
BC

biochimica clinica

In questo numero:

LABORATORIO E MEDICINA DELLA RIPRODUZIONE

Guest editors: Rossella Tomaiuolo e Carlo Alviggi



SIBioC - Medicina di Laboratorio
membro di

International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC)
European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM)



 **BIOMEDIA**
La condivisione del sapere



Fertility
Technologies

Tecnologie innovative per il successo della procreazione assistita



Dedicated to the details that matter

MERCK

sommario

41

EDITORIALE

291 Ringraziamento
M. Panteghini

292 Il laboratorio nella medicina della riproduzione
R. Tomaiuolo, M. Panteghini

RASSEGNE

294 Individualization of treatment in controlled ovarian stimulation: myth or reality?
A. Conforti, F. Cariatì, R. Vallone, C. Alviggi, G. de Placido

306 Prenatal screening in pregnancies achieved through assisted reproductive technologies
M. Locci, G. Nazzaro, R. Iazzetta, M. Miranda, T. Palmieri, E. Salzano

314 Indicazioni e limiti della diagnosi genetica preimpianto
V. D'Argenio, M. Nunziato, N. D'Uonno, F. Borrillo, R. Vallone, A. Conforti, P. De Rosa, R. Tomaiuolo, F. Cariatì

322 Oncofertilità: dove siamo?
R. Vallone, C. Buonfantino, A. Conforti, P. De Rosa, F. Cariatì, S. Picarelli, F. Caggiano, E. Spadarella, R. Tomaiuolo, C. Alviggi, G. De Placido

335 The role of the laboratory in the evaluation of male factor in couple infertility
R. Pivonello, D. Paoli, C. Salzano, F. Pallotti, C. De Angelis, M. Galdiero, G. Senofonte, G. Galdiero, D. Menafra, F. Garifalos, A. Colao, A. Lenzi

CONTRIBUTI SCIENTIFICI

346 Validazione preclinica della tecnologia "next generation sequencing" per l'identificazione di embrioni a mosaico durante l'analisi genetica preimpianto
F. Spinella, A. Bircik, S. Bono, M.G. Minasi, A. Ruberti, E. Greco, F. Fiorentino

353 The improvement of oocyte selection for social freezing application
F. Cariatì, F. Bagnulo, S.R. Peluso, M. De Simone, A. Conforti, R. Pivonello, A. Vaccina, C. Alviggi

358 Human papillomavirus infection and male infertility
A. Garolla, A. Presciutti, E. Marcazzan, M. Menegazzo, A. Di Nisio, C. Foresta

OPINIONI

364 Male infertility and ageing: two faces of the same coin?
M. Alfano, M. Nebuloni, P. Zerbi, A. Salonia

368 Tutela della dignità umana e libertà di ricerca scientifica: una possibile soluzione al conflitto in tema di embrioni sovrannumerari
V. Marzocco, B. Salvatore

371 La legge sulla procreazione medicalmente assistita: dall'emanazione alla demolizione
F. Gallo, F. Re

NOTIZIE SIBioC

375 LabTestsOnline (LTO) Italia
G. Messeri

CASI CLINICI

e25 Gravidanza gemellare dizigotica in una donna affetta da diabete MODY3
O. Bitterman, D. Iafusco, F. Torcia, D. Pirozzi, P. De Sanctis, A. Napoli, N. Tinto

379 Indice dei contenuti - Volume 41, 2017

383 Indice degli autori - Volume 41, 2017

biochimica clinica

Rivista fondata da Norberto Montalbetti
e già diretta da Carlo Franzini

Rivista della Società Italiana di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica - Medicina di Laboratorio

membro di

International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC)
European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM)

*Biochimica Clinica è indicizzata in Scopus (www.info.scopus.com), EMBASE (www.info.embase.com)
Engineering Village (www.ei.org), Reaxys (www.info.reaxys.com) e ESCI (www.wokinfo.com/products_tools/multidisciplinary/esci)*
*Biochimica Clinica is indexed in Scopus (www.info.scopus.com), EMBASE (www.info.embase.com)
Engineering Village (www.ei.org), Reaxys (www.info.reaxys.com) and ESCI (www.wokinfo.com/products_tools/multidisciplinary/esci)*

Editor-in-Chief

Mauro Panteghini

Reviews Editor

Maria Stella Graziani

Associate Editors

Marco Besozzi
Ferruccio Ceriotti
Alberto Dolci
Davide Giavarina
Giampaolo Merlini
Andrea Mosca
Rossella Tomaiuolo
Martina Zaninotto

Editorial Secretary

Federica Crespi - Biomedica srl
Via L. Temolo, 4 - 20126 Milano
Tel. 0245498282 - Fax 0245498199
e-mail: biochimica.clinica@sibioc.it
www.bc.sibioc.it

Responsible Editor

Giuseppe Agosta

Publisher

Biomedica srl
Via L. Temolo, 4 - 20126 Milano
www.biomedica.net

SIBioC Executive Board

2016-2017

Sergio Bernardini
Sabrina Buoro
Assunta Carnevale
Ferruccio Ceriotti (Past President)
Marcello Ciaccio (Presidente)
Davide Farci Santarcangeli
Silvia Mengozzi
Michele Mussap
Antonello Nonnato
Massimo Quercioli
Tommaso Trenti
Martina Zaninotto

Amministrazione e Pubblicità Business Office and Advertising

Biomedica srl
Via L. Temolo 4 - 20126 Milano
Tel. 0245498282 - Fax. 0245498199



utilizza un Sistema di
Gestione Qualità
Certificato per l'attività di

Fornitura di servizi per la progettazione,
realizzazione e distribuzione di prodotti editoriali

Autorizzazione del Tribunale di Milano
n. 40 del 2.02.1987

Grafica e impaginazione

Biomedica srl
Via L. Temolo, 4 - 20126 Milano

Stampa

GRAFICA BRIANTEA srl
20040 Usmate (MI)

Abbonamento annuo
Euro 50 per Italia/Privati
Euro 75 per Italia/Enti
Euro 75 per Estero/Privati
Euro 90 per Estero/Enti

Prezzo di un fascicolo Euro 5,16

Spedizione in abbonamento postale
D.L. 353/2003 (conv. in L. 27/02/2004
n. 46) art. 1, comma 1, LO/MI

Associato all'USPI
Unione Stampa
Periodica Italiana
Tiratura di questo
numero 4000 copie
4000 copies of this
issue have been printed
ISSN 0393-0564



L'utilizzo degli estratti dei lavori pubblicati è
consentito esclusivamente per uso personale
e non può essere in alcun modo esteso ad
altri impieghi (commerciali, pubblicitari, ecc).
La SIBioC - Medicina di Laboratorio si riserva
di perseguire eventuali utilizzi impropri.

Volume 41

Numero 4 - Dicembre 2017

Ringraziamento

Termina con questo numero, dopo 11 anni, la mia avventura di Direttore di *Biochimica Clinica*.

Per me è stata senz'altro un'esperienza coinvolgente, a volte quasi pignolesca, con la quale ho tentato di portare prima e mantenere poi la nostra rivista a un livello di fruibilità e di supporto formativo, che spero abbiano soddisfatto soci della società e lettori tutti.

L'idea editoriale perseguita è stata da sempre quella di diventare mezzo divulgativo nel campo della Medicina di Laboratorio e, fin dove possibile, palestra educativa e formativa, specie per i più giovani tra i colleghi che vivono e lavorano in laboratorio. Non abbiamo, per scelta, perseguito a tutti i costi gli aspetti più scientifici o di ricerca propri di rinomate riviste internazionali, per cercare invece di raggiungere il maggior numero possibile di lettori, anche quelli che solitamente non leggono le riviste sopra menzionate. Se un merito mi dovesse essere riconosciuto, desidererei quindi fosse quello di aver contribuito a elevare un poco il livello culturale della nostra tanto vituperata professione.

Voglio ringraziare qui tutti gli Editori Associati che mi hanno seguito in questo lungo periodo (senza critiche e senza defezioni) e hanno condiviso con me compiti e scelte, sopportando la mia conduzione, a volte anche un po' "dispotica", nella gestione della rivista. Ringrazio la ragazze che si sono succedute nel ruolo di segretaria editoriale, alle quali spero di aver lasciato qualcosa in eredità in termini professionali. Ringrazio, infine, l'Editore Biomedica, che ha sempre immediatamente soddisfatto la benché minima esigenza o richiesta con estrema professionalità, ma anche con molta simpatia.

A tutti i Lettori va il mio più cordiale saluto.

Mauro Panteghini

Il laboratorio nella medicina della riproduzione

Rossella Tomaiuolo^{1,2}, Mauro Panteghini³

¹Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università di Napoli Federico II, Napoli

²CEINGE-Biotecnologie Avanzate scarl, Napoli

³Dipartimento di Scienze Biomediche e Cliniche 'Luigi Sacco', Università di Milano

La medicina di laboratorio riveste ormai un ruolo essenziale in tutte le fasi del percorso riproduttivo, dall'approccio diagnostico alla scelta delle terapie più complesse. Basti pensare come nell'arco degli ultimi anni si siano consolidati nella pratica clinica quotidiana strumenti preziosi come la diagnosi preimpianto (1) e le tecniche di criobiologia nell'ambito dei programmi di preservazione della fertilità (2), contribuendo sensibilmente al successo delle tecniche di procreazione medicalmente assistita (PMA). Il ritmo vertiginoso al quale sono avvenuti i cambiamenti ha fatto sì che la medicina e la biologia della riproduzione rappresentino oggi, nell'ambito dell'evoluzione della medicina in genere, esempi evidenti di come sia complesso, ma essenziale, un adeguamento dinamico della pratica clinica e delle tecniche di laboratorio alle nuove conoscenze.

In questo scenario, *Biochimica Clinica* ha deciso di dedicare un numero monografico multidisciplinare al ruolo della medicina di laboratorio nella medicina e biologia della riproduzione, con l'intento di fornire sia un aggiornamento scientifico che un supporto alla pratica clinica quotidiana. Ci è sembrato, infatti, che promuovere un tentativo di integrazione tra le varie discipline e una rappresentazione chiara degli scenari attuali di ricerca ed evoluzione tecnologica potesse rappresentare il presupposto fondamentale per una pratica di laboratorio adeguata. Gli articoli presenti in questo numero della rivista riguardano aspetti fondamentali della medicina e biologia della riproduzione, quali la fertilità femminile, quella maschile e la diagnosi antenatale. Inoltre, sono stati approfonditi temi di assoluta attualità, come la preservazione della fertilità e l'impatto degli aspetti legislativi.

L'infertilità è un disordine complesso del sistema riproduttivo, caratterizzato dall'incapacità di ottenere una gravidanza dopo un periodo di più di 12 mesi di rapporti sessuali regolari e non protetti, che interessa più di 75 milioni di coppie in età riproduttiva nel mondo (3). Identificare la causa dell'infertilità permette di definire la

strategia terapeutica ottimale. Tuttavia, mentre l'infertilità femminile è stata ampiamente investigata (4), solo recentemente si sta ponendo attenzione alle cause eziologiche e fisiopatologiche correlate all'infertilità maschile. Ad esempio, come discusso da Alfano et al. (5), porre l'infertilità maschile in stretta correlazione con lo stato di salute e l'invecchiamento potrebbe permettere, anche attraverso la dimostrazione di analogie, di approfondirne significativamente le conoscenze. Tra le possibili cause eziologiche, il contributo di Garolla et al. (6) investiga l'implicazione del virus del papilloma umano nella fertilità maschile, analizzando in specifico l'impatto di questa infezione sui principali parametri dello spermogramma. Tali parametri, che costituiscono tuttora un punto cardine della diagnostica dell'infertilità maschile, sono discussi in maniera esaustiva nella rassegna di Pivonello et al. (7), sia in termini di utilizzo clinico che di armonizzazione delle procedure di esecuzione.

Sebbene le tecniche di PMA, attraverso trattamenti mirati (8), permettano di superare l'infertilità di coppia, le gravidanze così generate sono considerate ad alto rischio e richiedono obbligatoriamente un approccio di screening antenatale (9). Oltre alle indagini di laboratorio più tradizionali, è ormai indiscusso che le metodiche di biologia molecolare stiano assumendo particolare centralità nel supportare l'efficacia delle tecniche di PMA e l'approccio di diagnostica preimpianto (10, 11). Accanto alle applicazioni delle biotecnologie avanzate e/o a sistemi complessi di valutazione dell'espressione genica, si stanno anche sviluppando sistemi integrati, come quello descritto nel contributo di Cariati et al. (12), nel quale sono riportate le potenzialità di una "pipeline" bioinformatica, che attraverso la valutazione dei numerosi fattori che contribuiscono a determinare la buona qualità dell'ovocita, potrebbe supportare gli embriologi nella selezione degli ovociti destinati alla crioconservazione.

L'attenzione alla fertilità va posta non solo nelle coppie infertili, ma anche, nel contesto sanitario attuale,

Corrispondenza a: Rossella Tomaiuolo, CEINGE-Biotecnologie Avanzate scarl, Via G. Salvatore 486, 80131 Napoli. Tel. 0813737890, Fax 0813737808, E-mail rossella.tomaiuolo@unina.it

Ricevuto: 04.10.2017

Revisionato: 04.10.2017

Accettato: 30.10.2017

Pubblicato on-line: 17.11.2017

DOI: 10.19186/BC_2017.041

includendo i pazienti oncologici. Infatti, grazie ai programmi di oncofertilità, tanti pazienti con una malattia oncologica prima dei 40 anni possono oggi affrontarla con il conforto di poter diventare genitori una volta concluso il percorso di cura (13).

L'approccio multidisciplinare, la ricerca continua e l'innovazione delle metodiche di laboratorio permettono di offrire ai pazienti e alle coppie con problemi di fertilità, aborti spontanei e disturbi endocrinologici con ricadute sulla funzionalità riproduttiva, percorsi diagnostico-terapeutici di alta qualità. Le ricadute positive di tali possibilità e miglioramenti continui possono riscontrarsi anche in ambito socio-economico: è da sottolineare come la recente entrata in vigore dei nuovi livelli essenziali di assistenza (LEA) abbia, per la prima volta in Italia, incluso le prestazioni sanitarie relative alle tecniche di PMA (omologa ed eterologa) e modificato in modo significativo anche i protocolli di assistenza, dall'epoca preconcezionale alla gravidanza fino ad arrivare alla diagnostica in epoca antenatale. Di conseguenza, se da un lato è necessario continuare a investire nella ricerca clinica e di laboratorio per migliorare l'"outcome" riproduttivo, dall'altro è indispensabile procedere speditamente con l'integrazione dell'apparato legislativo, come ben evidenziato dai due contributi di Marzocco e Salvatore (14) e Gallo e Re (15).

In conclusione, l'intenzione è che quella presentata in questo fascicolo sia una monografia multidisciplinare, con uno sguardo ai vari segmenti che concorrono al processo diagnostico-terapeutico della coppia, avendo come angolo di osservazione preferenziale le pratiche di laboratorio. Ci sembra che questo possa assumere particolare rilievo in un'epoca in cui la medicina, dell'appropriatezza e della precisione, non può prescindere anche da valutazioni di ordine socio-sanitario ed economico.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Traeger-Synodinos J. Pre-implantation genetic diagnosis. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2017;39:74-88.
2. Massarotti C, Scaruffi P, Lambertini M, et al. State of the art on oocyte cryopreservation in female cancer patients: a critical review of the literature. *Cancer Treat Rev* 2017;57:50-7.
3. Gurunath S, Pandian Z, Anderson RA, et al. Defining infertility: a systematic review of prevalence studies. *Hum Reprod Update* 2011;17:575-88.
4. Hanson B, Johnstone E, Dorais J, et al. Female infertility, infertility-associated diagnoses, and comorbidities: a review. *JJ Assist Reprod Genet* 2017;34:167-77.
5. Alfano M, Nebuloni M, Zerbi P, et al. Male infertility and ageing: two faces of the same coin? *Biochim Clin* 2017;41:364-7.
6. Garolla A, Presciutti A, Marcazzan E, et al. Human papillomavirus infection and male infertility. *Biochim Clin* 2017;41:358-63.
7. Pivonello R, Paoli D, Salzano C, et al. The role of the laboratory in the evaluation of male factor in couple infertility. *Biochim Clin* 2017;41:335-45.
8. Conforti A, Cariati F, Vallone R, et al. Individualization of treatment in controlled ovarian stimulation: myth or reality? *Biochim Clin* 2017;41:294-305.
9. Locci M, Nazzaro MG, Iazzetta R, et al. Prenatal screening in pregnancies achieved through assisted reproductive technologies. *Biochim Clin* 2017;41:306-13.
10. Spinella F, Biricik A, Bono S, et al. Validazione preclinica della tecnologia "next generation sequencing" per l'identificazione di embrioni a mosaico durante l'analisi genetica preimpianto. *Biochim Clin* 2017;41:346-52.
11. D'Argenio V, Nunziato M, D'Uonno N, et al. Indicazioni e limiti della diagnosi genetica preimpianto. *Biochim Clin* 2017;41:314-21.
12. Cariati F, Bagnulo F, Peluso SR, et al. The improvement of oocyte selection for social freezing application. *Biochim Clin* 2017;41:353-7.
13. Vallone R, Buonfantino C, Conforti A, et al. Oncofertilità: dove siamo? *Biochim Clin* 2017;41:322-34.
14. Marzocco V, Salvatore B. Tutela della dignità umana e libertà di ricerca scientifica: una possibile soluzione al conflitto in tema di embrioni sovranumerari. *Biochim Clin* 2017;41:368-70.
15. Gallo F, Re F. La legge sulla procreazione medicalmente assistita: dall'emanazione alla demolizione. *Biochim Clin* 2017;41:371-4.

Individualization of treatment in controlled ovarian stimulation: myth or reality?

Alessandro Conforti¹, Federica Cariati^{2,3,4}, Roberta Vallone¹, Carlo Alviggi¹, Giuseppe de Placido¹

¹Department of Neuroscience, Reproductive Science and Odontostomatology and ²Department of Molecular Medicine and Medical Biotechnology, University of Naples Federico II

³CEINGE-Biotecnologie Avanzate Scarl, Napoli

⁴KronosDNA s.r.l., spin-off of University of Naples Federico II

ABSTRACT

Variability in the infertile population excludes the possibility of a single approach to controlled ovarian stimulation. The modern technology has led to the development of new drugs, treatment options and quantitative methods that allow an individualized approach to *in vitro* fertilization. The personalization of treatments requires a comprehensive evaluation of several important aspects. Age still remains the best predictive factor of gametes euploidy rate. It was estimated that the percentage of abnormal embryos/oocytes increased dramatically in women >35 years old. Strategies to improve the number of vital and euploid embryos in those women represents the most intriguing challenge nowadays, considering that more and more women seeking assisted reproductive technologies are in advanced age. On the other hand, ovarian reserve markers, namely follicle stimulating hormone, anti-Mullerian hormone and antral follicle count are also considered the most accurate predictor of ovarian reserve and could be successfully used to guide controlled ovarian stimulation. Finally, there is an emerging evidence in literature which suggests that the ovarian sensitivity to exogenous gonadotropins could be also influenced by specific genotypes characteristics. If these data will be confirmed, a genetic screening might allow in the future a pharmacogenomic approach to better control ovarian stimulation.

