11-12, la cui sequenza nucleotidica non è omogenea nella popolazione perché possiede un tratto altamente polimorfico a livello del primo esone, in cui è presente una sequenza ricca di triplette CAG (Fig. 2) che vengono tradotte in un tratto di poli-glutamine nel dominio TAD.

Recentemente si è scoperto che questo polimorfismo è direttamente responsabile dell'affinità del recettore

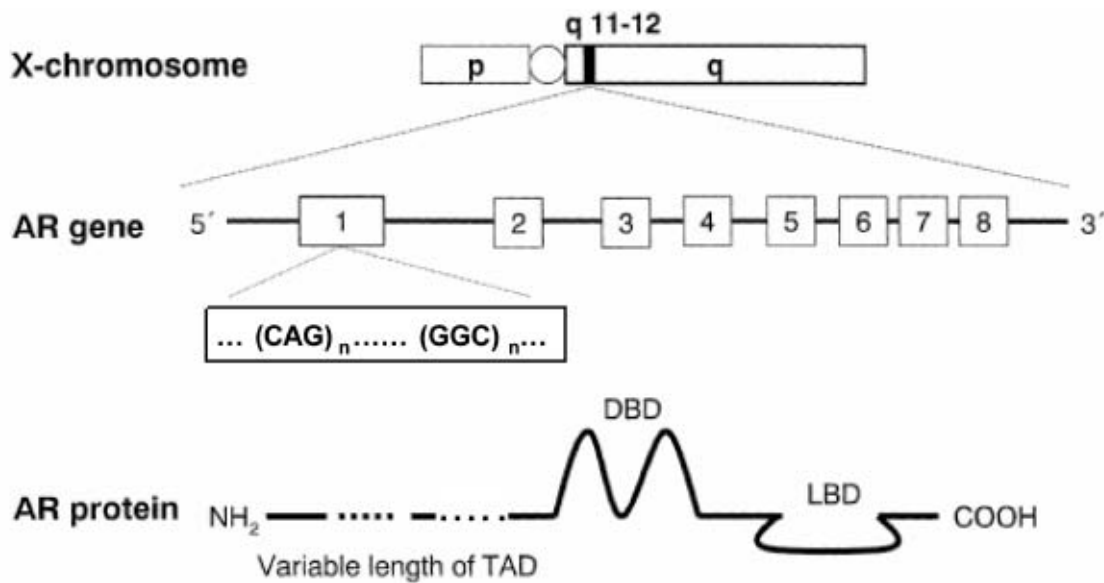


Fig. 2. Struttura del recettore umano degli androgeni: TAD = dominio transattivatore, DBD = dominio che lega DNA, LBD = dominio per l'androgeno. *Human androgen receptor structure: TAD = transactivation domain, DBD = DNA binding domain, LBD = ligand binding domain.*

per il proprio ligando: proteine con una espansione CAG corta sono molto affini e sensibili all'androgeno perché costituiscono un complesso ormone-recettore stabile con elevata capacità di transattivare le sequenze *target* di DNA<sup>13</sup>. Viceversa, proteine con una lunga espansione CAG sono poco affini all'ormone e, se la ripetizione supera le 40 triplette, insorge inoltre una grave patologia, detta atrofia spino-bulbare di Kennedy. Tale patologia neuromuscolare è associata ad un marcato ipogonadismo primario con un grado variabile di ginecomastia.

Potenzialmente, i soggetti con KS possiedono due loci per l'RA (uno in ogni cromosoma), entrambi teoricamente inattivabili con la medesima probabilità. Da recenti studi<sup>14</sup> risulta chiaro però che la scelta di inattivare uno dei due cromosomi non è casuale, ma viene preferenzialmente inattivato il cromosoma X che veicola l'RA con l'espansione polimorfica CAG più corta (per cui viene silenziato l'RA più attivo). I soggetti con KS quindi non solo possiedono una scarsa produzione di androgeni (secondaria all'ipogonadismo) ma anche un recettore attivo meno affine agli androgeni perché dotato di una più lunga sequenza di poli-glutamina.

La lunghezza dell'espansione CAG è finora l'unico parametro geneticamente individuabile che correla direttamente con l'ampio grado di variabilità fenotipica della KS, con particolare riferimento all'ipogo-

nadismo, all'infertilità, alla ginecomastia e alla densità ossea.

## Segni clinici

I principali segni clinici che si riscontrano nella KS sono: ipogonadismo, infertilità, alterazione dell'assetto ormonale, tratti dismorfici con anomalie dei caratteri sessuali secondari, problemi di natura psico-comportamentale, patologie cardiovascolari ed osteoporosi. L'ipogonadismo si definisce come un quadro clinico caratterizzato da una inadeguata sintesi di testosterone da parte dei testicoli. Nella KS la ridotta secrezione non è secondaria ad una patologia dell'adenoipofisi o dell'ipotalamo (i cui ormoni sono necessari per la sintesi gonadica degli steroidi sessuali) ma ad una primitiva alterazione degenerativa del parenchima testicolare. La progressiva degenerazione fibrosa dei tubuli seminiferi inizia già nel feto, continua nell'infanzia e subisce una rapida progressione nella pubertà<sup>10</sup>, momento in cui inizia lentamente a farsi sentire l'insufficienza di androgeni. I testicoli dei pazienti con KS sono di ridotte dimensioni e di notevole consistenza perché atrofici e fibrosi. Il volume medio delle gonadi, misurato con ecografia testicolare, si attesta sui 5,5 ml<sup>6</sup>, mentre nei maschi sani oscilla in un range di 12-30 ml.

L'ipogonadismo causa infertilità nel maschio adulto, ovvero una delle ragioni principali per cui il soggetto KS si rivolge ad un centro specialistico in cui vengono generalmente eseguiti degli accertamenti in seguito ai quali, nella maggior parte delle volte, viene posta per la prima volta la diagnosi di KS (vedi paragrafo dedicato).

Dal punto di vista endocrinologico le concentrazioni sieriche di molti ormoni sono alterate: non solo il testosterone ( $< 200$  ng/dl or  $< 7$  nmol/l) ma anche l'inibina- $\beta$ , un ormone polipeptidico, è carente a causa della sua ridotta produzione da parte delle cellule di Sertoli. I livelli di inibina- $\beta$  sono comparabili nel periodo prepubere sia nei soggetti KS che nei controlli; dopo i 13 anni però nella popolazione adulta sana l'ormone si riscontra in una concentrazione sierica di 150-200 pg/ml, mentre nei pazienti con KS è generalmente inferiore a 50 pg/ml<sup>15</sup>. Mancando il *feedback* inibitorio fisiologico di questi due ormoni a livello ipofisario vi è una eccessiva secrezione di LH e FSH, che caratterizzano il quadro generale dell'ipogonadismo ipergonadotropo. L'incremento dell'ormone follicolo-stimolante (FSH) si attesta nei pazienti con KS ad una concentrazione media di 33,7 U/l, contro una media nella popolazione normale maschile inferiore alle 7 U/l; l'ormone luteinizzante (LH) risulta aumentato in misura più ridotta da 2-10 U/l a 18,7 U/l. Viceversa, i livelli di estrogeni, soprattutto il 17- $\beta$ -estradiolo, sono all'incirca doppi rispetto ai controlli<sup>6,14</sup>. A causa dell'eliminazione del *feedback* inibitorio di controllo fornito fisiologicamente dagli androgeni il fegato produce una maggior quota di SHBG (*sex hormone binding globulin*); nei soggetti con KS la proteina si trova a una concentrazione superiore al range normale (11-71 nmol/l)<sup>6</sup>. Dopo i 25 anni, circa il 70% dei pazienti manifesta un generale calo della libido e della potenza sessuale come risultato del deficit generalizzato di androgeni<sup>6</sup>.

Dal punto di vista fenotipico il 40% dei soggetti con KS manifesta la presenza di taurodontismo<sup>16</sup>, un'anomalia caratterizzata dall'ingrandimento dei denti a causa dell'estensione del canale pulpare. Per quanto riguarda le misure antropometriche, i valori si attestano nella normale variabilità della popolazione generale, anche se circa il 20% dei soggetti presenta di norma un aspetto enucoide, con statura elevata, arti superiori lunghi (la cui apertura supera di almeno due cm l'altezza dell'individuo) e scarsa presenza di barba in viso. La statura è conseguenza di una maggiore lunghezza delle gambe, in risposta ad una ritardata saldatura delle epifisi (fisiologicamente indotta dagli androgeni). La presenza di que-

sta caratteristica prima della pubertà esclude che essa sia dovuta alla deficienza di androgeni, ma piuttosto suggerisce il coinvolgimento di altri fattori al momento non noti; nell'adulto, invece l'insufficiente attività del testosterone viene considerata come causativa. Anche, il ridotto diametro biacromiale sembra essere invece una conseguenza del ridotto testosterone in circolo. L'altezza media ( $180 \pm 6,7$  cm) dei soggetti con ridotta espansione CAG in RA risulta significativamente minore rispetto ai soggetti con maggior numero di triplette ( $189,4 \pm 7,3$  cm)<sup>14</sup>. I caratteri sessuali secondari sono direttamente influenzati dall'ipogonadismo, infatti la presenza di una barba normale si riscontra solo nel 20% dei casi e la forza muscolare denota un notevole calo come conseguenza della ridotta androgenizzazione. Spesso si manifesta anche una ginecomastia bilaterale che probabilmente riflette l'eccesso di estrogeni circolanti: l'ipertrofia della ghiandola mammaria è più frequente in soggetti con l'RA dotato di espansione CAG più lunga<sup>14</sup>.

Meno precisamente quantificabili sono i tratti dismorfici o i problemi di natura psico-comportamentale. I soggetti prepuberi con KS possono manifestare difficoltà di concentrazione, di comunicazione, disturbi della memoria uditiva e visiva a breve termine, scarsa socializzazione, lentezza nell'esecuzione dei movimenti, nonché problemi di natura comportamentale che potrebbero indirizzare l'andrologo ad un possibile sospetto diagnostico<sup>17</sup>. A livello intellettuale, i soggetti non presentano ritardo mentale, ma piuttosto dimostrano un certo ritardo cognitivo dal punto di vista linguistico e organizzativo. Entrambi i parametri sono comunque difficilmente diagnosticabili perché scarsamente quantificabili. In generale, i pazienti con KS presentano in media un quoziente intellettuale (QI) di circa 10 punti inferiore rispetto alla media della popolazione generale<sup>18</sup>, ma se si tende a considerare che le limitazioni delle funzioni intellettive dei pazienti con KS spesso non sono dovute ad un deficit del loro QI, quanto piuttosto all'incapacità di assimilare ed elaborare le nozioni in maniera immediata. Questo determina in genere bassi livelli nella valutazione scolastica, difficoltà nel linguaggio o disordini del discorso di tipo fonetico e/o espressivo, che rappresentano una stigmata caratteristica di questa popolazione di individui. Anatomicamente si può notare un'alterata lateralizzazione degli emisferi cerebrali. I pazienti KS con fenotipo clinico più evidente a volte denotano una scarsa scolarità e una ridotta capacità di mantenere relazioni durature, mentre i soggetti con fenotipo più lieve possiedono

un livello di educazione superiore e hanno una normale vita di relazione <sup>14</sup>.

Dal punto di vista cardiocircolatorio, molte patologie hanno un'incidenza maggiore tra i soggetti con KS, facendo emergere un probabile ruolo patogenetico della sindrome. Ad esempio, alcune condizioni associate a scarsi livelli ematici di testosterone, quali il diabete o l'obesità addominale, sono fattori di rischio per l'aterosclerosi. È frequente il riscontro di vene varicose, con associato un maggiore rischio di trombosi venosa profonda in almeno un terzo dei casi. Il maggior rischio di patologie trombo-emboliche in soggetti ipogonadici sembra esser dovuto alla ridotta fibrinolisi secondaria al calo degli androgeni, che comporta anche un maggior rischio di sviluppare aterosclerosi. Nei pazienti KS si riscontra anche di frequente una lieve anemia <sup>3</sup>. Secondo alcune recenti teorie, il testosterone stesso agisce come vasodilatatore: se iniettato direttamente nelle coronarie induce aumento del lume vasale in soggetti con coronaropatia conclamata <sup>19</sup>. In base a questo, il ridotto livello di testosterone circolante presente nei soggetti KS potrebbe spiegare l'aumentata incidenza di malattie cardiocircolatorie.

La sindrome inoltre, comporta una generale intolleranza al glucosio, in alcuni casi probabilmente secondaria ad una alterata regolazione del metabolismo degli acidi grassi che comporta, a sua volta, obesità addominale <sup>3</sup>: la dislipidemia incrementa quindi il rischio di sviluppare forme di diabete mellito di tipo 1 e tipo 2.

Infine gli ormoni sessuali giocano un ruolo fondamentale nello sviluppo del sistema muscolare, osseo e articolare: sono già state dimostrate l'attività di anabolizzante proteico degli androgeni e il ruolo protettivo degli estrogeni nelle donne in età fertile nei confronti dell'osteoporosi. La densità minerale ossea BMD (*bone mineral density*) aumenta molto durante la pubertà, per poi assestarsi in valori simili all'adulto circa due anni dopo il completamento della pubertà stessa <sup>20</sup>. Il deficit di androgeni comporta direttamente un calo del BMD, per cui i soggetti con KS presentano non solo un maggior rischio di essere affetti da osteoporosi, ma anche una precoce insorgenza della patologia: tra i soggetti KS l'incidenza dell'osteopenia supera il 40%. A livello istologico, nell'ipogonadismo (e quindi nella KS) si nota perdita di tessuto osseo, con ridotta attività osteoblastica di deposizione della matrice sia organica che minerale, cui si aggiunge una perdita di componente compatta molto maggiore rispetto alla componente trabecolare. L'escrezione urinaria di idrossiprolina nei pazienti con KS varia con l'età, con un massimo durante l'adolescenza fino a minimi cambiamenti nell'adulto <sup>20</sup>.

## KS e cancro

La probabilità dei pazienti KS di sviluppare alcuni tipi di neoplasie è peculiare, in quanto il meccanismo patogenetico della sindrome appare direttamente correlato ad alcune patologie, mentre sembra addirittura un fattore di protezione per altre. In generale, la mortalità per tutti i tipi di patologia neoplastica risulta aumentata nei pazienti con KS, con un indice di SMR (*standardized mortality ratio*) pari a 1,2, mentre nei pazienti con mosaico 46,XY/47,XXY l'indice di SMR è 2,5 <sup>18</sup>.

Utilizzando come parametro statistico l'eccesso di rischio assoluto AER (*Absolute Excess Risk* per 100.000 soggetti-anno) risulta particolarmente aumentata nella KS la mortalità per cancro ai polmoni (AER + 23,7), linfomi non-Hodgkin (AER + 12,1) e tumore alla mammella maschile (AER + 9,3) <sup>18</sup>. In quest'ultimo, la mortalità risulta 20-40 volte superiore rispetto al campione di controllo e l'età media della diagnosi si avvicina ai 58 anni (significativamente diminuita rispetto ai controlli). La trasformazione neoplastica sembra essere secondaria alla ginecomastia estrogeno-dipendente <sup>21</sup>. Per quanto riguarda i linfomi, alcuni Autori suggeriscono come causa eziologica la generale immunodeficienza che può essere indotta dalla scarsa presenza di androgeni in circolo <sup>18</sup>.

Tale ipoandrogenizzazione è protettiva nei confronti dell'insorgenza di cancro alla prostata nei pazienti KS, i quali presentano un rischio di trasformazione neoplastica nettamente inferiore rispetto alla popolazione di controllo. È noto inoltre che vi è una correlazione inversa tra numero di CAG e rischio di cancro alla prostata, essendo questa una neoplasia ormono-dipendente <sup>14</sup>. Poiché, come precedentemente menzionato, nei soggetti KS vi è una preferenziale inattivazione dell'allele CAG più corto, ciò comporta un'incidenza significativamente ridotta di cancro alla prostata con AER -10,3 <sup>18</sup>. Secondo recenti studi esiste un'ulteriore spiegazione al fatto che un elevato livello di testosterone circolante predispone all'ipertrofia prostatica.

## KS, fertilità e riproduzione

La KS è una delle più frequenti cause genetiche di infertilità maschile. Infatti, in circa il 10% dei maschi azoospermici, che si sottopongono ad accertamenti per valutare la propria fertilità, viene riscontrato un cariotipo 47,XXY.

La maggior parte dei pazienti KS presenta un liquido seminale con assenza di spermatozoi nell'eiaculato <sup>22</sup>. La biopsia testicolare rivela una marcata fibrosi dei tubuli seminiferi, con completa assenza della linea spermatogenetica e iperplasia delle cellule di Leydig.

Anche se in generale si tende a considerare il paziente con KS come incapace a riprodursi, sono descritte in letteratura gravidanze ottenute con concepimento naturale con partner KS relativamente giovani e con oligozoospermia grave <sup>7</sup>. In rari casi, infatti, rimangono attivi alcuni foci residui di spermatogenesi incompleta, in quanto bloccata nelle fasi precoci della prima divisione meiotica <sup>22</sup>, che possono andare incontro a meiosi. Ciò è ancora più frequente nei casi di mosaicismi 46,XX/47,XXY. La conferma dell'esistenza di una spermatogenesi residua è data dal fatto che il numero riscontrato di eventuali spermatozoi iperaploidi 24,XX o 24,XY è significativamente maggiore rispetto a quelli attesi e prodotti dalla frazione di spermatozoi normali 46,XY (Tab. I). I maschi con KS producono un elevato numero di spermatozoi aneuploidi in risposta all'alterato cariotipo degli spermatozoi o a non-disgiunzioni meiotiche indotte dall'ambiente testicolare, particolarmente ostile e compromesso nella sindrome. Nei gameti di un paziente affetto da KS risulta particolarmente aumentata la frequenza del numero di disomie XX ( $4,6 \pm 2,6\%$ ) e XY ( $10,0 \pm 5,9\%$ ) mentre le disomie YY si inseriscono in un normale

range di variabilità <sup>22</sup>. A dimostrazione del fatto che anche gli spermatozoi 47,XXY possono andare incontro a meiosi, la maggior frequenza di spermatozoi iperaploidi 24,XX o 24,XY non è associata a una maggior presenza di gameti ipoaploidi 22,0 (come ci si aspetterebbe in caso di non-disgiunzione a carico di uno spermatozono 46,XY).

Nei casi di residua spermatogenesi, alcune tecniche di fecondazione assistita possono dare la possibilità ai pazienti KS di avere figli propri. Se alcuni gameti immaturi sono presenti nei testicoli, precisamente nei tubuli seminiferi, essi possono essere estratti tramite biopsie testicolari multiple mediante TESE (*testicular sperm extraction*). La probabilità di trovare spermatozoi con questo metodo in pazienti con KS si attesta tra il 25 e il 40%. Il riscontro di gameti residui è più frequente nei soggetti giovani, perché il numero di spermatozoi diminuisce rapidamente con l'età. Risulta perciò fondamentale che la diagnosi di KS venga fatta il prima possibile, per garantire la crioconservazione del seme prima che si sia manifestata l'infertilità completa <sup>7</sup>, dal momento che anche l'eventuale somministrazione terapeutica di androgeni influenza negativamente la fertilità <sup>6</sup>.

Essendo tipo TESE, la biopsia testicolare è una tecnica diagnostica particolarmente invasiva, è sempre consigliato valutare la presenza di alcuni indicatori che suggeriscono una residua spermatogenesi. I parametri che possono correlare positivamente con una

**Tab. I.** Frequenza delle aneuploidie dei cromosomi sessuali degli spermatozoi nel liquido seminale di dodici uomini con sindrome di Klinefelter (da Ferlin et al. <sup>22</sup>, mod.). *Sex chromosome aneuploidies of seminal spermatozoa in twelve men with Klinefelter Syndrome (modified from Ferlin et al. <sup>22</sup>).*

	Gameti normali		XX	Disomie YY	XY	Altri
	X	Y				
	43,4	48,8	1,2	0,1	1,4	5,1
	51,9	24,6	6,9	0,2	14,6	1,8
	56,0	28,6	3,3	0,1	10,0	2,0
	49,6	48,3	0,4	0,4	0,5	0,8
	49,9	44,9	0,6	0,4	1,0	3,2
	49,6	28,5	4,4	0	16,4	1,1
	49,8	27,5	7,5	1,8	12,8	0,6
	50,8	28,4	5,8	0	14,5	0,5
	51,3	24,0	6,1	0	14,2	4,4
	52,4	27,0	6,4	0,1	13,5	0,6
	53,2	26,4	6,4	0,3	13,1	0,6
	53,9	26,2	6,5	0,4	8,4	4,6
Totale (n: 12)	$51,0 \pm 3,1^*$	$31,9 \pm 9,4^*$	$4,6 \pm 2,6^*$	$0,3 \pm 0,5$	$10,0 \pm 5,9^*$	$2,1 \pm 1,7^*$
Controlli (n: 103)	$49,4 \pm 1,6$	$49,0 \pm 1,7$	$0,1 \pm 0,5$	$0,1 \pm 0,9$	$0,2 \pm 0,5$	$0,1 \pm 0,4$

\* =  $p < 0,01$

residua fertilità sono: volume testicolare superiore ai 15 ml, valori di FSH compresi tra 31,2 e 40 U/l, presenza di inibina- $\beta$  inferiore a 50 pg/ml e assenza di ginecomastia<sup>7,15</sup>, anche se nei pazienti KS l'unico fattore predittivo confermato per il successo di questa tecnica rimane il risultato dell'esame istologico. Il 69% dei pazienti con KS, ai quali vengono precedentemente somministrati inibitori dell'aromatasi e hCG (gonodotropina corionica umana) per stimolare la produzione endogena testicolare di testosterone, possiede spermatozoi gonadici necessari ad una fecondazione assistita con metodo ICSI (*Intra Cytoplasmatic Sperm Injection*). Tra questi circa il 30% ottiene una gravidanza a termine e un nascituro con cariotipo normale<sup>23</sup>.

I figli nati da pazienti KS con l'ausilio della fecondazione assistita non presentano una più alta incidenza di anomalie numeriche dei cromosomi sessuali (anche se comunque il rischio di questa eventualità è aumentato a causa della tecnica utilizzata), ma si riscontra piuttosto un'aumentata incidenza, statisticamente significativa, di produrre gameti con disomia

21 nel padre<sup>6</sup>. Il fatto che la prole non presenti una frequenza di aneuploidie dei cromosomi sessuali statisticamente significativa può essere spiegata dal fatto che, per esempio, gli spermatozoi alterati 24,XY potrebbero non essere in grado di fecondare l'ovocita, oppure lo zigote appena formato con un cariotipo 47,XXY potrebbe non essere in grado di procedere oltre lo stadio embrionale<sup>22</sup>. Un'adeguata diagnosi preimpianto (ove consentita) o la diagnostica prenatale mediante amniocentesi sono suggerite, così come la consulenza genetica alla coppia che si accinge a concepire.

## Diagnosi

Il sospetto diagnostico di KS dovrebbe essere formulato non appena si presentano almeno tre segni clinici caratteristici della sindrome quali ginecomastia, atrofia testicolare, livelli di testosterone ematico inferiori a 200 ng/dl o 7 nmol/l (Fig. 3) e ridotta fertilità. La difficoltà diagnostica aumenta se si

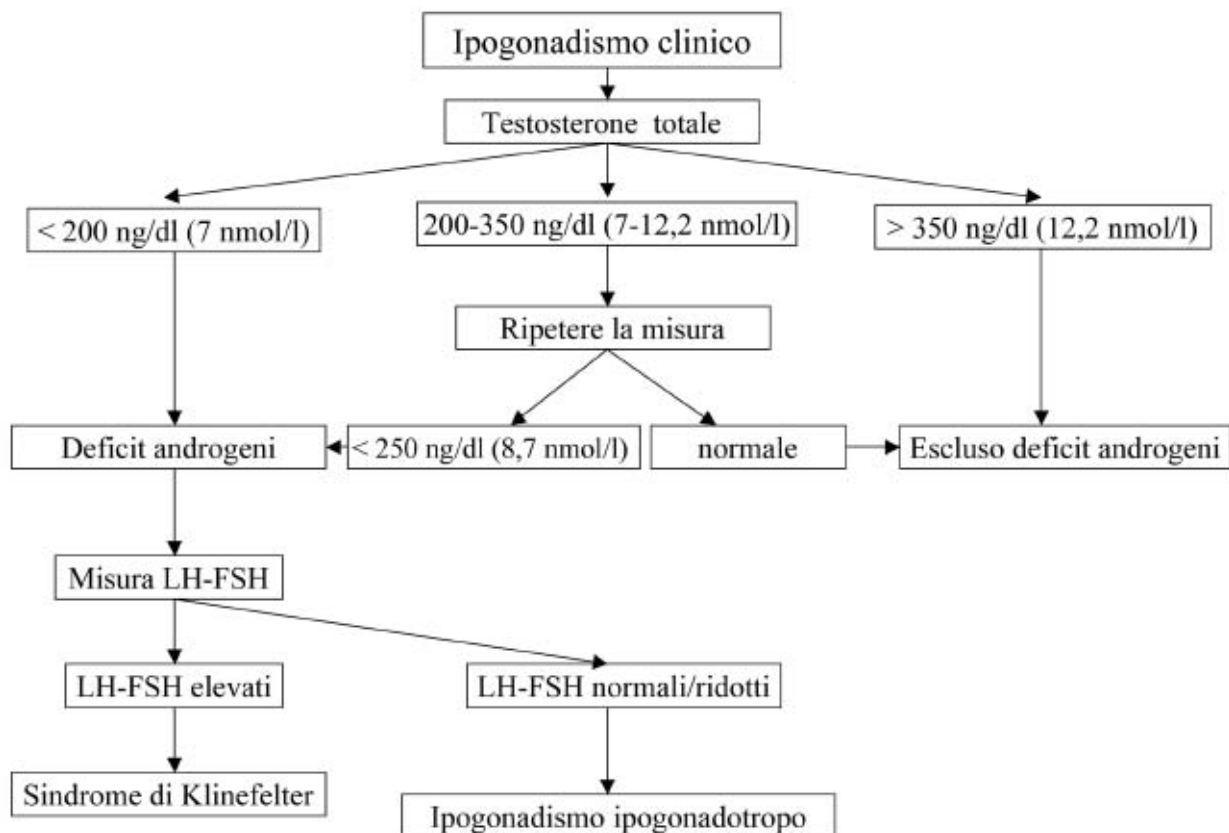


Fig. 3. Valutazione dell'ipogonadismo e diagnosi della sindrome di Klinefelter. FSH = ormone follicolo-stimolante, LH = ormone luteinizzante. *Evaluation of hypogonadism and diagnosis of Klinefelter Syndrome. FSH = follicle-stimulating hormone, LH = luteinizing hormone.*

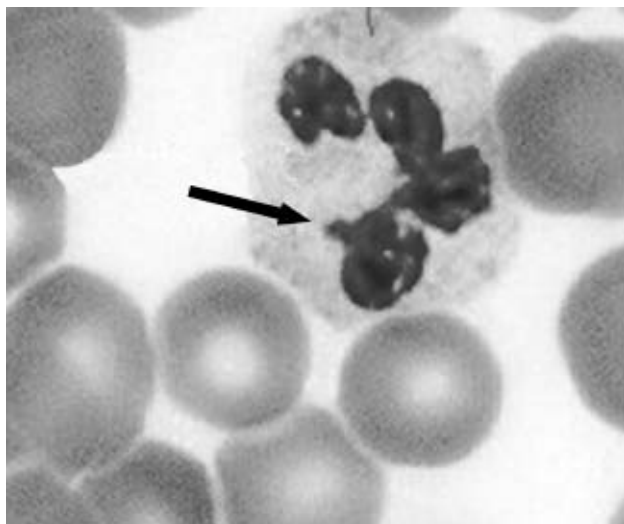


Fig. 4. Evidenza del corpo di Barr in un linfocita polimorfonucleato in uno striscio di sangue periferico (la freccia nera indica al corpo di Barr). *Evidence of Barr body in a polymorphonuclear leukocyte from peripheral blood (black arrow shows Barr Body).*

considera la grande variabilità fenotipica e che tali sintomi raramente si manifestano contemporaneamente nello stesso paziente. La determinazione dei livelli plasmatici dei principali ormoni coinvolti nella KS può essere di aiuto nei pazienti adulti, mentre in epoca pediatrica tale esame non è quasi mai dirimente.

In passato, il migliore test diagnostico dotato di alta sensibilità (82%) e specificità (95%) era l'analisi dei corpi di Barr (Fig. 4) nel nucleo dei linfociti periferi-

ci (riscontro cellulare del cromosoma X soprannumerario inattivato), mentre oggi si esegue preferenzialmente il cariotipo (Fig. 5) su sangue periferico. Per confermare il sospetto di mosaicismi vengono inoltre richiesti il cariotipo e/o l'analisi FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*) (Fig. 6) su fibroblasti cutanei o tessuto testicolare.