INTRODUCTION

Individualized controlled ovarian stimulation (iCOS) is becoming a reality in human reproduction field. At the beginning, controlled ovarian stimulation (COS) was carried out taking into account only demographic and anthropometric characteristics of women, such as age and body mass index (BMI). Moreover, previous response to exogenous gonadotropins still represents a useful information for pharmacological approach to infertile women. This aspect has a great importance in clinical practice in terms of both number of oocytes retrieved and cumulative dosage required during COS.

With respect to ovarian response to gonadotropin, terms as “hyper”, “normal” or “poor” response have been introduced. Essentially, those definitions are based on the number of oocytes retrieved after COS. For instance, while ‘hyper-response’ refers to the retrieval of >15 oocytes (1), the term of “poor response” (POR) reflects the retrieval of ≤3 after conventional stimulation protocol (2).

The definition of POR women still represents a debatable topic in reproductive field. A systematic review

assessing the definitions for “poor ovarian responders” used among randomized trials, identified 41 different definitions of POR women (3). Only relatively recently, a consensus promoted by the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) was reached (2). In detail, at least two of the following 3 features must be present to identify POR: a) advanced maternal age (≥40 years) or any other risk factor for POR, b) a previous POR (≤3 oocytes with a conventional stimulation protocol), c) an abnormal ovarian reserve test [i.e. antral follicle count (AFC), 5-7 follicles or anti-Mullerian hormone (AMH), 0.5-1.1 µg/L]. These criteria have subsequently been criticized for including heterogeneous populations with different characteristics and clinical prognosis. Added to this, the Bologna criteria do not address the issue of oocyte quality, which is crucial for *in vitro* fertilization (IVF) success (4). More recently, a new stratification of patients with low prognosis to assisted reproductive technology (ART) has been proposed (5). An international panel of experts has agreed on a new detailed stratification of women who show low prognosis to conventional COS [Patient-Oriented-Strategies-Encompassing-Individualized-

Corrispondenza a: Alessandro Conforti, Via Sergio Pansini 5, 80131 Naples, Italy. Tel. 08174626993748, Fax 0817463747, E-mail confale@hotmail.it

Ricevuto: 08.02.2017

Revisionato: 31.05.2017

Accettato: 08.06.2017

Pubblicato on-line: 17.11.2017

DOI: 10.19186/BC_2017.051

Oocyte Number ("Poseidon") classification for low prognosis women in ART], taking into account not only the number of oocytes retrieved, but also the ovarian sensitivity to exogenous gonadotropins and the age-related embryo/blastocyst aneuploidy rate.

A "normal response" is usually identified when 10-15 oocytes are collected at the end of ovarian stimulation. Recently, terms as "hyporesponse" and "suboptimal response" have been introduced to describe those women with an impaired gonadotropin response, but who do not fit POR criteria. "Suboptimal response" is based only on the number of oocytes (between 4-9) (6), whereas "hyporesponse" profile includes those patients who required higher amount of exogenous follicle stimulating hormone (FSH) to obtain an adequate number of oocytes (7) or who show a steady response in terms of both follicular growth and oestradiol level during COS (8).

The most critical issue in iCOS is the individualization of the appropriate dosage. Given that a woman has a definite number of follicles for each cycle, the optimal strategy should ideally be able to recruit all the available follicles avoiding low follicular development. At the same time, the consequence of an excessive ovarian response should be prevented.

The prediction of "poor", "hyper", "suboptimal" or "hyporesponse" to COS is necessary for a correct iCOS, allowing clinicians to provide women possible explanation of events, such as protracted cycles, cycle cancellation or interruption of treatment. Prediction of ovarian response could be explained by the interplay between demographic and anthropometric characteristic and ovarian reserve markers; however, some authors also advocate the involvement of environmental contaminants (9, 10). Emerging evidence also suggests that specific genotype characteristics could significantly affect COS (11, 12). In detail, specific polymorphisms of gonadotropins and their receptors were associated with a significant alteration in women response to gonadotropins (7, 13, 14).

The aim of the present review is to summarize the available evidence concerning iCOS predictors and pharmacological approaches retrievable in literature. The following topics will be developed: a) ovarian reserve, b) anthropometric and demographic parameters, c) ovarian reserve hormonal and functional biomarkers, d) genetic biomarkers.

MATERIAL AND METHODS

A comprehensive literature research of studies that address iCOS approaches to ART has been performed. With this purpose, a systematic research of Medline (Pubmed), Scopus and Isi Web of Science databases with no time restriction was carried out using the following search terms: "anti-Mullerian hormone", "AMH", "AFC", "antral follicle count", "individualized controlled ovarian stimulation", "iCOS", "ovarian reserve", "genetic biomarkers". English written randomized controlled trials, meta-analysis, systematic review, narrative review,

prospective studies and retrospective trials were included. Case reports, books and data that were published in conference or meeting proceedings were not included. The grey literature was not considered.

RESULTS

Ovarian reserve

Ovarian reserve represents the individual reproductive potential based on both number and quality of remaining oocytes (15). The ovarian reserve pool consists in both primordial non-growing follicles and pre-antral and antral follicles recruited for the final ovulation. Primordial follicles derive from primordial germ cells migrated from hindgut to genital ridges during embryo development and arrested at the first meiotic division. Although it is believed that neo-oogenesis does not occur in adults, several lines of evidence indicate that a post-natal replenishment of follicles could not be excluded (16).

Since the prenatal period, a dramatic reduction of germ cells takes place (17). At 18 weeks of gestation, the peak number of 6-7 million of primordial follicles progressively reduces to 1-2 million at birth through apoptosis process (18). When puberty occurs, there are ~300.000 follicles. Finally, in menopause stage it was estimated that <1000 follicles remain (19). Not only the number, but also oocytes quality decreases relentlessly. As a matter of fact, an increased incidence of chromosomal anomalies (e.g. trisomy 21) is observed in older women. Some authors hypothesize that this phenomenon could be attributed to the reduced rate of anomalous oocytes apoptosis in advanced age (20).

The individual ovarian reserve and the proportion of follicles, which undergo atresia, depends on menopausal age. By the age of 45 years, a precocious decline in follicles quantity was hypothesized to be approximately at 32 years of age, although the maintenance of regular menstrual cycles would make the woman unaware. Furthermore, prenatal or post-natal exposure to nutritional, social or environmental factors may also influence ovarian reserve and age of menopause (18). For instance, elevated prenatal androgens, specific social factors and smoking habits could contribute to diminished ovarian reserve.

Anthropometric and demographic parameters

The most commonly used predictors of ovarian response in clinical practice are age and BMI. Women age is clearly linked to human fertility and significantly influences ART success. Indeed, age represents one of the key points in Bologna criteria for the identification of POR women (2). The importance of the age is even more stressed in the new stratification of low prognosis women to ART, recently proposed by Poseidon group (5). The likelihood of embryo implantation and successful live birth rate slowly decrease over the age of 35 years (21). Conversely, the outcome of women using donor eggs does not relevantly change with increasing age,

confirming the crucial role played by oocytes quality (22). Nonetheless, the chronological age alone could not reflect exhaustively the real potential fecundity. For this reason, the clear identification of biological age requires the evaluation of other parameters, such as ovarian response to FSH and specific biomarker levels (AMH, AFC). Moreover, it was reported that women with similar age showed a wide variability in baseline antral follicles (23). Age alone showed low correlation with the number of oocytes gathered (24).

Obesity is another important factor associated with ovulatory dysfunction and infertility (25). It was estimated that the relative risk (RR) of anovulatory infertility is 1.3 [95% confidence interval (CI): 1.2-1.6] among women with BMI between 24 and 31 kg/m² and 2.7 (95% CI: 2.0-3.7) for those with BMI \geq 32 kg/m² (26). A large prospective including 3029 subfertile women indicated that the probability of spontaneous conception is declined by 4% per kg/m², when BMI is $>$ 29 kg/m² (27). Weight loss is significantly associated with improved reproductive outcome.

Regarding ART, an increasing body of evidence suggest that obesity could as well impair reproductive outcome. Obesity was associated with lower oocytes retrieval, cancellation rate, prolonged stimulation and reduced response to exogenous gonadotropins (25). Apparently, no evident association between obesity and oocytes quality was reported (25)

A meta-analysis by Rittenberg et al., including 47,967 treatment cycles, indicated that women with BMI \geq 25 kg/m² showed lower clinical pregnancy rate (RR: 0.9; P <0.0001), live birth rate (RR: 0.84; P=0.0002) and significantly higher miscarriage rate (RR: 1.31; P <0.0001) (28). A subgroup analysis confirmed these findings even in women with BMI between 25 and 29.9 kg/m². Nevertheless, a more recent systematic review and meta-analysis did not detect any relevant detrimental effect on IVF outcome in obese oocytes donor recipients (29).

Hormonal biomarkers

FSH

Serum FSH concentrations are usually dosed on cycle day 2-5 and is commonly used as a measure of ovarian reserve (15). Elevated concentrations (10-25 IU/L) were associated with impaired ovarian stimulation and low pregnancy rate. New standardized WHO assays have shown a high specificity (83–100%), but an extremely variable sensitivity (10-80%) to identify POR women in terms of retrieved oocyte (<4 oocytes) (30). Interestingly, normal basal serum FSH with elevated concentrations of estradiol in early follicular phase was also associated with lower pregnancy rate, higher cancellation rate and poor ovarian response (31).

Inhibin B

Several studies have evaluated the role of inhibin B in predicting the ovarian response in ART (30, 32). As AMH, inhibin B belong to transforming growth factor

(TGF) β family. Its concentrations rise during follicular phase, peak on 5-6 days of menstrual cycle and drop in the late follicular phase. Until the introduction in clinical practice of AMH and AFC, inhibin B has been used for the evaluation of ovarian reserve. Nevertheless, a systematic review and meta-analysis, including 9 studies, reported that the accuracy of inhibin B in the prediction of poor ovarian response and non-pregnancy was only modest (30). In addition, when compared with other ovarian reserve markers such as AMH and AFC, inhibin B showed inferior accuracy even for counselling purpose (30). Given that more reliable markers are now available, the evaluation of inhibin B is no more recommended for the evaluation of ovarian reserve (15).

AMH

AMH is a paracrine product of immature follicles, which represents one of the most valuable tool for ovarian reserve evaluation. AMH is a glycoprotein dimer composed of two 72 kDa monomers linked by disulphide bridges and is produced by the pre-antral and small antral follicles; AMH correlates with the number of primordial follicles at the gonadotropin independent stage of follicular development (33).

In a preliminary study, AMH $<$ 1.26 μ g/L showed a 97% sensitivity for predicting POR (<4 oocytes retrieved). Moreover, it was estimated a 98% correct prediction of "normal" response, if AMH concentrations were above this threshold (34). In this study, this cut-off value was calculated with a ROC curve developed to discriminate between women with poor and normal response ($>$ 4 oocytes) (34). These findings indicate that circulating AMH concentrations may be a good indicator of ovarian reserve and are highly correlated with ovarian response to COS. Several studies suggest that AMH could be also a valuable marker for the identification of polycystic ovarian syndrome (35).

In a study designed to evaluate the use of AMH to determine treatment strategy, Nelson et al. observed an improved safety, tolerability and success rates (36).

Recently, new Bologna criteria and low prognosis patients introduce by Poseidon group agree on AMH $<$ 1.2 μ g/L as cut-off for the identification of women with impaired reproductive prognosis (2, 5).

The main advantages of AMH determination include the minimal variability within natural cycles and the standard reference available for both adolescent and reproductive age patients (33, 37) In addition, AMH concentrations did not show the interoperator variability of other ovarian reserve markers, such as AFC (Table 1) (38). On the other hand, a relevant limiting factor in the use of AMH is the variability observed between results obtained with available commercial kits (39, 40).

Initially, two ELISA were used for the measurement of AMH, the Diagnostics Systems Laboratory (DSL) and the Immunotech assays. These assays employed different monoclonal antibodies giving different results. Subsequently, Beckman Coulter acquired both DSL and Immunotech and launched a new assay, the Beckman Coulter AMH Gen II assay (41). This new assay showed

Table 1

Advantages and disadvantages of anti-Mullerian hormone (AMH) vs. antral follicle count (AFC). Adapted from ref. 38.

AFC	AMH
<p><i>Advantages</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - Good predictive value for stimulation response - Useful for treatment decisions - Easy to perform and personalize - Non invasive - Immediate results 	<p><i>Advantages</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - Good predictive value for stimulation response - Useful for treatment decisions - Well-characterized across adolescent and reproductive ages - Can be performed at any point during a cycle - Low intracycle, intercycle, interoperator and intercentre variability
<p><i>Disadvantages</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - Must be carried out at the beginning of a cycle because of intracycle variation - Intercentre variation because of subjective estimate - Lack of standardization - Greater intercycle variation observed with overweight and obese women - High costs of ultrasound technique 	<p><i>Disadvantages</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - Intensive labour, requiring several hours - Requires careful sample preparation and storage - Interference with serum complement factors - No standardization across assays

~40% higher value comparing with DSL assay. After that, several other kits have been introduced in the market (42). The new fully automated systems available for AMH assay (Roche Elecsys and Beckman Coulter Access) will probably help to improve AMH measurement in terms of precision and reliability, providing faster results compared with previous assays (42, 43).

Improper storage and sampling process may dramatically interfere with the measurement of AMH (44). Furthermore, interferences by serum complement factors on AMH assays have also been observed. Smoking and use of contraceptives should also be taken into account for the evaluation of AMH levels. Decreased concentrations of AMH were observed in women with smoking habits as well as in women who underwent continuous contraceptive use (42, 45). Higher parity was associated with higher age-specific AMH values (45).

Functional biomarkers

AFC is the sum of antral follicles in both ovaries by ultrasound; it has progressively gained acceptance for the estimation of ovarian reserve and as predictive tools for ovarian response and IVF success (21). AFC is recommended by American Society for Reproductive Medicine (ASRM) for the evaluation of ovarian reserve (15). AFC is a relatively easy-to-perform technique, which is widely accessible in clinical practice and provide an immediate result (21, 38).

The main disadvantages of AFC consist in the relevant variation between sonographers and the lack of standard methodology. In addition, it depends on the operator training, technological resources as well as the ultrasound machine adopted. The presence of cysts,

fibroids and other anomalies of reproductive organs could also impair the results (38, 46).

A standardization of AFC was introduced in 2010 by Broekmans et al. (46). Here the basic clinical and technical requirements proposed are reported:

1) Clinical considerations:

- a) select patients with regular menstrual cycles with no coexisting pathologic condition that could technically affect the counting of follicles, such as ovarian endometriosis or previous ovarian surgery;
- b) count follicles between days 2 and 4 of a spontaneous menstrual or oral contraceptive cycle to avoid the effect of intracycle variation;
- c) include all antral follicles of 2-10 mm diameter.

2) Technical considerations:

- a) a limited number of personnel, appropriately trained in transvaginal ultrasound should perform AFC in each unit;
- b) real-time two-dimensional imaging is adequate;
- c) use a transvaginal transducer;
- d) use a probe with a minimum frequency of 7 MHz, which is maintained in an adequate condition and able to resolve a structure of 2 mm diameter;
- e) use the following systematic process for counting antral follicles:
 1. identify the ovary;
 2. explore the dimensions in two planes (perform a scout sweep);
 3. decide on the direction of the sweep to measure and count follicles;
 4. measure the largest follicle in two dimensions:
 - A. if the largest follicle is 10 mm in diameter:
 - i. start to count from outer ovarian margin of the sweep to the opposite

- margin;
 - ii. consider every round or oval transonic structure within the ovarian margins to be a follicle;
 - iii. repeat the procedure with the contralateral ovary;
 - iv. combine the number of follicles in each ovary to obtain AFC.
- B. if the largest follicle is >10 mm in diameter:
- i. further ascertain the size range of the follicles by measuring each sequentially smaller follicle, in turn, until a follicle with a diameter of 10 mm is found;
 - ii. perform a total count (as described) regardless of follicle diameter;
 - iii. subtract the number of follicles of >10 mm from the total follicle count.

Although this standardization have provided for the first time a guide for the evaluation of AFC, there are still unsolved issues. For instance, this recommendation excluded women with previous ovarian surgery, endometriosis cyst, with single ovary and with irregular menstrual bleeding (IMB). In addition, technical settings of the ultrasound machine (depth, gain, focus) are also missing (42).

In the last years, the use of three dimensional (3D) ultrasound calculator was evaluated for AFC (47). A preliminary study showed that the automated 3D ultrasound calculator is able to ameliorate detection of follicles by reducing intra- and interobserver variability and obtain results in a shorter time. This new ultrasound technique could also be adopted for storage and further data reevaluation (47). Nevertheless, the increased costs seem not balanced by a significant improvement of clinical results. Thus, more larger trials are needed before suggesting automated 3D ultrasound for AFC (38).

Some authors have advocated the need of specific training for the operator according to the model proposed by Fetal Medicine Foundation for nuchal translucency (42). The ongoing quality control and license for AFC may ameliorate operator skills, reducing the degree of variation between centres.

Genetic biomarkers

Pharmacogenetic studies evaluate the effect of individual genotypes on medications administrated in clinical practice. In the future, treatment of women based on her genotype profile could represent an important goal for a patient-tailored approach. Although biological response to medications may be influenced by hundreds of factors, progress is being made in the identification of specific genetic profiles that could predict the safety and effectiveness of certain drugs in individual patients. In the reproductive field, the role of genetic biomarkers is still matter of debate, but, in the next years, a personalization of protocols according to specific genotype profiles may become a valuable strategy (21).