Infine, essendo un noto modificatore del fenotipo, è importante quantificare la lunghezza dell'espansione di triplette CAG, che inizialmente veniva misurata mediante generazione di frammenti di restrizione (ottenuti con l'enzima sensibile alla metilazione HpaII sui linfociti periferici<sup>13</sup>), mentre attualmente si preferisce analizzarla per sequenziamento diretto.

Bisogna sempre considerare che durante l'infanzia e prima dell'adolescenza non si manifestano evidenti segni clinici, tranne un'alterazione della discesa testicolare che però non è patognomonica in questa fascia d'età. Ad un soggetto prepubere KS raramente viene fatta la diagnosi corretta, in quanto fisicamente e funzionalmente simile ai propri coetanei maschi con cariotipo normale. Dopo i 14-15 anni, con lo sviluppo dei caratteri sessuali, iniziano a manifestarsi i primi segni clinici evidenziazabili, anche se solo una minima frazione dei soggetti verrà diagnosticato nella propria vita, questo perché molte volte i sintomi nel paziente sono così sfumati da non venir individuati. Dalla pubertà in poi si manifesta sempre uno spiccato ipogonadismo ipergonadotropo, seguito dall'insufficienza androgenica. Il testosterone sierico cresce nel periodo puberale nei pazienti con KS come nei soggetti normali, poi però diminuisce e si assesta a livelli ridotti per tutta la vita.

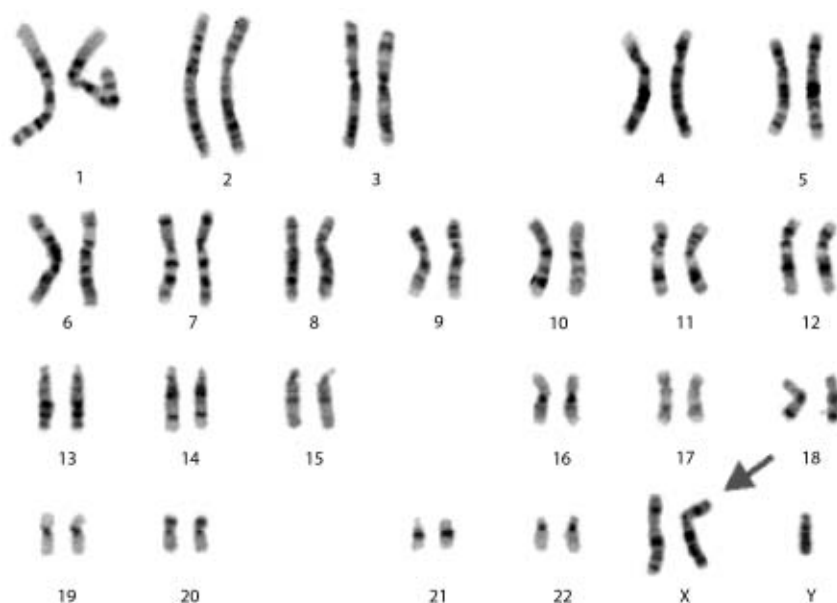


Fig. 5. Cariotipo di maschio con sindrome di Klinefelter: la freccia indica il cromosoma X soprannumerario. *Human karyotype with Klinefelter Syndrome: arrow shows the extra-X chromosome.*



**Fig. 6.** FISH in interfase che mostra la presenza di un cromosoma Y e due cromosomi X: la freccia indica il cromosoma Y, le due frecce indicano i due cromosomi X. *Interphase FISH that reveals the presence of one Y chromosome and two X chromosomes: arrow shows Y chromosome, two arrows show the two X chromosomes.*

## Terapia sostitutiva

Poiché la maggior parte delle patologie correlate alla KS è dovuta al deficit di androgeni, la terapia indicata è la somministrazione di testosterone esogeno e va iniziata il prima possibile, al momento della diagnosi. Questa terapia è stata adottata a partire dagli anni Cinquanta e previene la maggior parte delle complicanze derivanti dall'ipogonadismo: insufficiente virilizzazione, anemia, ridotta densità minerale ossea, scarsa forza muscolare o calo di desiderio e delle funzioni sessuali <sup>6 19</sup>. Essa risulta inefficace per

quanto riguarda la ginecomastia e il recupero della fertilità, in quanto il testosterone blocca il differenziamento degli spermatogoni <sup>6</sup>. La soglia attorno la quale si definisce se un soggetto possiede normale o ridotta concentrazione ematica di testosterone varia leggermente tra gli stati membri della Comunità Europea, anche se valori minori a 8 nmol/l sono generalmente accettati per iniziare una somministrazione esogena di androgeni <sup>19</sup>.

L'assunzione di androgeni stimola l'eritropoiesi midollare: durante la terapia (soprattutto in soggetti adulti) bisogna costantemente monitorare l'ematocrito per evitare le complicanze di un'eccessiva viscosità del sangue <sup>19</sup>. Il trattamento con testosterone può comportare anche una certa ipertrofia prostatica da tenere sempre sotto controllo per impedire eventuali trasformazioni neoplastiche, soprattutto in pazienti che già soffrono di stenosi uretrale.

Tra le varie forme di somministrazione di testosterone (impianto cutaneo, compresse, *patch* e gel trans-dermici, tavolette sub-linguali), il sistema terapeutico più adottato rimane l'iniezione intramuscolare di esteri del testosterone, che garantiscono un'emivita dell'ormone fino a 2-3 settimane <sup>19</sup>. Attualmente, i dosaggi sono stabiliti in base al peso e/o all'età del paziente, ma è auspicabile che un domani la farmacogenomica riuscirà ad adeguare il corretto quantitativo di ormone necessario ad un ottimale effetto terapeutico alle peculiari caratteristiche genetiche dell'individuo (numero di ripetizioni CAG nel RA).

## Bibliografia

- <sup>1</sup> Klinefelter HF, Reifenstein EC, Albright F. *Syndrome characterized by gynecomastia, aspermatogenesis without A-Leydigism, and increased excretion of follicle-stimulating hormone.* J Clin Endocrinol 1942;2:615-27.
- <sup>2</sup> Jacobs PA, Strong JA. *A case of human intersexuality having a possible XXY sex-determining mechanism.* Nature 1959;183:302-3.
- <sup>3</sup> Bojesen A, Juul S, Birkebaek N, Gravholt CH. *Morbidity in Klinefelter Syndrome: a Danish register study based on hospital discharge diagnosis.* J Clin Endocrinol Metab 2006;91:1254-60.
- <sup>4</sup> Bojesen A, Juul S, Birkebaek N, Gravholt CH. *Increased mortality in Klinefelter Syndrome.* J Clin Endocrinol Metab 2004;89:3830-4.
- <sup>5</sup> Diemer T, Desjardins C. *Developmental and genetic disorders in spermatogenesis.* Hum Reprod Update 1999;5:120-40.
- <sup>6</sup> Lanfranco F, Kamischke A, Zitzmann M, Nieschlag E. *Klinefelter's Syndrome.* Lancet 2004;364:273-83.
- <sup>7</sup> Forti G, Csilla K. *La fertilità nella sindrome di Klinefelter: implicazioni pratiche e terapia.* L'Endocrinologo 2006;7:32-9.
- <sup>8</sup> Lyon MF. *Gene action in the X-chromosome of the mouse (Mus Musculus L.).* Nature 1961;190:372-3.
- <sup>9</sup> Penny GD, Kay GF, Sheardown SA, Rastan S, Brockdorff N. *Requirement for Xist in X chromosome inactivation.* Nature 1996;379:131-7.
- <sup>10</sup> Aksglaede L, Wikstrom AM, Rajpert-De Meyets E, Dunkel L, Skakkebaek JA. *Natural history of seminiferous tubule degeneration in Klinefelter Syndrome.* Hum Reprod Update 2005;12:39-48.
- <sup>11</sup> Wikstrom AM, Raivio T, Hadziselimovic F, Wikstrom S, Tuuri T, Dunkel L. *Klinefelter Syndrome in adolescence: onset of puberty is associated with accelerated germ cell depletion.* J Clin Endocrinol Metab 2006;89:2263-70.
- <sup>12</sup> Wang PJ, McCarrey JR, Yang F, Page DC. *An abundance of X-linked genes expressed in spermatogonia.* Nature Genet 2001;27:422-6.
- <sup>13</sup> Zinn AR, Ramos P, Elder FF, Kowal K, Samango-Sprouse C, Ross JL. *Androgen receptors CAGn repeat length influences phenotype of 47,XXY (Klinefelter) Syndrome.* J Clin Endocrinol Metab 2005;90:5041-6.
- <sup>14</sup> Zitzmann M, Depenbusch M, Gromoll J, Nieschlag E. *X-chromosome inactivation patterns and androgen receptor func-*



- tionally influence phenotype and social characteristic as well as pharmacogenetics of testosterone therapy in Klinefelter Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:6208-17.
- <sup>15</sup> Christiansen P, Andersson AM, Skakkebaek NE. *Longitudinal studies of inhibin- $\beta$  levels in boys and young adults with Klinefelter Syndrome*. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:888-91.
- <sup>16</sup> Schulman GS, Redford-Badwal D, Poole A, Mathieu G, Burlison J, Dauser D. *Taurodontism and learning disabilities in patients with Klinefelter Syndrome*. *Pediatr Dent* 2005;27:389-94.
- <sup>17</sup> Geschwind DH, Boone KB, Miller BL, Swerdloff RS. *Neurobehavioral phenotype of Klinefelter Syndrome*. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 2000;6:107-16.
- <sup>18</sup> Swerdloff AJ, Schoemaker MJ, Higgins CD, Wright AF, Jacobs PA; UK Clinical Cytogenetics Group. *Cancer incidence and mortality in men with Klinefelter Syndrome: a cohort study*. *J Natl Cancer Inst* 2005;97:1204-10.
- <sup>19</sup> Nieschlag E, Behre HM, Bouchard P, Corrales JJ, Jones TH, Stalla GK, et al. *Testosterone replacement therapy: current trends and future directions*. *Hum Reprod Update* 2004;10:409-19.
- <sup>20</sup> Breuil V, Euler-Ziegler L. *Gonadal dysgenesis and bone metabolism*. *Joint Bone Spine* 2001;68:26-33.
- <sup>21</sup> Weiss JR, Moysich KB, Swede H. *Epidemiology of male breast cancer*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14:20-6.
- <sup>22</sup> Ferlin A, Garolla A, Foresta C. *Chromosome abnormalities in sperm of individual with constitutional sex chromosome abnormalities*. *Cytogenet Genome Res* 2005;111:310-6.
- <sup>23</sup> Schiff JD, Palermo GD, Veeck LL, Goldstein M, Rosenwaks Z, Schlegel PN. *Success of Testicular sperm injection and intracytoplasmic sperm injection in men with Klinefelter Syndrome*. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:6263-7.

### First group

#### Question 1: Hematic gonadotropins (LH and FSH) in Klinefelter syndrome are generally:

- a) Lower than average
- b) Average
- c) Higher than average

#### Question 2: If the sequence of androgen receptor has not a long CAG tail on first exon:

- a) Hormone-receptor complex is very efficient in transactivation of the transcription of specific target genes
- b) Hormone-receptor complex has tyrosin-kinase activity
- c) Receptor has marked affinity for its own ligand

#### Question 3: During development of parents' germ cells, a theoretical aneuploid zygote 47,XXY:

- a) Is generated by a sperm anomaly, which derives from an error during the second meiotic division in paternal spermatogenesis.
- b) Is generated only by an aneuploid oocyte 24,XX
- c. Could be generated by an aneuploidy in the oocyte as well as in the spermatozoa

### Second group

#### Question 4: In Klinefelter syndrome:

- a) There is preferential inactivation of X chromosome which carries an androgen receptor with longer CAG tail
- b) There is preferential inactivation of X chromosome which carries an androgen receptor with shorter CAG tail
- c) There is no difference between the choice of which X chromosome may undergo an inactivation

#### Question 5: First clinical features of inadequate testosterone's production appear:

- a) Before 13 years
- b) From 14 to 15 years
- c) After 16 years

**Question 6: Generally, the patient with Klinefelter syndrome has a relative risk:**

- a) Increased compared to average for all types of cancer
- b) Increased compared to average for lung cancer, but decreased for prostate cancer
- c) Decreased compared to average for male breast cancer and lymphoma

**Third group****Question 7: Aneuploid male germ-cells 47,XXY:**

- a) Never proceed beyond meiosis
- b) Can sometimes go through meiotic divisions
- c) Have no problems during cellular division because one X chromosome becomes inactive after methylation

**Question 8: TESE (testicular sperm extraction) in patients who want their own child:**

- a) Is recommended in every situation
- b) Is not practiced because of fibrotic nature of testes
- c) Is suggested only if patient shows certain clinical features

**Question 9: Management with exogenous testosterone:**

- a) Is useless for therapeutic purposes
- b) Has positive effects on spermatogenesis
- c) Must be started as soon as possible after diagnosis

**Primo gruppo****Domanda 1: I livelli ematici di gonadotropine (LH e FSH) nella sindrome di Klinefelter sono generalmente:**

- a) Inferiori alla media
- b) Nella media
- c) Superiori alla media

**Domanda 2: Se la sequenza del gene del recettore degli androgeni non possiede una numerosa espansione CAG a livello del primo esone:**

- a) Il complesso ormone-recettore è molto efficiente nel transattivare la trascrizione di specifici geni *target*
- b) Il complesso ormone-recettore possiede attività tirosin-chinasi
- c) Il recettore è molto affine al proprio ligando

**Domanda 3: Durante la gametogenesi dei genitori, un eventuale zigote aneuploide 47,XXY:**

- a) È frutto di una anomalia dello spermatozoo, che deriva da un errore durante la seconda divisione meiotica nella spermatogenesi del padre
- b) È causato solamente da un ovocita aneuploide 24,XX
- c) Può essere il prodotto di una aneuploidia presente sia nei gameti materni che in quelli paterni

**Secondo gruppo****Domanda 4: Nella sindrome di Klinefelter:**

- a) Viene inattivato con maggior frequenza il cromosoma X che veicola un recettore degli androgeni con maggior espansione di triplette CAG
- b) Viene inattivato con maggior frequenza il cromosoma X che veicola un recettore degli androgeni con minor espansione di triplette CAG
- c) Non vi è sostanziale differenza nella scelta di quale cromosoma X inattivare

**Domanda 5: I primi segni di insufficiente produzione di testosterone si manifestano clinicamente:**

- a) Prima dei 13 anni
- b) Tra i 14 e i 15 anni
- c) Oltre i 16 anni

**Domanda 6: Generalmente il paziente con sindrome di Klinefelter possiede un rischio relativo:**

- a) Aumentato rispetto alla media per tutti i tipi di neoplasia
- b) Aumentato rispetto alla media per il cancro ai polmoni, ma diminuito per il cancro alla prostata
- c) Diminuito rispetto alla media per il cancro alla mammella maschile e per i linfomi

**Terzo gruppo****Domanda 7: Gli spermatozoi aneuploidi 47,XXY:**

- a) Non procedono in nessun caso oltre la mitosi
- b) Possono in qualche caso andare incontro a divisioni meiotiche
- c) Non vanno incontro a difficoltà durante le divisioni cellulari perché un cromosoma X viene silenziato tramite metilazione

**Domanda 8: La biopsia testicolare nei pazienti che desiderano avere un figlio proprio:**

- a) Viene raccomandata in ogni situazione
- b) Non viene praticata perché si conosce a priori la natura fibrosa del testicolo
- c) Viene suggerita solo se il paziente manifesta certe caratteristiche cliniche

**Domanda 9: Il trattamento con testosterone esogeno:**

- a) È inutile a fini terapeutici
- b) Condiziona positivamente la spermatogenesi
- c) Deve essere iniziato il prima possibile dopo la diagnosi

# Età paterna ed *outcome* riproduttivo

## *Paternal Age and Reproductive Outcome*

M. MANNO, F. FORZANO\*

Unità di Fisiopatologia della Riproduzione Umana, S.O.C. Ostetricia e Ginecologia, Dipartimento Materno-Infantile, Ospedale di Pordenone; \* Ambulatorio di Genetica Umana, SC Laboratorio di Genetica, E.O. Ospedali "Galliera", Genova

**Parole chiave:** Età paterna, Aneuploidie spermatiche, Malformazioni, Aborto, Morte intrauterina, Basso peso alla nascita, Mutazioni dominanti, Mutazioni recessive

**Key words:** *Paternal age, Sperm aneuploidies, Malformations, Miscarriage, Stillbirth, Low birth weight, Dominant mutations, Recessive mutations*

### Riassunto

**Background.** Negli ultimi decenni stiamo assistendo ad un progressivo avanzamento dell'età paterna e materna al primo concepimento nei Paesi economicamente più avanzati. Da anni è noto che l'età materna avanzata costituisce un fattore di rischio per abortività spontanea ed anomalie cromosomiche fetali. Se anche l'avanzata età paterna sia fattore di rischio per gli stessi esiti riproduttivi è ancora materia dibattuta.

**Obiettivo.** Lo scopo del presente lavoro è di valutare le evidenze esistenti sul contributo dell'età paterna all'infertilità nonché ad aborto, morte in utero, basso peso alla nascita, aneuploidie e malformazioni congenite dovute a mutazioni dominanti o recessive.

**Metodo.** È stata eseguita una revisione della letteratura più rilevante su questo argomento mediante l'utilizzo di Medline.

**Risultati.** Sulla base delle evidenze attuali si può suggerire che l'età paterna in sé o in associazione con quella materna può essere fattore di rischio per numerosi esiti sfavorevoli della gravidanza come l'aborto, la morte endouterina, il basso peso alla nascita, le malformazioni congenite da mutazione autosomica dominante e forse alcune aneuploidie.

### Summary

**Background.** *In the last few decades, we have been facing a progressive increase both in maternal and paternal age at the time of first conception. It is well known that increased maternal age may be a risk factor for poor pregnancy outcomes and for miscarriage. Whether paternal age could also represent a risk factor for poor outcomes is still a matter of debate.*

**Objective.** *Aim of the present investigation was to evaluate the existing evidence on the contribution of paternal age to infertility and pregnancy outcomes such as miscarriage, stillbirth, low birth weight, aneuploidies and congenital malformations due to dominant and recessive mutations.*

**Method.** *A Medline search was performed to select the more relevant reviews and reports on this topic.*

**Results.** *Present evidence suggests that advanced paternal age could be a risk factor "per sé" or, in conjunction with advanced maternal age, for a poor pregnancy outcome, such as miscarriage, stillbirth, low birth weight, congenital malformations due to dominant mutations and possibly few aneuploidies.*

### Introduzione

Il progressivo differimento nei Paesi sviluppati dell'età alla quale viene iniziato il programma riproduttivo per motivi socio-economico-culturali ha determinato, oltre ad un incremento dell'incidenza dell'infertilità di coppia, una crescente preoccupazione per le implicazioni in termini di salute per la progenie.

Da anni è riconosciuta una relazione fra *outcome* riproduttivo ed età materna in termini di incremento sia dell'infertilità da progressivo declino della funzione ovarica

nel tempo, sia dell'abortività, particolarmente importante dopo i 40 anni di età, sia della frequenza delle aberrazioni cromosomiche numeriche (in particolare le trisomie es 21) da cui deriva l'indicazione allo *screening* citogenetico prenatale (*Pre Natal Diagnosis* = PND) nelle donne di età > 35 anni (amnio/villocentes), per consentire una diagnosi precoce di quelle aneuploidie che non abbiano indotto un'interruzione spontanea della gravidanza nel primo trimestre.

Diversamente dall'interruzione irreversibile della funzione ovarica in termini di gametogenesi e produzione

ormonale al momento della menopausa, l'assenza di una analoga interruzione della funzione spermatogenetica nel maschio di età avanzata ha portato, nel passato, a credere che l'età paterna potesse essere ininfluenza per l'esito riproduttivo della coppia. In realtà, un attento esame della letteratura, se da un lato porta a confermare una netta prevalenza dell'importanza del fattore età materna, non consente di escludere un'influenza anche dell'età paterna per l'*outcome* riproduttivo di coppia sia pur di minore importanza.

Infatti, se da un lato il permanere di una efficiente spermatogenesi in età avanzata rende possibile la paternità anche in tarda età, dall'altro, al contrario di quanto si verifica nell'oogenesi, proprio il perdurare della replicazione cellulare *sine die* fa sì che nella spermatogenesi si verifichino circa 150 divisioni cellulari fino all'età di 20 anni con un ulteriore incremento di circa 23 divisioni per anno successivamente<sup>1</sup>. Dal momento che a livello tubulare ogni duplicazione cellulare può essere causa di errore nella duplicazione del DNA, all'aumentare del numero delle duplicazioni cellulari è verosimile attendersi un aumento del carico di mutazioni (dominanti e recessive) trasmissibili alla progenie soprattutto in assenza di efficienti meccanismi di riparazione del DNA o di un efficiente apoptosi cellulare in grado di evitare la trasmissione dell'errore genetico. Ciò evidentemente pone le premesse per un possibile aumento dell'incidenza delle patologie autosomiche dominanti nella generazione immediatamente successiva e per un aumento del carico genetico di mutazioni recessive nelle generazioni future<sup>2</sup>.

Un aspetto peculiare della gametogenesi maschile è la presenza di gonosomi diversi quali X ed Y, che si appaiano solo parzialmente durante la meiosi (nella Regione Pseudo Autosomale, PAR) e presentano un tasso di *crossing over* ridotto rispetto agli autosomi. Ciò predisporrebbe il bivalente XY, secondo alcuni Autori<sup>3</sup>, ad un deficit di *crossing over* che, impedendo una stabilizzazione del bivalente, determina una non disgiunzione dei gonosomi stessi con conseguente produzione di aneuploidie spermatiche derivanti da errore della I meiosi (24,XY). Se tale rischio aumenti con l'età paterna è ancora oggetto di discussione fra i vari Autori.

Nella piena consapevolezza che allo stato attuale delle conoscenze non è possibile trarre conclusioni definitive su tale argomento, lo scopo del presente lavoro è stato quello di valutare i dati di letteratura esistenti circa il rapporto fra età paterna ed *outcome* riproduttivo in termini di: capacità riproduttiva, abor-

tività, mortalità fetale, epoca del parto, peso alla nascita, malformazioni, malattie autosomiche dominanti ed aneuploidie del prodotto del concepimento.

## Età paterna, funzionalità spermatozoaria e probabilità di concepimento

Nonostante la funzione spermatogenetica venga mantenuta fino alla senescenza senza evidenze di un fenomeno analogo alla menopausa del sesso femminile, la qualità della funzionalità testicolare esocrina risulta progressivamente in declino con il passare degli anni. Già una *review* del 2001<sup>4</sup> sull'argomento aveva evidenziato come al passare degli anni nel maschio si osservavano una progressiva riduzione del volume dell'ejaculato, della motilità nemaspermica e della percentuale di forme normali. Tale osservazione è stata del tutto recentemente confermata da un altro lavoro che ha valutato le caratteristiche di motilità mediante CASA (*computer-assisted semen analysis*) di campioni di seme di soggetti di età compresa fra i 22 e gli 80 anni: ne è emerso che con l'invecchiamento si assiste ad una riduzione della percentuale di spermatozoi mobili che sono in grado di mantenere una traiettoria rettilinea con conseguente riduzione della distanza percorsa per unità di tempo<sup>5</sup>.

Per quanto concerne le implicazioni di queste modificazioni della qualità del seme per la fertilità maschile, la letteratura è avara di studi opportunamente disegnati per escludere *bias* condizionanti il giudizio finale. È infatti difficile dirimere fra effetti legati ad una modificazione delle abitudini sessuali ed effetti puramente legati a meccanismi biologici. Peraltro esiste un lavoro di Autori francesi<sup>6</sup> che hanno studiato l'effetto dell'età paterna da sola e in associazione all'età della partner sulla probabilità di insuccesso delle procedure di fecondazione in vitro (FIVET) classica in coppie con infertilità tubarica. Tale lavoro ha evidenziato che il rischio relativo (OR) per l'insuccesso per i padri con età  $\geq 40$  anni rispetto a quelli  $< 30$  anni era pari a 1,7. Nella valutazione dell'interazione dell'età paterna con quella materna è emerso che l'OR per età paterna  $\geq 40$  anni era pari a 2 nelle coppie con partner femminile di età compresa fra 35 e 37 anni, 2,03 per quelle con età fra 38 e 40 e 5,75 per quelle con età  $\geq 41$  anni. Da questo lavoro, scevro da fattori confondenti quali la modificazione delle abitudini sessuali età correlata, sembra dunque emergere un ruolo dell'età paterna nell'infertilità coniugale riconducibile a puri meccanismi biologici.

## Età paterna e rischio di aborto

Da molto tempo è nota la relazione fra età materna e incidenza di aborto che oltre i 40 anni di età della partner porta a percentuali maggiori del 50%. Gran parte di tale incremento è riconducibile all'aumento delle aneuploidie nel prodotto del concepimento che portano alla tipica abortività precoce (entro la XII settimana) come conferma l'analisi del cariotipo dei prodotti abortivi del I trimestre. Tale fenomeno è nella donna riferibile ad una particolare sensibilità del meccanismo meiotico al fattore età durante l'oogenesi.

Al contrario i lavori esistenti in letteratura che hanno studiato la relazione fra età paterna ed abortività sono molto meno numerosi e relativamente recenti. Due recenti lavori condotti rispettivamente su un campione di soggetti americani e di soggetti europei e pubblicati sull'*American Journal of Epidemiology*<sup>7</sup> e su *Human Reproduction*<sup>8</sup> hanno evidenziato una associazione fra età paterna e rischio di aborto spontaneo. Lo studio di Slama et al. ha dimostrato un aumento del rischio solo per l'abortività del I trimestre. Alla luce dell'elevata frequenza di un'etiologia cromosomica nell'abortività precoce è possibile ipotizzare, pur in assenza di dati definitivi sul cariotipo dei prodotti abortivi, che l'incremento del rischio sia riconducibile ad un incremento delle aneuploidie del prodotto del concepimento. Il lavoro multicentrico europeo, a nostro giudizio particolarmente interessante, ha evidenziato una relazione fra età paterna > 40 anni e rischio di aborto per le donne di età  $\geq 35$  anni. Se dunque non vi è una relazione fra aneuploidie autosomiche a termine ed età paterna così importante come quella esistente con l'età materna, l'età paterna sembra comunque giocare un ruolo, soprattutto nelle coppie con età della partner  $\geq 35$  anni, nel rischio di abortività, probabilmente con un meccanismo di tipo genetico (aneuploidie).

## Età paterna ed anomalie cromosomiche spermatiche

Gli studi sulle aneuploidie negli spermatozoi venivano un tempo eseguiti con l'analisi citogenetica con metodica tradizionale di bandeggio dei cromosomi spermatici alla prima metafase dopo fertilizzazione degli ovociti di Hamster privati della zona pellucida con spermatozoi umani capacitati. Attualmente gli studi dei cromosomi spermatici vengono condotti con la tecnica di ibridizzazione *in situ* multipla (Mul-

ti-FISH) che consente la valutazione di un numero di spermatozoi molto più elevato<sup>9</sup>. Tale tecnica si basa sull'ibridizzazione del DNA cromosomico con specifiche sonde marcate con fluorocromi. Tali studi sono utili per confronti fra due popolazioni di pazienti ma risulta difficile attribuire loro un valore clinico-diagnostico assoluto nel singolo paziente per l'assenza di *range* di normalità condivisi per la frequenza delle singole aneuploidie. La maggior parte dei lavori condotti con la FISH ha inoltre documentato che le gravi dispermie si associano ad un importante aumento delle aneuploidie degli spermatozoi dell'eiaculato<sup>10</sup>, che è stato segnalato anche negli spermatozoi testicolari dei soggetti con azoospermia non ostruttiva<sup>11</sup>. Mancano però ad oggi dati certi sull'effetto dell'età nei pazienti dispermici.

Circa la relazione fra età paterna e frequenza delle aneuploidie spermatiche, le evidenze presenti vanno distinte in relative ad aneuploidie autosomiche e relative ai gonosomi. Circa le aneuploidie autosomiche le osservazioni nell'uomo in favore di un aumento età-correlato sono scarse. Per quanto concerne la sindrome di Down, circa il 5-9% dei casi riconosce un'origine paterna ed alcuni studi hanno suggerito una possibile relazione fra età paterna e rischio di trisomia 21 sostenendo che l'avanzata età paterna possa costituire indicazione allo *screening* prenatale<sup>12</sup>. Peraltro, in alcuni studi, la relazione non è risultata confermata quando l'analisi è stata condotta dopo correzione per l'età materna. È dunque evidente che la relazione fra età paterna e trisomia 21 risulta molto più debole di quella con l'età materna.

Come è noto, circa 1/500 nati è affetto da aneuploidie dei cromosomi sessuali, il 55% delle quali è di origine paterna. Chiaramente la frequenza dell'origine paterna è percentualmente diversa nelle varie aneuploidie: nel 100% dei cariotipi 47,XYY, (difetto meiosi II, 1/1.000 maschi), nell'80% dei cariotipi 45,XO (difetto meiosi I o mitotico post-zigotico 1/2.500 femmine), nel 50% dei cariotipi 47,XXY (difetto meiosi I, 1/500 nati maschi) e solo nel 6% dei cariotipi 47,XXX (difetto meiosi II, 1/1.000 femmine)<sup>13</sup>.