Usually, IVF/intracytoplasmic sperm injection (IVF/ICSI) protocols are optimal in ~85% of women, with an adequate number of oocytes recruited. Nonetheless, in ~12-15% of cases an initial low response is seen, leading to an increase in the daily dose of exogenous FSH. These observations led to the development of the concept of "hyporesponse" to COS. Namely, hyporesponse individuals are normogonadotrophic women who have normal estimated ovarian reserves, but require high amounts of exogenous FSH to obtain an adequate number of oocytes retrieved (48-51). On the basis of the current literature, it is possible to argue that inappropriate response to ovarian stimulation including "hyporesponse" or POR might be related to genetic characteristics (13, 52). In addition, relevant gynecological conditions, such as premature ovarian insufficiency (POI) and polycystic ovarian syndrome (PCOS) were also associated with genetic polymorphism of gonadotropins and their receptors (53-57).

The genetic variability that affects the innate activity of hormones could provide valuable predictive information and guide COS treatment choices. Mutations in the genes coding for LH (13, 58, 59), LH and FSH receptors (60-63) and FSH-29 promotor (64, 65) have been identified as possible causes of subfertility, as well as factors that may influence fertility treatment (66).

A common variant of the β subunit of the luteinizing hormone (LH) molecule (v-LH) is characterized by an additional sulphonated sugar at asparagine (Trp 8 Arg and Ile 15 Thr) (rs1800447). v-LH has elevated bioactivity *in vitro*, but significantly shorter half-life in circulation (5-9 min), when compared with the wild-type LH (wt-LH) (12-22 min) (67). The v-LH polymorphism is found in populations worldwide, but has so far been most commonly identified in northern European countries, such as Finland (68). Its incidence in Italy ranges between 12% and 13%. There is clinical evidence that the v-LH polymorphism affects FSH sensitivity and the ovarian response to COS. For example, in a group of 60 normogonadotrophic women aged 18-37 years, with normal menstruation, basal FSH ≤ 10 IU/L and at least 5 oocytes retrieved, one homozygote and seven v-LH heterozygotes were identified. When these women were stratified by the cumulative dose of FSH used (>3500 IU, 2000-3500 IU or <2000 IU), only one heterozygote fell in the middle range while the rest had doses >3500 IU (59). In another study, the effect of v-LH was retrospectively investigated in a larger series of women undergoing COS and, for the first time, in a Danish IVF population (13). 220 normogonadotrophic women following a long gonadotropin releasing hormone (GnRH)-agonist down-regulation protocol received an individualized dose of recombinant FSH (rFSH). Group A consisted of 196 wt/wt-LH women; group B included 24 individuals with v-LH (21 heterozygous and 3 homozygous). The latter received a significantly higher cumulative rFSH than group A (2435.9 \pm 932.8 IU vs. 1959.8 \pm 736.5 IU, P=0.048). One-way ANOVA within design showed a progressive increase from wt-LH form to that with complete v-LH genotype expression (13).

Hyposensitivity to FSH may also be caused by a genetic variant of the FSH receptor. Two FSH receptor variants that have single nucleotide polymorphism (SNP) in the coding region have been characterised (69). The SNP known as the serine680 (Ser680) variant causes the replacement of Asn with Ser at the 680 position, which is located in the intracellular domain of the FSH receptor protein (rs6166). Consistent with reduced sensitivity to endogenous FSH, carriers of this trait have higher FSH levels throughout most of the menstrual cycle and a significant increase in both total menstrual cycle length and number of antral follicles (70). One of the first studies regarding the effect of FSH receptor polymorphism rs6166 on ART detected significantly higher basal FSH levels as well as the number of FSH ampoules in carriers of the Ser680 variant (14).

The second receptor variant, known as the alanine307 (Ala307) variant, is generated through the substitution of threonine (Thr) with Ala at the 307 position, located in the extracellular domain of the FSH receptor (rs6165) (69). There is a very strong linkage disequilibrium between the two SNP. This means that women who possess Thr307 nearly always have Asn680 present on the same allele, and women who have Ala307 have Ser680 on the same allele (67). The link between FSH receptor SNP and PCOS has been studied extensively; however, there is some variation seen in the results. Some studies have demonstrated higher rates of patients with Ser680 in the PCOS population (71), whereas other investigators have shown differences in basal levels of FSH depending on the presence of the SNP (72). Interestingly, it has been demonstrated that PCOS patients with the Ser680 mutation have a natural resistance to clomiphene citrate (73). This may prove to be very important in the field of ovarian stimulation in the future, with clinicians devising their COS protocols according to factors including FSH receptor genotype. Additionally, the effect of the Ser680 SNP has been extensively studied in the general IVF population with conflicting results (74). For instance, some studies reported higher pregnancy rates in patients with Asn680 (75) and others showed higher pregnancy rates in patients with Ser680 (76).

An additional study looked at FSH-induced estradiol levels in women who were homozygous for the Ser680 variant compared with women with the wild-type (Asn/Asn). To our knowledge, this represented the first attempt to develop a pharmacogenomical approach to COS. Ser680/Ser680 carriers were randomly allocated to two subgroups to receive a daily FSH dose of 150 IU or 225 IU, respectively. Age and BMI matched Asn/Asn carriers, receiving a daily dose of 150 IU, constituted a third control group. Number of retrieved oocytes and fertilization rates were similar among groups, but women with wild-type form had higher estradiol production after treatment with 150 IU/day of FSH compared with the Ser680 group receiving the same dose; when Ser680/Ser680 carriers were treated with 225 IU/day, this difference disappeared (63).

A literature systematic review and meta-analysis

published in 2011, including a total of 1421 cases, collected from 8 studies, confirmed that Ser680 carriers required a higher amount of rFSH during COS (Weighted mean difference: -268.82 IU, 95% CI: -561.28 to 23.63, $P=0.07$). Despite of this, no differences in terms pregnancy rate and number of retrieved oocytes were detected (62).

In addition to the SNP described above, there are other genotypic polymorphisms that have been recently related to COS and ART outcomes. An interesting polymorphism in the untranslated region (-29G/A rs1394205) of the FSH receptor gene (*FSH-R*) has been identified. As reported by Nakayama et al., this variant could influence the normal transcription activity of FSH-R and seems to be related with the development of essential hypertension in women (77). Significantly lower estradiol levels were observed in AA carriers compared with patients with GG or GA genotypes. More interestingly, this polymorphism was associated with higher amounts of rFSH required during COS. Specifically, the subjects with AA genotype required the highest amount of rFSH with the lowest estradiol levels before the day of chorionic gonadotropin (hCG) when compared with other haplotypes (78). Moreover, AA carriers showed a significantly lower number of retrieved oocyte and preovulatory follicles. Nonetheless, the kind of protocol adopted as well as patients characteristics were not reported by the authors.

Finally, there is also evidence that specific LH/gonadotropin receptor (LHCGR) polymorphism could interfere with COS (61). Specifically, carriers of LHCGR (rs4073366) showed an increased risk to develop ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS) (odds ratio, 2.95; 95% CI: 1.09-7.96). Moreover, another LHCGR polymorphism (rs2293275) showed a significant association with the pregnancy rate of women undergoing IVF (58). This association became even more stronger when combined with FSH Ser680 polymorphism.

In conclusion, among all identified genotypes the FSH-R 680 and the LH variant are the most studied genetic marker associated with ovarian resistance to COS (13, 64). LH supplementation may be considered in the presence of v-LH, whereas a timely identification of Ser680 FSH-R variant may represent an indication to administer higher doses of FSH (Table 2). For other polymorphisms, such as promotor 29G/A FSH-R and LHCGR polymorphisms, further studies are needed to clarify their role as genetic biomarker.

DISCUSSION

In the past, the choice of the appropriate therapy was essentially based on anamnesis, BMI, age and outcome of previous IVF. Today, the concept of iCOS is progressively raising in ART. Currently, the vast number of medications and protocols gives the opportunity to tailor stimulation on the basis of individual characteristics of women.

The most adopted pre-stimulation parameter in

Table 2

Example of interplay between genetic profiles and biomarkers in the field of controlled ovarian stimulation (COS). Adapted from ref. 79

Genetic profile	Application in clinical practice
Low AMH levels, low AFC, no relevant mutations	Suggest that even high doses of FSH would be ineffective and that LH would not improve results Patients would benefit from counselling to better understand her limited chances of success
FSH receptor variant (e.g. Ser680), good AMH levels, good AFC	Suggest a good prognosis, but it also predicts "hyporesponse" to FSH that could be compensated by increasing FSH starting dose
Variant in β subunit of LH	Suggest that patient may benefit from LH supplementation during COS

AMH, anti-Mullerian hormone; AFC, antral follicle count; FSH, follicle stimulating hormone; LH, luteinizing hormone.

Table 3

Suggested cut-off values for anti-Mullerian hormone (AMH) and antral follicle count (AFC)

Poor response			
	ESHRE	La Marca-Sunkara (24)	Poseidon group (5)
AMH cut-offs	0.5-1.1 $\mu\text{g/L}$	0.7-1.3 $\mu\text{g/L}$	1.2 $\mu\text{g/L}$
AFC cut-offs	5-7	5-7	5
Hyperresponse			
	Literature (see text)	La Marca-Sunkara (24)	
AMH cut-offs	2.21-6.95 $\mu\text{g/L}$	3.36 $\mu\text{g/L}$	
AFC cut-offs	9-16	16	

ESHRE, European Society of Human Reproduction and Embryology.

clinical practice are AMH and AFC. The establishment of the right cut-off value is of great importance for a correct use of these biomarkers in clinical practice. Nonetheless, values reported in literature are widely heterogeneous across studies, so that the entire process for the identification of optimal cut-off is a challenging task. Through the analysis of literature, La Marca and Sunkara selected 66 papers that investigated the ability of AFC (n=25) and AMH (n=41) to predict response to COS (24). In Table 3 the adopted cut-off values for the prediction of both POR and hyperresponse to COS are illustrated.

More than 30 studies tried to identify the optimal cut-off for AMH to define a POR. This varies between 0.1 and 2.97 $\mu\text{g/L}$. The largest prospective trials indicate as optimal cut-off 0.7 $\mu\text{g/L}$ (75% sensitivity, 91% specificity) and 1.36 $\mu\text{g/L}$ (75.5% sensitivity, 74.8% specificity), respectively (80, 81). Based on those data, La Marca and Sunkara indicated a cut-off ranging from 0.7 to 1.3 $\mu\text{g/L}$ (24).

AFC cut-off values proposed for the identification of poor responders vary from 3 to 12 (82, 83). La Marca and Sunkara, on the basis of the most recent papers, individuated the AFC cut-off of POR prediction between 5 and 7 (24).

It should be stressed that ovarian reserve tests (AMH/AFC) have a false positive rate of 10-20% for the identification of POR women. In other words, no women should be excluded from their first IVF techniques only based on ovarian reserve tests.

"Hyperresponse" to COS affect 7% of women who

underwent IVF and 15% of women aged <30 years (24). "Hyper-response" is associated with OHSS, which represents the most critical life-threatening complication of IVF techniques. Therefore, a proper identification of a "hyper-responder" woman before COS is fundamental in order to prevent OHSS. According to the most recent data available in literature, "hyper-response" consists in the retrieval of >15 oocytes after standard COS (1, 84). 16 studies have reported the best cut-off values to identify "hyperresponders" according AMH levels, which range between 2.21 $\mu\text{g/L}$ to 6.95 $\mu\text{g/L}$. Sunkara and La Marca adopted 3.36 $\mu\text{g/L}$ according to DSL assay (4.67 $\mu\text{g/L}$ according to Beckman Coulter AMH Gen II assay) as optimal cut-off to identify patients at risk to develop a hyperresponse during COS (24, 85). Only 7 studies reported the cut-off values for AFC, with range between 9 and 16. The largest prospective trial involving 159 women suggested an AFC cut-off value of 16, with 89% sensitivity and 92% specificity (86). In a retrospective trial involving 82 women, Ocal et al. indicate 8 as cut-off value for AFC to predict the development of OHSS (78% sensitivity, 65% specificity, 52% positive predictive value, 86% negative predictive value) (87).

Unfortunately, there are not established AFC and AMH cut-off values to identify women with hyporesponse or suboptimal response.

The number of follicles recruited during COS depends essentially on the number of antral follicles at the beginning of the cycle. When antral follicles pool is large (e.g. in PCOS) an appropriate dosage of

exogenous FSH should be offered to prevent hyper-response and/or OHSS. On the other hand, an inappropriate administration of gonadotropin could lead to a poor recruitment of follicles and cycle cancellation (24). The ideal dosage should be able to exploit women ovarian reserve as much as possible, with an optimal risk/benefit ratio. This was clearly explained by the concept of follicle output rate (FORT) introduced by Genro et al. in 2011 (88). FORT consists in the ratio between preovulatory and baseline antral follicles and is an indirect measurement of antral follicle responsiveness to FSH. Higher values of FORT mean in most cases that an adequate stimulation protocol have been adopted.

It should be stressed that low ovarian reserve in terms of antral follicles does not ameliorate only by increasing the dosage. Several studies showed that increasing FSH dosage in women with poor ovarian reserve in terms of AMH and/or AFC could be meaningless and low cost-effective (89, 90).

Several attempts to develop an algorithm to individualize starting dose were proposed. In simple models, only one parameter was adopted for gonadotropin starting dose selections. Nelson et al. for the first time evaluated AMH-based COS strategies in two IVF centres (36). In this prospective cohort study, 538 women were stratified according to their AMH concentrations prior to COS (low: <5 pmol/L, medium: 5-15 pmol/L and high: >15 pmol/L). High, medium or low doses of FSH were given to women with low, medium and high AMH concentrations, respectively. In one study centre, the choice between the long GnRH agonist protocol vs. a milder GnRH antagonist protocol was also determined based on AMH concentrations. Most patients at the first centre (regardless of AMH level) were treated with a long GnRH agonist protocol, while in the second centre, those with high or low AMH concentrations were treated with a GnRH antagonist protocol. In both centres, low AMH concentrations were associated with a reduced clinical pregnancy rate, but the cohort of patients receiving the antagonist protocol had a median duration of treatment of 10 days, with a cancellation rate of 5%, compared with a duration of 14 days and cancellation rate of 19% for the group treated with long GnRH agonist protocol. As expected, women from both centres with physiological AMH concentrations had similar good outcome with no POR and no incidence of OHSS. Interestingly, the group of patients with high AMH concentrations showed better outcome using the GnRH antagonist compared with the agonist protocol. No patients with high AMH who underwent the GnRH antagonist protocol were hospitalised due to OHSS compared with 13.9% in the high AMH level group who received the GnRH agonist long protocol. In addition, the use of the antagonist protocol did not result in any cases of "total freeze" to avoid OHSS. Furthermore, the improvements in COS safety and tolerability observed with the GnRH antagonist protocol were accompanied by higher clinical pregnancy rates in both low (11.1% vs. 18.7%) and high AMH (40.1% vs. 63.6%) groups (36).

Data from this study suggested for the first time that a simple model using AMH may be used as a reliable predictive tool to determine treatment strategies, improving safety, tolerability and pregnancy outcomes.

Another retrospective large trial compared ART outcomes of 346 women using conventional stimulation protocols and 423 women treated under new AMH-tailored protocols (91). In detail, the following protocols were performed in study groups: no treatment or alternative ART in women where AMH was <2.2 pmol/L; 300 IU of human menopausal gonadotropin (hMG) plus GnRH antagonist from day 6 of stimulation in women with AMH between 2.2 pmol/L and 15.6 pmol/L; 200 IU of rFSH or 225IU hMG in long down-regulation protocol + GnRH agonist in women with AMH between 15.7 pmol/L and 28.6 pmol/L; 150 IU hMG plus GnRH antagonist from day 6 of stimulation in women with AMH >28.6 pmol/L (91). Compared with conventional stimulation protocols, AMH-tailored stimulation significantly improved embryo transfer rate and pregnancy rate per cycles. Furthermore, an amelioration in terms of OHSS syndrome and cost of fertility drug were also reported (91).

The main limitation of these two models is that they were based only on AMH parameter, measured by the "old" DSL assay, whose results are 40% lower than the new AMH Gen II assay.

Multivariate models adopting several parameters for the identification of the most appropriate starting dose were also proposed. Popovic-Todorovic et al. proposed a combination of age, AFC, ovarian volume, Doppler ovarian score and smoking status as prestimulation parameters (92). Howles et al. adopted BMI, AFC and day 3 serum FSH (93). More recently, another multivariate model was proposed by La Marca et al. (94). A cohort of women aged between 18-40 years at their IVF first cycle was enrolled with the aim of developing a model for the prediction of ovarian response. Women with irregular cycles, previous ovarian surgery or history of PCOS were excluded. A multivariate regression analysis showed that only age, AMH and serum day 3 FSH reached statistical significance to predict the number of oocytes per unit of exogenous FSH starting dose (94). Later, the same group carried out a retrospective study involving 505 IVF patients with the aim to elaborate a nomogram for the appropriate calculation of FSH starting dose (95). In this case, AFC was adopted instead of AMH as an independent variable. According to authors' findings, a model based on age, AFC and day 3 FSH was able to predict ovarian sensitivity in terms of number of oocytes retrieved (95). Comparing with previous models, the last two could be more easily applied in clinical practice; however, larger trials are needed to recommend their use.

CONCLUSIONS

After decades of IVF techniques, the availability of new markers of ovarian reserve could open a new scenario in reproductive field. While many years ago the

dosage was guided only by anthropometric characteristic (BMI, age), today the availability of more specific markers could significantly ameliorate IVF outcomes leading from a “one size fits all” to a “patient tailored” approach. In the future, the use of specific genetic tests (such as v-LH and Ser680 variant of FSH-R) might lead to pharmacogenomic approach to COS.

CONFLICTS OF INTEREST

Alessandro Conforti reports consultancy fees from Merck. Carlo Alviggi reports honoraria from Merck.

REFERENCES

1. Broer SL, Dolleman M, Opmeer BC, et al. AMH and AFC as predictors of excessive response in controlled ovarian hyperstimulation: a meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2011;17:46-54.
2. Ferraretti AP, La Marca A, Fauser BC, et al. ESHRE consensus on the definition of “poor response” to ovarian stimulation for in vitro fertilization: the Bologna criteria. *Hum Reprod* 2011;26:1616-24.
3. Polyzos NP, Devroey P. A systematic review of randomized trials for the treatment of poor ovarian responders: is there any light at the end of the tunnel? *Fertil Steril* 2011;96:1058-61.e7.
4. Venetis CA. The Bologna criteria for poor ovarian response: the good, the bad and the way forward. *Hum Reprod* 2014;29:1839-41.
5. Alviggi C, Andersen CY, Buehler K, et al. A new more detailed stratification of low responders to ovarian stimulation: from a poor ovarian response to a low prognosis concept. *Fertil Steril* 2016;105:1452-3.
6. Drakopoulos P, Blockeel C, Stoop D, et al. Conventional ovarian stimulation and single embryo transfer for IVF/ICSI. How many oocytes do we need to maximize cumulative live birth rates after utilization of all fresh and frozen embryos? *Hum Reprod* 2016;31:370-6.
7. Alviggi C, Conforti A, Caprio F, et al. In estimated good prognosis patients could unexpected “hyporesponse” to controlled ovarian stimulation be related to genetic polymorphisms of FSH Receptor? *Reprod Sci* 2016;23:1103-8.
8. De Placido G, Alviggi C, Perino A, et al. Recombinant human LH supplementation versus recombinant human FSH (rFSH) step-up protocol during controlled ovarian stimulation in normogonadotrophic women with initial inadequate ovarian response to rFSH. A multicentre, prospective, randomized controlled trial. *Hum Reprod* 2005;20:390-6.
9. Alviggi C, Guadagni R, Conforti A, et al. Association between intrafollicular concentration of benzene and outcome of controlled ovarian stimulation in IVF/ICSI cycles: a pilot study. *J Ovarian Res* 2014;7:67.
10. Tarín JJ, García-Pérez MA, Cano A. Assisted reproductive technology results: why are live-birth percentages so low? *Mol Reprod Dev* 2014;81:568-83.
11. Alviggi C, Conforti A, Esteves SC. Impact of mutations and polymorphisms of gonadotrophins and their receptors on the outcome of controlled ovarian stimulation. In: Ghumman S, ed. *Principles and practice of controlled ovarian stimulation in ART*. New Delhi: Springer 2015;147-56.
12. Alviggi C, Conforti A, Fabozzi F, et al. Ovarian stimulation for IVF/ICSI cycles: A pharmacogenomic approach. *Medecine Therapeutique Medecine de la Reproduction, Gynecologie et Endocrinologie* 2009;11:271-7.
13. Alviggi C, Pettersson K, Longobardi S, et al. A common polymorphic allele of the LH beta-subunit gene is associated with higher exogenous FSH consumption during controlled ovarian stimulation for assisted reproductive technology. *Reprod Biol Endocrinol* 2013;11:51.
14. Perez Mayorga M, Gromoll J, Behre HM, et al. Ovarian response to follicle-stimulating hormone (FSH) stimulation depends on the FSH receptor genotype. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:3365-9.
15. Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine. Diagnostic evaluation of the infertile female: a committee opinion. *Fertil Steril* 2012;98:302-7.
16. Johnson J, Canning J, Kaneko T, et al. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature* 2004;428:145-50.
17. Baker TG. A quantitative and cytological study of germ cells in human ovaries. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1963;158:417-33.
18. Richardson MC, Guo M, Fauser BC, et al. Environmental and developmental origins of ovarian reserve. *Hum Reprod Update* 2014;20:353-69.
19. Faddy MJ, Gosden RG, Gougeon A, et al. Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: implications for forecasting menopause. *Hum Reprod* 1992;7:1342-6.
20. Hulten MA, Patel S, Jonasson J, et al. On the origin of the maternal age effect in trisomy 21 Down syndrome: the Oocyte Mosaicism Selection model. *Reproduction* 2010;139:1-9.
21. Alviggi C, Humaidan P, Howles CM, et al. Biological versus chronological ovarian age: implications for assisted reproductive technology. *Reprod Biol Endocrinol* 2009;7:101.
22. Abdalla HI, Burton G, Kirkland A, et al. Age, pregnancy and miscarriage: uterine versus ovarian factors. *Hum Reprod* 1993;8:1512-7.
23. Almog B, Shehata F, Shalom-Paz E, et al. Age-related normogram for antral follicle count: McGill reference guide. *Fertil Steril* 2011;95:663-6.
24. La Marca A, Sunkara SK. Individualization of controlled ovarian stimulation in IVF using ovarian reserve markers: from theory to practice. *Hum Reprod Update* 2014;20:124-40.
25. Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine. Obesity and reproduction:

- an educational bulletin. *Fertil Steril* 2008;90:S21-9.
26. Rich-Edwards JW, Goldman MB, Willett WC, et al. Adolescent body mass index and infertility caused by ovulatory disorder. *Am J Obstet Gynecol* 1994;171:171-7.
 27. van der Steeg JW, Steures P, Eijkemans MJ, et al. Obesity affects spontaneous pregnancy chances in subfertile, ovulatory women. *Hum Reprod* 2008;23:324-8.
 28. Rittenberg V, Seshadri S, Sunkara SK, et al. Effect of body mass index on IVF treatment outcome: an updated systematic review and meta-analysis. *Reprod Biomed Online* 2011;23:421-39.
 29. Jungheim ES, Schon SB, Schulte MB, et al. IVF outcomes in obese donor oocyte recipients: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod* 2013;28:2720-7.
 30. Broekmans FJ, Kwee J, Hendriks DJ, et al. A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome. *Hum Reprod Update* 2006;12:685-718.
 31. Evers JL, Slaats P, Land JA, et al. Elevated levels of basal estradiol-17beta predict poor response in patients with normal basal levels of follicle-stimulating hormone undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1998;69:1010-4.
 32. Ficicioglu C, Kutlu T, Demirbasoglu S, et al. The role of inhibin B as a basal determinant of ovarian reserve. *Gynecol Endocrinol* 2003;17:287-93.
 33. La Marca A, Broekmans FJ, Volpe A, et al. Anti-Mullerian hormone (AMH): what do we still need to know? *Hum Reprod* 2009;24:2264-75.
 34. Gnoth C, Schuring AN, Friol K, et al. Relevance of anti-Mullerian hormone measurement in a routine IVF program. *Hum Reprod* 2008;23:1359-65.
 35. Iliodromiti S, Kelsey TW, Anderson RA, et al. Can anti-Mullerian hormone predict the diagnosis of polycystic ovary syndrome? A systematic review and meta-analysis of extracted data. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98:3332-40.
 36. Nelson SM, Yates RW, Lyall H, et al. Anti-Mullerian hormone-based approach to controlled ovarian stimulation for assisted conception. *Hum Reprod* 2009;24:867-75.
 37. Hehenkamp WJ, Looman CW, Themmen AP, et al. Anti-Mullerian hormone levels in the spontaneous menstrual cycle do not show substantial fluctuation. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:4057-63.
 38. Fleming R, Seifer DB, Frattarelli JL, et al. Assessing ovarian response: antral follicle count versus anti-Mullerian hormone. *Reprod Biomed Online* 2015;31:486-96.
 39. Rustamov O, Smith A, Roberts SA, et al. Anti-Mullerian hormone: poor assay reproducibility in a large cohort of subjects suggests sample instability. *Hum Reprod* 2012;27:3085-91.
 40. Freour T, Mirallie S, Bach-Ngohou K, et al. Measurement of serum anti-Mullerian hormone by Beckman Coulter ELISA and DSL ELISA: comparison and relevance in assisted reproduction technology (ART). *Clin Chim Acta* 2007;375:162-4.
 41. Wallace AM, Faye SA, Fleming R, et al. A multicentre evaluation of the new Beckman Coulter anti-Mullerian hormone immunoassay (AMH Gen II). *Ann Clin Biochem* 2011;48:370-3.
 42. Iliodromiti S, Anderson RA, Nelson SM. Technical and performance characteristics of anti-Mullerian hormone and antral follicle count as biomarkers of ovarian response. *Hum Reprod Update* 2015;21:698-710.
 43. Gassner D, Jung R. First fully automated immunoassay for anti-Mullerian hormone. *Clin Chem Lab Med* 2014;52:1143-52.
 44. Nelson SM, Telfer EE, Anderson RA. The ageing ovary and uterus: new biological insights. *Hum Reprod Update* 2013;19:67-83.
 45. Dolleman M, Verschuren WM, Eijkemans MJ, et al. Reproductive and lifestyle determinants of anti-Mullerian hormone in a large population-based study. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98:2106-15.
 46. Broekmans FJ, de Ziegler D, Howles CM, et al. The antral follicle count: practical recommendations for better standardization. *Fertil Steril* 2010;94:1044-51.
 47. Vandekerckhove F, Bracke V, De Sutter P. The value of automated follicle volume measurements in IVF/ICSI. *Front Surg* 2014;1:18.
 48. De Placido G, Mollo A, Alviggi C, et al. Rescue of IVF cycles by HMG in pituitary down-regulated normogonadotrophic young women characterized by a poor initial response to recombinant FSH. *Hum Reprod* 2001;16:1875-9.
 49. De Placido G, Alviggi C, Mollo A, et al. Effects of recombinant LH (rLH) supplementation during controlled ovarian hyperstimulation (COH) in normogonadotrophic women with an initial inadequate response to recombinant FSH (rFSH) after pituitary downregulation. *Clin Endocrinol* 2004;60:637-43.
 50. Ferraretti AP, Gianaroli L, Magli MC, et al. Exogenous luteinizing hormone in controlled ovarian hyperstimulation for assisted reproduction techniques. *Fertil Steril* 2004;82:1521-6.
 51. Devroey P, Fauser BC, Diedrich K. Approaches to improve the diagnosis and management of infertility. *Hum Reprod Update* 2009;15:391-408.
 52. Huang X, Li L, Hong L, et al. The Ser680Asn polymorphism in the follicle-stimulating hormone receptor gene is associated with the ovarian response in controlled ovarian hyperstimulation. *Clin Endocrinol* 2015;82:577-83.
 53. Rocca ML, Venturella R, Mocciano R, et al. Polycystic ovary syndrome: chemical pharmacotherapy. *Expert Opin Pharmacother* 2015;16:1369-93.
 54. Falbo A, Orio F, Venturella R, et al. Does metformin affect ovarian morphology in patients with polycystic ovary syndrome? A retrospective cross-sectional preliminary analysis. *J Ovarian Res* 2009;2:5.
 55. Orio F Jr., Ferrarini E, Cascella T, et al. Genetic analysis of the follicle stimulating hormone receptor gene in women with polycystic ovary syndrome. *J*

- Endocrinol Invest 2006;29:975-82.
56. Almawi WY, Hubail B, Arekat DZ, et al. Leutinizing hormone/choriogonadotropin receptor and follicle stimulating hormone receptor gene variants in polycystic ovary syndrome. *J Assist Reprod Genet* 2015;32:607-14.
 57. Vilodre LC, Kohek MB, Spritzer PM. Screening of follicle-stimulating hormone receptor gene in women with premature ovarian failure in southern Brazil and associations with phenotype. *J Endocrinol Invest* 2008;31:552-7.
 58. Huhtaniemi IT, Themmen AP. Mutations in human gonadotropin and gonadotropin-receptor genes. *Endocrine* 2005;26:207-17.
 59. Alviggi C, Clarizia R, Pettersson K, et al. Suboptimal response to GnRHa long protocol is associated with a common LH polymorphism. *Reprod Biomed Online* 2009;18:9-14.
 60. Lindgren I, Baath M, Uvebrant K, et al. Combined assessment of polymorphisms in the LHCGR and FSHR genes predict chance of pregnancy after in vitro fertilization. *Hum Reprod* 2016;31:672-83.
 61. O'Brien TJ, Kalmin MM, Harralson AF, et al. Association between the luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor (LHCGR) rs4073366 polymorphism and ovarian hyperstimulation syndrome during controlled ovarian hyperstimulation. *Reprod Biol Endocrinol* 2013;11:71.
 62. Yao Y, Ma CH, Tang HL, et al. Influence of follicle-stimulating hormone receptor (FSHR) Ser680Asn polymorphism on ovarian function and in-vitro fertilization outcome: a meta-analysis. *Mol Genet Metab* 2011;103:388-93.
 63. Behre HM, Greb RR, Mempel A, et al. Significance of a common single nucleotide polymorphism in exon 10 of the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor gene for the ovarian response to FSH: a pharmacogenetic approach to controlled ovarian hyperstimulation. *Pharmacogenet Genomics* 2005;15:451-6.
 64. La Marca A, Sighinolfi G, Argento C, et al. Polymorphisms in gonadotropin and gonadotropin receptor genes as markers of ovarian reserve and response in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2013;99:970-8.e1.
 65. La Marca A, Papaleo E, Alviggi C, et al. The combination of genetic variants of the FSHB and FSHR genes affects serum FSH in women of reproductive age. *Hum Reprod* 2013;28:1369-74.
 66. Altmae S, Hovatta O, Stavreus-Evers A, et al. Genetic predictors of controlled ovarian hyperstimulation: where do we stand today? *Hum Reprod Update* 2011;17:813-28.
 67. Haavisto AM, Pettersson K, Bergendahl M, et al. Occurrence and biological properties of a common genetic variant of luteinizing hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:1257-63.
 68. Lamminen T, Huhtaniemi I. A common genetic variant of luteinizing hormone; relation to normal and aberrant pituitary-gonadal function. *Eur J Pharmacol* 2001;414:1-7.
 69. Lalioti MD. Impact of follicle stimulating hormone receptor variants in fertility. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2011;23:158-67.
 70. Greb RR, Grieshaber K, Gromoll J, et al. A common single nucleotide polymorphism in exon 10 of the human follicle stimulating hormone receptor is a major determinant of length and hormonal dynamics of the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:4866-72.
 71. Gu BH, Park JM, Baek KH. Genetic variations of follicle stimulating hormone receptor are associated with polycystic ovary syndrome. *Int J Mol Med* 2010;26:107-12.
 72. Valkenburg O, Uitterlinden AG, Piersma D, et al. Genetic polymorphisms of GnRH and gonadotrophic hormone receptors affect the phenotype of polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 2009;24:2014-22.
 73. Overbeek A, Kuijper EA, Hendriks ML, et al. Clomiphene citrate resistance in relation to follicle-stimulating hormone receptor Ser680Ser polymorphism in polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 2009;24:2007-13.
 74. Mohiyiddeen L, Nardo LG. Single-nucleotide polymorphisms in the FSH receptor gene and ovarian performance: future role in IVF. *Hum Fertil* 2010;13:72-8.
 75. Jun JK, Yoon JS, Ku SY, et al. Follicle-stimulating hormone receptor gene polymorphism and ovarian responses to controlled ovarian hyperstimulation for IVF-ET. *J Hum Genet* 2006;51:665-70.
 76. Klinkert ER, te Velde ER, Weima S, et al. FSH receptor genotype is associated with pregnancy but not with ovarian response in IVF. *Reprod Biomed Online* 2006;13:687-95.
 77. Nakayama T, Kuroi N, Sano M, et al. Mutation of the follicle-stimulating hormone receptor gene 5'-untranslated region associated with female hypertension. *Hypertension* 2006;48:512-8.
 78. Achrekar SK, Modi DN, Desai SK, et al. Poor ovarian response to gonadotrophin stimulation is associated with FSH receptor polymorphism. *Reprod Biomed Online* 2009;18:509-15.
 79. Alviggi C, Humaidan P, Ezcurra D. Hormonal, functional and genetic biomarkers in controlled ovarian stimulation: tools for matching patients and protocols. *Reprod Biol Endocrinol* 2012;10:9.
 80. Nelson SM, Yates RW, Fleming R. Serum anti-Mullerian hormone and FSH: prediction of live birth and extremes of response in stimulated cycles--implications for individualization of therapy. *Hum Reprod* 2007;22:2414-21.
 81. Al-Azemi M, Killick SR, Duffy S, et al. Multi-marker assessment of ovarian reserve predicts oocyte yield after ovulation induction. *Hum Reprod* 2011;26:414-22.
 82. Chang MY, Chiang CH, Hsieh TT, et al. Use of the antral follicle count to predict the outcome of assisted reproductive technologies. *Fertil Steril* 1998;69:505-10.

83. Melo MA, Garrido N, Alvarez C, et al. Antral follicle count (AFC) can be used in the prediction of ovarian response but cannot predict the oocyte/embryo quality or the in vitro fertilization outcome in an egg donation program. *Fertil Steril* 2009;91:148-56.
84. La Marca A, Sighinolfi G, Radi D, et al. Anti-Mullerian hormone (AMH) as a predictive marker in assisted reproductive technology (ART). *Hum Reprod Update* 2010;16:113-30.
85. Lee TH, Liu CH, Huang CC, et al. Serum anti-Mullerian hormone and estradiol levels as predictors of ovarian hyperstimulation syndrome in assisted reproduction technology cycles. *Hum Reprod* 2008;23:160-7.
86. Aflatoonian A, Oskouian H, Ahmadi S, et al. Prediction of high ovarian response to controlled ovarian hyperstimulation: anti-Mullerian hormone versus small antral follicle count (2-6 mm). *J Assist Reprod Genet* 2009;26:319-25.
87. Ocal P, Sahmay S, Cetin M, et al. Serum anti-Mullerian hormone and antral follicle count as predictive markers of OHSS in ART cycles. *J Assist Reprod Genet* 2011;28:1197-203.
88. Genro VK, Grynberg M, Scheffer JB, et al. Serum anti-Mullerian hormone levels are negatively related to Follicular Output RaTe (FORT) in normo-cycling women undergoing controlled ovarian hyperstimulation. *Hum Reprod* 2011;26:671-7.
89. Klinkert ER, Broekmans FJ, Looman CW, et al. Expected poor responders on the basis of an antral follicle count do not benefit from a higher starting dose of gonadotrophins in IVF treatment: a randomized controlled trial. *Hum Reprod* 2005;20:611-5.
90. Berkkanoglu M, Ozgur K. What is the optimum maximal gonadotropin dosage used in microdose flare-up cycles in poor responders? *Fertil Steril* 2010;94:662-5.
91. Yates AP, Rustamov O, Roberts SA, et al. Anti-Mullerian hormone-tailored stimulation protocols improve outcomes whilst reducing adverse effects and costs of IVF. *Hum Reprod* 2011;26:2353-62.
92. Popovic-Todorovic B, Loft A, Lindhard A, et al. A prospective study of predictive factors of ovarian response in "standard" IVF/ICSI patients treated with recombinant FSH. A suggestion for a recombinant FSH dosage nomogram. *Hum Reprod* 2003;18:781-7.
93. Howles CM, Saunders H, Alam V, et al. Predictive factors and a corresponding treatment algorithm for controlled ovarian stimulation in patients treated with recombinant human follicle stimulating hormone (follitropin alfa) during assisted reproduction technology (ART) procedures. An analysis of 1378 patients. *Curr Med Res Opin* 2006;22:907-18.
94. La Marca A, Papaleo E, Grisendi V, et al. Development of a nomogram based on markers of ovarian reserve for the individualisation of the follicle-stimulating hormone starting dose in in vitro fertilisation cycles. *BJOG* 2012;119:1171-9.
95. La Marca A, Grisendi V, Giulini S, et al. Individualization of the FSH starting dose in IVF/ICSI cycles using the antral follicle count. *J Ovarian Res* 2013;6:11.