Per quanto concerne la relazione fra età paterna e rischio di aneuploidie spermatiche, alcuni lavori hanno osservato un incremento con l'età paterna del rischio di produrre spermatozoi con disomia gonosomica (24,XY) nei padri che hanno generato un figlio con sindrome di Klinefelter. Tale riscontro era presente solo nei padri dei casi di origine paterna (53%) e non in quelli di origine materna (frequenza = 0,27%) a parità di età al concepimento<sup>14</sup>.

In linea generale dei dieci studi FISH che hanno indagato la relazione fra età paterna e la frequenza di cariotipo 24,XY (conseguenza di un difetto della I divisione meiotica) a livello spermatozoario cinque hanno trovato una correlazione positiva con l'età paterna con un aumento di due-tre volte della frequenza nei maschi con età  $\geq 50$  anni. In tre di questi cinque studi la differenza ha raggiunto la significatività statistica. Circa le disomie derivanti da difetto della seconda divisione meiotica (24,XX e 24,YY) sei degli undici studi FISH hanno rilevato un effetto dell'età paterna<sup>13</sup>. Sembra dunque che sia la meiosi I (MI) che la meiosi II (MII) possano risentire di un'influenza negativa dell'età paterna la cui entità è stata diversamente valutata come più rilevante per la MII<sup>1</sup> o analoga per MI ed MII<sup>13</sup>.

Alcuni Autori hanno inoltre osservato un'aumentata frequenza di disomia XY e di disomia 21 nei padri di pazienti affetti da sindrome di Turner<sup>15</sup> o Down<sup>16</sup> rispettivamente. Tuttavia, in questi studi non è stata esclusa la possibilità di altri fattori predisponenti. In particolare, nelle aneuploidie autosomiche non era stata presa in considerazione la possibilità di un mosaicismo gonadico, che può rappresentare un fattore di rischio specifico per una determinata aneuploidia, oppure, più in generale, un'anomalia delle proteine del complesso sinaptonemale, condizione che può determinare un'alterata formazione dei bivalenti e dei *crossing over*, con conseguente aumentato rischio di non disgiunzione cromosomica<sup>17</sup>. Infine, per quanto riguarda le anomalie dei cromosomi sessuali, è stato sottolineato come un'alterazione dell'organizzazione nucleolare, essenziale per la formazione del bivalente XY<sup>18</sup>, possa essere alla base della disomia X paterna in modo età-dipendente.

Considerando l'aneuploidia nel prodotto del concepimento come conseguenza delle aneuploidie gametiche, vanno fatte alcune considerazioni preliminari. Come è noto esiste infatti un meccanismo naturale di pressione selettiva negativa nei confronti dei prodotti del concepimento con anomalie del cariotipo che fa sì che molte aneuploidie del prodotto del concepimento esitino in aborti precoci o addirittura preclinici (entro il I trimestre con visualizzazione o meno di camera ovulare rispettivamente). Ciò si traduce in un ridotto numero di concepimenti aneuploidi evolutivi e a termine rispetto a quelli attesi sulla base della frequenza delle aneuploidie gametiche. Tale meccanismo di selezione dimostra una efficienza diversa per le diverse aneuploidie cromosomiche dimostrabile dalla differente prevalenza dei diversi cariotipi nei prodotti abortivi del I

trimestre. Mentre per le monosomie e trisomie autosomiche e per la monosomia 45,XO tale efficienza sembra molto elevata, questa risulta bassa per il cariotipo 47,XXY e per la trisomia 21 che spesso arrivano a termine e vengono infatti osservate molto di rado come cariotipo di prodotti abortivi. Peraltro mentre per la trisomia 21, riconducibile nel 90% dei casi ad un difetto della I divisione meiotica materna, vi è una importante associazione del rischio con l'età materna (1/350 a 35 aa 1/100 a 40 aa della partner), per il cariotipo 47,XXY (riconducibile solo nel 50% dei casi ad un difetto della meiosi paterna) l'associazione con l'età paterna, sebbene possibile, è molto meno evidente.

Per quanto concerne invece la monosomia 45,XO derivante nell'80% dei casi omogenei dalla perdita del cromosoma di origine paterna, l'elevata selezione naturale esercitata su questa aneuploidia (99% di abortività) fa sì che l'incidenza alla nascita sia pari ad un solo caso su 2.500 nati femmine. Se si assume che il 99% delle monosomie 45,XO esita in aborto precoce, si evince che la frequenza di tale cariotipo patologico dovrebbe essere pari a 1 caso su 25 concepimenti (1/2.500 x 100) e quindi il cariotipo patologico più frequente. La maggioranza di cariotipi 45,XO è dovuta alla perdita di un cromosoma sessuale non correlata con la disgiunzione meiotica<sup>19</sup>. Ciò è anche dimostrato dal fatto che, se la frequenza particolarmente elevata del cariotipo 45,XO (circa l'1-2% delle gravidanze) fosse da ricondurre esclusivamente ad errori di disgiunzione meiotica, ci si dovrebbe aspettare una frequenza altrettanto elevata dei cariotipi "complementari" 47,XXY, 47,XYY e 47,XXX; al contrario la frequenza di tali aneuploidie gonosomiche è nettamente inferiore (almeno di un ordine di grandezza) rispetto alla monosomia X (45,XO).

In conclusione, riguardo alla relazione fra età dei partners e non disgiunzione autosomica, se l'età materna si può ritenere chiaramente correlata con tale rischio a seguito di un difetto della prima meiosi, un analogo legame con l'età paterna sembra molto più sfumato. Circa le aneuploidie dei cromosomi sessuali, è invece individuabile una maggiore responsabilità paterna e molti studi, anche se non tutti, sembrano individuare una relazione fra età paterna e difetti della I e II divisione meiotica. Si è inoltre stimato, sulla base della notevole varietà dei meccanismi di non disgiunzione, come improbabile un elevato rischio di ricorrenza di trisomia dei cromosomi sessuali. Ciò può avere una rilevanza nel *counselling* della coppia con pregressa trisomia.

Gli studi disponibili, invece, non forniscono conclusioni univoche per quanto concerne le diploidie: sono stati segnalati aumento, diminuzione o nessun effetto dell'età paterna sulla frequenza di spermatozoi diploidi in studi condotti con tecnica FISH<sup>13</sup>.

Circa la relazione fra età paterna e le anomalie cromosomiche strutturali, è da sottolineare che, pur essendo alla nascita lievemente meno comuni di quelle numeriche (0,25% vs. 0,33%), l'80% di quelle *de novo* sono di origine paterna. È stato riportato un aumento della frequenza età correlato di rotture cromosomiche e frammenti acentrici<sup>13</sup>. Per quanto riguarda i riarrangiamenti cromosomici (traslocazioni), a differenza di quanto osservato nei linfociti, negli spermatozoi non sembra esserci un aumento età correlato nei donatori.

Va sottolineato il fatto che mentre nel recente passato si è prevalentemente studiata la relazione fra età paterna ed aneuploidie nei concepimenti naturali, dal 1992, a seguito della larga diffusione della microiniezione intracitoplasmatica nei casi di fattore maschile grave, si deve considerare la possibilità di un "potenziamento" o comunque di una interazione tra gli effetti della dispermia e quelli legati all'avanzata età paterna sulla qualità della spermatogenesi. Così, se l'effetto dell'età paterna sulle non disgiunzioni meiotiche in soggetti normospermici potrebbe essere trascurabile, diversamente un possibile effetto somma o di potenziamento fra il dato anagrafico e la dispermia, al momento non escludibile, potrebbe determinare, a causa dell'ampia applicazione dell'ICSI per la correzione del fattore maschile grave, un impatto molto più rilevante per il prodotto del concepimento.

Circa i meccanismi responsabili delle anomalie cromosomiche descritte con l'avanzare dell'età sono stati ipotizzati:

- 1) esposizioni ambientali a sostanze specifiche (DDT, fumo di sigaretta);
- 2) difetti nei meccanismi di riparazione del DNA;
- 3) alterata ricombinazione meiotica con successivo difetto di segregazione cromosomica;
- 4) indice di frammentazione del DNA (DFI)<sup>20</sup>;
- 5) alterazioni endocrine quali aumento dei valori di FSH con conseguenti disturbi meiotici o riduzione della testosteronemia con difetto di produzione di topoisomerasi II necessaria per replicazione del DNA, mantenimento della stabilità del genoma, corrette segregazione e condensazione cromosomiche;
- 6) difetto di apoptosi;
- 7) eventuali alterazioni nutrizionali<sup>13</sup>.

Riassumendo, le evidenze attuali sembrano indicare che la paternità ad un'età avanzata sia collegata con un'aumentata frequenza di aberrazioni strutturali autosomiche e probabilmente gonosomiche numeriche (disomie e monosomie). Sebbene l'impatto in termini di salute della prole sia probabilmente limitato, un corretto *counselling* alla coppia infertile dovrebbe prevedere anche la segnalazione di questo incremento del rischio.

### **Età paterna e morte in utero**

Uno studio di Autori italiani pubblicato su *Human Reproduction* nel 2004<sup>21</sup> ha evidenziato nelle coppie con età materna  $\geq 30$  anni un possibile effetto cumulativo dell'età paterna in termini di aumento del rischio della morte endouterina. Il fatto che sia stato riscontrato in questo lavoro un incremento del 5% del rischio di morte endouterina ogni 5 anni di incremento dell'età paterna anche in condizioni favorevoli, come nelle coppie con età materna compresa fra i 30 ed i 34 anni con alto livello di istruzione, ha indotto gli Autori a suggerire che tale incremento possa essere riconducibile ad una componente genetica. Nello stesso anno l'associazione fra mortalità in utero ed età paterna ha trovato conferma in un lavoro su 24.000 gravidanze che ha evidenziato una relazione fra un rischio di morte fetale tardiva ed età paterna a partire dai 45 anni di età<sup>22</sup>.

### **Età paterna e rischio di basso peso alla nascita**

Mentre studi del recente passato sembravano escludere una responsabilità dell'età paterna nel rischio di parto pretermine o basso peso alla nascita<sup>23</sup> alcuni Autori hanno, del tutto recentemente, segnalato un rischio piccolo, ma significativamente maggiore, di parto pretermine per la prole con età paterna  $\geq 40$  anni<sup>24</sup> o di basso peso alla nascita addirittura per i padri di età  $> 34$  anni<sup>25</sup>.

### **Età paterna, malformazioni e patologie genetiche autosomiche dominanti**

Si stima che il 5% dei nati siano affetti da patologie genetiche. È stato riportato che il 20% di queste patologie è riconducibile a mutazioni *de novo* insorte nella linea germinale<sup>26</sup>.



Il permanere di un'attiva spermatogenesi nel maschio di età avanzata consente l'accumulo di mutazioni autosomiche dominanti e la loro possibile trasmissione alla progenie con conseguente manifestazione delle patologie correlate nella prima generazione. Per quanto riguarda le malattie monogeniche un incremento della frequenza di patologie autosomiche dominanti nella progenie di padri con età avanzata è stato descritto per alcune patologie genetiche tra le quali l'acondroplasia, l'osteogenesi imperfetta, la neurofibromatosi, la MEN 2 e la sindrome di Apert (craniosinostosi, sindattilia a carico di mani e piedi, ipoplasia mediofaciale), la sindrome di Pfeiffer, la sindrome di Crouzon e la schizofrenia<sup>20</sup>. Non è tuttavia semplice stabilire quale possa essere il rischio relativo in termini percentuali all'aumentare dell'età paterna al concepimento, in quanto esistono dei meccanismi più complessi che entrano in gioco sia in termini di selezione negativa che positiva che fanno sì che l'incidenza alla nascita di alcune patologie monogeniche sia diversa da quella attesa sulla base del tasso calcolabile di mutazione spontanea. Il più noto tra questi è il vantaggio selettivo che la mutazione G1138A del gene FGFR3, responsabile di acondroplasia, determina nello spermatozoo in termini di fertilizzazione e, successivamente, nell'embrione in termini di impianto e crescita embrionale<sup>27</sup>, e che rende l'acondroplasia la displasia scheletrica vitale più frequente nella popolazione mondiale.

L'accumulo di mutazioni nel genoma dello spermatozoo correlato all'età paterna riguarda, verosimilmente, sia le mutazioni di tipo recessivo che di tipo dominante; è evidente che solo per quelle dominanti è possibile una valutazione clinica diretta. Per le mutazioni recessive è possibile ipotizzare solo un aumento del carico genetico negativo per le generazioni future ma non è praticabile una valutazione a tappeto in ampie casistiche della loro frequenza in relazione con l'età paterna a soli fini di studio.

### **Difficoltà e *bias* nel rilievo dell'influenza dell'età paterna sullo stato di salute del concepito**

Gli studi epidemiologici che hanno cercato di verificare la relazione fra età paterna e rischio di malformazioni su base genetica o aneuploidie del prodotto del concepimento non sono molto numerosi. Questi studi si sono dovuti confrontare con una scarsa sensibilità generale per il problema dimostrata dal fatto che spesso i certificati di nascita sono risultati non ri-

portare l'età paterna. Altro elemento non trascurabile è il fatto che l'età paterna sembra correlare con l'età della partner per cui è assolutamente necessario distinguere l'effetto dell'età paterna da quello dell'età materna cosa che risulta difficile per la tendenza prevalente a costituire coppie di partners con età simile. Può giocare una certa responsabilità l'erronea assunzione che il perdurare di un'attiva spermatogenesi e della fertilità maschile anche in età avanzata sia in grado di garantire anche la normalità della prole concepita. Vi potrebbe essere sotto questo aspetto una certa analogia con quanto già in passato osservato nel campo dell'infertilità coniugale nel quale la "responsabilità" del mancato concepimento veniva spesso, erroneamente, attribuita aprioristicamente alla sola partner femminile. Come ben sappiamo lo sviluppo della conoscenza in ambito di infertilità coniugale ha invece consentito di documentare come in realtà tale "responsabilità" sia, in una percentuale dei casi stimabile intorno al 40%, riconducibile ad un fattore maschile. Circa possibili *bias* di rilevazione in grado di rendere ancor più arduo il compito di individuare una relazione fra età paterna e patologia della progenie, è da sottolineare il fatto che le malformazioni non sono sempre riportate alla nascita ma spesso solo dopo il primo anno di vita; per di più alcune patologie genetiche si manifestano clinicamente dopo i primi anni di vita. Un'ulteriore difficoltà nel rilevare l'associazione fra età paterna ed aberrazioni cromosomiche numeriche nel prodotto del concepimento, come precedentemente segnalato, è data dall'elevata efficienza della pressione selettiva negativa nei confronti della più frequente delle aneuploidie del prodotto del concepimento.

### **Conclusioni**

Al momento quindi è possibile concludere che la relazione fra età paterna e patologie della progenie merita ulteriori approfondimenti per una serie di motivi:

- 1) i dati attualmente disponibili in letteratura sono insufficienti e talora contraddittori;
- 2) è possibile una sottostima del fenomeno legato a *bias* di rilevazione;
- 3) il trend è nella direzione di uno spostamento in avanti dell'età paterna al momento del concepimento;
- 4) esiste la premessa biologica per ipotizzare che nel corso delle divisioni meiotiche gli spermatozoi possano, sulla base della ipotesi "*copy and error*", essere sede di accumulo progressivo di mutazioni

potenzialmente trasmissibili alla progenie con immediata estrinsecazione delle patologie dominanti nella generazione immediatamente successiva o aumento del carico genetico di mutazioni recessive per le generazioni future;

- 5) la progressiva diffusione della fertilizzazione assistita mediante ICSI nei soggetti dispermici potrebbe amplificare un effetto solo marginale della età paterna sulla qualità della progenie nei concepimenti naturali.

Gli studi di approfondimento richiederanno non solo il rilievo sistematico dell'età paterna a fini epidemiologici, ma anche, nei casi di patologie ereditarie della progenie, un accurato studio genetico per evidenziare l'origine parentale.

Per ciò che attiene alle aneuploidie del prodotto del concepimento, va considerato attentamente il fatto che la FISH sugli spermatozoi è in grado di dare solo una stima indiretta e molto approssimativa del rischio di anomalie cromosomiche numeriche nel prodotto del concepimento. Anche la diagnostica prenatale, mediante villocentesi ed amniocentesi, può darci solo una sottostima dell'incidenza di tali patologie, dal momento che l'aneuploidia è spesso causa di aborto precoce prima che possa essere applicata la PND (in particolare per ciò che concerne le trisomie autosomiche e la monosomia 45,XO soprattutto), ed è infatti stimato che le aneuploidie siano responsabili fino al 50% degli aborti spontanei precoci. D'altro canto gli studi che analizzano il cariotipo del prodotto del concepimento si basano su casistiche poco numerose ed in particolare mancano studi sulla relazione fra età paterna e frequenza delle aneuploidie nel materiale abortivo.

La recente introduzione dello *Screening* Genetico Preimpianto (PGS), una tecnica che consente di effettuare un'analisi cromosomica con tecnica FISH su unica cellula, ha consentito di evidenziare come circa metà degli embrioni concepiti *in vitro* siano portatori di anomalie cromosomiche<sup>28 29</sup>. Non è possibile escludere che una parte degli embrioni aneuploidi possano andare incontro a "rescue" spontaneo determinando una riduzione del tasso di aneuploidia nelle fasi di sviluppo successive. È indubbio che in futuro questa tecnica, nata a scopo diagnostico, ci consentirà di comprendere meglio alcuni meccanismi biologici di base delle fasi embrionarie precoci.

Possiamo infine asserire che se per circa una ventina di patologie vi è condivisione sull'esistenza di una relazione con l'età paterna molto ancora resta da fare per trarre delle conclusioni definitive per quanto concerne il rischio di aneuploidie del nascituro ed età paterna al concepimento.

Saranno necessari ancora molti studi per arrivare ad una comprensione profonda dei meccanismi fisiologici che regolano la riproduzione umana e la fisiopatologia gametica ed embrionale. Sarà allora possibile chiarire quale possa essere il reale impatto nella popolazione del progressivo aumentare dell'età paterna al concepimento fenomeno cui stiamo assistendo nella nostra società negli ultimi anni per motivi socio-economico-culturali.

Per quanto molti dati siano ancora controversi, riteniamo che nel *counselling* della coppia infertile debba essere considerata anche l'età paterna quale possibile fattore di rischio per infertilità, abortività e morte in utero.

## Appendice

Bivalente: coppia di cromosomi duplicati che si appaiano con i propri omologhi (tetrate, perché formata da quattro cromatidi) nella prima fase della meiosi.

Autosoma: cromosoma non sessuale.

Gonosoma: cromosoma sessuale (X o Y).

MI: meiosi I (fase riduzionale).

MII: meiosi II (fase equazionale).

Monosomia: mancanza di un cromosoma di una coppia di cromosomi omologhi.

Disomia: presenza di un cromosoma in eccesso a livello del singolo gamete (per mancata disgiunzione meiotica).

FIVET: Fecondazione *In Vitro* ed Embrio Transfert.

FISH: *Fluorescent In Situ Hybridization* = ibridazione *in situ* con sonde fluorescenti.

PND: *PreNatal Diagnosis* = diagnosi prenatale.

PGD: *Preimplantation Genetic Diagnosis* = diagnosi preimpianto (analisi dei blastomeri dell'embrione a 8 cellule mediante tecnica FISH o PCR).

PGS: *Preimplantation Genetic Screening* = screening genetico preimpianto (analisi del I e II globulo polare).

## Bibliografia

<sup>1</sup> Buwe A, Guttenbach M, Schmid M. *Effect of paternal age on the frequency of cytogenetic abnormalities in human spermatozoa*. *Cytogen Genom Res* 2005;111:213-28.

<sup>2</sup> Tacker PD. *Biological clock ticks for men, too. Genetic defects linked to sperm of older fathers*. *JAMA* 2004;291:1683-5.

<sup>3</sup> Lowe X, Eskenazi B, Nelson DO, Kidd S, Alme A, Wyrobek AJ. *Frequency of XY sperm increases with age in fathers of*

- boys with Klinefelter syndrome. *Am J Hum Genet* 2001;69:1046-54.
- 4 Kidd SA, Eskenazi B, Wyrobek AJ. *Effects of male age on semen quality and fertility: a review of literature*. *Fertil Steril* 2001;5:237-48.
  - 5 Slotter E, Schmid TE, Marchetti F, Eskenazi B, Nath J, Wyrobek AJ. *Quantitative effects of male age on sperm motion*. *Hum Reprod Advance Access* 2006;21:2868-75.
  - 6 De la Rochebrochard E, de Mouzon J, Thépot F, Thonneau P; the French National Registry (FIVNAT) association. *Fathers over 40 and increased failure to conceive: the lessons of in vitro fertilization in France*. *Fertil Steril* 2006;85:1420-4.
  - 7 Slama R, Bouyer J, Windham G, Fenster L, Werwatz A, Swan SH. *Influence of paternal age on the risk of spontaneous abortion*. *Am J Epidemiol* 2005;161:816-23.
  - 8 De la Rochebrochard E, Thonneau P. *Paternal age and maternal age are risk factors for miscarriage; results of a multicentre European study*. *Hum Reprod* 2002;17:1649-50.
  - 9 Oliver-Bonet M, Martin RH. *Studying meiosis: a review of FISH and M-FISH techniques used in the analysis of meiotic processes in humans*. *Cytogenet Genome Res* 2006;114:312-8.
  - 10 Vegetti W, Van Assche E, Frias A, Verheyen G, Bianchi MM, Bonduelle M, et al. *Correlations between semen parameters and sperm aneuploidie rates investigated by fluorescence in situ hybridisation in infertile men*. *Hum Reprod* 2000;15:351-65.
  - 11 Burello N, Vicari E, Calogero AE. *Chromosome abnormalities in spermatozoa of patients with azoospermia and normal somatic karyotype*. *Cytogenet Genome Res* 2005;111:363-5.
  - 12 Zhu JL, Madsen KM, Vestergaard M, Oelsen AV, Basso O, Olsen J. *Paternal age and congenital malformations*. *Hum Reprod* 2005;20:3173-7.
  - 13 Slotter E, Nath J, Eskenazi B, Wyrobek AJ. *Effects of male age on the frequencies of germinal and heritable chromosomal abnormalities in humans and rodents*. *Fertil Steril* 2004;81:925-43.
  - 14 Arnedo N, Templado C, Sanchez-Blanque Y, Rajmil O, Nogues C. *Sperm aneuploidie in fathers of Klinefelter's syndrome offspring assessed by multicolour fluorescent in situ hybridisation using probes for chromosomes 6, 13, 18, 21, 22, X and Y*. *Hum Reprod* 2006;21:524-8.
  - 15 Martinez-Pasarell O, Nogues C, Bosch M, Egozcue J, Templado C. *Analysis of sex chromosome aneuploidy in sperm from fathers of Turner syndrome patients*. *Hum Genet* 1999;104:345-9.
  - 16 Blanco J, Gabau E, Gomez D, Baena N, Guitart M, Egozcue J, et al. *Chromosome 21 disomy in spermatozoa of the fathers of children with trisomy 21, in a population with high prevalence of Down syndrome: increased incidence in cases of paternal origin*. *Am J Hum Genet* 1998;63:1067-72.
  - 17 Martin RH. *Mechanisms of non-disjunction in human spermatogenesis*. *Cytogenet Genome Res* 2005;111:245-9.
  - 18 Tres LL. *XY Chromosomal bivalent: nucleolar attraction*. *Mol Reprod Dev* 2005;72:1-6.
  - 19 Hall H, Hunt P, Hassold T. *Meiosis and sex chromosome aneuploidie: how meiotic errors cause aneuploidie; how aneuploidie causes meiotic errors*. *Curr Opin Genet Dev* 2006;16:323-9.
  - 20 Reichman NE, Teitler JO. *Paternal age as a risk factor for low birthweight*. *Am J Public Health* 2006;96:862-6.
  - 21 Astolfi P, De Pasquale A, Zonta LA. *Late paternity and stillbirth risk*. *Hum Reprod* 2004;19:2497-501.
  - 22 Andersen AM, Hansen KD, Andersen PK, Smith GD. *Advanced paternal age and risk of fetal death: a cohort study*. *Am J Epidemiol* 2004;160:1214-22.
  - 23 Tough SC, Faber AJ, Svenson LW, Johnston DW. *Is paternal age associated with an increased risk of low birthweight, preterm delivery, and multiple birth?* *Can J Public Health* 2003;94:88-92.
  - 24 Astolfi P, De Pasquale A, Zonta L. *Late childbearing and its impact on adverse pregnancy outcome: stillbirth, preterm delivery and low birth weight*. *Rev Epidemiol Sante Publique* 2005;53:S97-105.
  - 25 Walter CA, Intano GW, McCarrey JR, McMahan CA, Walter RB. *Mutation frequency declines during spermatogenesis in young mice but increases in old mice*. *Proc Natl Acad Sci* 1998;95:10015-9.
  - 26 Wyrobek AJ, Eskenazi B, Young S, Arnheim N, Tiemann-Boege I, Jabs EW, et al. *Advancing age has differential effects on DNA damage, chromatin integrity, gene mutations, and aneuploidies in sperm*. *Proc Natl Acad Sci* 2006;103:9601-6.
  - 27 Tiemann-Boege I, Navidi W, Grewal R, Cohn D, Eskenazi B, Wyrobek AJ. *The observed human sperm mutation frequency cannot explain the achondroplasia paternal age effect*. *PNAS* 2002;99:14952-7.
  - 28 Munnè S, Sultan KM, Weier HU, Grifo JA, Cohen J, Rosenwals Z. *Assessment of numeric abnormalities of X, Y, 18, and 16 chromosomes in preimplantation human embryos before transfer*. *Am J Obstet Gynecol* 1995;172:1191-201.
  - 29 Baart EB, Martini E, van den Berg I, Macklon NS, Galjiaard Fauser BCJM, Van Opstal D. *Preimplantation genetic screening reveals a high incidence of aneuploidy and mosaicism in embryos from young women undergoing IVF*. *Hum Reprod* 2006;21:223-33.

**Domanda 1: Esiste un effetto dell'età paterna sulla probabilità di concepimento?**

- a) No
- b) Sì, legato alle abitudini sessuali
- c) Sì, legato a fattori biologici

**Domanda 2: L'avanzata età paterna nei confronti dell'abortività è:**

- a) Fattore protettivo
- b) Fattore di rischio
- c) Indifferente

**Domanda 3: Che percentuale dei casi di sindrome di Down è riconducibile ad una responsabilità paterna?**

- a) 90%
- b) 0%
- c) 5-9%

**Domanda 4: Qual è la frequenza del cariotipo 45X0 al concepimento?**

- a) 1/2.500 casi
- b) 1/250 casi
- c) 1/25 casi

**Domanda 5: Il rischio di ricorrenza di trisomia dei cromosomi sessuali è:**

- a) Elevato
- b) 100%
- c) Basso

**Domanda 6: Qual è la percentuale stimata di aneuploidie negli aborti spontanei precoci?**

- a) 20%
- b) 50%
- c) 80%
- d) 100%

**Domanda 7: Con quale tecnica si valutano i cromosomi spermatici?**

- a) FISH
- b) Sequenziamento
- c) Microscopia elettronica
- d) DHPLC

**Domanda 8: Il cariotipo fetale 47,XXY è di origine:**

- a) Sempre materna
- b) Sempre paterna
- c) Paterna nell'80% dei casi
- d) Al 50% materna al 50% paterna

**Domanda 9: La trisomia 21 fetale:**

- a) È più spesso di origine materna
- b) Non può mai essere di origine paterna
- c) Viene sempre abortita spontaneamente
- d) Ha un'incidenza di 1 su 500 nati

**Domanda 10: Quale di queste patologie è stata associata ad età paterna avanzata?**

- a) Diabete mellito
- b) Acondroplasia
- c) Fibrosi cistica
- d) Sindrome di Down

# Il ruolo dell'eco-color-Doppler peniena dinamica nello studio del paziente con deficit erettile

## *Role of Penile Dynamic Duplex Ultrasound in the Study of Male Erectile Dysfunction*

L.M. SARTESCHI, A. AVERSA\*

Scuola di Specializzazione in Endocrinologia e Malattie del Ricambio, indirizzo Andrologia, Università di Pisa; \* Cattedra di Medicina Interna, Dip.to Fisiopatologia Medica, Università di Roma "La Sapienza", Roma

**Parole chiave:** Eco-color-Doppler peniena, Test di farmacoerezione intracavernosa, Disfunzione erettile, Pene

**Key words:** *Penile Duplex ultrasonography, Intracavernous injection pharmacotesting, Erectile dysfunction, Penis*

### Riassunto

L'eco-color-Doppler peniena dinamica rappresenta una procedura sicura, specifica e ben tollerata nell'approccio diagnostico alla disfunzione erettile maschile. Risulta utile nel discriminare la presenza di alterazioni anatomiche congenite o acquisite a carico dei corpi cavernosi (ad esempio: fibrosi, fratture e tumori) e/o dell'albuginea (morbo di La Peyronie). Quasi il 30% dei deficit erettile è determinato dalla presenza di malattie sistemiche che alterano l'irrorazione arteriosa del pene. Il solo test di iniezione intracavernosa di PGE1 non offre indicazioni circa lo stato delle arterie. In accordo con la maggiore richiesta di esami mini-invasivi, l'eco-color-Doppler peniena dinamica combinata al test di farmaco-erezione rappresenta una indagine vascolare di primo livello nello studio della funzione arteriosa e veno-occlusiva. La velocità di picco sistolico assieme alla variazione di diametro delle arterie cavernose sono indicatori di afflusso arterioso, mentre elevate velocità telediastoliche unitamente a bassi indici resistivi sono suggestivi di disfunzione del meccanismo veno-occlusivo. Questa *review* descrive in dettaglio la corretta esecuzione dell'eco-color-Doppler peniena dinamica, i quadri di normalità e la corretta interpretazione dei quadri patologici più frequentemente incontrati nella pratica clinica.