Prenatal screening in pregnancies achieved through assisted reproductive technologies

Mariavittoria Locci, Giovanni Nazzaro, Raffaella Iazzetta, Marilena Miranda, Teresa Palmieri, Emilia Salzano

Department of Neuroscience and Reproductive and Odontostomatological Sciences, University of Naples Federico II, Naples

ABSTRACT

Pregnancies achieved through assisted reproductive technologies (ART) represent a group of high-risk pregnancies with special needs of antenatal care. With regard to the increased risk of chromosomal disorders, women conceived by assisted reproduction are confronted with different prenatal screening modalities. As the vast majority wish to avoid invasive testing because of the associated risk of abortion, prenatal evaluation of sonographic and biochemical markers is the preferred option. First-trimester measurement of fetal nuchal translucency in singleton and twin gestations in ART pregnancies is associated with similar screening results when compared with spontaneous conception. First-trimester maternal serum free β -human chorionic gonadotropin and pregnancy-associated plasma protein-A levels are more obviously altered in assisted conceptions and carry the risk of higher false positive rates if not adjusted accordingly. This may help to avoid the unnecessary uptake of invasive testing. It is likely that this problem will become less thorny in the coming years with increasing access to non invasive genetic tests on maternal blood.

INTRODUCTION

Pregnancies conceived by assisted reproductive technologies (ART) are associated with a higher proportion of women aged 35 years or more and a higher rate of multiple pregnancies (1, 2). With regard to the increased risk of chromosomal disorders, women conceived by ART are confronted with different prenatal screening modalities. As most of patients wish to avoid invasive testing because of the associated risk of abortion, prenatal evaluation of sonographic and biochemical markers is the preferred option (3).

In standard practice, first-trimester screening combining maternal age, nuchal translucency thickness and maternal serum free β -human chorionic gonadotropin (β -hCG) and pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) can identify ~85–90% of cases with trisomy 21 with a false positive rate (FPR) of 3–5% (4, 5). The inclusion of additional ultrasound markers, such as fetal nasal bone, ductus venosus blood flow or tricuspid flow further improves the performance of first-trimester screening for aneuploidies (6–8).

The performance of nuchal translucency screening seems not to be affected by the mode of conception in most studies (9, 10). The issue of maternal biochemical

screening (β -hCG and PAPP-A) is even more controversial, with many studies demonstrating alterations in ART pregnancies. Application of these markers seems to increase the false positive rate in the screening of *in vitro* fertilization (IVF) and intracytoplasmic sperm injection (ICSI) pregnancies (11, 12).

NUCHAL TRANSLUCENCY AND OTHER ULTRASOUND MARKERS

First-trimester ultrasound markers are thought to be less affected by the mode of conception. Measurement of nuchal translucency thickness as a single marker is apparently the best investigated and most effective screening test. If performed by experts, the risk assessment by maternal age and nuchal translucency thickness identifies ~75–80% of cases with Down syndrome at a FPR of 3–5% (13).

There are several reports about the measurement of nuchal translucency thickness in various subgroups of assisted conceptions. In a Danish study, the median nuchal translucency thickness in the overall ART group (n=992) was smaller compared with controls (n=2532) (11). They also found differences depending on the

Correspondence to: Mariavittoria Locci, Department of Neuroscience and Reproductive and Odontostomatological Sciences, Section of Obstetrics and Gynecology, University of Naples Federico II, Via Pansini 5, 80131 Naples, Italy. Tel. 337865220, E-mail mariavittorialocci@virgilio.it

Ricevuto: 01.04.2017

Revisionato: 23.05.2017

Accettato: 20.06.2017

Publicato on-line: 15.11.2017

DOI: 10.19186/BC_2017.042

treatment method: nuchal translucency thickness was thinner in IVF cases compared with ICSI cases, and a smaller nuchal translucency was noted in pregnancies treated with the long protocol compared with those with the short protocol (11). The same group found also a difference in pregnancy dating on the basis of different dating criteria. Gestational age was greater in DOA (date of oocyte aspiration) group than in CRL (crown-rump length) group, with a difference of 1.5 days (14). They speculate that fetuses were larger than expected at the nuchal translucency scan and that the true biological gestational age was lower, thus contributing to the smaller nuchal translucency multiple of the median (MoM) values observed in the ART pregnancies (11). Comparable to these results, Engels et al. (12) observed slightly decreased nuchal translucency values in IVF pregnancies, but not in ICSI pregnancies and the combined ART group. Opposite findings were reported by Amor et al. (15). In this study of 833 ART pregnancies, a small increase in the nuchal translucency was detected compared with the non-ART group.

The majority of studies found no difference in the size of nuchal translucency in ART pregnancies compared with spontaneously conceived pregnancies and consequently no influence on the performance and FPR by combining nuchal translucency thickness and maternal age for Down syndrome risk assessment.

A further improvement in the screening performance can be achieved by including the assessment of additional ultrasound markers such as the nasal bone and ductus venosus and tricuspid valve blood flow (6-8, 13). Absence of the nasal bone, reversed a-wave in the ductus venosus and tricuspid regurgitation have been observed in ~60%, 65% and 55% of fetuses with Down syndrome and in 2.6%, 3.2%, and 0.9% of euploid fetuses, respectively. Screening for Down syndrome by maternal age, nuchal translucency thickness and either the nasal bone, the ductus venosus or the tricuspid flow, at a risk cut-off of 1:100, identified 83%, 85% and 85% of cases with FPR of 2.9%, 2.7% and 2.7%, respectively (13). Currently, there are no studies available assessing the profile of these ultrasound markers specifically in ART pregnancies.

FIRST-TRIMESTER BIOCHEMICAL MARKERS

A number of maternal and pregnancy co-variables have shown to influence the measured concentrations of free β -hCG and PAPP-A in first-trimester biochemical screening. To estimate accurate patient-specific risk, adjustments for gestational age, maternal weight, ethnicity, parity, smoking status and even employed assay are essential (16). Likewise, the mode of conception is an important covariate in first-trimester screening. In addition, women conceived by ART may suffer from various underlying endocrinological, metabolic or genetic diseases, which might have implications for biochemical screening. Other possible confounding factors are several types of hormonal treatment, different modes of assisted conceptions as

well as the transfer of fresh or frozen-thawed embryos.

In most of the studies exploring first-trimester markers in assisted conceptions, a significantly decreased PAPP-A has been described compared with spontaneous conception (15-17). Most of the studies failed to demonstrate intergroup differences between IVF and ICSI. In the largest study to date, including 2115 ART pregnancies, Kagan et al. (16) reported 10% lower PAPP-A values and 9% higher β -hCG values compared with spontaneously conceived pregnancies. As a consequence, the FPR increased from 4.6% to 7.6%. Amor et al. (15) investigated PAPP-A concentrations in fresh embryo transfers and frozen embryo transfers (FET). Compared with non-ART pregnancies, PAPP-A levels were reduced in both; however, fresh embryo transfers were associated with significantly lower PAPP-A values when compared with FET.

Reports regarding concentrations of free β -hCG in assisted conceptions are more variable. While some studies negate differences in β -hCG values compared to spontaneous conceptions (11, 15, 17), others found increased values in women conceived by ART (18), IVF (10, 16, 18, 19) or ICSI (10).

First-trimester screening with both ultrasonic and biochemical markers in ART conceptions may increase the risk of false positive results and therefore increase the likelihood of having chorionic villous sampling (CVS) or amniocentesis.

Without making adjustments in the measured maternal serum concentrations of PAPP-A and β -hCG in ART gestations, significantly higher FPR of 9–11% have been reported (11, 12, 15). Although women who conceived by ART are more reluctant to invasive prenatal testing than age-adjusted women who conceived spontaneously, an increase in the FPR will subsequently increase the uptake of CVS or amniocentesis in those pregnancies (15).

Possible causes of altered serum markers in ART

Pregnancies arising from different methods of ART due to various causes of infertility may behave differently with respect to altered serum biochemistry. Some studies found no correlation between PAPP-A and β -hCG levels and ovarian stimulation characteristics, i.e. the total dose of hormonal stimulation, the number of days treated and the number of oocytes retrieved (11, 20).

With regard to the source of infertility, an interesting study explored whether the observed marker changes are due to decreased fertility or the ART techniques used (21). The authors compared women with extended waiting time-to-pregnancy (TTP) (>25 months) but spontaneous conception, normal TTP (0-12 months, reference group) and IVF conceptions concerning first-trimester serum markers. The study found a similar screening profile in subfertile women (TTP >25 months) and IVF pregnancies, with significantly reduced PAPP-A concentrations compared with the reference group. No

differences were observed for β -hCG levels and nuchal translucency measurements between the groups. The authors assumed underlying subfertility rather than the use of ART as the mechanism behind altered first-trimester PAPP-A values (21).

Other possible effects of changed serum concentrations of PAPP-A and free β -hCG are a functional delay in placental and fetal development and a higher risk of obstetric complications (22-25). Advanced maternal age and, in particular, nulliparity, which occur more frequently among ART pregnancies (10), are known risk factors for adverse perinatal outcome. Low first-trimester PAPP-A values have been described as an indicator of placenta-related disorders, such as preeclampsia, fetal growth restriction, preterm birth and low birth weight (26-28), an overlapping spectrum of maternal and fetal complications known to be more frequent in assisted conceptions (22-24). Two studies explored the relationship between obstetric complications and PAPP-A values in ART pregnancies. While they found lower PAPP-A concentrations in complicated compared with uncomplicated pregnancies, PAPP-A remained significantly reduced in uncomplicated ART pregnancies compared with uncomplicated spontaneous controls (10, 15).

Another potential confounding factor on first-trimester biochemical markers is the presence of a vanishing twin. In women with a second empty gestational sac, the median PAPP-A and free β -hCG values were not different from the medians in singleton pregnancies. However, in those with a vanishing twin and a measurable CRL, significantly increased median PAPP-A concentrations, but unchanged median β -hCG concentrations were observed (29). A trend towards increased PAPP-A concentrations associated with multiple fetal hearts in early gestation was confirmed for ART pregnancies by Amor et al. (15). Therefore, in the presence of a late-vanishing twin, errors in risk estimation may occur and restriction to screening by use of ultrasound marker seems more advisable.

PREGNANCIES DERIVED FROM BLASTOCYST TRANSFER

Growing proportion of pregnancies from ART are obtained using frozen embryos or delaying the transfer up to the stage of blastocyst. These techniques may expose embryos to higher risks compared to those based on fresh cycles or early transfer on day 2-3. In fact, longer *in vitro* embryonic growth and association with freezing-thawing procedures with the use of cryoprotectants may somehow cause a biological damage to the cells (30-32). At present, there is limited information about the safety of these procedures in relation to the risk of chromosomal abnormalities and pregnancy complications (33). To our knowledge, there are few studies in the literature reporting on the impact of blastocyst transfer on first-trimester screening components. In one study, the sonographic measurement of nuchal translucency showed a

progressive increase from control group to the fresh-blasto group, and from the latter to the frozen-blasto group, which had the highest median delta nuchal translucency (34). In contrast, the increased nuchal translucency measurement both in the IVF-fresh and in the IVF-frozen group could be related to the duration of *in vitro* cell growth, which is ~2 days longer when blastocyst transfer is involved, as compared to ART with transfer of embryos at the cleavage stage. It may be speculated that the observed highest differences in the frozen group may be determined by the use of more invasive procedures necessary for the blastocyst cryopreservation process (such as assisted hatching and assisted shrinkage). These procedures, together with the use of high concentration of potentially toxic cryoprotectants, may cause a subclinical damage to the blastocysts (30-32). This mechanism may lead to an inflammatory reaction, presenting as increased nuchal translucency at a later stage.

One study showed a 30% increase of the free β -hCG MoM in frozen-blasto as compared to controls and a 10% increase in the free β -hCG MoM in fresh-blasto as compared to controls (34). PAPP-A did not differ among the 3 groups. With regard to the underlying pathophysiology for increased free β -hCG values, they may be a consequence of the hormonal treatment typical of ART procedures in fresh cycles or may be due to vanishing twins, which results from multiple embryos transfer, or to increased trophoblastic proliferation (34). These differences could lead to higher FPR of the first-trimester screening test, thus increasing the likelihood of having prenatal invasive tests, with their related risk of fetal loss or additional use of cell-free fetal DNA (cfDNA) testing. If these results will be confirmed, it could be necessary to make an adjustment in the screening algorithm for pregnancies achieved after blastocyst transfer in order to reduce the risk of unnecessary prenatal invasive tests.

SCREENING IN MULTIPLE PREGNANCIES

The incidence of multiple pregnancies has continued to increase over the past years and up to 25% of pregnancies arising from ART are twins or higher order multiples.

Diagnosis of chorionicity should be the first step of first-trimester ultrasound evaluation, as this has major impact on the screening for aneuploidies and further care of pregnancy. Despite the increased incidence of monochorionic twinning after ART, the majority of pregnancies results from the transfer of more than one embryo and is dichorionic (35). For dichorionic twins, an individual risk estimate based on the single nuchal translucency measurements in both co-twins is performed. In monochorionic and therefore monozygotic twins, screening for trisomy 21 is provided by risk calculation based on the average nuchal translucency of the two fetuses (36). The thickness of nuchal translucency has been shown to be affected by chorionicity. Mean fetal nuchal translucency thickness

and inter-twin nuchal translucency thickness were larger in monochorionic twins compared with dichorionic twins, irrespective of twin zygosity (37). Increased nuchal translucency thickness and discordance of nuchal translucency thickness in monochorionic twins have been also associated with adverse pregnancy outcome, i.e. perinatal death and twin-twin transfusion syndrome (TTTS) (38, 39). Detection rates for trisomy 21 of 75–80% have been reported in twin gestations using fetal nuchal translucency and maternal age for risk calculation (40, 41). The median nuchal translucency values in ART-achieved twin pregnancies have been found similar to those in spontaneous controls (35, 42, 43).

The addition of PAPP-A and β -hCG to first-trimester risk assessment in twin pregnancies may improve the detection rate by ~5–6% (44), helping to reduce the FPR (42, 45). As in singleton pregnancies, some maternal characteristics require the adjustment of calculated MoM values, a twin-specific one being chorionicity (46, 47).

Data regarding first-trimester biochemical screening in twin pregnancies achieved by ART are sparse. In two small studies without differentiation of chorionicity, no significant differences were found in serum markers between spontaneous and assisted twin conceptions (42, 43). With respect to pregnancy outcome, low PAPP-A (<0.52 MoM) has been associated with discordant growth and hypertensive disorders in twin pregnancies (48). Further, a trend towards increased values of β -hCG and PAPP-A values were observed in monochorionic twins complicated by TTTS (49).

cfDNA SCREENING FOR FETAL ANEUPLOIDY

The presence of fetal cfDNA in maternal circulation was first demonstrated by Lo et al. (50). This finding led to the discovery that cfDNA obtained from maternal plasma could be used for fetal aneuploidy analysis, termed non invasive prenatal testing (NIPT), along-awaited improvement to reduce invasive procedures and related miscarriage risk (51, 52). Non invasive prenatal screening that uses cfDNA from the plasma of pregnant women offers great potential as a screening method for fetal aneuploidy. In 2011, cfDNA analysis became clinically available and the American College of Obstetricians and Gynecologists and the Society for Maternal-Fetal Medicine recommended it as a screening option for women at increased risk of fetal aneuploidy. This population was defined as women 35 years or older, fetuses with ultrasonographic findings indicative of an increased risk of aneuploidy, women with a history of trisomy-affected offspring, a parent carrying a balanced robertsonian translocation with an increased risk of trisomy 13 or trisomy 21, and women with positive first-trimester or second-trimester screening test results. Circulating cfDNA of fetal origin comprises approximately 3–13% of the total maternal cfDNA after 10 weeks of gestation and is thought to be derived primarily from the placenta. The cfDNA test will screen for only the common trisomies and, if requested, sex chromosome composition. Testing can be performed starting as early

as 9 weeks and until delivery. All tests have a high sensitivity and specificity for trisomy 18 and trisomy 21, regardless of which molecular technique is used. Sensitivities for trisomy 13 and sex chromosome abnormalities are somewhat lower, averaging 80–90%, but the specificity remains >99% for each condition. Accuracy of sex determination generally exceeds 98% (53–55).

Current cfDNA-based NIPT approaches focus on detection of a limited set of conditions, which typically include trisomy 21, trisomy 18, trisomy 13, sex chromosome aneuploidies and selected microdeletions. Consequently, a large set (~17%) of clinically relevant chromosomal abnormalities is currently not accessible to standard cfDNA testing and is neglected by such a restricted detection scheme. Genome-wide analysis of cfDNA would greatly expand the range of chromosomal rearrangements detectable by NIPT, because it extends screening to include also rare autosomal trisomies and structural chromosome anomalies throughout the fetal genome. Such level of testing has the potential to improve overall pregnancy management, providing a significant higher sensitivity compared to standard screening. The clinical utility of expanding NIPT to include detection of these other rearrangements, particularly in low-risk pregnancies, is controversial because this could lead to a decrease of specificity, potentially affecting to some degree one of the major perceived benefits of NIPT screening: the significantly reduced requirement for invasive testing. Therefore, any change to the standard cfDNA screening approaches that may increase the FPR, leading to maternal anxiety, should be weighed against the possible benefits prior to the routine implementation. Although genome-wide cfDNA analysis has shown the potential to improve overall pregnancy management, additional clinical data must be obtained before this approach can be evaluated for integration into NIPT programs. Further prospective studies in this area, with a large cohort of patients analyzed, will further enhance understanding of clinical effectiveness of genome-wide screening, elucidating the role that this technique will come to play in NIPT, including whether it may replace the use of standard cfDNA screening (56).