### Summary

*The penis is ideally suited to ultrasound imaging as it is a superficial structure. A number of disease processes, including Peyronie's disease, penile fractures and penile tumours, are clearly visualized with ultrasound. Almost 30% of erectile dysfunction is due to the presence of systemic disease which affects the blood supply to the penis. The intracavernosal injection test with prostaglandin E1 alone offers limited information on the vascular status. In accordance with the increasing demand for less invasive procedures, penile color-coded duplex sonography combined with the pharmaco-erection test represents a first-line non-invasive approach to investigate arterial and veno-occlusive function. Peak systolic velocity and a change in cavernous artery diameter are indicators of arterial inflow, while the high end diastolic velocity and low resistance index reveal veno-occlusive dysfunction. This pictorial review illustrates the range of normality, diseases and interpretation of those frequently occurrences with penile ultrasound.*

### Introduzione

L'impotenza sessuale di tipo vasculogenico, costituisce probabilmente la forma più frequente di deficit erettile su base organica<sup>1</sup>.

L'eco-color-Doppler peniena dinamica (ECDPD), permettendo una simultanea valutazione delle condizioni del tessuto erettile, dello stato dei vasi e delle caratteristiche del flusso ematico all'interno di essi, consente un approccio diagnostico strumentale molto semplice e non invasivo.

### Metodica d'esame

Data la notevole influenza che la psiche esercita sul fenomeno erettile<sup>2,3</sup>, è d'obbligo che l'ECDPD sia eseguita in ambiente riservato, preferibilmente con il solo operatore presente nella stanza d'esame.

L'esame si esegue con il paziente adagiato in posizione supina, invitato a tenere il pene fermo sulla linea mediana e rovesciato sul triangolo pubico, previa astensione per almeno 12 ore da nicotina e caffeina.

S'inizia con uno studio in scala dei grigi degli involucri

penieni e del tessuto erettile in condizioni di base, allo scopo di escludere lesioni di tali strutture.

Dopo questa fase preliminare, si procede alla farmaco-stimolazione con iniezione di 10 mcg di PGE1 intracavernosa, seguita da un breve massaggio atto a favorire la diffusione del farmaco.

Nei primi 5 minuti successivi all'iniezione, si osserva con il color-Doppler (CD) la progressiva dilatazione delle arterie cavernose, se ne controlla la simmetria di calibro e di flusso e si ricercano eventuali affluenti secondari.

Dopo questo primo controllo si passa allo studio con power-Doppler (PWD), allo scopo di verificare il rilasciamento delle cavernose e dei rami emergenti, valutare la morfologia di questi vasi e l'eventuale presenza di varianti anatomiche di essi.

In caso di ipertono adrenergico le cavernose mantengono aspetto a cavaturaccioli e i rami emergenti non sono visualizzabili. In tale evenienza è inoltre necessario interrogare il soggetto circa la qualità dell'erezione da lui ottenuta in corso di indagine, e cioè se di qualità non inferiore a quella ottenuta privatamente a casa ("Best Quality of Erection"). Se l'erezione ottenuta in corso di indagine è di qualità inferiore, il test non è attendibile per presenza di inibizione da laboratorio<sup>4</sup>. Si procede quindi facendo rilassare il paziente, lasciandolo solo per qualche minuto.

Per favorire il rilasciamento trabecolare alcuni Autori<sup>5</sup> suggeriscono di associare alla farmacostimolazione (componente periferica) la *Video Sexual Stimulation* (VSS) che innesca la componente centrale dell'erezione, ma tale approccio potrebbe generare in alcuni casi problemi opposti di inibizione capaci di falsare il giudizio diagnostico. A tale proposito, l'impiego di VSS (con occhiali virtuali) in ambito di valutazione dinamica della emodinamica peniena ha indagato la possibile ansia indotta dalla metodica, e non l'ha riscontrata superiore rispetto al gruppo controllo. Di contro la percentuale di indagini con ottenimento di completo rilasciamento della muscolatura liscia è risultato superiore nel gruppo VSS rispetto al gruppo controllo<sup>6</sup>. Un altro sistema, sicuramente più efficace per vincere gli stati inibitori è l'impiego della cosiddetta "triple drug mixture", che utilizza la associazione di PGE1, Papaverina e Fentolamina. La maggiore incidenza di effetti collaterali (dal priapismo alla crisi ipotensiva) tuttavia consiglia questo approccio solo in casi selezionati, laddove non sia stato possibile l'ottenimento della massima erezione durante il test e l'operatore sia in grado di fronteggiare potenziali (ma rari) casi di erezione prolungata<sup>7</sup>. Recentemente è stata proposta l'associazione tra sildenafil e VSS per indurre l'erezione. Noi sottoli-

neiamo il significativo prolungamento del tempo d'esame, che a nostro parere pregiudica notevolmente questo tipo di induzione dell'erezione.

Nella nostra esperienza abbiamo riscontrato, che se dopo 10-15 minuti dall'iniezione intracavernosa di PGE1 non si è ancora superata la fase di tumescenza, basta lasciare il paziente da solo per qualche minuto, in autostimolazione, senza VSS, e si riesce ad avere la risoluzione dell'ipertono adrenergico, che condiziona lo sviluppo del meccanismo veno-occlusivo. Se anche dopo tale accorgimento persiste mancanza di rigidità, noi preferiamo procedere ad un *redosing* di ulteriori 10 mcg PGE1 con associazione di fentolamina (1-2 mg/mL) ovvero clorpromazina (2,5-5 mg/mL) che, attraverso il blocco dei recettori  $\alpha$ -adrenergici, determina una riduzione dei falsi-positivi al test<sup>8</sup>.

Dopo lo studio morfologico si passa alle rilevazioni velocitometriche con il Doppler-pulsato (DP), alterando fra i due lati, allo scopo di assicurarsi la simmetria perfusionale; se si è certi che l'apporto ematico è simile, si potrà proseguire l'esame campionando solo una delle cavernose. Tali rilevazioni proseguiranno poi fino al raggiungimento dell'erezione.

È importante che la valutazione con DP sia effettuata avendo cura di posizionare il volume campione all'origine dell'arteria cavernosa. Questo accorgimento è necessario perché, in primo luogo, è evidente una progressiva riduzione della velocità di flusso nelle sedi più distali delle arterie e, secondariamente, perché l'aumento della pressione intracavernosa provoca anche una progressiva compressione dei vasi, che però è meno intensa alla loro origine dal pavimento pelvico. Nello stato di massima erezione si completa lo studio in scala dei grigi dei rivestimenti e del tessuto erettile (alcune placche di IPP si rendono manifeste solo in questo modo). Se vi sono segni di ipoafflusso arterioso sarà buona norma includere nell'esame anche lo studio dell'aorta addominale e delle arterie iliache comuni (molto difficile è il rilevamento delle ipogastriche), allo scopo di documentare eventuali segni di coinvolgimento prossimale della patologia arteriosa<sup>9</sup>. Al termine dell'esame, raccomandiamo di esprimere un giudizio clinico sul raggiungimento dello stato di erezione del paziente (Tab. I).

## Analisi ragionata del velocitogramma arterioso

### ANALISI QUALITATIVA

Nella forma dell'onda Doppler si riconoscono agevolmente la componente sistolica e la componente

**Tab. I.** Modalità di valutazione clinica dell'erezione dopo test di farmacoerezione. *In-office evaluation of erection by the examiner after pharmacoerection test.*

Tipo erezione 1	Tumescenza massima con o senza rigidità, durata insufficiente
Tipo erezione 2	Semirigidità, valida per la penetrazione
Tipo erezione 3	Massima rigidità, con o senza durata eccessiva

diastolica. Nei tracciati “a basse resistenze periferiche” la fase sistolica inizia con una ripida ascesa, che culmina con un picco acuminato. Da qui il tracciato ridiscende meno bruscamente e termina, talora con una piccola incisura, dando inizio alla fase diastolica, a sua volta caratterizzata da una deflessione dolcemente inclinata verso la linea di base, che si mantiene però costantemente positiva. Nei tracciati “ad alte resistenze periferiche” la fase sistolica inizia, analogamente, con una ripida ascesa, culminante in un picco aguzzo. Diversamente dal precedente tipo di velocitogramma però, qui il tracciato discende con simile ripidezza e termina con una deflessione negativa, inizio della fase diastolica, che rapidamente riguadagna la linea di base.

Se con l'iniezione dei farmaci vaso-attivi si potesse abolire, in tutti i pazienti, ogni controllo inibitorio funzionale del tono della muscolatura liscia trabecolare, la semplice osservazione dello svolgimento delle fasi consentirebbe di esprimere un giudizio soddisfacente sulla qualità del meccanismo veno-occlusivo. In tal caso si potrebbero diagnosticare con certezza le forme di impotenza c.d. “venogenica” su base organica. Purtroppo, come abbiamo anticipato, ciò non è possibile in tutti i casi.

### ANALISI QUANTITATIVA

Tra i diversi parametri usati in diagnostica vascolare per la quantificazione dei flussi, solo alcuni si dimostrano utili nello studio dell'impotenza e questi sono: la velocità di picco sistolico (VPS), il tempo di accelerazione (AT) e la velocità telediastolica (VTD). I valori dei tre parametri sono rapidamente ottenibili con il software del sistema adoperato.

### Velocità di picco sistolico

La velocità di picco sistolico (“*peak systolic velocity*” – PSV), espressa in cm/sec, indica la massima velocità di flusso rilevabile in sistole, nei diversi campionamenti eseguiti durante l'esame. Tuttavia, perché la misurazione sia affidabile, è necessario puntualizzare alcuni accorgimenti tecnici:

1. bisogna porre il volume campione all'origine della cavernosa in esame<sup>10</sup>. Misurazioni effettuate in sedi più distali forniscono dati diversi e risentono maggiormente del grado di replezione dei corpi cavernosi;
2. è necessario essere certi di aver campionato l'arteria cavernosa principale<sup>11 12</sup>. Non sono infrequenti infatti rami arteriosi omolaterali secondari, che hanno una velocità di flusso decisamente inferiore;
3. bisogna aver cura di posizionare con precisione l'angolo di correzione Doppler, secondo l'effettiva direzione del flusso, poiché è in base a questo strumento che l'apparecchiatura riesce a calcolare la velocità di flusso;
4. benché la massima VPS si sviluppi in genere dopo 5-6 minuti dalla farmacostimolazione, il 22% dei pazienti ha una maggiore latenza di risposta (range 1-18 minuti)<sup>13</sup>. La valutazione della VPS dovrà pertanto proseguire per almeno 20 minuti.

A questo riguardo si deve tener presente che nei soggetti particolarmente ansiosi si può sviluppare un ipertono adrenergico persistente dopo l'iniezione di PGE1<sup>14</sup>. Tale situazione, che di solito compromette il meccanismo veno-occlusivo, talora può impedire perfino il rilasciamento delle arterie cavernose e dei loro rami terminali. In questi casi le velocità di picco sistolico si mantengono basse; l'uso oculato del CD o del PWD consente di rilevare un caratteristico aspetto “a cavaturaccioli” delle cavernose e l'assenza di visualizzazione dei rami emergenti. L'ipertono adrenergico solitamente si risolve tranquillizzando e lasciando solo il paziente per qualche minuto dopo la farmacostimolazione: le arterie si rilasciano e i tracciati velocitometrici si normalizzano. In caso contrario, come già suggerito in precedenza, l'utilizzo di un  $\alpha$ -litico può notevolmente migliorare l'accuratezza dell'esame soprattutto nei soggetti molto giovani in cui la componente ansiosa è predominante (< 30 anni), permettendo una migliore visualizzazione al PWD delle arteriole elicine. Vogliamo qui ricordare che non sono solo i soggetti giovani ed ansiosi che possono mostrare ipertono (nor)adrenergico in sede di indagine, ma anche soggetti che, pur di base non ansiosi, sviluppano per loro carattere, sensibilità, livello culturale una inibizione da laboratorio in sede di indagine. Segnaliamo infine che un'altra indagine dinamica peniena, la cavernosometria, è invece capace di monitorare l'entità del rilasciamento della muscolatura liscia in corso di indagine, anche se rappresenta una indagine invasiva e da praticare soltanto in ambiente altamente specializzato.

Se si applicano i suggerimenti sopra esposti, la misurazione della VPS costituisce un criterio fondamentale per la diagnosi del deficit erettile<sup>15-19</sup>. Studi comparativi con farmaco-arteriografia hanno infatti dimostrato che il valore soglia, al di sotto del quale si deve sospettare un'alterazione arteriosa, è 35 cm/sec. Fra 34 e 30 cm/sec si può parlare di ipoafflusso arterioso lieve; fra 25 e 29 cm/sec, di ipoafflusso arterioso medio; al di sotto di 25 cm/sec, di ipoafflusso arterioso grave<sup>20</sup>.

È stato altresì suggerito che la VPS è un parametro che correla inversamente con l'età; è quindi possibile correggere la VPS per età del paziente (Tab. II). In ogni caso, una VPS molto bassa (< 25 cm/s) deve far porre il sospetto di una malattia vascolare diffusa e suggerisce di estendere la valutazione ecografica alle arterie di altri distretti corporei che in tali casi possono essere coinvolti nel 75% dei casi<sup>21</sup>. Si deve peraltro notare che vi sono numerosi pazienti che a fronte di valori di VPS maggiori di 25 cm/sec presentano comunque una significativa arteriopatìa all'esame angiografico<sup>22</sup>, e pazienti con evidente arteriopatìa al PWD delle cavernose possono presentare valori di VPS assolutamente normali<sup>23</sup>. Infine, è stato dimostrato che soggetti con arterie comunicanti valide (dorso-cavernose e cavernose accessorie con flussi comparabili con quelli dei tronchi principali) possono raggiungere un'erezione valida anche con valori di VPS più bassi di quelli ritenuti normali<sup>24</sup>. Già in passato alcuni Autori avevano criticato la validità assoluta di questo indice<sup>25</sup> e in anni recenti un ulteriore elemento di dubbio è emerso da un lavoro in cui si dimostrava la scarsa riproducibilità dell'ECD nel follow-up dei pazienti impotenti<sup>26</sup>. Pertanto, la velocità di picco sistolico è da ritenersi un parametro valido per la diagnosi morfo-funzionale del deficit erettile, ma non in valore assoluto per quanto riguarda la malattia vascolare sistemica<sup>27</sup>.

**Tab. II.** Valori normali di VPS corretti per età. *Age-adjusted normal PSV values [according to Caretta et al., Int J Impotence Res 2006;18:306-10].*

Età (anni)	Valori normali di picco sistolico (cm/s)
40	> 34,5
45	> 38
50	> 41,5
55	> 45
60	> 48,5
65	> 52
70	> 55,5

Alcuni Autori infine hanno recentemente proposto la valutazione della VPS a pene flaccido<sup>28</sup> che noi riteniamo poco utile ai fini di uno studio vascolare accurato della dinamica erettiva. Lo stato di flaccidità infatti, non consente all'operatore di valutare l'entità dell'erezione (*Best Quality of Erection*) ed in particolare la corretta funzionalità del meccanismo veno-occlusivo, né tantomeno fornisce indicazioni morfologiche sul riempimento delle arterie cavernose che dovrebbe essere seguito durante l'erezione.

### Tempo di accelerazione

Il tempo di accelerazione (AT "acceleration time", o SRT, "systolic rise time"), espresso in millisecondi (msec), è il tempo misurato dalla partenza del picco sistolico fino al suo massimo valore. Il suo significato corrisponde a quello della celerità del polso. Esso solitamente rallenta nelle arteriopatie obliteranti<sup>29</sup>: la branca ascendente si fa tarda, l'apice si arrotonda e la velocità di flusso si riduce ("polso piccolo e tardo"). Correlando i dati dell'ECD con quelli della farmaco-arteriografia, alcuni Autori hanno trovato che tempi di accelerazione superiori alla soglia di 110 msec hanno un valore predittivo positivo per arteriopatìa molto elevato<sup>30</sup>. Tuttavia questo parametro è molto variabile durante l'esecuzione dell'esame, pertanto riteniamo debba essere valutato in maniera molto critica dall'esaminatore, al fine di potere esprimere un giudizio diagnostico accurato.

Utilizzando solo questo parametro, resta tuttavia difficile differenziare fra arteriopatìa ed arteriopatìa. Eppure è stato dimostrato che anche dall'alterazione delle arterie terminali può derivare un deficit erettile conseguente a disfunzione del meccanismo veno-occlusivo<sup>31</sup>.

In arteriografia si sospetta una disfunzione arteriolare quando le branche delle elicine sono scarsamente visualizzabili negli ingrandimenti degli arteriogrammi, a dispetto di una buona visualizzazione delle arterie peniene<sup>32</sup>. Tale criterio può essere correttamente applicato anche alla diagnostica con ECD. L'analisi morfologica del pattern vascolare ottenibile con il power-Doppler ha ampiamente confermato l'esistenza del danno primitivamente arteriolare, dimostrando in alcuni pazienti il restringimento, la distorsione e la rarefazione di questi piccoli vasi.

### Velocità di fine diastole e indice di resistenza

La velocità di fine diastole ("end diastolic velocity" – VTD), espressa in cm/sec, indica la quantità di



flusso ancora presente in un vaso al termine della fase diastolica. L'equivalente semiquantitativo di tale parametro è l'indice di resistenza ("resistance index" – RI), che risulta dalla formula  $PSV-VTD/PSV$  ed esprime il grado di resistenza periferica al flusso.

Alcuni Autori, sulla base dei dati della cavernosometria, sostengono che una velocità di fine diastole persistentemente maggiore o uguale a 4,5-5 cm/sec dopo farmaco-stimolazione, in presenza di un normale afflusso arterioso, sarebbe indicativo di deficit veno-occlusivo<sup>33-35</sup>.

Altri attribuiscono una notevole importanza all'indice di resistenza<sup>36</sup>. Un RI maggiore di 0,90 indicherebbe uno stato di normalità, mentre un RI inferiore a 0,75 sarebbe suggestivo di "fuga venosa". Per valori compresi tra 0,75 e 0,90 si avrebbe una sovrapposizione di pazienti normali e pazienti con deficit veno-occlusivo<sup>37</sup>. Abbiamo però visto precedentemente che l'informazione relativa al grado di veno-occlusione è ottenibile più semplicemente con l'analisi morfologica della curva velocitometrica, la cui forma consente di intuire addirittura l'entità della pressione endocavernosa<sup>38</sup>. Per di più, quando la forma dell'onda inizia a riflettere una maggiore pulsatilità, l'uso dell'RI diventa assolutamente non appropriato, poiché velocitogrammi diversi, tipici di differenti gradi di resistenza, possono avere indici identici. Infine, la difficoltà a differenziare fra deficit veno-occlusivo funzionale ed organico non è rimossa dall'uso di questi parametri. Per tali motivi noi riteniamo che più del valore assoluto della velocità di fine diastole e dell'indice di resistenza, sia il raggiungimento stabile della fase 3 e 4 (azzeramento od inversione della fase diastolica) ad indicare il raggiungimento di un'adeguata pressione intracavernosa e di conseguenza un corretto funzionamento del meccanismo veno-occlusivo. Allo stato attuale delle conoscenze, la diagnosi di falso positivo di disfunzione veno-occlusiva<sup>2</sup> rappresenta un reale problema interpretativo della metodica, e noi suggeriamo una ripetizione dell'esame per una migliore accuratezza diagnostica qualora il *re-dosing* con mix farmacologico non sia stato efficace nell'indurre un rilasciamento completo della muscolatura liscia cavernosa.

Nella nostra esperienza, riteniamo abbandonati criteri diagnostici come i parametri relativi all'incremento di diametro delle arterie cavernose e la valutazione della velocità di flusso nella vena dorsale profonda.

## ECD peniena dinamica: quadro normale

### ECOGRAFIA IN SCALA DEI GRIGI

I corpi cavernosi del pene, del glande e la spongiosa uretrale sono ben visualizzabili in ogni loro porzione. A pene flaccido la complessa stratificazione anatomica del pene è solo parzialmente risolvibile, mentre una migliore visualizzazione si ottiene durante la tumescenza. Cute, sottocutaneo e dartos non sono sempre facilmente separabili. Una sottilissima, e spesso non delimitabile, linea iperecogena, ci segnala l'interfaccia costituita dalla fascia del pene. Subito al di sotto di essa si trova uno strato ecogeno costituito dal connettivo vascolare esterno all'albuginea, nel quale decorrono le vene circonflesse e il fascio nerveo-vascolare, dorsalmente. Lo strato successivo è l'albuginea, che appare in sezione assiale come una fascia ipoecogena ben misurabile, di spessore uniforme, disposta attorno ai corpi cavernosi (Fig. 1).

L'ecostruttura normale dei corpi cavernosi ha una ecogenicità media, abbastanza omogeneamente distribuita, dovuta alle molteplici interfacce realizzate dai setti. Durante l'erezione l'albuginea si assottiglia progressivamente, mentre nei corpi cavernosi si assiste alla

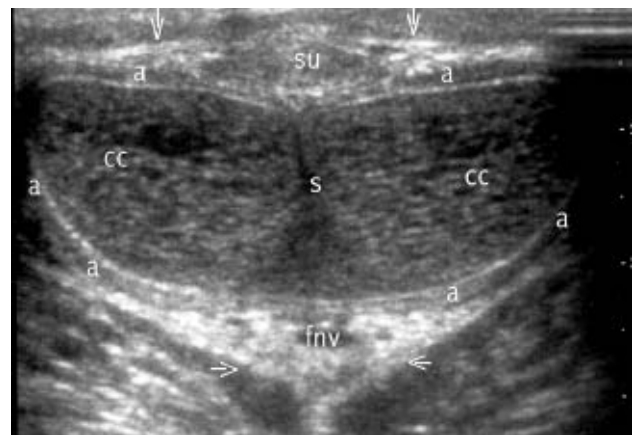


Fig. 1. Esame in scala dei grigi. Scansione assiale, ventro-dorsale, del pene in tumescenza. Nei corpi cavernosi (cc) si evidenziano le lacune dilatate. L'albuginea (a) è dimostrabile come una fascia ipoecogena di spessore misurabile delimitata tra due sottilissime interfacce iper-riflettenti. Axial, ventro-dorsal grey-scale scanning of the tumescent penis. Dilated "lacunae" of the corpora cavernosa (cc) are visible. Tunica albuginea (a) is represented by a hypoechoic strip between two thin hyperechoic layers.

Freccie: fascia di Buck; fnv: fascio nerveo-vascolare; su: spongiosa uretrale. Arrows: Buck's fascia; fnv: neurovascular bundle; su: urethral spongiosum.

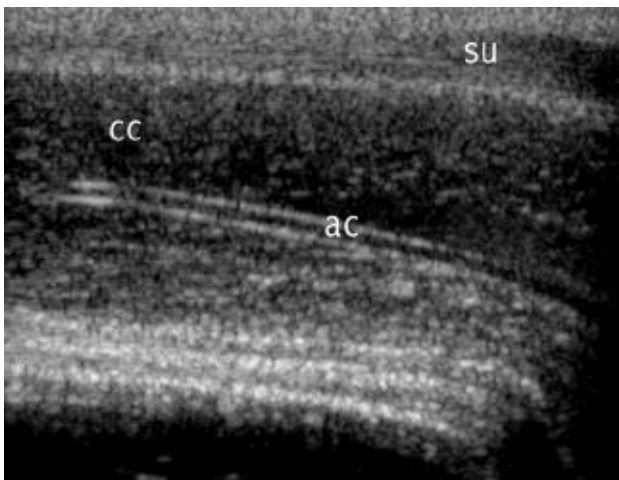


Fig. 2. Esame in scala dei grigi. Arteria cavernosa (ac) in tumescenza. Grey-scale sagittal scanning of tumescence cavernous artery (ac).

cc: corpo cavernoso; su: parte della spongiosa uretrale. cc: corpus cavernosus; su: part of urethral spongiosum.

dilatazione delle lacune, specialmente di quelle centrali, periarteriose, con evidenziazione delle trabecole. Le arterie cavernose appaiono come due sottili binari iper-ecogeni parasettali nelle scansioni sagittali (Fig. 2).

In questa fase è possibile, mediante una tecnica non invasiva ormai validata<sup>39</sup>, studiare la capacità funzionale dell'endotelio cavernoso a rilasciare nitrosido dopo occlusione mediante cuffia. Tale metodica è in grado di identificare con precisione (*cut-off* per la *flow-mediated-dilatation* del 40%), in assenza di altri parametri patologici, la presenza di disfunzione endoteliale precoce e quindi di spiegare numerose condizioni in cui i parametri emodinamici risultino nei limiti della norma dopo l'esame dinamico<sup>40</sup>.

### COLOR-DOPPLER

A pene flaccido le arterie cavernose sono ben visualizzabili solo all'origine. Nei minuti immediatamente successivi all'iniezione del farmaco si osserva una netta, simmetrica, dilatazione delle arterie, che diventano esplorabili in tutta la loro lunghezza; anche i tronchi emergenti principali si rendono evidenti. Il colore delle arterie, inizialmente rosso perché il flusso è diretto verso la sonda, tende a diventare blu. Ciò avviene perché, come abbiamo visto, nel paziente normale si sviluppa una progressiva riduzione del flusso diastolico, fino alla sua inversione. Poiché il tempo di diastole è superiore al periodo sistolico, il segnale dominante risulta essere quello del reflusso

diastolico, in allontanamento rispetto alla sonda e perciò codificato in blu.

Nel periodo successivo alla stimolazione farmacologica diventano ben evidenti gli eventuali affluenti secondari e i normali vasi comunicanti, come le arterie trans-settali e le anastomosi cavernoso-spongiose.

### POWER-DOPPLER

Il power-Doppler rende possibile una vera e propria "eco-angiografia" delle cavernose e dei rami da esse emergenti (Fig. 3)<sup>41</sup>. Il quadro normale dimostra la regolarità del calibro e del decorso delle cavernose.

### DOPPLER PULSATO

In condizioni di flaccidità la curva velocitometrica presenta i caratteri tipici dei flussi ad alto indice di resistenza. Il picco sistolico normale supera abbondantemente i 12 cm/sec, è acuminato ed è seguito da una brusca deflessione, che si negativizza nella protodiastole.

Nei primi minuti dopo l'iniezione del farmaco il velocitogramma sale notevolmente con il picco sistoli-

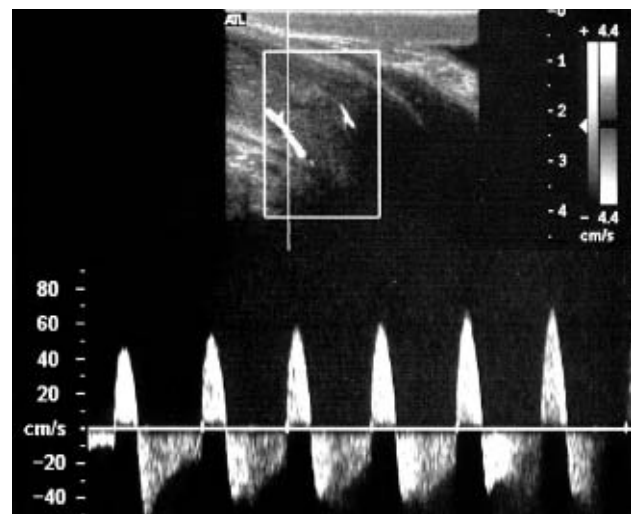


Fig. 3. La fase 5 completa il ciclo dei mutamenti della forma dell'onda durante l'erezione. In questa fase si assiste ad una contemporanea riduzione sia del picco sistolico che del flusso diastolico invertito. A questa fase corrispondono dagli 83 ai 105 mmHg di pressione endocavernosa. Phase 5 ultimates the changes of the wave form during the erection phase, with concomitant reduction of both PSV and VTD (inversion). In this phase, intracavernous pressure approximates 83-105 mmHg.

1. VPS > 35 cm/sec. 2. AT < 110 m/sec. 3. VTD ≤ 0 cm/sec. 1. Peak systolic rate > 35 cm/sec. 2. Acceleration time < 110 m/sec. 3. Telediastolic rate ≤ 0 cm/sec.

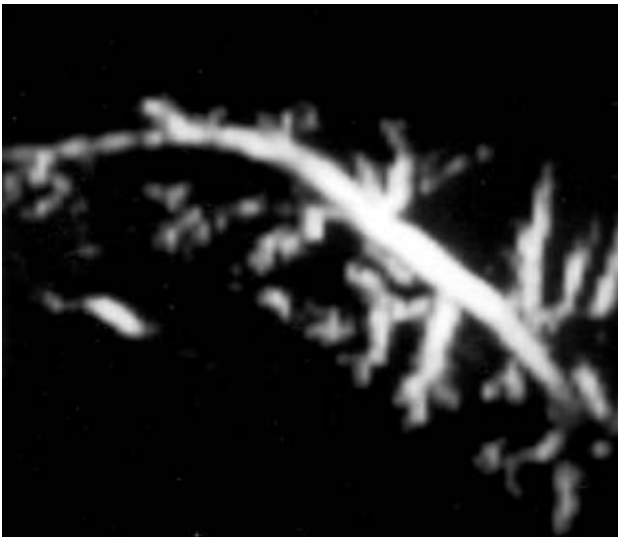


Fig. 4. Valutazione morfologica con power-Doppler. Arteria cavernosa ben distesa con rami emergenti ben dimostrabili fino al terzo grado di ramificazione. *Power-doppler morphological evaluation. The cavernous artery is well relaxed and emergent roots are visible until the third degree ramifications.*

co e ha l'aspetto di un'onda continua per la presenza di un'elevata componente di flusso diastolico (Fase 1). Entro 5'-7' solitamente si raggiunge la massima PSV e già si osserva un progressivo calo della velocità di flusso diastolico, con la comparsa di un'onda dicrota all'inizio della diastole (Fase 2). Fra i 5 e i 10 minuti si ha la progressione alle fasi 3 e 4, con l'azzeramento prima, e il sottoslivellamento poi, della curva di flusso diastolico. La fase 5 (erezione piena) non sempre viene raggiunta; la contrazione volontaria dei muscoli bulbocavernosi ne favorisce l'ottenimento (Fig. 4). In linea di massima, i parametri quantitativi dell'ECD normale possono essere così riassunti:

## Conclusioni

L'avvento della terapia orale per il DE ne ha sicuramente ridimensionato l'iter diagnostico. Non si può

## Bibliografia

- 1 Fabbri A, Caprio M, Aversa A. *Pathology of erection*. J Endocrinol Invest 2003;26(Suppl 3):87-90.
- 2 Aversa A, Isidori AM, Caprio M, Cerilli M, Frajese V, Fabbri A. *Penile pharmacotesting in diagnosing male erectile dys-*

negare il fatto che, se si esclude la terapia ormonale per le endocrinopatie, sono solo tre i presidi terapeutici impiegabili in progressione, dal meno al più invasivo: 1) la terapia orale, 2) la farmacoinfusione endocavernosa, 3) la protesi peniena o i dispositivi *ex-vacuo*. Ci si può giustamente chiedere quale valore possano avere ancora gli studi con NPT, con ECDPD, o con cavernosometria, quando, per qualunque causa di DE, avremo sempre un'unica terapia (orale) di primo livello e comunque con un semplice test con farmaci orali sarà possibile capire quali ulteriori mosse diagnostiche e terapeutiche è necessario intraprendere <sup>42</sup>.

Noi riteniamo che l'ECDPD abbia un ruolo diagnostico fondamentale nel giovane paziente con DE primario ovvero secondario a trauma della pelvi, del perineo e del pene. La possibilità di restituire la normale funzione erettile con un intervento di rivascularizzazione, liberando il paziente dal bisogno di farmaci, costituisce senz'altro un'indicazione assoluta alla diagnosi.

L'importanza del riconoscimento dell'eziologia del DE è stata comunque ribadita recentemente anche nel soggetto anziano <sup>43</sup>. A tale proposito, si vuole ricordare come una esecuzione di una ECDPD prima della prescrizione di farmaci orali, possa essere spesso predittiva di efficacia degli stessi. I dati indicano infatti che esiste una correlazione tra la natura e la severità del danno vascolare penieno e la risposta a farmaci orali quali il sildenafil, con una minore risposta osservata in presenza di disfunzione venocclusiva severa ovvero di DE di tipo misto <sup>44</sup>.

Vogliamo infine sottolineare che il DE può essere il primo campanello d'allarme per i pazienti a rischio vascolare <sup>45 46</sup>. L'esecuzione di una ECDPD in maniera corretta è in grado di riconoscere varie forme di vasospasmo, senza che il paziente abbia coscienza di questa sua somatizzazione dell'ansia. Riteniamo che lo studio dinamico penieno debba pertanto essere eseguito da mani esperte, in quanto, se positivo per arteriopatia, dovrà comprendere quanto meno anche un esame morfologico dell'aorta, dei vasi iliaci, delle femorali e delle biforcazioni carotidiche, alla ricerca di lesioni misconosciute che potrebbero mettere a rischio la vita stessa del paziente.

*function: evidence for lack of accuracy and specificity.* Int J Androl 2002;25:6-10.

<sup>3</sup> Allen RP, Engel RM, Smolev JK, Brendler CB. *Comparison of duplex ultrasonography and nocturnal penile tumescence in evaluation of impotence.* J Urol 1994;151:1525-9.

<sup>4</sup> Pescatori ES, Hatzichristou DG, Namburi S, Goldstein I. A

- positive intracavernous injection test implies normal veno-occlusive but not necessarily normal arterial function: a hemodynamic study. *J Urol* 1994;151:1209-16.
- 5 Montorsi F, Guazzoni G, Barbieri L, Galli L, Rigatti P, Pizzini G, et al. *The effect of intracorporeal injection plus genital and audiovisual sexual stimulation versus second injection on penile color Doppler sonography parameters.* *J Urol* 1996;155:536-40.
  - 6 Pescatori ES, Silingardi V, Galeazzi GM, Rigatelli M, Ranzi A, Artibani W. *Audiovisual sexual stimulation by virtual glasses is effective in inducing complete cavernosal smooth muscle relaxation: a pharmacocavernosometric study.* *Int J Impot Res* 2000;12:83-90.
  - 7 Sarteschi LM, Littara A, Rossi P, Simi S, Turchi P, Sciboma M, et al. *Farmaci e metodiche di esecuzione dell'eco-color-Doppler peniena dinamica.* *Giorn It Androl* 1996;4:130-3.
  - 8 Aversa A, Bonifacio V, Moretti C, Frajese G, Fabbri A. *Redosing of prostaglandin-E1 versus prostaglandin-E1 plus phentolamine in male erectile dysfunction: a dynamic color power Doppler study.* *Int J Impot Res* 2000;12:33-40.
  - 9 Leriche R, Morel A. *The syndrome of thrombotic obliteration of aortic bifurcation.* *Ann Surg* 1948;127:193-20.
  - 10 Kim SH, Paick JS, Lee SE, Choi BI, Yeon KM, Han MC. *Doppler sonography of deep cavernosal artery of the penis: variation of peak systolic velocity according to sampling location.* *J Ultrasound Med* 1994;13:591-4.
  - 11 Jarow JP, Pugh VW, Routh WD, Dyer RB. *Comparison of penile duplex ultrasonography to pudendal arteriography. Variant penile arterial anatomy affects interpretation of duplex ultrasonography.* *Invest Radiol* 1993;28:806-10.
  - 12 Chiou RK, Alberts GL, Pomeroy BD, Anderson JC, Carlson LK, Anderson JR, et al. *Study of cavernosal arterial anatomy using color and power Doppler sonography: impact on hemodynamic parameter measurement.* *J Urol* 1999;162:358-60.
  - 13 Patel U, Amin Z, Friedman E, Vale J, Kirby RW, Lees WR. *Colour flow and spectral Doppler imaging after papaverine-induced penile erection in 220 impotent men: study of temporal patterns and the importance of repeated sampling, velocity asymmetry and vascular anomalies.* *Clin Radiol* 1993;48:18-24.
  - 14 Aversa A, Rocchietti-March M, Caprio M, Giannini D, Isidori A, Fabbri A. *Anxiety-induced failure in erectile response to intracorporeal prostaglandin-E1 in non-organic male impotence: a new diagnostic approach.* *Int J Androl* 1996;19:307-13.
  - 15 Lue TF, Hricak H, Marich KW, Tanagho EA. *Vasculogenic impotence evaluated by high-resolution ultrasonography and pulsed Doppler spectrum analysis.* *Radiology* 1985;155:777-81.
  - 16 Kryszewicz S, Mellinger BC. *The role of imaging in the diagnostic evaluation of impotence.* *Am J Roentgenol* 1989;153:1133-9.
  - 17 Quam JP, King BF, James EM, Lewis RW, Brakke DM, Ilstrup DM, et al. *Duplex and color Doppler sonographic evaluation of vasculogenic impotence.* *Am J Roentgenol* 1989;153:1141-7.
  - 18 Benson CB, Vickers MA. *Sexual impotence caused by vascular disease: diagnosis with duplex sonography.* *Am J Roentgenol* 1989;153:1149-53.
  - 19 Meuleman EJ, Bemelmans BL, van Asten WN, Doesburg WH, Skotnicki SH, Debruyne FM. *Assessment of penile blood flow by duplex ultrasonography in 44 men with normal erectile potency in different phases of erection.* *J Urol* 1992;147:51-6.
  - 20 Benson CB, Aruny JE, Vickers MA Jr. *Correlation of duplex sonography with arteriography in patients with erectile dysfunction.* *Am J Roentgenol* 1993;160:71-3.
  - 21 Vicari E, Arcidiacono G, Di Pino L, Signorelli S, Arancio A, Sorrentino F, et al. *Incidence of extragenital vascular disease in patients with erectile dysfunction of arterial origin.* *Int J Impotence Res* 2005;17:277-82.
  - 22 Valji K, Bookstein JJ. *Diagnosis of arteriogenic impotence: efficacy of duplex sonography as a screening tool.* *Am J Roentgenol* 1993;160:65-9.
  - 23 Sarteschi LM, Montorsi F, Fabris FM, Guazzoni G, Lencioni R, Rigatti P. *Cavernous arterial and arteriolar circulation in patients with erectile dysfunction: a power Doppler study.* *J Urol* 1998;159:428-32.
  - 24 Mancini M, Bartolini M, Maggi M, Innocenti P, Forti G. *The presence of arterial anatomical variations can affect the results of duplex sonographic evaluation of penile vessels in impotent patients.* *J Urol* 1996;155:1919-23.
  - 25 Raijfer J, Canan V, Dorey FJ, Mehringer MC. *Correlation between penile angiography and duplex scanning of cavernous arteries in impotent men.* *J Urol* 1990;143:1128-30.
  - 26 Millis RD, Sethia KK. *Reproducibility of penile arterial colour duplex ultrasonography.* *Br J Urol* 1996;78:109-12.
  - 27 Bocchio M, Scarpelli P, Necozone S, Pelliccione F, Spartera C, Francavilla F, et al. *Penile duplex pharmaco-ultrasonography of cavernous arteries in men with erectile dysfunction and generalized atherosclerosis.* *Int J Androl* 2006;29:496-501.
  - 28 Roy C, Saussine C, Tuchmann C, Castel E, Lang H, Jacqmin D. *Duplex Doppler sonography of the flaccid penis: potential role in the evaluation of impotence.* *J Clin Ultrasound* 2000;28:290-4.
  - 29 Bagi P, Sillesen H, Hansen HJ. *Quantitative Doppler ultrasound evaluation of occlusive arterial disease in the lower limb.* *Eur J Vasc Surg* 1988;2:409-15.
  - 30 Speel TGW, Van Langen H, Wijkstra H, Meuleman EJH. *Penile duplex pharmaco-ultrasonography revisited: revalidation of the parameters of the cavernous arterial response.* *J Urol* 2003;169:216-20.
  - 31 Wespes E, Raviv G, Vanegas JP, Decaestecker C, Petein M, Danguy A, et al. *Corporeal veno-occlusive dysfunction: a distal arterial pathology?* *J Urol* 1998;160:2054-7.
  - 32 Bookstein JJ, Valji K. *The arteriolar component of impotence: a possible paradigm shift.* *Am J Roentgenol* 1991;157:932-4.
  - 33 Fitzgerald SW, Erickson SJ, Foley WD, Lipchik EO, Lawson TL. *Color Doppler sonography in the evaluation of erectile dysfunction: patterns of temporal response to papaverine.* *Am J Roentgenol* 1991;157:331-6.
  - 34 Wilkins CJ, Sriprasad S, Sidhu PS. *Colour Doppler ultrasound of the penis.* *Clin Radiol* 2003;58:514-23.
  - 35 Cornud F, Boisrond L, Bonnel D, Dadoun D, Casanova JM,

- Lepage T, et al. *Color Doppler echography in the exploration of vasculogenic impotence*. *Progr Urol* 1992;2:420-6.
- <sup>36</sup> Merckx LA, De Bruyne RM, Goes E, Derde MP, Keuppens F. *The value of dynamic color duplex scanning in the diagnosis of venogenic impotence*. *J Urol* 1992;148:318-20.
- <sup>37</sup> Altinkilic B, Hauck EW, Weidner W. *Evaluation of penile perfusion by color-coded duplex sonography in the management of erectile dysfunction*. *World J Urol* 2004;22:361-4.
- <sup>38</sup> Aversa A, Bertucci B, Bonifacio V, Isidori A, Fabbri A. *The use of dynamic Doppler color ultrasonography of the penis in the study of erectile dysfunction*. *Radiol Med* 1999;97:499-505.
- <sup>39</sup> Virag R, Floresco J, Richard C. *Impairment of shear-stress-mediated vasodilation of cavernous arteries in erectile dysfunction*. *Int J Impotence Res* 2004;16:39-42.
- <sup>40</sup> Aversa A, Greco E, Bruzziches R, Pili M, Rosano G, Spera G. *Relationship between chronic tadalafil administration and improvement of endothelial function in men with erectile dysfunction: a pilot study*. *Int J Impotence Res*, Advance Online Publication, 31 Agosto 2006.
- <sup>41</sup> Montorsi F, Sarteschi M, Maga T, Guazzoni G, Menchini Fabris GF, Rigatti P, et al. *Functional anatomy of cavernous helicine arterioles in potent subjects*. *J Urol* 1998;159:808-10.
- <sup>42</sup> Foresta C, Caretta N, Aversa A, Bettocchi C, Corona G, Mariani S, et al. *Erectile dysfunction: symptom or disease?* *J Endocrinol Invest* 2004;27:80-95.
- <sup>43</sup> Aversa A, Bruzziches R, Spera G. *Diagnosing erectile dysfunction: the penile dynamic colour duplex ultrasound revisited*. *Int J Androl* 2005;28(Suppl 2):61-3.
- <sup>44</sup> Mulhall J, Barnas J, Aviv N, Anderson M, Parker M. *Sildenafil citrate response orrelates with the nature and the severity of penile vascular insufficiency*. *J Sex Med* 2005;2:104-8.
- <sup>45</sup> Kirby M, Jackson G, Betteridge J, Friedli K. *Is erectile dysfunction a marker for cardiovascular disease?* *Int J Clin Pract* 2001;55:614-8.
- <sup>46</sup> Aversa A, Bruzziches R, Pili M, Spera G. *Phosphodiesterases type 5 inhibitor drugs in the treatment of erectile dysfunction*. *Curr Pharm Des* 2006;12:3467-84.

**Domanda 1: Una risposta positiva al test di farmacoerezione intracavernosa è indicativa di:**

- a) Corretto funzionamento del meccanismo venocclusivo
- b) DE organica
- c) Nessuna delle due
- d) DE mista
- e) DE psicogena

**Domanda 2: Quale esame viene considerato di primo livello nella diagnostica vascolare della DE?**

- a) Il test di farmacoerezione intracavernosa di farmaci vasoattivi
- b) La TC multistrato
- c) L'eco-color-Doppler penieno dinamico (ECDPD)
- d) Arteriografia selettiva
- e) Cavernosometria/grafia

**Domanda 3: Quali sono i tempi di esecuzione delle scansioni delle arterie cavernose durante ECDPD?**

- a) 0, 10, 20 min
- b) 0, 20, 40 min
- c) 0, 30 min
- d) 0, 5, 10, 20 min
- e) Nessuna delle precedenti

**Domanda 4: Qual è il valore soglia della VPS all'ECDPD per il sospetto diagnostico di arteriopatia?**

- a) 30 cm/s
- b) 35 cm/s
- c) È un parametro età-correlato
- d) Nessuna delle precedenti
- e) Tutte le precedenti

**Domanda 5: L'aspetto della componente diastolica della curva velocitometrica fornisce un'indicazione indiretta:**

- a) Della pressione raggiunta all'interno dei corpi cavernosi
- b) Dell'entità dell'afflusso arterioso al pene
- c) Della velocità di flusso nella vena dorsale profonda
- d) Della velocità di flusso nelle vene cavernose
- e) Della velocità di flusso nella vena dorsale superficiale

**Domanda 6: La misurazione dei flussi arteriosi deve essere effettuata:**

- a) In una sola cavernosa, al terzo medio dell'asta
- b) Nelle due cavernose al terzo medio dell'asta
- c) All'origine del pavimento pelvico di entrambe le cavernose
- d) Nelle arterie dorsali
- e) In qualsiasi punto delle arterie cavernose

# Oligozoospermia e background genetico

## *Oligozoospermia and Genetic Background*

G. PELUSO, G. MORRONE

U.O.S. di Andrologia e Fisiopatologia della Riproduzione, A.O. di Cosenza

**Parole chiave:** ICSI, Oligozoospermia, Microdelezioni cromosoma Y, Aplogruppi cromosoma Y, Regione AZF

**Key words:** ICSI, Oligozoospermia, Y-chromosome microdeletions, Y-chromosome haplogroups, AZF region

### Riassunto

**Introduzione.** È stata ipotizzata una associazione tra danneggiamento della funzione spermatica e aplogruppi del cromosoma Y. Per di più, delezioni dei geni localizzati nella regione AZF (DAZ) sono stati descritti con un'alta frequenza negli uomini oligozoospermici. In questo studio abbiamo valutato l'incidenza delle microdelezioni del cromosoma Y in pazienti affetti da severa oligozoospermia ed una associazione di aplogruppi del cromosoma Y con questo fenotipo.

**Materiali e metodi.** 86 uomini provenienti dal Sud Italia, affetti da severa oligozoospermia, sono stati scrinati per delezioni del cromosoma Y con PCR Multiplex. In 77 soggetti l'affiliazione del cromosoma Y è stata determinata mediante DHPLC per l'indagine di mutazione dei marcatori diagnostici. Il gruppo di controllo del cromosoma Y ha incluso 438 uomini del Sud Italia.

**Risultati.** 3 degli 86 pazienti hanno evidenziato delezioni del cromosoma Y nella regione AZF ed in tutti i casi appartenevano all'aplogruppo J del cromosoma Y, ma ciò non è stato statisticamente significativo. La cosa più importante è che non sono state osservate differenze nella distribuzione di ulteriori aplogruppi del cromosoma Y tra la popolazione oligozoospermica ed il gruppo di controllo.

**Conclusioni.** Come evidenziato, non c'è associazione tra disfunzione spermatica e particolari aplogruppi del cromosoma Y come suggerito da altri Autori. Tuttavia la frequenza delle delezioni del cromosoma Y nel nostro gruppo di pazienti è rimarchevolmente più bassa rispetto a quella riportata in letteratura.

### Summary

**Introduction.** An association between sperm function impairment and Y-chromosome haplogroups has been hypothesized. Furthermore, deletions of genes located in the AZF region (DAZ) have been described at a high frequency in oligozoospermic men. In this study, we evaluated the incidence of Y-chromosome microdeletions in patients affected by severe oligozoospermia and the association of Y-chromosome haplogroups with this phenotype.

**Materials and methods.** Eighty-six men from Southern Italy, affected by severe oligozoospermia and undergoing ICSI, were screened for Y-chromosome deletions by multiplex PCR.

In 77 subjects, the Y-chromosome haplogroup affiliation was determined by DHPLC survey of diagnostic marker mutations.

The Y-chromosome control group included 438 Italian men from Center-South Italy.

**Results.** Three out of 86 patients (3.5%) harboured Y chromosome deletions in the AZF region, and, in all cases, they belonged to Y-chromosome haplogroup J, but this was not statistically significant.

Most importantly, no differences were observed in the distribution of either Y-chromosome haplogroups between the oligozoospermic population and the control group.

**Conclusions.** There appears to be no association between sperm dysfunction and particular haplogroups of the Y-chromosome, as proposed by other Authors.

Furthermore, the frequency of the Y-chromosome deletions, in our group of patients, is remarkably lower than that reported in the literature.

### Introduzione

L'infertilità colpisce circa il 10-15% delle coppie in età fertile <sup>1</sup> ed in genere il fattore maschile è riscontrabile in quasi la metà dei casi <sup>1</sup>. Tra quelle determinan-

ti, le cause su base genetica rappresentano circa il 5% dei casi <sup>2,3</sup>.

L'introduzione della tecnica ICSI (*intracytoplasmic sperm injection*) negli anni '90 <sup>4</sup> ha ulteriormente contribuito allo sviluppo delle ricerche sulle possibili cau-

se genetiche responsabili di alterazioni della spermatogenesi che sono alla base di severe forme di infertilità, destando preoccupazioni per quanto riguarda la potenziale trasmissione di anomalie genetiche alla prole del maschio infertile<sup>5</sup>.

Tali tecniche aggirano i meccanismi fisiologici legati alla fecondazione, infatti la ICSI permette allo spermatozoo alterato di fecondare l'ovocita, aumentando così la probabilità di rischio di trasmissione di anomalie genetiche alla prole<sup>6-8</sup>.

È ormai accertato che la causa genetica-molecolare più frequente dell'oligo/azoospermia è rappresentata dalle microdelezioni del cromosoma Y<sup>9,10</sup>.

Grazie all'analisi di mappatura molecolare sono state finora identificate molte sequenze specifiche del cromosoma Y che hanno permesso lo studio su larga scala del suo braccio lungo sul quale sono situate copie multiple di geni coinvolti nello sviluppo delle cellule germinali maschili che, quando deleti, possono causare un parziale o totale fallimento della spermatogenesi. Esse sono distinte in tre regioni chiamate *Azoospermia Factor*: AZFa, AZFb, AZFc<sup>10,11</sup>.

L'AZFa comprende tre geni: DFFRY, DBY, ed UTY; di essi il I, noto anche come USP9Y, codifica per una proteina che sembra funzionare come un'idrolasi C-terminale dell'ubiquitina e che, se associato al DBY, sembra essere quello più deleto per quanto riguarda quest'intervallo.

L'AZFb comprende 4 geni: EIF1AY, PRY, TTY2 ed RBMY-1. L'ultimo gene sembra essere il miglior candidato per quest'intervallo per uno studio molecolare dettagliato, ciò grazie alla sua specificità per il testicolo e la sua prevalenza di delezione nei soggetti infertili<sup>12</sup>. Codifica per una proteina RBM (*RNA binding motif*); è stato visto essere espresso nella linea germinale nel testicolo (spermatociti e spermatozoi rotondi), anche se la sua reale funzione nelle cellule germinali maschili rimane tuttora poco chiara<sup>12</sup>. Infine l'AZFc comprende 3 geni: DAZ, BPY2 e CDY1<sup>13</sup>.

Il gene più importante per questo intervallo, data la sua alta incidenza di delezioni nei soggetti infertili, è il "DAZ", membro di una famiglia multigenica (famiglia genica DAZ) e caratterizzato da una struttura piuttosto complessa<sup>14,15</sup>.

È stato visto che, per quanto riguarda la correlazione genotipo-fenotipo, le delezioni relative all'intervallo AZFa sono rare<sup>16,17</sup>, di solito associate a fenotipo azoospermico con assenza completa di spermatogoni (SCO tipo I) ed incorrono con incidenza del 4,9% nella popolazione maschile generale di infertili; quelle relative all'AZFb sono di solito associate ad arresto ma-

turativo delle cellule germinali causando nei 2/3 dei casi azoospermia, con una frequenza pari al 15,8% della popolazione generale di soggetti infertili<sup>8,16,18</sup>.

Infine, le delezioni dell'intervallo AZFc che coinvolgono soprattutto il gene DAZ, sono le più comuni. Esse sono in genere associate a fenotipi azoospermici e più frequentemente oligozoospermici, provocano un'alterazione nel processo maturativo piuttosto che una perdita completa della linea spermatogenetica ed incidono con frequenza che nei vari lavori va dall'1 al 50% dei maschi infertili<sup>18-20</sup>.

Numerosi studi in letteratura sono stati pubblicati su questo argomento e, nell'insieme, i dati emersi suggeriscono che, tra i vari Autori, esistono differenze notevoli nella frequenza delle microdelezioni con un *range* variabile dall'1,5 al 18% soprattutto per quanto riguarda l'intervallo AZFc (DAZ)<sup>18</sup>.

Questa discrepanza nella frequenza potrebbe essere dovuta: 1) ai differenti criteri di selezione clinica adottati per i pazienti, anche se l'orientamento attuale riguarda individui azo/oligozoospermici severi con conta spermatica < 5 x 10<sup>6</sup> spermatozoi/ml<sup>22</sup> (l'incidenza delle microdelezioni diminuisce al crescere del numero degli spermatozoi nell'eiaculato<sup>23,24</sup>); 2) alla diversa origine etnico/geografica dei campioni studiati<sup>24</sup>.

Rimane tuttavia inspiegato come un'alta percentuale di soggetti con azo/oligozoospermia severa non è incline alle microdelezioni del cromosoma Y.

È stato ipotizzato che altri fattori legati al cromosoma Y possono contribuire alla determinazione dell'azo/oligozoospermia. Tali fattori *Y-linked* che includono variazioni di sequenze ripetute in famiglie geniche multicopia, polimorfismi di geni specifici del cromosoma Y, riarrangiamenti non evidenziabili attraverso le microdelezioni del cromosoma stesso, potrebbero segregare con determinati gruppi monofiletici o aplogruppi del cromosoma Y (combinazione di una serie di marcatori polimorfici nelle regioni non codificanti del cromosoma Y umano: ad esempio, polimorfismi di un unico nucleotide o delezioni/inserzioni di sequenze di DNA)<sup>25-27</sup> che definiscono la stabilità della linea umana preservando il patrimonio genetico paterno della nostra specie<sup>28</sup>.

Alcuni di essi proteggono dai riarrangiamenti strutturali del cromosoma Y rispetto ad altri, altrettanto significativi nella popolazione, che invece predispongono ai riarrangiamenti (duplicazioni/inversioni) o mutazioni di geni specifici contribuendo alla determinazione di un particolare fenotipo<sup>29</sup>.

Pertanto lo studio di associazione di specifici aplogruppi (*background* genetico) ed infertilità da alterata spermatogenesi è un modo indiretto che ci aiuta a



capire se i geni del cromosoma Y sono implicati nell'eziologia della stessa <sup>30</sup>.

La prima associazione tra *background* genetico del cromosoma Y e predisposizione a riarrangiamenti del cromosoma stesso è stata precedentemente descritta da Jobling et al. nel 1998 per quanto riguarda un particolare aplogruppo europeo più incline alla Sindrome del Maschio 46,XX, in cui parte del braccio corto del cromosoma Y, compreso il gene SRY, risulta traslocato sul cromosoma X a seguito di un evento di ricombinazione ectopica <sup>31 32</sup>.

In letteratura sono state recentemente descritte da alcuni Autori correlazioni tra oligozoospermia e particolari aplogruppi nelle popolazioni: giapponese, italiana e danese <sup>30 33 34</sup> nell'ambito delle quali è stata analizzata la distribuzione dei diversi aplogruppi in soggetti oligo/azoospermici e nella popolazione generale.

L'analisi ha evidenziato nella popolazione danese che uno specifico aplogruppo risultava più rappresentato in pazienti oligo/azoospermici (27,8%) rispetto alla popolazione generale esaminata (4,6%) <sup>30</sup>. Anche per quanto riguarda le microdelezioni dell'AZF è stata osservata, da parte di alcuni Autori, un'associazione con uno specifico aplogruppo del cromosoma Y <sup>35</sup>, ma questo dato è stato successivamente smentito da altri <sup>29 36</sup>.

Studi sugli aplogruppi del cromosoma Y in diversi gruppi etnici sono stati effettuati in letteratura in relazione anche ai percorsi storici e migratori delle popolazioni prese in esame <sup>37</sup>.

In questo studio abbiamo valutato l'incidenza delle microdelezioni del cromosoma Y e una loro eventuale associazione con aplogruppi dello stesso cromosoma in un gruppo di soggetti provenienti dal Sud Italia affetti da oligozoospermia severa.