The fetal fraction (FF), i.e. the amount of the cfDNA in the maternal blood that is of fetal origin, is essential for accurate test results. The amount of fetal cfDNA in plasma from a pregnant woman is ~10% when sampling is carried out between 10 and 20 gestational weeks, but there is a large variance in the FF cfDNA among patients. The FF typically increases with advancing gestational age. The FF is a key determinant of assay performance. If there is sufficient fetal cfDNA in the plasma sample, then the assay can provide accurate counting of the fetal chromosome fragments. The larger the FF, the better the ability to distinguish between euploid and aneuploid pregnancies, thereby the better the test performance. Instead, if the FF is too low, then a chromosomal abnormality could be masked by the overwhelming proportion of euploid maternal cfDNA,

thereby increasing the risk of achieving false negative test results. Clinical tests that rely on the quantification of FF require the amount of fetal cfDNA in maternal plasma to be above a minimum level for accurate aneuploidy assessment. A FF of ~4% or greater is the suggested minimum threshold currently employed by NIPT methods for a reportable result. Below this value, the cfDNA test is usually presented as a failure and no result is reported. However, no experimental data are available on the actual limit of detection (LOD) of these NIPT approaches. As a consequence, the use of the above cut-off value could be not necessarily appropriate for all cfDNA testing methodologies. The minimum FF level necessary for accurate aneuploidy assessment should be related to the actual LOD of each specific NIPT approach used and not necessarily fixed at 4% for all cfDNA testing methodologies. The determination of the LOD is advisable for any NIPT method, so that the appropriate FF cut-off value can be used (57).

Results may not be obtained because of low FF in patients carrying aneuploid fetuses or those who are obese. For patients weighing >120 kg, 10% or more may have a FF <4% (58). Rates of aneuploidy >23% (due to low FF or other unknown factors) have been reported for women who fail to receive an interpretable result from cfDNA testing. Women whose results are not reported, indeterminate or uninterpretable (a "no call" test result) from cfDNA screening should receive further genetic counseling and be offered comprehensive ultrasound evaluation and diagnostic testing because of an increased risk of aneuploidy.

The sensitivity and specificity in the general obstetric population are similar to the levels previously published for the aforementioned high-risk population. The positive predictive value, however, is lower in this population, given the lower prevalence of aneuploidy. Consequently, fewer women with a positive test result will actually have an affected fetus and there will be more false positive test results.

Although there is considerable evidence for robust NIPT performance in singleton pregnancies, there is still relatively little published about performance in twins. The data regarding the performance of cfDNA screening in twin gestations are limited (59, 60). Regardless of the method, the accuracy of screening for aneuploidy is limited in multiple gestations. With any method based on maternal blood (serum biomarkers or DNA), only a single composite result for the entire gestation is provided, with no ability to distinguish a differential risk between fetuses. One of the principal areas of discussion surrounding the application of NIPT in twin pregnancies is that of FF. Although the total FF of twin pregnancies might be higher than that of singletons, the individual contribution from each twin is generally lower than that of a singleton.

The detection rate for trisomy 21 in twins appears to be in line with that in singletons. cfDNA performs well in twin pregnancies, with overall very low false positive frequencies (61). NIPT has the potential to be used as a good alternative approach of conventional prenatal

screening at the first-trimester in ART twin pregnancy. Conventional prenatal screening based on maternal age, biochemical and ultrasound markers showed inconsistent performance in ART pregnancies comparing to natural conceptions because ART treatments may induce the alteration of biomarker expression. The major utility of implementing NIPT in prenatal screening in ART twin pregnancy would be providing early and accurate screening result and reducing the difficulty of making pregnant decision. ART is increasingly used in infertility treatment, and >30% of ART-related live births are twin pregnancy. Given the long, stressful and occasionally painful process of getting pregnant via ART, women cherish their fetuses and stay away from invasive tests. Thus, there is an increasing demand of safe and accurate screening method for fetal aneuploidy in this enlarging group of pregnant population. However, there is a lack of effective prenatal screening method in ART twin pregnancy. Mid-gestation and first-trimester serum screening in ART twin pregnancy has been shown increased FPR because of the varied expression of biochemical markers. Ultrasound nuchal translucency is widely used in prenatal screening in ART twin pregnancy, even though the detection rate is only ~70%, with a 5% FPR. High FPR potentially posts great mental stress to pregnant women with IVF twins, because the risk of procedure-related fetal loss in ART twin pregnancies is more than doubled comparing to singleton pregnancy. In contrast, NIPT has shown an extremely low FPR and high positive predictive value in some studies and can be performed at early pregnancy; therefore, it has the potential to significantly reduce the risk of unnecessary invasive procedure and increase the number of affected fetus that can be identified (62).

Patients should be counseled that cfDNA screening does not replace the accuracy obtained with diagnostic tests, such as CVS or amniocentesis and, therefore, is limited in its ability to identify all chromosome abnormalities. Not only can there be false positive test results, but a positive cfDNA test result for aneuploidy is unable to determine if the trisomy is due to a translocation, which affects the risk of recurrence. If a fetal structural anomaly is identified on ultrasound examination, diagnostic testing should be offered rather than cfDNA screening. A diagnostic test should be also recommended for a patient who has a positive cfDNA test result. Management decisions, including termination of the pregnancy, should not be based on the results of the cfDNA screening alone. False positive test results do occur and diagnostic testing with amniocentesis or CVS should be recommended before any pregnancy termination decision. Patients should be counseled that a negative cfDNA test result does not ensure an unaffected pregnancy. A negative test result still carries a residual risk of one of the common trisomies and does not ensure that the fetus does not have another chromosome abnormality or genetic diagnosis.

Use of cfDNA screening as a follow-up test for patients with a positive traditional screening test result is reasonable for patients who want to avoid a diagnostic

test. Given that the residual risk of a chromosomal abnormality with a normal cfDNA screening test result after an abnormal traditional screening test has been reported to be 2%, patients should be informed of this limitation (63).

CONCLUSIONS

ART pregnancies differ from natural conceptions in many aspects and represent a selected high-risk group of pregnancies. Although minor alterations in nuchal translucency thickness have been observed in ART singletons, this had no major impact on first-trimester screening performance for trisomy 21 based on nuchal translucency measurement and maternal age. Likewise, evaluation of fetal nuchal translucency seems the best investigated and least affected screening modality in twins. The use of other sonographic markers has not been widely explored at present. There is, however, current evidence of altered first-trimester biochemistry in singleton ART conceptions, necessitating accordant adjustments. This may help to prevent higher FPR and therefore avoid the unnecessary uptake of invasive testing. It is likely that this problem will become less thorny in the coming years with increasing access to non invasive genetic tests on maternal blood. This could rule out trisomy 21 in the great majority of cases without recourse to invasive collection of amniotic fluid or CVS. Although the ultrasound and biochemical markers are extremely useful in monitoring pregnancy, they are totally inadequate for the diagnosis of many genetic diseases, for which the only diagnostic approach are the invasive techniques.

CONFLICTS OF INTEREST

None.

REFERENCES

- Weisz B, Rodeck CH. An update on antenatal screening for Down's syndrome and specific implications for assisted reproduction pregnancies. *Hum Reprod Update* 2006;12:513–8.
- Gjerris AC, Loft A, Pinborg A, et al. Prenatal testing among women pregnant after assisted reproductive techniques in Denmark 1995–2000: a national cohort study. *Hum Reprod* 2008;23:1545–52.
- Geipel A, Berg C, Katalinic A, et al. Different preferences for prenatal diagnosis in pregnancies following assisted reproduction versus spontaneous conception. *Reprod Biomed Online* 2004;8:119–24.
- Kagan KO, Wright D, Baker A, et al. Screening for trisomy 21 by maternal age, fetal nuchal translucency thickness, free beta-human chorionic gonadotropin and pregnancy-associated plasma protein-A. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2008;31:618–24.
- Kagan KO, Etchegaray A, Zhou Y, et al. Prospective validation of first-trimester combined screening for trisomy 21. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2009;34:14–8.
- Kagan KO, Cicero S, Staboulidou I, et al. Fetal nasal bone in screening for trisomies 21, 18 and 13 and Turner syndrome at 11–13 weeks of gestation. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2009;33:259–64.
- Maiz N, Valencia C, Kagan KO, et al. Ductus venosus Doppler in screening for trisomies 21, 18 and 13 and Turner syndrome at 11–13 weeks of gestation. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2009;33:512–7.
- Kagan KO, Valencia C, Livanos P, et al. Tricuspid regurgitation in screening for trisomies 21, 18 and 13 and Turner syndrome at 11+0 to 13+6 weeks of gestation. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2009;33:18–22.
- Lambert-Messerlian G, Dugoff L, Vidaver J, et al. First- and second-trimester Down syndrome screening markers in pregnancies achieved through assisted reproductive technologies (ART): a FASTER trial study. *Prenat Diagn* 2006;26:672–8.
- Bender F, Hecken J, Reinsberg J, et al. Altered first-trimester screening markers after IVF/ICSI: no relationship with small-for-gestational-age and number of embryos transferred. *Reprod Biomed Online* 2010;20:516–22.
- Gjerris AC, Loft A, Pinborg A, et al. First-trimester screening markers are altered in pregnancies conceived after IVF/ICSI. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2009;33:8–17.
- Engels MA, Kooij M, Schats R, et al. First-trimester serum marker distribution in singleton pregnancies conceived with assisted reproduction. *Prenat Diagn* 2010;30:372–7.
- Kagan KO, Staboulidou I, Cruz J, et al. Two-stage first-trimester screening for trisomy 21 by ultrasound assessment and biochemical testing. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2010;36:542–7.
- Gjerris AC, Loft A, Pinborg A, et al. First-trimester screening in pregnancies conceived by assisted reproductive technology: significance of gestational dating by oocyte retrieval or sonographic measurement of crown-rump length. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2008;32:612–7.
- Amor DJ, Xu JX, Halliday JL, et al. Pregnancies conceived using assisted reproductive technologies (ART) have low levels of pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) leading to a high rate of false-positive results in first trimester screening for Down syndrome. *Hum Reprod* 2009;24:1330–8.
- Kagan KO, Wright D, Spencer K, et al. First-trimester screening for trisomy 21 by free beta-human chorionic gonadotropin and pregnancy-associated plasma protein-A: impact of maternal and pregnancy characteristics. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2008;31:493–502.
- Matilainen M, Peuhkurinen S, Laitinen P, et al. In combined first-trimester Down syndrome screening, the positive rate is not higher in pregnancies conceived after assisted reproduction compared with spontaneous pregnancies. *Fertil Steril* 2011;95:378–81.
- Ghisoni L, Ferrazzi E, Castagna C, et al. Prenatal diagnosis after ART success: the role of early combined screening tests in counselling pregnant patients. *Placenta* 2003;24:99–103.
- Bellver J, Lara C, Soares SR, et al. First trimester biochemical screening for Down's syndrome in singleton pregnancies conceived by assisted reproduction. *Hum Reprod* 2005;20:2623–7.
- Anckaert E, Schiettecatte J, Sleurs E, et al. First-trimester screening for Down's syndrome after assisted reproductive technology: nonmale factor infertility is associated with elevated free beta-human chorionic gonadotropin levels at 10–14 weeks of gestation. *Fertil Steril* 2008;90:1206–10.
- Ranta JK, Raatikainen K, Romppanen J, et al. Increased time-to-pregnancy and first trimester Down's syndrome screening. *Hum Reprod* 2010;25:412–7.
- Helmerhorst FM, Perquin DA, Donker D, et al. Perinatal

- outcome of singletons and twins after assisted conception: a systematic review of controlled studies. *Br Med J* 2004;328:261–5.
23. Williams C, Sutcliffe A. Infant outcomes of assisted reproduction. *Early Hum Dev* 2009;85:673–7.
 24. Henningsen AK, Pinborg A, Lidegaard O, et al. Perinatal outcome of singleton siblings born after assisted reproductive technology and spontaneous conception: Danish national sibling-cohort study. *Fertil Steril* 2011;95:959–63.
 25. Hui PW, Lam YH, Tang MH, et al. Maternal serum pregnancy-associated plasma protein-A and free beta-human chorionic gonadotropin in pregnancies conceived with fresh and frozen-thawed embryos from in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Prenat Diagn* 2005;25:390–3.
 26. Gagnon A, Wilson RD, Audibert F, et al. Obstetrical complications associated with abnormal maternal serum markers analytes. *J Obstet Gynaecol Can* 2008;30:918–49.
 27. Pihl K, Larsen T, Krebs L, et al. First trimester maternal serum PAPP-A, beta-hCG and ADAM12 in prediction of small-for-gestational-age fetuses. *Prenat Diagn* 2008;28:1131–5.
 28. Papageorgiou AT, Leslie K. Uterine artery Doppler in the prediction of adverse pregnancy outcome. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2007;19:103–9.
 29. Spencer K, Staboulidou I, Nicolaides KH. First trimester aneuploidy screening in the presence of a vanishing twin: implications for maternal serum markers. *Prenat Diagn* 2010;30:235–40.
 30. Bernard A, Fuller BJ. Cryopreservation of human oocytes: a review of current problems and perspectives. *Hum Reprod Update* 1996;2:193–207.
 31. Sathananthan AH, Trounson A, Freemann L, et al. The effects of cooling human oocytes. *Hum Reprod* 1988;3:968–77.
 32. Van der Elst J, Van den Abbeel E, Jacobs R, et al. Effect of 1,2-propanediol and dimethylsulphoxide on the meiotic spindle of the mouse oocyte. *Hum Reprod* 1988;3:960–7.
 33. Wennerholm UB, Soderstrom-Anttila V, Bergh C, et al. Children born after cryopreservation of embryos or oocytes: a systematic review of outcome data. *Hum Reprod* 2009;24:2158–72.
 34. Cavoretto P, Dallagiovanna C, Vignani P et al. First trimester combined screening test in pregnancies derived from blastocyst transfer. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 2016;198:50–5.
 35. Maymon R, Neeman O, Shulman A, et al. Current concepts of Down syndrome screening tests in assisted reproduction twin pregnancies: another double trouble. *Prenat Diagn* 2005;25:746–50.
 36. Vandecruys H, Faiola S, Auer M, et al. Screening for trisomy 21 in monochorionic twins by measurement of fetal nuchal translucency thickness. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2005;25:551–3.
 37. Cheng PJ, Huang SY, Shaw SW, et al. Difference in nuchal translucency between monozygotic and dizygotic spontaneously conceived twins. *Prenat Diagn* 2010;30:247–50.
 38. El Kateb A, Nasr B, Nassar M, et al. First-trimester ultrasound examination and the outcome of monochorionic twin pregnancies. *Prenat Diagn* 2007;27:922–5.
 39. Kagan KO, Gazzoni A, Sepulveda-Gonzalez G, et al. Discordance in nuchal translucency thickness in the prediction of severe twin-to-twin transfusion syndrome. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2007;29:527–32.
 40. Sebire NJ, Snijders RJ, Hughes K, et al. Screening for trisomy 21 in twin pregnancies by maternal age and fetal nuchal translucency thickness at 10–14 weeks of gestation. *Br J Obstet Gynaecol* 1996;103:999–1003.
 41. Chasen ST, Perni SC, Kalish RB, et al. First-trimester risk assessment for trisomies 21 and 18 in twin pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2007;197:374.e1–3.
 42. Gonc e A, Borrell A, Fortuny A, et al. First-trimester screening for trisomy 21 in twin pregnancy: does the addition of biochemistry make an improvement? *Prenat Diagn* 2005;25:1156–61.
 43. Hui PW, Tang MH, Ng EH, et al. Nuchal translucency in dichorionic twins conceived after assisted reproduction. *Prenat Diagn* 2006;26:510–3.
 44. Spencer K, Nicolaides KH. Screening for trisomy 21 in twins using first trimester ultrasound and maternal serum biochemistry in a one-stop clinic: a review of three years experience. *BJOG* 2003;110:276–80.
 45. Orlandi F, Rossi C, Allegra A, et al. First trimester screening with free beta-hCG, PAPP-A and nuchal translucency in pregnancies conceived with assisted reproduction. *Prenat Diagn* 2002;22:718–21.
 46. Spencer K, Kagan KO, Nicolaides KH. Screening for trisomy 21 in twin pregnancies in the first trimester: an update of the impact of chorionicity on maternal serum markers. *Prenat Diagn* 2008;28:49–52.
 47. Linskens IH, Spreeuwenberg MD, Blankenstein MA, et al. Early first trimester free beta-hCG and PAPP-A serum distributions in monochorionic and dichorionic twins. *Prenat Diagn* 2009;29:74–8.
 48. Chasen ST, Martinucci S, Perni SC, et al. First-trimester biochemistry and outcomes in twin pregnancy. *J Reprod Med* 2009;54:312–4.
 49. Linskens IH, Engels M, Oepkes D, et al. A trend toward increased first trimester free beta-hCG and PAPP-A in monochorionic twins complicated by twin-to-twin transfusion syndrome. *Prenat Diagn* 2010;30:909–10.
 50. Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 1997;350:485–7.
 51. Fan HC, Blumenfeld YJ, Chitkara U, et al. Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:16266–71.
 52. Lo YM, Lun FM, Chan KC, et al. Digital PCR for the molecular detection of fetal chromosomal aneuploidy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:13116–21.
 53. Bianchi DW, Platt LD, Goldberg JD, et al. Genome-wide fetal aneuploidy detection by maternal plasma DNA sequencing. Maternal Blood IS Source to Accurately Diagnose Fetal Aneuploidy (MELISSA) Study Group. *Obstet Gynecol* 2012;119:890–901.
 54. Norton ME, Brar H, Weiss J, et al. Non-Invasive Chromosomal Evaluation (NICE) Study: results of a multicenter prospective cohort study for detection of fetal trisomy 21 and trisomy 18. *Am J Obstet Gynecol* 2012;207:137.e1–8.
 55. Norton ME, Jacobsson B, Swamy GK, et al. Cell-free DNA analysis for noninvasive examination of trisomy. *N Engl J Med* 2015;372:1589–97.
 56. Fiorentino F, Bono S, Pizzuti F, et al. The clinical utility of genome-wide non invasive prenatal screening. *Prenatal Diagnosis* 2017;37:1–9.
 57. Fiorentino F, Bono S, Pizzuti F, et al. The importance of determining the limit of detection of non-invasive prenatal testing methods. *Prenat Diagn* 2016;36:304–11.
 58. Ashoor G, Syngelaki A, Poon LC, et al. Fetal fraction in maternal plasma cell-free DNA at 11–13 weeks' gestation: relation to maternal and fetal characteristics. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2013;41:26–32.