## Metodi

### PAZIENTI

Sono stati inclusi nello studio soggetti di età compresa tra i 20 ed i 55 anni afferenti al nostro Servizio per problemi di infertilità.

Dopo un completo esame andrologico comprensivo di: almeno due spermioigrammi condotti ed in accordo alle Linee Guida del WHO 1999 <sup>38</sup> a distanza di una settimana l'uno dall'altro, analisi del cariotipo, esami ormonali ed ecografia testicolare, sono stati isolati, tra i soggetti esaminati, 86 pazienti con oligozoospermia idiopatica severa che rappresentano il

nostro campione per lo studio, scelto in base al seguente criterio clinico d'inclusione: oligozoospermia severa idiopatica con concentrazione spermatica in un *range* da 1 a  $5 \times 10^6$  spermatozoi/ml. Il criterio di esclusione ha riguardato invece entrambe le azoospermie (secretorie e ostruttive), oligozoospermie dovute a cause anatomiche, genetiche, ormonali, patologie (varicocele, criptorchidismo) ed anomalie cromosomiche (Sindrome di Klinefelter, ecc.).

Tali soggetti avevano fornito il consenso informato per l'inclusione nello studio.

Parallelamente è stato esaminato un gruppo di controllo di 438 soggetti della stessa provenienza geografica. In particolare si trattava di soggetti maschi sani con valori normali dei parametri seminali testati secondo le raccomandazioni del WHO 1999 e con la seguente ripartizione geografica:

Calabria	97
Basilicata	24
Puglia	139
Campania	94
Centro Italia	84

I dati relativi alle regioni non calabresi sono stati estrapolati dalla letteratura <sup>39</sup>.

### ANALISI MOLECOLARE

Il DNA genomico del campione in oggetto è stato isolato da *buffy-coat* mediante la metodica di estrazione standard fenolo-cloroformio, e successivamente utilizzato per l'analisi di microdelezioni e aplotipi del cromosoma Y.

Lo *screening* per microdelezioni del cromosoma Y è stato effettuato usando una PCR (*Polymerase Chain Reaction*) Multiplex dei geni situati nei 3 loci AZF e specifiche sequenze bersaglio del cromosoma Y (STS). Le sequenze dei *primer-PCR* usate in questo studio sono state estrapolate dalla *GeneBank* o descritte in altri lavori <sup>9 40-43</sup>: 16 geni (RBM1, RBMY2, DAZ, SPGY, TTY1, TTY2, PRY, DFFRY, DBY, UTY, TB4Y, BPY1, CDY, XKRY, eIF-1AY, BPY2) e 32 markers STS (SY14, SY18, SY19, SY70, SY78, SY81, SY82, SY83, SY84, SY85, SY86, SY87, SY165, SY182, SY151, SY100, SY128, SY131, SY132, SY134, SY136, SY139, SY153, SY152, SY155, SY147, SY156, SY149, SY254, SY157, SY243, SY202) sono stati scrinati mediante altrettante PCR multiplex e 5 reazioni a singole paia di *primers* in accordo con le procedure pubblicate <sup>9 10 13 44</sup>.

Tutti i cicli termali sono stati effettuati mediante una PTC-100 *Programmable Thermal Controller* (GENENCO) e gli ampliconi successivamente testati su gel d'agarosio all'1,8%.

In ciascuna PCR sono stati inclusi, come controlli per i marcatori e l'esecuzione dell'amplificazione, campioni di DNA di maschio e femmina normale, oltre che un campione non contenente DNA (controllo bianco).

I test di PCR mostranti la delezione del gene per i loci AZF sono stati confermati con l'analisi di sequenza e i frammenti di PCR sequenziati con *Abi Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Applied Biosystem)* in accordo con le raccomandazioni della casa, insieme a un sequenziatore ABI PRISM 377 DNA (PE Applied Biosystem, Foster City, CA, USA).

### ANALISI DEGLI APOLOGRUPPI DEL CROMOSOMA Y

Un totale di 77 cromosomi Y da pazienti con oligozoospermia sono stati genotipizzati per 11 marcatori biallelici – YAP-DYS287, SRYY4064, M201, 12f2 (DYS11), M9, M17, M74, M170, M173, M269, P25 – e classificati nei maggiori aplogruppi europei del cromosoma Y (Hgs- The Y-Chromosome-Consortium- the YCC, 2002)<sup>28</sup>. Ad eccezione dei marker YAP e 12f2, esaminati in accordo con alcuni Autori<sup>45 46</sup>, rispettivamente tutti gli altri marcatori sono stati sottoposti ad analisi mediante DHPLC (*Denaturing High Performance Liquid Chromatography*), come precedentemente riportato<sup>26</sup>.

### TEST STATISTICI

L'analisi dei dati è stata condotta utilizzando la funzione di probabilità  $\chi^2$  (Chi quadro) a 6 gradi di libertà, con un test ad una coda ed un livello di significatività alfa = 0,05.

A livello di significatività alfa = 0,05, la dipendenza fra le righe e le colonne era assunta non significativa.

### Risultati

I dati epidemiologici emersi dal nostro studio e riportati in Tabella I mostrano i seguenti risultati: le delezioni del cromosoma Y per quanto riguarda l'AZFc sono state riscontrate solo in 3 degli 86 soggetti oligozoospermici esaminati (3,5%).

Le frequenze dell'aplogruppo del cromosoma Y in 77 dei soggetti oligozoospermici (Tab. II) evidenziano che: tutti i cromosomi Y sono stati trovati appartenere agli aplogruppi E (D), G, I, J ed R. Dalla comparazione con il gruppo di controllo non è stata osservata alcuna differenza nella distribuzione degli aplogruppi ( $\chi^2 = 12,168$ ;  $p = 0,058$ ). Sebbene tutti i 3 pazienti con delezioni del cromosoma Y (AZFc) ap-

**Tab. I.** Dati epidemiologici di pazienti italiani oligozoospermici. *Epidemiologic data in Italian oligozoospermic patients.*

Numero di pazienti	86
Età (Media $\pm$ SD)	37,1 $\pm$ 3,8
Tempo di infertilità (media $\pm$ SD)	2,8 $\pm$ 1,1
Conta spermica ( $10^6 \times$ ml)	3,2 $\pm$ 0,7
Motilità spermatica (%)	15,6 $\pm$ 4,9
Normale morfologia spermatica	21,4 $\pm$ 8,5
Pazienti con delezioni del cromosoma-Y	3 (3,5%)

partenessero all'aplogruppo J (il più comune aplogruppo nell'Italia Centro-Sud), questi dati non sono risultati statisticamente significativi.

### Discussione

Con la ICSI, la prognosi riproduttiva di uomini con oligozoospermia severa<sup>47</sup> è cambiata sostanzialmente, sebbene l'uso di tale tecnica desta tuttora preoccupazioni per le probabili conseguenze sulla prole, da quando lo sperma non naturalmente selezionato o immaturo e quello prelevato direttamente dai testicoli vengono usati per fertilizzare gli ovociti, aggirando le naturali barriere di selezione<sup>5</sup>.

È stato riportato in letteratura un aumento, nella ICSI, di prole con aneuploidie dei cromosomi sessuali<sup>6</sup> e documentato inoltre un incremento di cromosomi aneuploidi negli spermatozoi di uomini oligozoospermici<sup>48 49</sup>.

Inoltre, la scoperta delle delezioni del locus AZFc nel cromosoma Y di uomini infertili ha evidenziato ancor di più il rischio di trasferire alterazioni genetiche alla prole mediante ICSI<sup>9 10</sup>.

Dai dati riportati in letteratura ad oggi sono state riscontrate larghe differenze nella frequenza delle delezioni del cromosoma Y in un *range* variabile da 1,5 a 18% di uomini infertili<sup>18 20</sup>.

Gli stessi *range* di frequenze nei casi di azoospermia non ostruttiva vanno da 10 a 35%, mentre nelle oligozoospermie severe idiopatiche variano da 8 a 14%<sup>12 41 44</sup>.

Nel nostro campione di soggetti con oligozoospermia severa idiopatica, la frequenza delle delezioni del cromosoma Y riscontrata è risultata significativamente più bassa rispetto a quelle riportate in letteratura<sup>18 19 21 24 50 51</sup>: infatti solo il 3,5% dei pazienti ha mostrato una delezione del locus AZFc, frequenza a nostro avviso piuttosto bassa rispetto a quella riportata dai diversi Autori (1,5-18%).

**Tab. II.** Frequenze di aplogruppi del cromosoma Y in soggetti oligozoospermici e controlli. *Y-chromosome haplogroup frequencies in oligozoospermic subjects and controls.*

Popolazione	N° di campioni	Aplogruppi del cromosoma Y <sup>a</sup>						
		E	G	I	J	R1a1	R1b	Altri
Soggetti oligozoospermici	77 <sup>b</sup>	14 (18,2)	11 (14,3)	10 (13,0)	23 (29,8)	1 (1,3)	17 (22,1)	1 (1,3)
Soggetti di controllo	438 <sup>c</sup>	79 <sup>d</sup> (18,0)	31 <sup>e</sup> (7,1)	31 (7,1)	128 <sup>d</sup> (19,2)	12 (2,7)	126 (28,8)	31 (7,1)

$\chi^2 = 12,168$ ; gradi di libertà = 6;  $p = 0,058$  ( $\alpha = 0,05$ ); <sup>a</sup> = nella Tabella, per ciascun gruppo di studio la I riga riporta il numero di soggetti studiati; la II riga riporta la percentuale nel relativo gruppo; <sup>b</sup> = sono stati considerati solo campioni di provenienza italiana; degli 86 presi in esame, 2 non avevano uguale provenienza geografica e 7 non erano identificabili; <sup>c</sup> = il gruppo di controllo include 97 soggetti calabresi e 351 soggetti provenienti da regioni del Centro-Sud 39; <sup>d</sup> = l'aplogruppo E, insieme a J, è considerato un "SUPER-APLOGRUPPO" <sup>37</sup>; <sup>e</sup> = l'aplogruppo G rientra nel pattern della linea di aplogruppi più comuni nel Sud-Italia <sup>39</sup>.

Differenze nelle procedure di selezione dei pazienti potrebbero spiegare queste rimarchevoli discrepanze nella frequenza.

Nella nostra opinione, la reale frequenza di delezioni AZFc in uomini oligozoospermici potrebbe essere ri-considerata, rispetto a quella riportata in letteratura dell'1-18%, ad una più realistica del 2-3% che corrisponde a quella da noi riscontrata.

Recentemente alcuni lavori in letteratura hanno riportato una associazione tra specifici aplogruppi ed infertilità, sebbene i dati siano contraddittori.

Difatti, questa associazione è stata descritta da alcuni Autori in una popolazione di giapponesi infertili ed anche in uomini italiani <sup>33 35</sup>, ma non confermata da altri <sup>51</sup>, o addirittura messa in dubbio per essere un artefatto della frequenza dell'aplogruppo nella popolazione di controllo <sup>32</sup>.

Più recentemente è stata osservata nella popolazione danese un'associazione tra bassa conta spermatica e aplogruppi del cromosoma Y <sup>34</sup>.

Anche per quanto riguarda le delezioni del cromosoma Y non c'è accordo tra gli Autori: alcuni di essi <sup>29 51</sup> hanno mostrato una mancanza di associazione tra aplogruppi del cromosoma Y e delezioni nell'AZFc. Dall'altro canto altri <sup>52</sup> hanno riportato una associazione tra aplogruppi N e delezioni dell'AZFc nella popolazione tedesca.

I dati emersi da questo studio mostrano una mancanza di associazione tra oligozoospermia e *background* genetico del cromosoma Y.

Inoltre, per quanto riguarda le delezioni dell'AZFc, non abbiamo riscontrato alcuna associazione significativa con aplogruppi del cromosoma Y.

Questo risultato potrebbe in parte essere spiegato dalla differente distribuzione di aplogruppi in differenti gruppi etnici e, con maggiore probabilità, dalla procedura di selezione dei gruppi di controllo.

Tuttavia, in generale i nostri dati evidenziano che <sup>29</sup> il *background* genetico del cromosoma Y non gioca un ruolo chiave nel rischio di oligozoospermia e frequenza di delezioni dell'AZFc, probabilmente per il fatto che l'oligozoospermia è una patologia multifattoriale dovuta a fattori di diversa natura: anatomici, ambientali, che vanno ad agire sul *background* genetico determinandone il fallimento spermatogenetico <sup>29 34</sup>.

Tuttavia, lo *screening* genetico per microdelezioni dell'AZF in pazienti con compromessa spermatogenesi (dispermia severa) rappresenta, insieme al cariotipo e alla ricerca per mutazioni del gene della fibrosi cistica, uno *step* fondamentale nel *work-out* clinico di questi pazienti <sup>53</sup>.

## Bibliografia

- De Kretser DM, Baker HWG. *Infertility in men: recent advances and continuing controversies.* J Clin Endocrinol Metab 1999;84:3443-50.
- Dohle GR, Halley DJ, Van Hemel JO, van den Ouwel AM,

Pieter MH, Weber RF, et al. *Genetic risk factors in infertile men with severe oligozoospermia and azoospermia.* Hum Reprod 2002;17:13-6.

- Miharu N. *Chromosome abnormalities in sperm from infertile men with normal somatic karyotypes oligozoospermia.* Cytogenet Genome Res 2005;111:347-51.

- 4 Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. *Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte*. Lancet 1992;340:17-8.
- 5 Martin RH. *The risk of chromosomal abnormalities following ICSI*. Hum Reprod 1996;11:924-5.
- 6 Bonduelle M, Van Assche E, Joris H, Keimolen K, Devroey P, Van Steirteghem A, et al. *Prenatal testing in ICSI pregnancies: incidence of chromosomal anomalies in 1586 karyotype and relation to sperm parameters*. Hum Reprod 2002;17:2600-14.
- 7 Page DC, Silber S, Brown LG. *Men with infertility caused by AZFc deletion can produce sons by intracytoplasmic sperm injection, but are likely to transmit the deletion and infertility*. Hum Reprod 1999;14:1722-6.
- 8 Ferlin A, Moro E, Garolla A, Foresta C. *Human male infertility and Y chromosome deletions: role of the AZF-candidate genes DAZ, RBM, and DFFRY*. Hum Reprod 1999;14:1710-6.
- 9 Reijo R, Lee TY, Salo P, Alagappan R, Brown LG, Rosenberg M, et al. *Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene*. Nat Genet 1995;10:383-93.
- 10 Vogt PH, Edelmann A, Kirsch S, Henegariu O, Hirschmann P, Kiesewetter F, et al. *Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11*. Hum Mol Genet 1996;5:933-43.
- 11 Tiepolo L, Zuffardi O. *Localization of factors controlling spermatogenesis in the long nonfluorescent portion of the human Y chromosome arm*. Hum Genet 1976;34:119-24.
- 12 Foresta C, Ferlin A, Garolla A, Rossato M, Barboux S, De Bortoli A. *Y-chromosome deletions in idiopathic severe testicular pathologies*. J Clin Endocrinol Metab 1997;82:1075-83.
- 13 Lahn BT, Page DC. *Functional coherence of the human Y chromosome*. Science 1997;278:675-80.
- 14 Kuroda-Kawaguchi T, Skaletsky H, Brown LG, Minx PJ, Cordum HS, Waters Wilson RK, et al. *The AZFc region chromosome features massive palindromes and uniform recurrent deletions in infertile men*. Nat Genet 2001;29:279-86.
- 15 Saxena R, Brown LG, Hawkins T. *The DAZ gene cluster on the human Y chromosome arose from an autosomal gene that was transposed, repeatedly, amplified and pruned*. Nat Genet 1996;14:292-9.
- 16 Krausz C, Quintana-Murci L, Barboux S, Siffroi JP, Rouba H, Delafontaine D, et al. *A high frequency of Y chromosome deletions in males with nonidiopathic infertility*. J Clin Endocrinol Metab 1999;84:3606-12.
- 17 Foresta C, Ferlin A, Garolla A, Moro E, Pistorello M, Barboux S, et al. *High frequency of well defined Y-chromosome deletions in idiopathic Sertoli cell-only syndrome*. Hum Reprod 1998;13:302-7.
- 18 Krausz C, Forti G, McElreavey K. *The Y chromosome and male fertility and infertility*. Int J Androl 2003;26:70-5.
- 19 Oliva R, Margarit E, Balleca JL, Carrio A, Sanchez A, Mila M, et al. *Prevalence of Y chromosome microdeletions in oligospermic and azospermic candidates for intracytoplasmic sperm injection*. Fertil Steril 1998;70:506-10.
- 20 Stuppia L, Gatta V, Calabrese G, Guanciali Franchi P, Mingarelli R, Palka G, et al. *A quarter of men with idiopathic oligo-azoospermia display chromosomal abnormalities and microdeletions of different types in interval 6 of Yq11*. Hum Genet 1998;102:566-70.
- 21 van der Ven K, Montag M, Peschka B, Leygraaf J, Schwanitz G, Haidl G, et al. *Combined cytogenetic and Y chromosome microdeletions screening in males undergoing intracytoplasmic sperm injection*. Mol Hum Reprod 1997;3:699-704.
- 22 Foresta C, Moro E, Garolla A, Onisto M, Ferlin A. *Y chromosome microdeletions in cryptorchidism and idiopathic infertility*. J Clin Endocrinol Metab 1999;84:3660-5.
- 23 Pryor JL, Kent-First M, Roberts KP. *Microdeletions in the Y chromosome of infertile men*. N Engl J Med 1997;336:534-9.
- 24 Krausz C, Bussani-Mastellone, Granchi S, Scarselli G, Forti G. *Screening for microdeletions of Y chromosome genes in patients undergoing intracytoplasmic sperm injection*. Hum Reprod 1999;14:1717-21.
- 25 Krausz C, Quintana-Murci L, Forti G. *Y Chromosome polymorphism in medicine*. Ann Med 2004;36:573-83.
- 26 Underhill PA, Passarino G, Lin AA, Cavalli-Sforza LL. *The phylogeography of Y-chromosome binary haplotype and the origins of modern human populations*. Ann Hum Genet 2001;65:43-62.
- 27 Vogt HP. *AZF deletions and Y chromosomal haplogroups: history and update based on sequence*. Hum Reprod Update 2005;11:319-36.
- 28 Y Chromosome Consortium. *A nomenclature system for the tree of human Y chromosomal binary haplogroups*. Genome Res 2002;12:339-48.
- 29 Quintana-Murci L, Krausz C, Heyer E, Jobling MA, McElreavey K. *The relationship between Y chromosome DNA haplotype and Y chromosome deletions leading to male infertility*. Hum Genet 2001;108:55-8.
- 30 Krausz C, Quintana-Murci L, Rajpert-De Meyts E, Jorgensen N, Jobling MA, Rosser ZH, et al. *Identification of a Y chromosome haplogroup associated with reduced sperm counts*. Hum Mol Genet 2001b;10:1873-7.
- 31 Jobling MA, Williams GA, Schiebel GA, Pandya GA, McElreavey GA, Salas GA, et al. *A selective difference between human Y chromosomal DNA haplotype*. Curr Biol 1998;8:1391-4.
- 32 Jobling MA, Tyler-Smith C. *New uses for new haplotype the human Y chromosome, disease and selection*. Trends Genet 2000;16:356-62.
- 33 Kuroki Y, Iwamoto T, Lee J, Yoshiike M, Nozawa S, Nishida T, et al. *Spermatogenic ability is different among males in different Y chromosome lineage*. J Hum Genet 1999;44:289-92.
- 34 Previdere C, Stuppia L, Gatta V, Fattorini P, Palka G, Tyler-Smith C. *Y chromosomal DNA haplotype differences in control and infertile Italian subpopulations*. Eur J Hum Genet 1999;7:733-6.
- 35 Fernandes S, Huellen K, Goncalves J, Dukal H, Zeisler J, Rajpert De Meyts E, et al. *High frequency of DAZ1/DAZ2 gene deletions in patients with severe oligozoospermia*. Mol Hum Reprod 2002;8:286-98.
- 36 Paracchini S, Stuppia L, Gatta V, Palka G, Moro E, Foresta C, et al. *Y chromosome DNA haplotype in infertile European males carrying Y-microdeletions*. J Endocrinol Invest 2000;23:671-6.

- <sup>37</sup> Semino O, Magri C, Benuzzi G, Lin AA, Al-Zahery N, Battaglia V, et al. *Origin, diffusion, and differentiation of Y-chromosome haplogroups E and J: inferences on the neolithization of Europe and later migratory events in the Mediterranean Area.* *Am J Hum Genet* 2004;74:1023-34.
- <sup>38</sup> World Health Organization. *WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction.* Cambridge, UK: Cambridge University Press 1999.
- <sup>39</sup> Di Giacomo F, Luca F, Anagnou N, Ciavarella G, Corbo RM, Cresta M, et al. *Clinical patterns of human Y chromosomal diversity in continental Italy and Greece are dominated by drift and founder effects.* *Mol Phylogenet Evol* 2003;28:387-95.
- <sup>40</sup> Najmabadi H, Huang V, Yen P, Subbarao MN, Bhasin D, Bannaag L, et al. *Substantial prevalence of microdeletions of the Y-chromosome in infertile men with idiopathic azoospermia and oligozoospermia detected using a sequence-tagged site-based mapping strategy.* *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:1347-52.
- <sup>41</sup> Nakashima M, Koh E, Namiki M, Yoshida A. *Multiplex sequence-tagged-site PCR for efficient screening of microdeletions in Y chromosome in infertile males with azoospermia or severe oligozoospermia.* *Arch Androl* 2002;48:351-8.
- <sup>42</sup> Simoni M, Gromoll J, Dworniczak B, Rolf C, Abshagen K, Kamischke A, et al. *Screening for deletions of the Y chromosome involving the DAZ (Deleted in AZoospermia) gene in azoospermia and severe oligozoospermia.* *Fert Steril* 1997;67:542-7.
- <sup>43</sup> Simoni M, Bakker E, Krausz C. *EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions. State of the art 2004.* *Int J Androl* 2004;27:240-9.
- <sup>44</sup> Girardi SK, Mielnik A, Schlegel PN. *Submicroscopic deletions in the Y chromosome of infertile men.* *Hum Reprod* 1997;12:1635-41.
- <sup>45</sup> Hammer MF. *A recent common ancestry for human Y chromosomes.* *Nature* 1995;378:376-8.
- <sup>46</sup> Rosser ZH, Zerjal T, Hurler ME, Adojaan M, Alavantic D, Amorim A, et al. *Y-chromosomal diversity in Europe is clinal and influenced primarily by geography, rather than by language.* *Am J Hum Genet* 2000;67:1526-43.
- <sup>47</sup> Van Steirteghem AC, Nagy Z, Joris H, Liu J, Staessen C, Smits J, et al. *High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection.* *Hum Reprod* 1993;8:1061-6.
- <sup>48</sup> Vegetti W, Van Assche E, Frias A, Verheyen G, Bianchi MM, Bonduelle M, et al. *Correlation between semen parameters and sperm aneuploidy rates investigated by fluorescence in-situ hybridization in infertile men.* *Hum Reprod* 2000;15:351-65.
- <sup>49</sup> Sbracia M, Baldi M, Cao D, Sandrelli A, Chiandetti A, Poverini R, et al. *Preferential location of sex chromosomes, their aneuploidy in human sperm, and their role in determining sex chromosome aneuploidy in embryos after ICSI.* *Hum Reprod* 2002;17:320-4.
- <sup>50</sup> Fernandes S, Huellen K, Goncalves J, Dukal H, Zeisler J, Rajpert De Meyts E, et al. *High frequency of DAZ1/DAZ2 gene deletions in patients with severe oligozoospermia.* *Mol Hum Reprod* 2002;8:286-98.
- <sup>51</sup> Carvalho CM, Fujisawa M. *Lack of association between Y chromosome haplogroups and male infertility in Japanese men.* *Am J Med Genet* 2003;116A:152-8.
- <sup>52</sup> Fernandes S, Parracchini S, Meyer LH, Florida G, Tyler-Smith C, Vogt PH. *A large AZFc deletion removes DAZ3/DAZ4 and nearby genes from men in Y haplogroup.* *N Am J Hum Genet* 2004;74:180-7.
- <sup>53</sup> Kupker W, Schwinger E, Hiort O, Ludwig M, Nikolettos N, Schlegel PN, et al. *Genetics of male subfertility: consequences for the clinical work-up.* *Hum Reprod* 1999;14:24-37.

# Appunti di statistica. L'odds ratio

## Notes on Statistics: Odds Ratio

E. RICCI, S. CIPRIANI\*

I Clinica Ostetrico-ginecologica, Università di Milano; \* Istituto di Ricerche Farmacologiche "Mario Negri", Milano

*Odds* è un termine difficilmente traducibile in italiano. La parola che più si avvicina a tradurla è "quota", termine che si ritrova nel mondo delle scommesse, ma per non generare confusione è preferibile utilizzare il termine inglese.

L'*odds* si definisce come un rapporto tra probabilità: quella che un evento si verifichi e quella che non si verifichi. Se ne ricava che, necessariamente, l'esito cui l'*odds* si riferisce deve essere dicotomico: sì o no, presenza o assenza, salute o malattia.

Ricordando le formule della probabilità <sup>1</sup>:

probabilità dell'esito A	probabilità dell'esito B
$P(A) = \frac{A}{A+B}$	$P(B) = \frac{B}{A+B}$

se l' $odds_A = P(A)/P(B)$ , avremo che

$$odds_A = \frac{A}{A+B} \div \frac{B}{A+B}$$

ovvero  $odds_A = A/B$ .

Ne ricaviamo che, se la probabilità che in un lancio di dadi esca il 6 è 1/6, perché 6 sono gli esiti possibili di un singolo lancio, l'*odds* che esca 6 è 1:5, ovvero la probabilità che esca il 6 (uno degli esiti) contro la probabilità che esca una delle altre 5 facce (gli altri 5 esiti possibili).

Se invece che giocare d'azzardo faccio ricerca, potrò voler valutare l'*odds* di una malattia in un gruppo di persone. Se A è il numero di malati tra i soggetti, e B il numero di non malati, potrò calcolare l'*odds* della malattia nel gruppo. Se all'interno del gruppo ho il sospetto che la malattia si verifichi più frequentemente in chi presenta una certa caratteristica, potrò indagare se l'*odds* varia nei gruppi determinati dalla presenza/assenza della caratteristica in questione.

In uno studio caso controllo abbiamo arruolato 50 pazienti con disfunzione erettile (DE) manifestatasi di re-

cente e 50 controlli della stessa età che non hanno mai presentato DE. Se indicazioni da altri studi (o nostre indagini preliminari) ci suggeriscono che il fumo può essere associato al DE, potremo calcolare l'*odds* di DE tra i fumatori e i non fumatori.

Fumo	DE		Totale
	Sì	No	
Sì	15	5	20
No	35	45	80
Totale	50	50	100

Dalla Tabella vediamo che l'*odds* di DE dei 20 fumatori è 15:5 (3,0), quello degli 80 non fumatori 35:45 (0,8). Come quantifico l'associazione tra il fumo e il DE?

Lo strumento che serve a valutare le associazioni tra le variabili e l'esito è il rapporto tra gli *odds*, più noto con il suo nome inglese di *odds ratio* (OR).

Il rapporto tra gli *odds* nei fumatori e nei non fumatori darà la misura dell'associazione tra il fumo e il DE.

DE tra i fumatori	$odds F = \frac{15}{5} = 3,0$
DE tra i non fumatori	$odds NF = \frac{35}{45} = 0,78$
<i>Odds ratio</i> fumatori vs. non fumatori	$OR = \frac{3,0}{0,78} = 3,9$

Da questi numeri si può affermare (come esempio) che il DE tra i fumatori è quasi quattro volte più frequente. L'OR ci fornisce una misura della forza dell'associazione tra la variabile di esposizione e la variabile di esito.

Generalizzando, se in uno studio vogliamo valutare l'associazione tra un'esposizione e un esito, dovremo elaborare una Tabella di questo tipo:

Esposizione	Esito		Totale
	Sì	No	
Sì	a	b	a + b
No	c	d	c + d
Totale	a + c	b + d	

nella quale  $a/b$  sarà l'odds negli esposti,  $c/d$  sarà l'odds nei non esposti, e il loro rapporto definirà l'odds ratio dell'esposizione. L'OR quindi, anche se spesso a fini didattici viene presentato come rapporto tra i prodotti crociati della precedente Tabella ( $a*d/b*c$ ), è in realtà un rapporto tra l'odds nel gruppo esposto e l'odds nel gruppo non esposto, ovvero:

$$\text{odds ratio (OR)} = \frac{a/b}{c/d}$$

Matematicamente, il rapporto sarà inferiore a 1 quando nel gruppo esposto vi saranno meno esiti "indagati" rispetto al gruppo non esposto, superiore a 1 quando sarà vero il contrario. L'OR quindi mi dice quanto nei soggetti esposti varia il rischio dell'esito in esame, rispetto ai non esposti al fattore. Abbiamo visto che il fumo aumentava il rischio dell'esito DE, quindi diremo che il fumo è un fattore di rischio per il DE. Al contrario, se consideriamo un altro fattore, scopriremo che mentre sono 10 i soggetti con DE a fare regolarmente attività fisica, i soggetti di controllo sono 25. Rifacendo i calcoli come indicato sopra, scopriamo che l'odds di DE in chi è attivo è  $10/25$ , mentre l'odds di chi è inattivo è  $40/25$ . Il loro rapporto ci fornisce un  $OR = 0,25$ , che indica che l'attività fisica diminuisce di 4 volte l'esito DE. Si dice quindi che l'attività fisica è un fattore protettivo rispetto al DE.

L'OR è ampiamente – anche se non propriamente – usato anche nei report di studi clinici controllati. Tale ampio utilizzo è dovuto alla sua efficacia nel misurare la forza e la significatività dell'associazione tra due variabili, dal momento che ne fornisce una stima e un intervallo di confidenza, nonché alla possibilità che offre di tener conto dell'effetto di altre variabili su questa associazione (regressione logistica)<sup>2</sup>. Inoltre in alcune occasioni, cioè quando l'esito in esame è molto poco frequente, rappresenta una buona approssimazione del rischio relativo.

## Bibliografia

<sup>1</sup> Ricci E, Cipriani S. *Appunti di statistica. La probabilità*. Giornale Italiano di Medicina Sessuale e Riproduttiva 2006;13:102-3.

<sup>2</sup> Bland JM, Altman DG. *Statistics notes. The odds ratio*. BMJ 2000;320:1468.

### Domanda 1: L'odds ratio è una funzione statistica utilizzata per:

- Valutare l'incidenza di una patologia
- Valutare la forza dell'associazione fra una variabile esito e una caratteristica (fattore di rischio, fattore protettivo)
- Valutare la distribuzione di una caratteristica (es. assunzione di alcool) nella popolazione

**Domanda 2: L'OR è una funzione statistica che può assumere valori compresi fra 0 e infinito. Sappiamo che a seconda dei valori assunti l'OR indica che la variabile oggetto di studio può essere un fattore di rischio oppure un fattore protettivo. Supponiamo di aver calcolato un OR dei fumatori rispetto ai non fumatori. Come viene interpretato tale OR?**

- OR tra 0 e 1: il fumo è un fattore protettivo  
OR = 1: assenza di associazione (uguaglianza degli odds)  
OR > 1: il fumo è un fattore di rischio
- OR tra 0 e 10: il fumo è un fattore protettivo  
OR = 10: assenza di associazione  
OR > 10: il fumo è un fattore di rischio
- OR tra 0 e 1: il fumo è un fattore di rischio

OR = 1: assenza di associazione

OR > 1: il fumo è un fattore protettivo

**Domanda 3: Che tipo di variabile deve essere la variabile esito per poter permettere il calcolo dell'OR?**

- a) Una variabile continua (es. livello della pressione arteriosa)
- b) Una variabile categorica (es. gradi di una patologia)
- c) Una variabile dicotomica (es. sì/no, sano/malato, ecc.)

**Esercizio**

Supponiamo di aver effettuato uno studio caso-controllo avente come malattia oggetto di studio il DE. Nella scheda abbiamo dunque definito per ciascun paziente se si tratta di un caso o di un controllo e, per entrambi, abbiamo provveduto a rilevare i dati relativi alle variabili per le quali abbiamo formulato l'ipotesi che possa trattarsi di fattori di rischio o fattori protettivi. Tra queste variabili abbiamo rilevato la variabile "fumatore sì/no" e i dati raccolti possono essere sintetizzati, nella relativa tabella di contingenza, come segue:

Fumo	DE		Totale
	Sì (Caso)	No (Controllo)	
Sì	200	400	600
No	100	300	400
Totale	300	700	1000

1) Calcolare l'*odds* di DE tra fumatori, tra non fumatori e, quindi, l'OR:

*Odds* (fumatore) = —

*Odds* (non fumatore) = —

OR =

2) Come deve essere interpretato il valore di OR di 1,5 che abbiamo calcolato? OR = 1,5 significa che:

- a) non esiste associazione fra il fumo e il DE
- b) esiste associazione: un soggetto fumatore ha un rischio di sviluppare DE doppio rispetto a un soggetto non fumatore
- c) esiste associazione: un soggetto fumatore ha un rischio di sviluppare DE pari a 1,5 rispetto a un soggetto non fumatore

3) Sappiamo che per poter calcolare un OR dobbiamo essere in presenza di una variabile esito che sia

dicotomica (sì/no, salute/malattia, ecc.). In verità l'OR può essere calcolato solo quando si è in presenza di una Tabella 2x2. Supponiamo ora di aver rilevato una variabile fumo non dicotomica (es. non fumatore/lieve fumatore/forte fumatore).

Supponiamo che i dati raccolti possano essere sintetizzati nella Tabella di seguito.

Fumo	DE		Totale
	Sì (Caso)	No (Controllo)	
Forte fumatore	120	200	320
Lieve fumatore	80	200	280
Non fumatore	100	300	400
Totale	300	700	1000

Riorganizzare i dati della Tabella, tenendo come categoria di riferimento la categoria dei non fumatori, in modo da calcolare i due OR: OR dei forti fumatori rispetto alla categoria di riferimento e OR dei lievi fumatori rispetto alla categoria di riferimento.

Fumo	DE		Totale
	Sì (Caso)	No (Controllo)	
Forte fumatore			
Non fumatore			
Totale			

Fumo	DE		Totale
	Sì (Caso)	No (Controllo)	
Lieve fumatore			
Non fumatore			
Totale			



# Linee Guida per la diagnosi genetica della coppia infertile

## *Guidelines for the Genetic Diagnosis of Infertile Couple*

C. FORESTA, A. FERLIN

Centro di Crioconservazione dei Gameti Maschili, Università di Padova

### Introduzione

Nonostante l'alta prevalenza dell'infertilità, la ricerca si è focalizzata solo di recente sui fattori genetici che possono causare infertilità maschile e femminile. È ormai chiaro che alterazioni genetiche sono presenti in circa il 15% degli uomini e nel 10% delle donne infertili, ed includono sia alterazioni cromosomiche che mutazioni di singoli geni. Le tecniche di riproduzione assistita rendono possibile che alterazioni genetiche possano essere trasmesse ai figli e tale rischio è in molti casi veramente elevato. La ICSI ha suscitato i dubbi maggiori circa un possibile aumento di malattie genetiche nei figli, poiché essa oltrepassa i normali meccanismi fisiologici della fecondazione. Tuttavia il rischio di trasmissione riguarda anche la FIVET e l'inseminazione endouterina (IUI), poiché anche soggetti infertili normozoospermici possono essere portatori di anomalie genetiche (per esempio 47,XXY). La selezione naturale previene la trasmissione di mutazioni che provocano infertilità, mentre tale meccanismo protettivo viene sorpassato dalle tecniche di riproduzione assistita. Il rischio è quindi che tali difetti genetici persistano o addirittura aumentino nelle generazioni future. L'identificazione di fattori genetici in una coppia infertile è pertanto obbligatoria sia per una diagnosi ed un trattamento accurati che ai fini prognostici.

La mancanza di regole nazionali ed internazionali per la diagnosi di difetti genetici nella coppia infertile ha spinto i ricercatori e i clinici italiani che si occupano di Medicina della Riproduzione a mettere a punto alcune Linee Guida. Si è pertanto dato vita ad una *Consensus Conference* con lo scopo di esprimere su questo complesso e delicato problema opinioni e suggerimenti condivisi dalla comunità medico-scientifica che in Italia opera nell'ambito della riproduzione umana.

Il Comitato di esperti include le diverse discipline coinvolte nella riproduzione umana (Ginecologia, Andrologia, Endocrinologia, Biologia della Riproduzione, Urologia, Embriologia e Genetica) ed è costituito da rappresen-

tanti ufficialmente designati dalle seguenti Società Scientifiche italiane e straniere: Associazione Ginecologi Extra Ospedalieri (AGEO), Società Italiana di Andrologia (SIA), Società Italiana di Andrologia Medica (SIAM), Società Italiana di Ecografia Urologica, Andrologica e Nefrologica (SIEUN), Società Italiana di Embriologia e Riproduzione (SIER), Società Italiana di Endocrinologia (SIE), Società Italiana di Fertilità e Sterilità (SIFES), Società Italiana di Fisiopatologia della Riproduzione (SIFR), Società Italiana di Genetica Umana (SIGU), Società Italiana di Ginecologia e Ostetricia (SIGO), Società Italiana di Riproduzione (SIDR), Società Italiana di Urologia (SIU), *American Society of Andrology* (ASA), *European Academy of Andrology* (EAA), *European Society of Human Reproduction and Embryology* (ESHRE), *International Society of Immunology of Reproduction* (ISIR).

Il Comitato ha lavorato per cinque mesi e nel febbraio 2001 i risultati sono stati discussi ad un convegno tenutosi ad Abano Terme (PD). La bozza del documento conclusivo è rimasta disponibile su Internet per un altro mese per raccogliere ogni ulteriore commento e poi è stato preparato il documento definitivo. Esso rappresenta quindi un reale "consensus" che qui di seguito viene brevemente sintetizzato.

Nelle Linee Guida non sono state incluse tutte le cause di infertilità ma solamente quelle clinicamente rilevanti, sia in termini di prevalenza nell'infertilità maschile e femminile che come rischio di trasmissione ai figli. Inoltre esse sono state concepite per un uso clinico e quindi non analizzano gli aspetti tecnici legati a ciascun test genetico. Poiché questo campo è in rapida espansione le Linee Guida e l'approccio diagnostico, qui di seguito proposto, saranno periodicamente rivisti.

### Infertilità maschile

Le conoscenze sui meccanismi molecolari della spermatogenesi sono in rapida evoluzione ed è probabile

che molti altri geni coinvolti nell'infertilità maschile verranno identificati nei prossimi anni. Le ricerche più recenti hanno permesso di chiarire che diverse alterazioni genetiche hanno un'importante rilevanza clinica, sia come causa di infertilità maschile che in termini di rischio di trasmissione mediante metodiche di riproduzione assistita. Queste alterazioni includono sia aberrazioni cromosomiche che mutazioni di specifici geni.

La Tabella I riassume le cause genetiche di infertilità maschile poste in discussione. La Tabella II elenca i

**Tab. I.** Classificazione delle cause genetiche di infertilità maschile.

#### **Aberrazioni cromosomiche (omogenee o in mosaico)**

Cromosomi sessuali  
47,XXY (sindrome di Klinefelter)  
47,XYY e altre aneuploidie-XX  
Maschio 46,XX 45,X  
Aberrazioni strutturali del cromosoma Y  
    Delezioni  
    Anelli  
    Isocromosomi  
    Inversioni  
Autosomi  
    Traslocazioni Robertsoniane  
    Traslocazioni reciproche  
    Inversioni  
    Sindromi cliniche  
        Trisomia 21  
        Duplicazioni e delezioni parziali  
Eteromorfismo cromosomici  
    Inv (9)  
    Inversione familiare dell'Y  
    Yq +

#### **Mutazioni geniche**

Legate all'Y  
    Microdelezioni dell'Yq11  
Legate all'X  
    Sindrome di Kallmann  
    Sindrome da insensibilità agli androgeni  
Autosomiche  
    Sindromi genetiche complesse in cui l'infertilità è una manifestazione minore (Tab. III)  
    Infertilità è come manifestazione maggiore  
        CFTR  
        Geni per le subunità  $\beta$  di LH e FSH e geni per i recettori di LH e FSH

#### **Alterazioni cromosomiche confinate agli spermatozoi**

Gravi testicolopatie primarie  
Post-chemio- e radio-terapia

test genetici che il Comitato raccomanda di includere nell'uso clinico.

#### **ANALISI DEL CARIOTIPO**

È noto da più di 20 anni che la prevalenza di anomalie cromosomiche è maggiore nei maschi infertili e la percentuale è inversamente proporzionale alla conta spermatica. Rispetto alla popolazione generale le alterazioni cromosomiche sono molto comuni nei partner maschili di coppie sottoposte a ICSI. Sono stati condotti diversi studi in passato dai quali risulta che l'incidenza di fattori cromosomici nei soggetti infertili è compresa tra il 2 e l'8% con un valore medio di circa il 5%. Questa percentuale aumenta fino al 15% nei soggetti azoospermici nei quali l'anomalia maggiore è rappresentata dall'aneuploidia 47,XXY. Le alterazioni dei cromosomi sessuali sono l'anomalia maggiore nei soggetti azoospermici, ma nei pazienti infertili si possono riscontrare anche diverse anomalie strutturali degli autosomi, che includono le traslocazioni Robertsoniane e reciproche, inversioni, duplicazioni e delezioni.

Nei soggetti infertili sottoposti ad ICSI in Francia il 3,7% ha anomalie dei cromosomi sessuali ed il 2,4% ha anomalie degli autosomi. Nei soggetti azoospermici le anomalie dei cromosomi sessuali si ritrovano nel 15,9% e anomalie degli autosomi nel 2,8% dei casi. È interessante notare che nei soggetti normozoospermici la percentuale delle alterazioni cromosomiche era del 3,0%, comprendente sia aneuploidie dei cromosomi sessuali (per esempio 47,XXY e mosaicismi) (1,4%) e anomalie strutturali bilanciate (1,6%). Studi preliminari sulle gravidanze ottenute mediante ICSI suggeriscono che le alterazioni dei cromosomi sessuali sono più frequenti rispetto alle gravidanze naturali. In generale i bambini nati mediante ICSI hanno un più alto rischio di anomalie cromosomiche. Anche se i dati sono ancora contrastanti sembra che la percentuale di alterazioni cromosomiche nei nati ICSI sia nell'ordine del 3%, la metà delle quali viene trasmessa dal padre.

Data la frequenza delle aberrazioni cromosomiche nei soggetti infertili con testicolopatia grave, il Comitato ha raccomandato l'analisi del cariotipo durante il processo diagnostico dei soggetti con azoospermia e grave oligozoospermia. In questi pazienti lo *screening* citogenetico è obbligatorio prima di qualsiasi forma di riproduzione assistita. Inoltre l'analisi del cariotipo dovrebbe essere eseguito nei pazienti candidati a metodiche di fecondazione assistita (inclusa la IUI) anche quando i parametri seminali sono nella norma o solo leggermente alterati. Infine, poiché alcune anomalie cromosomiche (come il 47,XXY) si possono ri-

Tab. II. Test genetici nell'infertilità maschile.

	<b>Azoospermia</b>	<b>Grave oligozoospermia (conta spermatica &lt; 10 x 10<sup>6</sup>/ml)</b>	<b>Moderata oligozoospermia (conta spermatica 10-20 x 10<sup>6</sup>/ml) e normozoospermia</b>
Cariotipo	– Durante l'iter diagnostico – Prima di ART	– Durante l'iter diagnostico – Prima di ART	– Dopo un anno di rapporti mirati – Prima di ART
Microdelezioni del cromosoma Y	– Durante l'iter diagnostico (non ostruttiva) – Prima di ART	– Durante l'iter diagnostico – Prima di ART	—
CFTR	– Durante l'iter diagnostico (CBAVD) – Prima di ART	– Durante l'iter diagnostico (CUAVD) – Prima di ART	—
KAL1	– Durante l'iter diagnostico (HH)	—	—
Recettore per gli androgeni	Suggerito: – Durante l'iter diagnostico (alto ASI)	Suggerito: – Durante l'iter diagnostico (alto ASI)	—
5 $\alpha$ -reduttasi 2	Suggerito: – Casi clinici selezionati	Suggerito: – Casi clinici selezionati	—
Analisi delle aneuploidie spermatiche mediante FISH	—	Non suggerito: – Eventualmente durante l'iter diagnostico – Dopo radio- – Chemioterapia	—

scontrare in soggetti con un'apparente normozoospermia, l'analisi del cariotipo dovrebbe essere eseguita se dopo un anno di rapporti mirati non è stata ancora ottenuta una gravidanza.

#### **MICRODELEZIONI DEL BRACCIO LUNGO DEL CROMOSOMA Y**

Molti studi hanno chiarito che le microdelezioni del braccio lungo del cromosoma Y (Yq) rappresentano una causa frequente di infertilità maschile. Esistono tre diversi loci chiamati “*azoospermia factors*” (AZ-Fa, b e c) e diversi geni sono stati isolati da queste regioni, ma anche altri geni che mappano nell'Yq potrebbero avere un loro ruolo nel determinare il fenotipo dei pazienti deleti. Le microdelezioni dell'Yq determinano una grave testicolopatia che si esprime con azoospermia o grave oligozoospermia. In generale la prevalenza di microdelezioni dell'Yq nei soggetti infertili è stimata attorno al 10%. In pazienti selezionati questa percentuale aumenta al 15% nei pazienti con grave oligozoospermia idiopatica e al 20% in quelli con azoospermia non ostruttiva idiopatica. Microdelezioni si possono anche riscontrare nei soggetti con grave testicolopatia associata ad altre cause

di danno testicolare come il varicocele o il criptorchidismo.

I pazienti con microdelezioni dell'Yq hanno frequentemente spermatozoi nell'ejaculato o nei testicoli e pertanto sono spesso candidati a tecniche di fecondazione assistita. In questi casi l'anomalia genetica viene sicuramente trasmessa all'eventuale figlio maschio che quindi erediterà la stessa malattia del padre (l'infertilità). Tuttavia la reale conseguenza di questa trasmissione non è tuttora chiara e il recente riscontro di aneuploidie spermatiche nei pazienti con microdelezioni (con conseguente rischio di generare figlie affette da sindrome di Turner) impone problemi sia medici che etici.

Il Comitato ha suggerito di eseguire l'analisi delle microdelezioni dell'Yq durante l'approccio diagnostico dei soggetti infertili con azoospermia non ostruttiva e grave oligozoospermia, indipendentemente dalla presenza di altre possibili cause di danno testicolare. Questa analisi non è indicata quando la concentrazione spermatica è maggiore di 10 milioni per millilitro. Inoltre tutti i soggetti con azoospermia non ostruttiva e grave oligozoospermia dovrebbero

bero essere sottoposti a quest'analisi prima di metodiche di fecondazione assistita.

### GENE CFTR

Un individuo su 2.500 è affetto da fibrosi cistica e uno su 25 è portatore asintomatico eterozigote. Il gene CFTR è localizzato sul cromosoma 7q31.1-31.2 e la mutazione più frequente è rappresentata dalla delezione di una fenilalanina in posizione 508 (DF508), ma esistono più di 800 mutazioni diverse.

L'agenesia bilaterale dei vasi deferenti (CBAVD) rappresenta in molti casi una forma lieve o incompleta di fibrosi cistica, infatti circa il 70-80% di questi soggetti sono eterozigoti o eterozigoti composti per una mutazione CFTR. Una particolare mutazione associata alla CBAVD è chiamata "5T allele" (il normale allele ha 7T o 9T nucleotidi nell'introne 8), che causa la mancata trascrizione dell'esone 9 e bassi livelli di espressione della proteina CFTR. Anche l'agenesia monolaterale dei deferenti (CUAVD) può essere associata a mutazioni CFTR. Sebbene la prevalenza delle mutazioni in questo gruppo di soggetti sia molto variabile in diversi studi (dall'11 al 75%), si ritiene comunque che un certo numero di CUAVD sia causato dalla mancanza della proteina CFTR. In ogni caso i soggetti con CBAVD o CUAVD hanno una normale spermatogenesi e quindi sono candidati alla ICSI utilizzando spermatozoi eiaculati, epididimali o intratesticolari. In questi casi il rischio maggiore è rappresentato da figli affetti da fibrosi cistica conclamata in quei casi in cui anche la partner femminile sia eterozigote composta per una mutazione CFTR. Il Comitato ha suggerito di eseguire lo *screening* delle mutazioni CFTR (incluso l'allele 5T) nei soggetti infertili con CBAVD o CUAVD. Se la coppia è candidata a tecniche di riproduzione assistita il test dovrebbe essere eseguito sia nel maschio che nella partner femminile e andrebbe offerto un servizio di consulenza genetica.

### GENE KAL1

La sindrome di Kallmann colpisce un maschio su 10.000 e consiste di un ipogonadismo ipogonadotropo (HH) isolato, idiopatico e congenito associato ad anosmia. Esistono tre differenti forme di sindrome di Kallmann ereditate come forme legate all'X o autosomiche dominanti o recessive. La forma legata all'X causa il 10-15% delle sindromi di Kallmann. Il gene di questa forma, KAL1, codifica per una proteina (anosmina) con un ruolo centrale nella migrazione dei neuroni GnRH e dei nervi olfattori all'ipotalamo. Altre manifestazioni cliniche in questi soggetti

possono includere criptorchidismo, agenesia renale monolaterale, palatoschisi e cecità per i colori.

Sebbene la sindrome di Kallmann sia rara e l'analisi di mutazioni del gene KAL1 non sia facilmente eseguibile, il Comitato ha raccomandato di includere lo *screening* del gene KAL1 in tutti i soggetti azoospermici con HH e anosmia. Questa decisione è anche motivata dal fatto che un trattamento ormonale può riportare la fertilità in questi soggetti, ma ciò rende possibile la trasmissione del difetto genetico ai figli.

### GENE PER IL RECETTORE DEGLI ANDROGENI

La sindrome da insensibilità agli androgeni è una malattia recessiva legata all'X causata da un'anomalia del gene per il recettore degli androgeni (AR) che è localizzato in Xq11-12. I soggetti affetti possono presentare diversi fenotipi che variano da un fenotipo femminile completo all'ambiguità genitale al maschio infertile. Sono state riportate più di 300 mutazioni nel gene AR, la maggior parte delle quali è rappresentata da mutazioni puntiformi che portano a sostituzione aminoacidica. I maschi infertili con mutazioni dell'AR presentano azoospermia o grave oligozoospermia, sia come manifestazione isolata che associata ad altre anomalie dovute ad una scarsa sensibilità agli androgeni (come criptorchidismo, ipospadia, ginecomastia, scarsa virilizzazione). Questi soggetti hanno un particolare profilo ormonale con aumentati livelli plasmatici di LH e testosterone normale o aumentato. Il prodotto LH per testosterone (espresso in U x nmol/l2), chiamato indice di sensibilità agli androgeni (ASI), può essere utile nell'identificare i pazienti a rischio di mutazioni del gene AR. La frequenza di mutazioni nei soggetti infertili con azoospermia o grave oligozoospermia è del 2-3%. Poiché la stessa mutazione può essere associata a diversi fenotipi, non si possono prevedere le conseguenze cliniche nei bambini nati mediante tecniche di riproduzione assistita e la coppia deve essere informata circa la possibilità di un peggioramento delle manifestazioni cliniche nei figli che ereditano il difetto genetico. Un'espansione della tripletta CAG nell'esone 1 (più di 40 ripetizioni) causa l'atrofia muscolare spino-bulbare (SBMA o malattia di Kennedy). Non è ancora chiaro se un'espansione minore di triplette CAG causi un difetto isolato della spermatogenesi.

Solo pochi studi sono stati eseguiti per valutare le mutazioni del gene AR nei soggetti infertili senza altre anomalie congenite. In ogni caso il Comitato ha suggerito di eseguire il test nei soggetti azoospermici e gravemente oligozoospermici con un alto ASI,

anche se questa non è una regola assoluta. Inoltre in questi soggetti il test dovrebbe essere comunque effettuato come analisi di secondo livello dopo l'analisi del cariotipo. Ovviamente l'analisi genetica del gene AR dovrebbe essere eseguita quando ci sono altre manifestazioni cliniche di insensibilità agli androgeni. Poiché il ruolo delle triplette CAG nell'infertilità maschile è ancora dibattuto, questa analisi non dovrebbe essere inclusa nella pratica clinica.

### **GENE 5 $\alpha$ -REDUTTASI-2 (SRD5 $\alpha$ 2)**

Questo enzima converte il testosterone in 5 $\alpha$ -diidrotosterone in specifici tessuti androgeno-dipendenti. Il deficit della 5 $\alpha$ -reduttasi-2 causa pseudoermafroditismo maschile che normalmente si manifesta alla nascita con ipospadia perineo-scrotale pseudovaginale. Una certa virilizzazione avviene alla pubertà con crescita del pene e discesa testicolare. I soggetti adulti possono presentare azoospermia o grave oligozoospermia talvolta associate a testicoli ritenuti e ipospadia. Sono state riportate gravidanze mediante inseminazione endouterina in pazienti con deficit della 5 $\alpha$ -reduttasi.

Data la bassa incidenza di anomalie del gene 5 $\alpha$ -reduttasi nei soggetti infertili il Comitato ha ritenuto di suggerire questa analisi solamente in casi selezionati che presentano caratteristiche particolari.

### **ANALISI DELLE ANEUPLOIDIE SPERMATICHE**

I maschi normali producono una percentuale variabile (tra l'1 ed il 15%) di spermatozoi con aberrazioni cromosomiche, la maggior parte delle quali rappresentato da alterazioni strutturali (circa 90%). Alcuni dati suggeriscono che alcune condizioni cliniche collegate ad infertilità maschile sono associate ad un'aumentata percentuale di spermatozoi ipo- o iperaploidi. Nei soggetti infertili con grave testicolopatia, le anomalie numeriche spermatiche sono aumentate come conseguenza di alterazioni mitotiche e meiotiche. Inoltre, la chemioterapia e la radioterapia hanno un effetto dannoso sulla spermatogenesi che persiste fino a sei mesi dopo la fine della terapia. L'ibridizzazione *in situ* fluorescente (FISH), che rappresenta la tecnica di studio delle aneuploidie spermatiche, ha tuttavia alcune limitazioni. Infatti non è in grado di individuare le anomalie strutturali, solo pochi spermatozoi possono essere studiati ed ha alcuni problemi tecnici legati alla ibridizzazione. Al momento attuale quindi non esiste un accordo unanime circa l'utilizzo della FISH nella pratica clinica ed il Comitato non ha suggerito questa analisi come test di routine nei soggetti infertili. Se ulteriori dati speri-

mentali dimostreranno l'efficacia di questa metodica allora la FISH dovrebbe essere eseguita nelle gravi testicolopatie primarie e dopo trattamenti radio- e chemioterapici. Almeno i cromosomi sessuali ed il cromosoma 21 dovrebbero essere inclusi in questa analisi.

### **ALTRE CONDIZIONI**

Altre anomalie genetiche sono state considerate dal Comitato, ma non sono state incluse come test da effettuarsi di routine nei soggetti infertili perché estremamente rare o perché mancano ancora dati scientifici certi. Tali alterazioni comprendono mutazioni in geni essenziali per lo sviluppo gonadico e la funzione testicolare (deficit di enzimi della steroidogenesi, mutazioni nei geni delle subunità  $\beta$  dell'LH e FSH e dei recettori per LH e FSH), e geni pleiotropici le cui mutazioni alterano anche la spermatogenesi (distrofia miotonica, DAX1). Inoltre molti difetti genetici possono alterare la spermatogenesi, ma le manifestazioni cliniche sono così complesse che l'infertilità in realtà rappresenta solo un'espressione minore.

## **Infertilità femminile**

A parte le anomalie cromosomiche, le alterazioni dello sviluppo sessuale femminile e della funzione riproduttiva possono essere causate da difetti di geni che agiscono a vari livelli dell'asse ipotalamo-ipofisi-ovaie o nella biosintesi gonadica e surrenalica di steroidi e dei loro recettori. Inoltre, alcune condizioni cliniche comuni come la sindrome dell'ovaio policistico (PCOS) o la menopausa precoce (POF) possono avere un'origine genetica. I progressi tecnici nel campo delle tecniche di riproduzione assistita hanno ancor più stimolato la ricerca in questo settore. Di conseguenza alcuni aspetti particolari legati a queste metodiche, come la scarsa risposta ovarica all'iperstimolazione (donne "*poor responders*"), sono stati analizzati come di possibile origine genetica. Infine, una relazione causale è stata stabilita tra alcune anomalie cromosomiche e la poliabortività. In Tabella III sono riassunte le cause genetiche di infertilità femminile mentre in Tabella IV sono indicati i test genetici che il Comitato ha suggerito di eseguire.

### **ANALISI DEL CARIOTIPO**

La sindrome di Turner è la più comune alterazione cromosomica nelle donne infertili, ma si possono riscontrare con una certa frequenza anche diverse aberrazioni strutturali autosomiche. La frequenza delle

**Tab. III.** Classificazione delle cause genetiche di infertilità femminile.

---

**Aberrazioni cromosomiche (omogenee o in mosaico)**

---

Cromosomi sessuali

Sindrome di Turner e disgenesie gonadiche con bassa statura (45,X; mosaicismi di tipo 45,X/46,XX e 45,X/47,XXX; isocromosoma Xq; del(Xq); del(Xp); r(X) ecc.)