59. Canick JA, Kloza EM, Lambert-Messerlian GM, et al. DNA sequencing of maternal plasma to identify Down syndrome and other trisomies in multiple gestations. *Prenat Diagn* 2012;32:730–4.
60. Huang X, Zheng J, Chen M, et al. Noninvasive prenatal testing of trisomies 21 and 18 by massively parallel sequencing of maternal plasma DNA in twin pregnancies. *Prenat Diagn* 2014;34:335–40.
61. Fosler L, Winters P, Jones K.W, et al. Aneuploidy screening by non-invasive prenatal testing in twin pregnancy. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2017;49:470-7.
62. Tan Y, Gao Y, Lin G, et al. Noninvasive prenatal testing (NIPT) in twin pregnancies with treatment of assisted reproductive techniques (ART) in a single center. *Prenat Diagn* 2016;36:672–9.
63. Norton ME, Jelliffe-Pawłowski LL, Currier RJ. Chromosome abnormalities detected by current prenatal screening and noninvasive prenatal testing. *Obstet Gynecol* 2014;124:979–86.

Indicazioni e limiti della diagnosi genetica preimpianto

Valeria D'Argenio^{1,2,3}, Marcella Nunziato^{1,4}, Nadja D'Uonno¹, Francesca Borrillo¹, Roberta Vallone⁵, Alessandro Conforti⁵, Pasquale De Rosa⁵, Rossella Tomaiuolo^{1,2,3}, Federica Cariatì^{1,2,3}

¹CEINGE-Biotecnologie Avanzate s.c.ar.l., Napoli

²Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli

³KronosDNA s.r.l., spin-off accademico dell'Università Federico II, Napoli

⁴Dipartimento di Scienze Motorie e del Benessere, Università Parthenope, Napoli

⁵Dipartimento di Neuroscienze, Scienze Riproduttive e Odontostomatologiche, Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli

ABSTRACT

Indications and limitations for preimplantation genetic diagnosis. The preimplantation genetic diagnosis allows to identify genetic disease and chromosomal alterations in early stages of embryonic development, giving the opportunity to overcome the risk of transmitting an inherited disease and to improve the efficiency of *in vitro* fertilization techniques. In this paper, we provide an overview of indications and of the advantages and limits of techniques used to perform the preimplantation genetic diagnosis. We describe the multiplex-polymerase chain reaction (PCR) and the karyomapping for the genetic diagnosis of inherited disease as well as the comparative genomic hybridization array, the qualitative real-time PCR and the next generation sequencing for the screening of chromosomal aneuploidy.

INTRODUZIONE

I recenti progressi nella comprensione del genoma umano e nelle metodiche di diagnostica molecolare hanno portato a una maggiore conoscenza e consapevolezza dei meccanismi alla base di malattie ereditate riconducibili ad alterazioni genetiche o cromosomiche (1). Si stima che ciascun individuo sia portatore di 5-8 alterazioni della sequenza del DNA associate a disturbi genetici recessivi. Pertanto, un'accurata valutazione della storia familiare permette di identificare gli individui con un elevato rischio per le malattie ereditarie (2). La valutazione del rischio familiare è particolarmente importante per le coppie che affrontano un percorso di procreazione medicalmente assistita (PMA), in quanto consente sia di conoscere i rischi genetici prima della gravidanza (in ~65% dei casi) sia le cause dell'infertilità, spesso correlata ad alterazioni genetiche o cromosomiche (in ~20% dei casi) (3, 4). Sulla base di queste conoscenze, le coppie a rischio di trasmissione di alterazioni genetiche possono scegliere di utilizzare tecniche come la diagnosi genetica preimpianto (PGD) (5). In particolare, attraverso la PGD è possibile identificare la presenza di malattie genetiche

o di alterazioni cromosomiche nelle fasi molto precoci dello sviluppo embrionale. Essa consente di evidenziare l'eventuale presenza di malattie genetiche in embrioni generati da coppie in cui è nota la presenza di alleli mutati in uno o entrambi i partner (6). Lo screening genetico preimpianto ("preimplantation genetic screening", PGS), invece, verifica la presenza di aneuploidie nell'embrione, migliorando l'efficienza della tecniche di PMA (6).

PGS e PGD sono processi multistep, che vedono coinvolto un team multidisciplinare composto da ginecologi, embriologi e biologi molecolari. In dettaglio, il processo prevede: a) la raccolta dei gameti da entrambi i partner, b) la fecondazione dell'ovocita mediante iniezione intracitoplasmatica ("intracytoplasmic sperm injection", ICSI) e, successivamente allo sviluppo dell'embrione, c) la biopsia, che permette di prelevare una o più cellule di blastomeri o di trofotoderma, rispettivamente 3 o 5 giorni post-fecondazione (7, 8). Nonostante la biopsia del trofotoderma permetta di ottenere un numero maggiore di cellule (5-10 cellule) e risultati significativamente meno dannosa per le potenzialità di sviluppo dell'embrione (9), secondo i dati riportati dall'"European Society of Reproduction and Embryology" (ESHRE), nel 74% dei casi si esegue la

Corrispondenza a: Federica Cariatì, CEINGE-Biotecnologie Avanzate s.c.ar.l., Via G. Salvatore 486, 80145 Napoli. Tel. 0813737890, Fax 0813737808, E-mail cariatì@ceinge.unina.it

Ricevuto: 01.04.2017

Revisionato: 23.05.2017

Accettato: 20.06.2017

Pubblicato on-line: 15.11.2017

DOI: 10.19186/BC_2017.043

biopsia dei blastomeri e solo nel 24% quella del trofotoderma (10). La biopsia dei blastomeri è quindi ancora la tecnica più utilizzata, nonostante le molte pubblicazioni che ne dimostrano importanti svantaggi, che vanno dall'impatto del mosaicismo, e quindi da problematiche tecniche relative all'analisi genetica di una singola cellula, al rischio di compromettere la vitalità degli embrioni (11-15).

Grazie a recenti miglioramenti ottenuti nelle tecniche di crioconservazione e agli ottimi risultati nel trasferimento di embrioni in cicli successivi a quello di stimolazione, gli embrioni dopo biopsia possono essere vitrificati con perdita di vitalità non significativa. Di conseguenza, l'esigenza di ottenere la diagnosi (PGD o PGS) in 24 ore e trasferire gli embrioni "freschi" è decisamente diminuita, permettendo anche un'analisi molecolare più dettagliata (16).

PGD

La PGD richiede l'applicazione delle tecniche di fecondazione *in vitro* anche per le coppie in grado di concepire in maniera naturale. Infatti, grazie alla sentenza 96/2015 della Corte Costituzionale, che ha dichiarato l'illegittimità costituzionale degli art. 1, commi 1, 2 e 4, della legge 19 febbraio 2004, n. 40 (Norme in materia di procreazione medicalmente assistita), coppie fertili con accertata malattia genetica trasmissibile possono accedere alle tecniche di fecondazione *in vitro* al fine di poter eseguire la PGD e, quindi, procreare un figlio non affetto dalla malattia oggetto della diagnosi. La PGD permette di evidenziare la presenza degli alleli a rischio di trasmettere la patologia genetica ereditaria presente nella famiglia (Figura 1). Gli embrioni non affetti dalla malattia in esame possono essere trasferiti in utero dopo 24 ore dalla diagnosi oppure essere congelati e

trasferiti successivamente (17).

La PGD condivide la stessa motivazione diagnostica della diagnosi prenatale tradizionale (PND), con il vantaggio di anticipare i tempi della diagnosi evitando così il ricorso all'aborto terapeutico. Tuttavia, è necessario sottolineare che la PGD è complementare ma non sostituiva della PND (18).

Il principale limite tecnico dei protocolli di PGD è la scarsa quantità del campione iniziale. Infatti, a seguito della prima fase analitica che prevede la lisi cellulare, è necessario procedere con l'indagine molecolare e tutti i passaggi avvengono rigorosamente in unico tubo di reazione. È tuttavia possibile superare tale limite, facendo seguire alla lisi cellulare l'amplificazione dell'intero genoma (WGA) in modo da ottenere una quantità di DNA genomico sufficiente per una o più indagini molecolari (19, 20).

La seconda fase è la diagnosi molecolare che, seguendo le linee guida ESHRE, può essere effettuata tramite "multiplex polymerase chain reaction" (PCR) e analisi in elettroforesi capillare. In dettaglio, il protocollo diagnostico prevede l'identificazione diretta della mutazione causativa della malattia e l'analisi di almeno due marcatori polimorfici informativi [i più utilizzati sono i "short tandem repeats" (STR), microsatelliti caratterizzati da brevi ripetizioni nucleotidiche in tandem] oppure l'analisi di almeno 3 marcatori polimorfici nel caso in cui la mutazione causativa non sia nota (21).

Tale approccio rende possibile eseguire la diagnosi molecolare e testare simultaneamente la contaminazione del DNA, le relazioni di parentela e la presenza di artefatti tecnici (ad es., amplificazione preferenziale e/o mancata amplificazione di un allele) (7, 21-24). L'identificazione e la caratterizzazione di marcatori polimorfici in tutto il genoma hanno permesso di affermare l'utilizzo della multiplex PCR seguita da

INDAGINE	<p>PGD Diagnosi genetica di difetti ereditari</p>	<p>PGS Screening genetico di aneuploidie cromosomiche</p>
INDICAZIONI	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Portatori di traslocazioni cromosomiche ✓ Portatori di malattie monogeniche: <ul style="list-style-type: none"> ➢ autosomiche dominanti ➢ autosomiche recessive ➢ X-linked ✓ Tipizzazione HLA 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Età materna avanzata ✓ Poliabortività ✓ Ripetuti tentativi di IVF falliti ✓ Fattore maschile severo
TECNICHE	<ul style="list-style-type: none"> • Multiplex PCR • Karyomapping 	<ul style="list-style-type: none"> • Array-CGH • qPCR • NGS

Figura 1

Indicazioni e tecniche della diagnosi preimpianto.

PGD, diagnosi genetica preimpianto; PGS, screening genetico preimpianto; IVF, fecondazione in vitro; PCR, "polymerase chain reaction"; Array-CGH, "comparative genomic hybridization array"; qPCR, "quantitative real-time PCR"; NGS, "next generation sequencing".

elettroforesi capillare per l'analisi su singola cellula indipendentemente dalla patologia genetica presente nella famiglia. Selezionando i marcatori polimorfici vicini al gene in cui è localizzata la mutazione e stabilendo nei genitori e nel caso indice (in genere uno dei loro figli o un consanguineo di primo grado), mediante analisi di "linkage", quale variante è presente sull'allele portatore della mutazione, ciascun marcatore fornisce una verifica indipendente della mutazione nel campione (21). Gli artefatti tecnici e la contaminazione del campione sono un limite esistente, ma grazie a risultati contraddittori ottenuti dall'interpretazione del pannello di STR, è possibile riconoscere l'artefatto e quindi evitare il trasferimento di un embrione potenzialmente affetto (21).

STR sono marcatori polimorfici particolarmente informativi poiché, grazie alla loro elevata eterogeneità, possono potenzialmente avere un diverso numero di ripetizioni su ciascun allele dei genitori. Pertanto, l'uso di STR strettamente legati al gene in cui è localizzata la mutazione, in combinazione con l'identificazione diretta della mutazione, si è affermato come il "gold standard" per la PGD di malattie monogeniche (25).

Tale strategia diagnostica prevede un lavoro di personalizzazione del protocollo da utilizzare sia per l'indagine diretta della mutazione da indagare, sia per selezionare STR informativi nei genitori e nel caso indice. Ne consegue che la PGD è una procedura laboriosa e costosa, che richiede molto tempo nella fase preliminare di studio della famiglia, determinando lunghe liste d'attesa per le coppie che intendono affrontare tale percorso diagnostico. Inoltre, alcune mutazioni (ad es., piccole delezioni, duplicazioni o riarrangiamenti cromosomici complessi) non possono essere rilevate e, quindi, diagnosticate utilizzando le attuali strategie analitiche. Per questo motivo, sono stati introdotti nuovi approcci di screening in grado di analizzare marcatori genici presenti in tutto il genoma ("genome-wide") e, dunque, superare queste limitazioni. L'utilizzo della WGA ha reso possibile l'applicazione dei metodi di analisi "genome-wide" anche su campioni costituiti da singole o poche cellule (26, 27).

Un esempio è il protocollo del "karyomapping", un metodo che prevede l'uso dell'Infinium HumanKaryomap-12 DNA Analysis kit (Illumina) e che è basato su polimorfismi a singolo nucleotide (SNP)-array in grado di determinare il genotipo di un individuo mediante l'analisi di migliaia di SNP distribuiti in tutto il genoma. Ogni SNP è biallelico per cui presenta uno dei due possibili nucleotidi su ciascun cromosoma (A o B). Individualmente, quindi, sono meno informativi dei STR, che invece hanno un'elevata eterogeneità allelica. Tuttavia, un set di quattro marcatori SNP è sufficiente per la determinazione del genotipo dei genitori e del caso indice (28).

Il "karyomapping" si basa sull'analisi di "linkage": attraverso il confronto tra gli SNP associati alla mutazione causativa della malattia da investigare, presenti sul caso indice e quindi sui cromosomi dei genitori, con quelli presenti nelle cellule dell'embrione, è possibile identificare la presenza o l'assenza dell'allele

portatore della mutazione.

Uno studio retrospettivo ha dimostrato un'alta concordanza dei risultati ottenuti analizzando gli stessi campioni mediante una piattaforma array in grado di analizzare contemporaneamente ben 300.000 SNP e il tradizionale approccio basato su multiplex PCR seguita da elettroforesi capillare (29). Il "karyomapping" è stato inoltre applicato in parallelo all'analisi convenzionale (30-32).

Il "karyomapping" segna il passaggio da un approccio diagnostico personalizzato per famiglia e/o malattia a un approccio "genome-wide" applicabile in linea di principio a qualsiasi alterazione monogenica in cui sono presenti SNP informativi. Inoltre, il "karyomapping" supera il problema della mancata amplificazione di un allele, in caso di una singola cellula, distinguendo SNP "chiave" nel campione dell'embrione da SNP "non-chiave". Questo non elimina completamente gli errori di genotipizzazione, ma li riduce significativamente e, nella maggior parte dei casi, si traduce in un insieme di marcatori SNP chiave con risultati coerenti.

Il vantaggio principale del "karyomapping" è la significativa riduzione di tempo e sforzi necessari per preparare un ciclo PGD, in quanto preliminarmente comporta soltanto la genotipizzazione dei genitori e del caso indice per confermare una sufficiente copertura di SNP informativi nel locus dell'alterazione monogenica presente nella famiglia. Inoltre, la densità degli SNP permette di avere una risoluzione più elevata in caso di incroci tra cromosomi vicini al gene in cui è localizzata la mutazione, migliorando così l'efficienza della diagnosi anche rispetto all'uso dei STR. Infine, è possibile utilizzare il "karyomapping" in famiglie con combinazioni di più alterazioni monogeniche o che richiedono compatibilità HLA, indagini davvero impegnative da effettuare con i metodi convenzionali.

Uno dei limiti del "karyomapping" è che, oltre al DNA dei genitori, è richiesto il DNA del caso indice o di altri membri della famiglia, che spesso non sono disponibili o accessibili. Inoltre, il "karyomapping" perde di efficacia quando non è possibile stabilire quale allele dei genitori è legato all'alterazione genetica; questa possibilità si verifica sia nel caso di insorgenza di mutazioni *de novo* (ossia non presenti in membri della famiglia precedentemente affetti) sia nelle coppie consanguinee, in quanto il numero dei SNP informativi si riduce notevolmente: in questi casi, quindi, è essenziale condurre l'indagine attraverso l'analisi diretta.

La possibilità di identificare trisomie meiotiche, monosomie, nullisomie e delezioni parziali attraverso la presenza o l'assenza di entrambi i gruppi di SNP chiave in uno o entrambi i genitori, è un'altra caratteristica unica del "karyomapping". Basandosi su questo principio, potrebbero essere identificate eventuali aneuploidie: questa possibilità, in fase di validazione clinica, è importante nel contesto della PGD, dal momento che il successo in termini di efficienza delle tecniche di fecondazione *in vitro* dipende anche dall'assetto cromosomico dell'embrione (33, 34).

Alcuni sostengono che l'analisi dell'intero genoma potrebbe essere controproducente in questo ambito, perché si potrebbe non essere in grado di correlare le informazioni ottenute a una patologia specifica. Per questo motivo, è bene sottolineare che il "karyomapping", pur essendo uno SNP-array, permette di identificare nell'embrione la presenza o l'assenza del genotipo precedentemente caratterizzato nei genitori e nel caso indice (patologie autosomiche dominanti, recessive o "X-linked", riarrangiamenti cromosomici o disturbi mitocondriali).

ESHRE ha registrato il numero di cicli di PGD eseguiti in Europa e altrove nel corso degli ultimi 10 anni: nel 2010, l'anno per cui sono disponibili i dati statistici più recenti, sono stati effettuati 2753 cicli di PGD, di cui 1071 per anomalie cromosomiche, 108 per disordini "X-linked" e 1574 per patologie mendeliane (35).

PGS

La tecnica PGS consente di evidenziare la presenza di alterazioni cromosomiche nell'embrione prima del trasferimento in utero (36). La tecnica PGS è indicata principalmente per le coppie con età materna avanzata, fallimento ricorrente dell'impianto, aborti ricorrenti o infertilità maschile grave (Figura 1). Gli errori meiotici durante la maturazione degli ovociti sembrano essere una delle principali cause del basso tasso di successo (~30%) delle tecniche di fecondazione *in vitro*. Inoltre, negli ultimi 4 decenni, soprattutto nei paesi industrializzati, l'età delle donne alla prima gravidanza ha mostrato un costante aumento e, considerando che l'incidenza delle aneuploidie nell'embrione aumenta con l'età materna, tale problema sta acquisendo dimensioni notevoli. Studi randomizzati (37-39) e metanalisi (40) hanno dimostrato che la tecnica PGS mira ad aumentare i tassi di gravidanza per ogni embrione trasferito e i tassi di natalità che seguono la fecondazione *in vitro*, rendendo tale diagnosi un ulteriore criterio di scelta degli embrioni idonei all'ottenimento di una gravidanza (7).

Nonostante i notevoli progressi compiuti, un numero elevato di embrioni euploidi non evolve in una gravidanza a termine. La spiegazione può essere di origine embrionale, endometriale o attribuita a fattori epigenetici, ma anche ad alterazioni subcromosomiche, aneuploidie parziali o eventi di mosaicismi embrionale (41). Allo stesso tempo, recenti pubblicazioni hanno dimostrato che embrioni in cui era stato riscontrato uno stato di mosaicismi, una volta trasferiti, hanno generato feti con un cariotipo normale (confermato successivamente mediante villocentesi) e gravidanze a termine (42). Di conseguenza, oggetto di dibattito attuale sono la quantizzazione di tali alterazioni genetiche, la scelta di un cut-off per gli stati di mosaicismi e la modalità di discussione di questi risultati con i pazienti. A tal proposito, diventa fondamentale la scelta della metodica più appropriata per la tecnica PGS, sottolineando la risoluzione e i limiti associate alle diverse piattaforme.