Disgenesie gonadiche con linea cellulare Y

Disgenesia mista (45,X/46,XY)

Disgenesia gonadica 46,XY (Sindrome di Swyer)

Ermafroditismo vero con linea cellulare Y

Traslocazioni X-autosomiche

47,XXX e mosaicismi

Autosomi

Traslocazioni Robertsoniane

Traslocazioni reciproche

Inversioni

---

**Mutazioni geniche**

---

Legate all'X

Sindrome dell'X fragile (FRAXA)

Sindrome Kallmann

Sindrome da completa insensibilità agli androgeni

Autosomiche

Sindromi genetiche complesse in cui l'infertilità è una manifestazione minore

Infertilità come manifestazione maggiore

Gene per la subunità  $\beta$  dell'FSH e geni per i recettori di LH e FSH

Gene per il recettore del GnRH

BPES (blefarofimosi, ptosi, *epicanthus inversus*)

Sindrome di Daniys-Drash

Sindrome di Fresier

---

**Aberrazioni cromosomiche confinate agli ovociti**

---

Età avanzata

anomalie cromosomiche nell'infertilità femminile è variabile in diversi studi, ma si può stimare intorno al 5%. Il 2,8% delle partner femminili di coppie sottoposte a ICSI presenta alterazioni numeriche dei cromosomi sessuali, mentre il 2,1% ha anomalie strutturali degli autosomi. Il fenotipo delle donne affette da aberrazioni cromosomiche sessuali è molto variabile, sia in termini di genitali esterni ed interni che di caratteristiche somatiche. Per esempio, le donne con sindrome di Turner o altre sindromi con bassa statura e disgenesia gonadica possono presentare diversi dismorfismi e anomalie. Tuttavia, una caratteristica comune di tutte queste alterazioni cromosomiche è rappresentata da

una disfunzione ovarica primaria (ipergonadotropa) con amenorrea primaria o secondaria (inclusa la POF) o oligomenorrea. Per esempio, circa il 30% delle amenorree primarie è causato dalla sindrome di Turner. Inoltre, le aberrazioni strutturali autosomiche possono causare poliabortività.

Il Comitato ha suggerito di eseguire l'analisi del cariotipo durante la fase diagnostica delle donne infertili con disfunzione ovarica primaria o poliabortività. Questo *screening* è inoltre obbligatorio nelle donne candidate a tecniche di riproduzione assistita. Come per il maschio, l'analisi del cariotipo dovrebbe essere eseguita dopo un anno di rapporti mirati senza risultato, poiché anche in questi casi possono esistere alterazioni del cariotipo (tipo 47,XXX).

**SINDROME DELL'X FRAGILE (FRAXA)**

Rappresenta la più comune causa di ritardo mentale nei maschi ed è causata dalla espansione della tripletta CGG nell'esone 1 del gene FMR1 localizzato in Xq27.3. Nella popolazione generale si riscontrano meno di 50 ripetizioni, mentre più di 200 ripetizioni (mutazione completa) causano il ritardo mentale. Una premutazione è definita come 50-200 ripetizioni e può essere associata con POF in donne per il resto normali. Infatti, il 15-25% delle donne premutate sono affette da POF ed il 6,5% delle donne con POF ha una premutazione FRAXA. Le pazienti che sviluppano POF frequentemente presentano un periodo di oligomenorrea con un progressivo aumento delle gonadotropine. La premutazione è stata inoltre associata ad una scarsa risposta ovarica alla iperstimolazione durante cicli di fecondazione *in vitro*. È importante notare che la premutazione predispone ad un'ulteriore espansione delle triplette nella linea germinale e quindi le donne con premutazione hanno un più alto rischio di concepire figli con ritardo mentale.

Il Comitato ha suggerito di includere questo test nello *screening* diagnostico delle donne con oligomenorrea o amenorrea causata da disfunzione ovarica primaria (inclusa la POF), soprattutto quando queste donne devono essere sottoposte a fecondazione assistita. Lo *screening* di premutazioni dovrebbe anche essere eseguita in donne apparentemente normali ma con bassa risposta ovarica alla iperstimolazione in precedenti cicli FIVET o ICSI.

**GENE KAL1**

La sindrome di Kallmann causata dalla mutazione del gene KAL1 è estremamente rara nelle donne e si presenta con amenorrea primaria ipergonadotropa e ano-

Tab. IV. Test genetici nell'infertilità femminile.

	<b>Amenorrea (primaria e secondaria, inclusa la POF) e oligomenorrea con ipergonadotropinismo</b>	<b>Ipogonadismo ipogonadotropo</b>	<b>Apparentemente normale</b>	<b>Aborti ripetuti</b>
Cariotipo	- Durante l'iter diagnostico - Prima di ART	-	- Dopo un anno di rapporti mirati - Prima di ART	- Durante l'iter diagnostico
FRAXA	- Durante l'iter diagnostico - Prima di ART	-	- Prima di ART (scarsa risposta ovarica)	-
KAL1	-	- Durante l'iter diagnostico	-	-
CFTR e	-	-	- Prima di ART	-

smia. Le donne eterozigoti non hanno anomalie evidenti. La sindrome di Kallmann dovrebbe essere sospettata quindi solo nelle donne con HH ed in questi casi dovrebbe essere eseguita l'analisi del gene KAL1.

#### **GENE CFTR**

Mutazioni del gene CFTR non sono associate sicuramente ad infertilità femminile. Tuttavia, le donne affette da fibrosi cistica hanno un aumentato rischio di complicazioni durante la gravidanza. Vista l'alta prevalenza di mutazioni del CFTR nella popolazione generale e l'alto rischio di mutazioni del CFTR nei maschi sottoposti a ICSI, il Comitato ha suggerito di eseguire il test in tutte le donne candidate a tecniche di riproduzione assistita.

#### **ALTRE CONDIZIONI**

Come per il maschio anche altre condizioni possono determinare infertilità femminile. Tuttavia, sono

estremamente rare e di scarsa rilevanza clinica per gli specialisti nel campo della riproduzione. Alcuni esempi includono le mutazioni del gene per il recettore degli androgeni che causano una completa insensibilità agli androgeni, le sindromi in cui l'infertilità è una manifestazione minore e le sindromi in cui l'infertilità è una manifestazione maggiore (mutazioni nei geni per i recettori dell'FSH e LH, gene per FSH, gene per il recettore del GnRH).

È da notare che anche le donne con cariotipo normale producono una percentuale variabile (più del 20%) di ovociti con alterazioni cromosomiche. Questa percentuale aumenta con l'avanzare dell'età in conseguenza di alterati *crossing-over* e non disgiunzioni meiotiche. Una consulenza genetica è quindi raccomandata anche quando si effettuano metodiche di riproduzione assistita in donne non più giovani.

# Futuri eventi congressuali di interesse andrologico

## Future Congresses of Sexual and Reproductive Medicine Interest

A CURA DI G. MAIO


### Congressi 2006

#### OTTOBRE

D	L	M	M	G	V	S
01	02	03	04	05	06	07
08	09	10	11	12	13	14
15	16	17	18	19	20	21
22	23	24	25	26	27	28
29	30	31				


 6-7 Ottobre – Amsterdam, The Netherlands  
European Society for Andrological Urology (ESAU)  
5<sup>th</sup> Meeting  
Tel. +31 2638 91751  
E-mail: info@congressconsultants.com  
Website: www.uroweb.org


 6-7 Ottobre – Roma  
Male Infertility and ART  
Tel. 06 489 06436  
E-mail: info@nicocongressi.it  
Website: www.nicocongressi.it

 14-15 Ottobre – Chicago, USA  
ISSWSH  
Update in Management of Women's Sexual Health  
2006  
Tel. +1 847 5177 225  
E-mail: isswsh@wjweiser.com  
Website: www.isswsh.org

 19-23 Ottobre – Shanghai, China  
Second Asia-Pacific Forum on Andrology (2<sup>nd</sup> APFA)  
Tel. +86-21-5492 2824

Fax +86-21-5492 2825  
E-mail: apfa@sibs.ac.cn  
Website: [www.asiaandro.com/2APFA](http://www.asiaandro.com/2APFA)

 21-25 Ottobre – New Orleans, Louisiana  
American Society for Reproductive Medicine (ASRM)  
62<sup>nd</sup> Annual Meeting  
Website: www.asrm.org

 27-28 Ottobre – Reggio Calabria  
Società Italiana di Andrologia  
Congresso Annuale della Sezione Campania Calabria  
Website: www.andrologiaitaliana.it


 27-29 Ottobre – Verona, Italy  
Italian Association of Clinical Endocrinologists  
American Association of Clinical Endocrinologists  
6<sup>th</sup> AME National Meeting  
3<sup>rd</sup> Joint Meeting with AACE:  
Update in Clinical Endocrinology  
Tel. +39 0432 21391  
Fax +39 0432 506687  
E-mail: ame@nordestcongressi.it  
Website: www.associazionemediciendocrinologi.it  
www.aace.com

#### NOVEMBRE


D	L	M	M	G	V	S
			01	02	03	04
05	06	07	08	09	10	11
12	13	14	15	16	17	18
19	20	21	22	23	24	25
26	27	28	29	30		


### Legenda simboli

 Andrologia generale

 Medicina Sessuale

 Urologia

 Medicina della Riproduzione

 Endocrinologia

 Male Aging



♂ 2-4 Novembre – Marrakech, Marocco  
 Association Mediterranee d'Andrologie (AMA)  
 5<sup>th</sup> Annual Meeting  
 Tel./Fax +20 3 359 5043/44  
 E-mail: drashraf@aast.edu  
 Website: ama-andrologie.org

♂♀ 2-5 Novembre – Las Vegas, USA  
 American Sexual Medicine Society Annul Meeting  
 E-mail: suo@wjweiser.com  
 Website: www.smsna.org

♂ 9-11 Novembre – Firenze  
 Società Italiana di Andrologia Medica  
 VII Congresso Nazionale  
 Website: www.andrologiamedica.it

♂♀ 10-11 Novembre – Milano  
 Società Italiana di Chirurgia Genitale Maschile  
 8° Congresso Nazionale  
 Tel. 06 4997 5601  
 E-mail: sicgem@libero.it

♂♀ 12-16 Novembre – Cape Town, Sud Africa  
 Societe Internationale d'Urologie (SIU)  
 28<sup>th</sup> Congress  
 E-mail: central.office@siu-urology.org  
 Website: www.siu-urology.org

♂ 15-18 Novembre – Leeds, UK  
 British Andrology Society  
 2006 Annual Meeting  
 Tel. +44-113-3923882  
 E-mail: d.miller@leeds.ac.uk  
 Website: http://britishandrology.org.uk

♂♀ 15-18 November – Ottawa, Canada  
 Canadian Fertility and Andrology Society  
 2006 Annul Meeting  
 E-mail: agneta.hollander@cfas.ca  
 Website: www.cfas.ca

♂♀ 17-19 Novembre – Istanbul, Turkey  
 Hypospadias and Intersex Disorders  
 First World Congress  
 Tel. +90 212 291 19 06  
 Fax +90 212 219 05 88  
 E-mail: cnidus@cnidus.com  
 Website: www.ishid.org  
 www.hypospadias-intersex.org

♂ 24-25 Novembre – Cosenza  
 Società Italiana di Andrologia  
 Meeting Nazionale di Andrologia e Medicina della  
 Riproduzione  
 Website: www.andrologiaitaliana.it

## DICEMBRE

D	L	M	M	G	V	S
					01	02
03	04	05	06	07	08	09
10	11	12	13	14	15	16
17	18	19	20	21	22	23
24	25	26	27	28	29	30
31						

♂♀ 1-3 Dicembre – Mumbai, India  
 Asia Pacific Society for Sexual Medicine (APSSM)  
 2<sup>nd</sup> Regional Conference  
 Tel. +91 4023 402430  
 E-mail: agassi.apssm@gmail.com  
 Website: www.agassi.in

♂♀ 3-6 Dicembre – Vienna, Austria  
 European Society for Sexual Medicine (ESSM)  
 9<sup>th</sup> Congress  
 Tel. +49 40 670 882 0  
 Fax +49 40 670 32 83  
 E-mail: essm@cpo-hanser.de  
 Website: www.essm.org

♂♀ 4-7 Dicembre – Clermont-Ferrand, Francia  
 4<sup>th</sup> International Workshop on Epididymis  
 Tel. +33 473 615188  
 E-mail: joel.drevet@univ-bpclermont.fr  
 Website: www.agence-mo.com/epididymis4

♂ 7-10 Dicembre – Toulouse, Francia  
 European Association of Andrology  
 4<sup>th</sup> European Congress of Andrology  
 E-mail: androlog@cict.fr  
 Website: www.eaacongress2006.cict.fr

♂♀ 15-16 Dicembre – Roma  
 Il maschio e l'amore – Le paure, i miti,  
 i sogni, le terapie mediche e psicologiche  
 Website: www.andrologiaitaliana.it

## Congressi 2007

### GENNAIO

D	L	M	M	G	V	S
	01	02	03	04	05	06
07	08	09	10	11	12	13
14	15	16	17	18	19	20
21	22	23	24	25	26	27
28	29	30	31			



24-27 Gennaio – Bali, Indonesia  
4<sup>th</sup> Congress of the Asia Pacific Society for the Study on Aging Male (APSSAM)  
E-mail: apssam2007@urologi.or.id  
website: <http://apssam2007.urologi.or.id>



25-26 Gennaio – Napoli  
Grandangolo 2007 – Un anno di Urologia  
Website: [www.andrologiaitaliana.it](http://www.andrologiaitaliana.it)



28-30 Gennaio – San Francisco, USA  
UCSF – CHE  
Summit on environmental challenger to reproductive health and fertility  
Tel. +1 415 4762563  
E-mail: [wadem@obgyn.ucsf.edu](mailto:wadem@obgyn.ucsf.edu)

### FEBBRAIO

D	L	M	M	G	V	S
				01	02	03
04	05	06	07	08	09	10
11	12	13	14	15	16	17
18	19	20	21	22	23	24
25	26	27	28			



6-9 Febbraio – Dubai  
Pan Arab Society for Sexual Medicine  
3<sup>rd</sup> Biannual Conference  
Tel. 202 303 3238  
Fax 202 380 3072  
E-mail: [info@passm.org](mailto:info@passm.org)  
Website: [www.passm.org/dubai](http://www.passm.org/dubai)



8-10 Febbraio – Montreal, Canada  
ISSAM (International Society for the Study of the Aging Male)

2<sup>nd</sup> North American Congress

Tel. +41 22 9080 488

Fax +41 22 7322 850

E-mail: [aging@kenes.com](mailto:aging@kenes.com)

Website: [www.kenes.com/aging/cssam2](http://www.kenes.com/aging/cssam2)



16-18 Febbraio – Lisbon, Portugal  
International Society for Male Health and Gender (ISMH)  
5<sup>th</sup> International Symposium: Addressing the couple: a broader perspective for sexual medicine  
Website: [www.ismh.org/ismh/english/symposia\\_2006.htm](http://www.ismh.org/ismh/english/symposia_2006.htm)



22-25 Febbraio – Orlando, Florida USA  
ISSWSH Annual Meeting (International Society for the Study of Women's Sexual Health)  
Tel. +1 847 5177 225  
Fax +1 847 5177 229  
E-mail: [isswsh@wjweiser.com](mailto:isswsh@wjweiser.com)  
Website: [www.isswsh.org/](http://www.isswsh.org/)

### MARZO

D	L	M	M	G	V	S
				01	02	03
04	05	06	07	08	09	10
11	12	13	14	15	16	17
18	19	20	21	22	23	24
25	26	27	28	29	30	31



8-11 Marzo – Roma, Italy  
Second World Congress on Gender-Specific Medicine: "The Endocrine Impact"  
Website: [www.gendermedicine.com](http://www.gendermedicine.com)



21-24 Marzo – Berlino, Germania  
European Association of Urology  
22<sup>nd</sup> Annual Congress  
E-mail: [EAU@uroweb.org](mailto:EAU@uroweb.org)  
Website: [www.uroweb.org](http://www.uroweb.org)

**APRILE**

D	L	M	M	G	V	S
01	02	03	04	05	06	07
08	09	10	11	12	13	14
15	16	17	18	19	20	21
22	23	24	25	26	27	28
29	30					

- ♂♀ 15-19 Aprile – Sydney, Australia  
World Association for Sexual Health (WAS)  
18<sup>th</sup> Congress  
Tel. +61 2 93 68 12 00  
Fax +61 2 93 68 15 00  
E-mail: was@iceaustralia.com  
Website: www.sexo-sydney-2007.com

- ♂ 18-24 Aprile – New Orleans, Louisiana  
32<sup>th</sup> Congress of American Society of Andrology (ASA)  
E-mail: info@andrologysociety.com  
Website: www.andrologysociety.com/meetings

- 🌍 29 Aprile – 3 Maggio: Durban, Sud Africa  
International Federation of Fertility Societies (IFFS)  
19<sup>th</sup> World Congress  
Tel. +27 31 3321 451  
E-mail: pda@iafrica.com  
Website: www.iffs2007.org.za

**MAGGIO**

D	L	M	M	G	V	S
		01	02	03	04	05
06	07	08	09	10	11	12
13	14	15	16	17	18	19
20	21	22	23	24	25	26
27	28	29	30	31		

- ♂♀ 9-12 Maggio – Bali, Indonesia  
Asia Pacific Society for Sexual Medicine (APSSAM)  
E-mail: apssam2007@urologi.or.id  
Website: http://apssam2007.urologi.or.id

- 🌍 11-12 Maggio – Peschiera del Garda  
Varicocele ed Infertilità dalla prevenzione alla terapia  
L'importanza di una sinergia tra pediatra di libera scelta, medico di medicina generale e specialista.  
Website: www.andrologia italiana.it

- 🌍 19-24 Maggio – Anaheim, USA  
102<sup>nd</sup> Annual Meeting of the American Urological Association (AUA)  
1120 North Charles Street  
Baltimore, Maryland 21201-5559, USA  
Tel. +1 40122 34308  
E-mail: convention@auanet.org  
Website: www.auanet.org

**GIUGNO**

D	L	M	M	G	V	S
					01	02
03	04	05	06	07	08	09
10	11	12	13	14	15	16
17	18	19	20	21	22	23
24	25	26	27	28	29	30

- 🌍 20-23 Giugno – Verona  
Società Italiana di Endocrinologia  
32° Congresso Nazionale  
Website: www.societaitalianadiendocrinologia.it

- 🌍 21-24 Giugno – Dallas, USA  
AUA Annual Review Course  
E-mail: registration@auanet.org  
Website: www.auanet.org

**LUGLIO**

D	L	M	M	G	V	S
01	02	03	04	05	06	07
08	09	10	11	12	13	14
15	16	17	18	19	20	21
22	23	24	25	26	27	28
29	30	31				

- 🌍 1-4 Luglio – Lyon, France  
European Society for Human Reproduction (ESHRE)  
23<sup>rd</sup> Annual Meeting  
Website: www.eshre.com

## Risposte ai precedenti questionari, vol. 13, n. 2, giugno 2006

### LA TERAPIA MEDIANTE ONDE D'URTO EXTRACORPOREE NEL TRATTAMENTO DELLA MALATTIA DI LA PEYRONIE: RISULTATI DI UNO STUDIO MULTICENTRICO RANDOMIZZATO VERSUS VITAMINA E

A. Moiso, R. Vella, E. Uberti, G. Camana, P. Carbone, A. Tamagnone, D. Randone, O. Sedigh, U. Ferrando, G. Del Noce, M. Laudi, A. Serao, P. Gontero, B. Frea, G. Fontana

#### Domanda 1: Quale delle possibili origini eziopatogenetiche possono essere corrette parlando di Malattia di La Peyronie?

- a) Genetico-familiare
- b) Traumatica-ischemica
- c) **Tutte le precedenti sono corrette**

#### Domanda 2: La terapia medica locale con corticosteroidi intraplacca è consigliabile?

- a) Indipendentemente dalla storia naturale della malattia
- b) **Solo nella fase acuta**
- c) Tutte le precedenti risposte sono corrette

#### Domanda 3: In una paziente affetto da Malattia di La Peyronie in fase stabilizzata da oltre un anno, con curvatura inferiore ai 50° in senso dorsale e senza coinvolgimento del setto, la terapia chirurgica preferibile sarebbe?

- a) Chirurgia di placca (incisione) con graft autologo o eterologo
- b) Corporoplastica di raddrizzamento ("tunica shortening")
- c) **Discussione con il paziente circa aspettative, presenza/assenza di deficit erettile, ed orientamento verso una corporoplastica tipo "tunica shortening"**
- d) Nessuna delle precedenti
- e) Tutte le precedenti sono corrette

#### Domanda 4: Qual è la base fisica che regola il meccanismo di una terapia con onde d'urto per il trattamento della Induratio Penis Plastica (IPP)?

- a) Cavitazione
- b) Implosione di bolle gassose nel tessuto
- c) **Tutte le precedenti risposte sono corrette**

#### Domanda 5: Un valore pari al 7,1% può essere un dato di prevalenza accettabile per la Malattia di La Peyronie?

- a) Sì, sempre
- b) **Sì, ma solo considerando una fascia di età compresa tra i 50 ed i 69 anni di età**
- c) No, mai

### DIFFERENCES IN PENILE HEMODYNAMIC RESPONSES AFTER SHORT-TERM TREATMENTS FOR ORGANIC ERECTILE DYSFUNCTION

R. Bruzziches, E.A. Greco, M. Pili, G. Spera, A. Aversa

#### Domanda 1: La terapia a breve termine (3 mesi) della DE di origine organica con iniezione intracavernosa di alprostadil (2 somministrazioni/settimana):

- a) Migliora i parametri emodinamici penieni ma non la funzionalità erettiva ed il grado di soddisfazione sessuale globale
- b) **Migliora i parametri emodinamici penieni, la funzionalità erettiva ed il grado di soddisfazione sessuale globale**
- c) Migliora i parametri emodinamici penieni, la funzionalità erettiva ed il grado di soddisfazione sessuale globale, soltanto se associato ad un inibitore della PDE5
- d) Migliora i parametri emodinamici penieni, la funzionalità erettiva ed il grado di soddisfazione sessuale globale in maniera sovrapponibile ad un inibitore della PDE5 assunto con le stesse modalità

#### Domanda 2: Il possibile meccanismo biochimico responsabile dell'effetto riabilitativo dell'iniezione intracavernosa di alprostadil sull'endotelio dei corpi cavernosi:

- a) Si identifica con una sovra-regolazione dell'espressione della ossido nitrico sintetasi con conseguente aumento del rilascio di ossido nitrico, attraverso un meccanismo mediato dal cAMP
- b) Si identifica con una sovra-regolazione dell'espressione della ossido nitrico sintetasi con conseguente aumento del rilascio di ossido nitrico, attraverso un meccanismo mediato dal cGMP
- c) Si identifica con un incremento dell'espressione di un fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF)
- d) **a + c**

#### Domanda 3: La terapia della DE di origine organica con iniezione intracavernosa di alprostadil:

- a) Può essere intrapresa in pazienti con DE di origine organica non responsivi al sildenafil o nei casi in cui questa classe di farmaci è controindicata
- b) Può essere intrapresa in pazienti con DE di origine organica, inizialmente non responsivi al sildenafil, candidati ad un successivo trattamento con inibitori delle PDE5
- c) **a + b**
- d) In associazione al sildenafil 100 mg mostra una rispo-

sta erettiva migliore rispetto alla sola iniezione intracavernosa di alprostadil

**Domanda 4: La somministrazione di fentolamina 1 mg in associazione ad alprostadil nell'esecuzione di un ecocolordoppler penieno dinamico (CDU):**

- a) **Ha lo scopo di potenziare la risposta erettile e di migliorare la sensibilità diagnostica dell'esame**
- b) Ha funzione analgesica
- c) La fentolamina è un a-bloccante con azione inibitoria sui recettori a-1 adrenergici
- d) La fentolamina è un a-bloccante con azione inibitoria sui recettori a-2 adrenergici

**Domanda 5: L'International Index of Erectile Function (IIEF):**

- a) Valutano il grado di soddisfazione sessuale globale
- b) **Si riferiscono rispettivamente alla capacità di ottenere una erezione valida per la penetrazione e a mantenere l'erezione fino al completamento del rapporto sessuale**
- c) Fanno riferimento al grado di desiderio sessuale del paziente
- d) Si riferiscono rispettivamente alla capacità di mantenere l'erezione fino al completamento del rapporto sessuale e di ottenere una erezione valida per la penetrazione

#### **ESPLORAZIONE MICROCHIRURGICA DEL TESTICOLO PER IL TRATTAMENTO "TESTIS SPARING" DELLE LESIONI TESTICOLARI IPOECOGENE NON PALPABILI**

L. Rolle, M. Timpano, A. Tamagnone, P. Destefanis, C. Fiori, A. Bosio, C. Ceruti, C. Negro, P. Fauciglietti, D. Fontana

**Domanda 1: Le lesioni ipoecogene testicolari:**

- a) Sono sinonimo di lesioni benigne
- b) Devono essere sicuramente asportate per il rischio di degenerazione maligna
- c) **Non hanno interpretazione univoca, rendendo così consigliabile l'esplorativa chirurgica, possibilmente associata ad esame istologico estemporaneo**
- d) Vanno considerate benigne o maligne a seconda della dimensione

**Domanda 2: L'esame istologico estemporaneo al congelatore:**

- a) È in grado di discriminare lesioni benigne da lesioni maligne e può pertanto essere utilizzato per orientare il chirurgo nella scelta di un trattamento conservativo
- b) Non è da eseguire, in quanto non è accurato nel riconoscere le lesioni maligne

- c) Presenta un'accuratezza sovrapponibile all'esame istologico definitivo nel riconoscere lesioni maligne
- d) **Risposte A e C**

**Domanda 3: L'approccio micro-chirurgico testis sparing:**

- a) Rappresenta la metodica di I scelta per qualunque tipo di lesione testicolare
- b) **Consiste nell'identificare con l'ausilio del microscopio operatore aree testicolari non palpabili rilevate all'ecografia, selettivamente escisse, così da risparmiare il parenchima circostante sano**
- c) Consente di evitare sempre l'orchifunicolectomia
- d) Non può essere mai utilizzato per lesioni sicuramente maligne

**Domanda 4: L'accesso al testicolo per l'esplorazione microchirurgica del parenchima va effettuato:**

- a) Con incisione scrotale
- b) **Con incisione inguinale, in modo da poter isolare e clampare il funicolo spermatico, in caso di lesioni maligne**
- c) Scrotale o inguinale a seconda della probabilità di trovarsi di fronte ad una lesione benigna o maligna
- d) Nessuna delle precedenti

**Domanda 5: Alcuni tra i vantaggi della microchirurgia testis sparing sono costituiti da:**

- a) La possibilità di eseguire un contestuale prelievo microchirurgico (Micro-TeSE) di spermatozoi da destinare a tecniche di procreazione medicalmente assistita in pazienti azoospermici
- b) La possibilità di risparmiare parenchima testicolare sano e di conseguenza le funzioni endocrina e riproduttiva in pazienti monorchidi
- c) Ridurre al minimo le complicanze intra- e post-operatorie legate ad un approccio macroscopico
- d) **Tutte le precedenti**

#### **L'ECOGRAFIA NELLA DIAGNOSTICA DELLE LESIONI ESPANSIVE SCROTALI**

L.M. Sarteschi, N. Dinelli, G. Morelli, F. Menchini Fabris, G.F. Menchini Fabris

**Domanda 1: Il tumore del testicolo rappresenta la più comune lesione maligna del maschio in età compresa fra i:**

- a) 65-85 anni
- b) 15-34 anni
- c) **35-64 anni**
- d) 5-14 anni

**Domanda 2: L'attuale probabilità di guarigione in caso di neoplasia testicolare è del:**

- a) **95%**
- b) 10%
- c) 50%
- d) 70%

**Domanda 3: Il criptorchidismo comporta un rischio neoplastico rispetto alla popolazione generale:**

- a) **Di circa quattro volte superiore**
- b) Non diverso
- c) Leggermente superiore
- d) Dieci volte superiore

**Domanda 4: Il ruolo degli ultrasuoni nella diagnostica del tumore testicolare è:**

- a) Valutare il valore T
- b) Stadiare il tumore
- c) **Confermare la localizzazione testicolare di una lesione e caratterizzarla strutturalmente**
- d) Confermare la localizzazione strutturale e dirimere tra masse benigne e maligne

**Domanda 5: La microlitiasi testicolare**

- a) È sicuramente una condizione predisponente allo sviluppo di una neoplasia di tipo non seminomatoso
- b) È sicuramente una condizione predisponente allo sviluppo di una neoplasia di tipo seminomatoso
- c) Non ha nessun rapporto con lo sviluppo di neoplasie
- d) **La sua relazione con lo sviluppo di neoplasia testicolare rimane un tema controverso**

**Domanda 6: Di fronte al rilevamento di un micronodulo solido intratesticolare l'atteggiamento più prudente è:**

- a) Seguirlo nel tempo con ecografia
- b) Controllarlo con risonanza magnetica
- c) Eseguire un agoaspirazione ecoguidata
- d) **Fare esplorazione chirurgica con guida ecografica con diagnosi istologica estemporanea**