La possibilità di identificare aneuploidie in singoli

fibroblasti, globuli bianchi e blastomeri umani mediante ibridazione genomica comparativa (CGH) su singola cellula ha mostrato la sua validità prima utilizzando "array" con cromosomi batterici artificiali (BAC-array) e, successivamente, anche "chip" contenenti sonde specifiche per polimorfismi a singolo nucleotide (SNP-array). Queste tecniche sono rapidamente diventate una pratica standard per il rilevamento di aneuploidie. Tra le tecniche utilizzate per evidenziare le alterazioni del numero di copie dei cromosomi si sono annoverate: a) la "fluorescent in situ hybridization" (FISH) eseguibile su cromosomi in metafase o nuclei in interfase per l'analisi di specifiche regioni "target" (ad es., cromosomi 13, 18, 21, X, Y); b) le tecniche di "array" eseguibili su singole cellule in seguito a WGA, con una risoluzione migliorata negli ultimi 10 anni grazie all'analisi di tutti i cromosomi e all'individuazione di alterazioni più piccole; c) il sequenziamento a elevata processività che a differenza degli "array" migliora la diagnosi in termini di tempo e di costo (43, 44).

Ogni metodo è caratterizzato da particolari vantaggi e svantaggi e la scelta dipende anche dalla domanda, dal carico di lavoro e dal costo. Attualmente, le tecniche più utilizzate sono il CGH-array (a-CGH) mediante BAC, la "quantitative real-time PCR" (qPCR) e la "next generation sequencing" (NGS) (Figura 2).

"Microarray"

I "microarray" utilizzati per PGS sono basati o sull'analisi di polimorfismi di un singolo nucleotide (SNP-array) o sull'ibridazione genomica comparativa (a-CGH) (45-48). a-CGH permette di identificare solo varianti del numero di copie ("copy numbers variations", CNV), mentre gli SNP-array consentono sia di evidenziare le aneuploidie che di effettuare la genotipizzazione. Per

	qPCR	aCGH	NGS
"Whole genome amplification"	NA	X	X
24 cromosomi	X	X	X
Delezioni/duplicazioni parziali	NA	X	X
Traslocazioni non bilanciate	NA	X	X*
Mosaicismi	NA	X	X
Cromosomi + geni	NA	NA	X
Validazione ISO, CAP, NEQAS	NA	X	X
Tempo di analisi	4 ore	12 ore	12 ore

*rilevabili alterazioni >6 MB

Figura 2

Confronto tra le tecniche utilizzate per lo screening genetico preimpianto di aneuploidie cromosomiche.

qPCR, "quantitative real-time PCR"; aCGH, "comparative genomic hybridization array"; NGS, "next generation sequencing"; NA, non applicabile; ISO, "International Organization of Standardization"; CAP, "College of American Pathologists"; NEQAS, "National External Quality Assessment Schemes".

entrambe le piattaforme di "microarray", le cellule devono essere lisate e sottoposte a WGA. Come con qualsiasi esame genetico, la qualità del risultato diagnostico inizia con la qualità del campione di DNA amplificato (49).

Il principio su cui si basa la tecnica a-CGH è la comparazione quantitativa del DNA proveniente dalle cellule dell'embrione con il DNA genomico di riferimento proveniente da un soggetto sano 46, XY e/o 46, XX ("DNA reference"). Grazie all'utilizzo di molecole fluorescenti, i campioni di DNA sono marcati in maniera differenziale e, successivamente, incubati (fase di ibridazione) su un "microarray", costituito da un supporto di vetro la cui superficie è coperta di frammenti di DNA (sonde o cloni), che rappresentano una specifica regione del genoma umano, con l'intento di coprire l'intero assetto cromosomico umano. Sia il DNA in esame che quello di riferimento si legano alle sonde presenti sull'"array", generando però due distinti segnali fluorescenti le cui intensità sono misurate mediante uno scanner. Un apposito "software", rielaborando le intensità di fluorescenza emesse dai due DNA, evidenzia le eventuali variazioni del numero di copie del DNA campione rispetto al riferimento (50).

La piattaforma "array" più utilizzata per PGS è basata sull'utilizzo di BAC, ossia "microarray" costituiti da migliaia di spot, ciascuno dei quali comprende frammenti di DNA che coprono regioni del cromosoma tipicamente dell'ordine di 150-200 kb. La maggior parte di questi BAC-array contiene meno cloni rispetto agli SNP-array, più che sufficienti tuttavia per evidenziare delezioni o duplicazioni che interessano interi cromosomi (47, 50), che è l'obiettivo principale della PGS. La dimensione delle sonde è grande al punto che ogni "spot" di un "array" lega molti frammenti di DNA; questo riduce l'influenza di artefatti tecnici come l'amplificazione preferenziale di un allele (PA) o la mancata amplificazione di un allele ("amplification drop out", ADO).

La maggior parte delle tecniche di WGA è compatibile con questo tipo di piattaforma. Tuttavia, la WGA può provocare alterazioni nel rapporto di fluorescenza di campioni e riferimento. Per questo motivo è importante che il risultato finale sia estrapolato dalla fluorescenza media ottenuta dai dati provenienti da diverse sonde adiacenti; la necessità di combinare i risultati limita la risoluzione dei BAC-array e tende ad aumentare il numero di sonde necessarie per ottenere un risultato accurato per ciascun cromosoma (47, 51). Tanto più è elevato il numero di cloni tanto maggiore è l'efficacia dell'"array" nell'identificazione delle variazioni del numero di copie corrispondenti anche a piccole porzioni di ciascun cromosoma. Quindi, il potere risolutivo della piattaforma utilizzata può variare in funzione della densità e della tipologia delle sonde utilizzate; attualmente per scopi diagnostici vengono impiegati "array" tra 1 Mb e 100 kb (52).

Il BAC-array è in grado di identificare le aneuploidie che interessano l'intero cromosoma e non è progettato o validato per individuare aberrazioni cromosomiche strutturali. Inoltre, non può distinguere un corredo

cromosomico 46, XX da 69, XXX o 46, XY da 69, XXY, tantomeno può identificare una disomia uniparentale (50). Infine, gli a-CGH prevedono un lasso di tempo più breve (12-15 ore) rispetto agli SNP-array (30-40 ore) per completare l'analisi (53).

qPCR

La qPCR nasce con l'intento di velocizzare la diagnosi ed evitare lo step della WGA. Infatti, alla lisi alcalina delle cellule, segue una multiplex-PCR di 96 loci (4 per ciascun cromosoma) e una successiva "real-time PCR". Il principio della metodica si basa sull'utilizzo di sonde oligonucleotidiche marcate con molecole fluorescenti e legate a specifiche sequenze di DNA bersaglio e molecole fluorescenti che si intercalano in modo aspecifico tra le basi del DNA durante la reazione di PCR. L'analisi dei dati segue un approccio di quantizzazione relativa secondo il metodo del "delta-delta threshold cycle" (CT) ($\Delta\Delta CT$), che determina la concentrazione relativa del "target" nel campione da analizzare rispetto a un campione di controllo (54). In particolare, si normalizza il campione, cioè si escludono variazioni dovute al caricamento di quantità diverse tra un campione e l'altro, e poi si confrontano i CT dei campioni da analizzare rispetto al controllo (euploide) e infine si calcolano le differenze.

Questa metodica, validata con studi preclinici e clinici, è stata progettata per identificare aneuploidie dell'intero cromosoma e non aneuploidie parziali (14, 55, 56). Rispetto ad altri metodi, come a-CGH e SNP-array, la principale differenza, oltre al fatto che non prevede la WGA, è che l'analisi dei dati ottenuti si basa su specifici cut-off, che sono stati precedentemente stabiliti dall'analisi di dati ottenuti da embrioni aneuploidi: in questo modo sono ridotti i falsi positivi (56).

La principale difficoltà della qPCR è quella di costruire un set di "primer" per amplificare con successo i marcatori molecolari in un singolo esperimento. Un recente studio randomizzato ha dimostrato che la qPCR, seguita dal trasferimento di un singolo embrione (SET), migliora il processo di selezione embrionale individuando un embrione euploide con alto potenziale di impianto. In linea con il principio del PGS, non sono quindi compromessi i tempi rispetto al trasferimento di due embrioni non selezionati, il che può generare gravidanze multiple e complicazioni associate a esse, come il parto prematuro, il basso peso alla nascita e il ricorso alla terapia intensiva neonatale (57).

NGS

Il sequenziamento genomico di tipo NGS comprende differenti chimiche di sequenziamento accumulate dalla capacità di sequenziare in parallelo numerose ed eterogenee regioni genomiche di interesse o "target" (58). In soli 10 anni questa metodica ha mostrato una crescita esponenziale in termini di produttività (numero di basi sequenziate per singola seduta analitica) e una corrispondente, e altrettanto esponenziale, riduzione dei

costi del sequenziamento per singola base (58, 59). Entrambi questi fattori hanno rappresentato un volano per la diffusione delle tecniche di NGS anche nella diagnostica molecolare quotidiana (60-62). In questo contesto, si inserisce la possibilità di utilizzare le tecniche di NGS per PGS (63). La metodica di NGS attualmente utilizzata per PGS prevede l'amplificazione del genoma da singola cellula mediante WGA, la preparazione di una libreria di DNA, a partire direttamente dal DNA amplificato, e il successivo sequenziamento in parallelo di un pool di librerie, ciascuna identificata da una specifica sequenza "barcode". Infine, un "software" di analisi che compara le sequenze ottenute in ciascun campione rispetto al "human hap-map reference genome" permette di identificare l'eventuale presenza di aneuploidie cromosomiche (63). I dati presenti in letteratura confermano che NGS può essere applicata con successo alla diagnosi di una varietà di anomalie genetiche, anche in singole cellule isolate da embrioni umani in seguito a WGA, e presenta numerosi vantaggi rispetto alle tecnologie tradizionalmente utilizzate per la PGD (63-66). In particolare, i vantaggi che NGS può offrire nella valutazione del numero di copie cromosomiche rispetto agli a-CGH includono: a) i ridotti costi del sequenziamento, come conseguenza dell'aumento di produttività delle piattaforme di NGS, che si riflette nella possibilità di analizzare un numero crescente di campioni contemporaneamente in ciascuna seduta analitica; b) la riduzione delle fasi operatore-dipendenti e, quindi, delle possibilità di errore umano, grazie all'automazione dei protocolli di preparazione delle librerie di DNA; c) la possibilità di aumentare la sensibilità diagnostica, grazie al progressivo aumento della risoluzione, ma anche alla possibilità di rilevare mosaicismi (67-71).

Numerosi studi basati sull'analisi comparativa degli stessi campioni mediante NGS e a-CGH hanno dimostrato l'affidabilità del NGS per le analisi delle aneuploidie e acceso l'entusiasmo verso la loro applicazione nella pratica clinica della PGD, soprattutto in caso di biopsia da blastocisti (64, 69, 70, 72, 73). Infatti, la diagnosi su cellule di trofoblasto ha diversi vantaggi, tra cui l'integrità dell'"inner cell mass" che genererà il feto, e risultati sicuramente più robusti. Inoltre, eventi di mosaicismo, abbastanza comuni durante lo sviluppo embrionale (74), possono essere evidenziati con maggiore affidabilità con NGS rispetto all'a-CGH, dove eventuali alterazioni potrebbero essere interpretate come artefatti di WGA (75). Grazie a una risoluzione di 14 Mb, NGS risulta inoltre in grado di rilevare alterazioni parziali (69). Infine, l'approccio NGS rappresenta oggi l'unica possibilità che consente l'analisi simultanea di malattie monogeniche, traslocazioni e screening completo di aneuploidie dalla stessa biopsia, senza la necessità di molteplici piattaforme tecnologiche (67, 68). L'ulteriore validazione della metodica su casistiche più ampie permetterà di confermare l'impiego del NGS per la PGD nella pratica clinica.

CONCLUSIONI

L'avanzamento tecnico e i crescenti tassi di successo renderanno la PGD una pratica routinaria. L'impatto sarà quello di una ridotta frequenza di rare e gravi malattie genetiche ereditarie e potrebbe, ad esempio, condurre a una selezione negativa delle varianti genetiche più comuni a esordio tardivo o dei disturbi recessivi (ad es., fibrosi cistica). In futuro, le nuove tecnologie diagnostiche non solo forniranno gli strumenti per dare ai futuri genitori la possibilità di effettuare una scelta informata, ma potranno anche portare verso la medicina fetale personalizzata. Gli esami genetici preimpianto presentano numerosi vantaggi, ma anche importanti sfide tecniche; inoltre, l'accettazione e l'integrazione di questa possibilità diagnostica apre la strada a dibattiti etico-sociali. Al momento in Italia, nonostante il riconoscimento della procreazione medicalmente assistita nei Livelli Essenziali di Assistenza del 2017, la PGD non viene riconosciuta, per cui risulta a carico delle coppie, da eseguire in strutture private o pubbliche che abbiano un laboratorio di genetica dedicato o in possesso di una convenzione con un laboratorio esterno.

RINGRAZIAMENTI

Il progetto dal titolo "Sviluppo di una piattaforma per la diagnosi preimpianto di malattie genetiche e screening cromosomici" è stato finanziato da SIBioC (08/14). Il progetto "Karyomapping for preimplantation genetic diagnosis" è stato finanziato dal Consorzio Interuniversitario Biotecnologie (11/15).

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Genomes Project C, Auton A, Brooks LD, et al. A global reference for human genetic variation. *Nature* 2015;526:68-74.
2. Hussein N, Weng SF, Kai J, et al. Preconception risk assessment for thalassaemia, sickle cell disease, cystic fibrosis and Tay-Sachs disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2015;CD010849.
3. Branch DW, Gibson M, Silver RM. Clinical practice. Recurrent miscarriage. *N Engl J Med* 2010;363:1740-7.
4. Vance A, Zouves C. The importance of family history risk assessment in the infertility setting. *Fertil Steril* 2005;84:S125.
5. American College of and Gynecologists Committee on Gynecologic. ACOG Committee Opinion No. 452: Primary and preventive care: periodic assessments. *Obstet Gynecol* 2009;114:1444-51.
6. Chen M, Wei S, Hu J, et al. Can comprehensive chromosome screening technology improve IVF/ICSI outcomes? A meta-analysis. *PLoS One* 2015;10:e0140779.
7. Brezina PR, Kutteh WH. Clinical applications of preimplantation genetic testing. *Br Med J* 2015;350:g7611.

8. Capalbo A, Bono S, Spizzichino L, et al. Sequential comprehensive chromosome analysis on polar bodies, blastomeres and trophoblast: insights into female meiotic errors and chromosomal segregation in the preimplantation window of embryo development. *Hum Reprod* 2013;28:509-18.
9. Simpson JL. Preimplantation genetic diagnosis at 20 years. *Prenat Diagn* 2010;30:682-95.
10. Moutou C, Goossens V, Coonen E, et al. ESHRE PGD consortium data collection XII: cycles from January to December 2009 with pregnancy follow-up to October 2010. *Hum Reprod* 2014;29:880-903.
11. Los FJ, Van Opstal D, van den Berg C. The development of cytogenetically normal, abnormal and mosaic embryos: a theoretical model. *Hum Reprod Update* 2004;10:79-94.
12. Munne S, Escudero T, Fischer J, et al. Negligible interchromosomal effect in embryos of Robertsonian translocation carriers. *Reprod Biomed Online* 2005;10:363-9.
13. Johnson DS, Cinnioglu C, Ross R, et al. Comprehensive analysis of karyotypic mosaicism between trophectoderm and inner cell mass. *Mol Hum Reprod* 2010;16:944-9.
14. Scott RT, Jr., Upham KM, Forman EJ, et al. Cleavage-stage biopsy significantly impairs human embryonic implantation potential while blastocyst biopsy does not: a randomized and paired clinical trial. *Fertil Steril* 2013;100:624-30.
15. Van der Aa N, Zamani Esteki M, Vermeesch JR, et al. Preimplantation genetic diagnosis guided by single-cell genomics. *Genome Med* 2013;5:71.
16. Coates A, Kung A, Mounts E, et al. Optimal euploid embryo transfer strategy, fresh versus frozen, after preimplantation genetic screening with next generation sequencing: a randomized controlled trial. *Fertil Steril* 2017;107:723-30.e3.
17. Goossens V, Harton G, Moutou C, et al. ESHRE PGD consortium data collection IX: cycles from January to December 2006 with pregnancy follow-up to October 2007. *Hum Reprod* 2009;24:1786-810.
18. Harton G, Braude P, Lashwood A, et al. ESHRE PGD consortium best practice guidelines for organization of a PGD centre for PGD/preimplantation genetic screening. *Hum Reprod* 2011;26:14-24.
19. Vanneste E, Melotte C, Voet T, et al. PGD for a complex chromosomal rearrangement by array comparative genomic hybridization. *Hum Reprod* 2011;26:941-9.
20. D'Argenio V, Tomaiuolo R, Cariati F. La "whole genome amplification" su singola cellula. *Biochim Clin* 2016;40:293-301.
21. Harton GL, De Rycke M, Fiorentino F, et al. ESHRE PGD consortium best practice guidelines for amplification-based PGD. *Hum Reprod* 2011;26:33-40.
22. Renwick PJ, Trussler J, Ostad-Saffari E, et al. Proof of principle and first cases using preimplantation genetic haplotyping—a paradigm shift for embryo diagnosis. *Reprod Biomed Online* 2006;13:110-9.
23. Huang L, Ma F, Chapman A, et al. Single-cell whole-genome amplification and sequencing: methodology and applications. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2015;16:79-102.
24. Salvatore F, Cariati F, Tomaiuolo R. Facts, challenges, difficulties and hopes in single-cell biology: physiopathological studies. *Single Cell Biology* 2015;4:121.
25. Fiorentino F, Biricik A, Nuccitelli A, et al. Strategies and clinical outcome of 250 cycles of preimplantation genetic diagnosis for single gene disorders. *Hum Reprod* 2006;21:670-84.
26. Handyside AH, Robinson MD, Simpson RJ, et al. Isothermal whole genome amplification from single and small numbers of cells: a new era for preimplantation genetic diagnosis of inherited disease. *Mol Hum Reprod* 2004;10:767-72.
27. Hellani A, Coskun S, Benkhalifa M, et al. Multiple displacement amplification on single cell and possible PGD applications. *Mol Hum Reprod* 2004;10:847-52.
28. Handyside AH, Harton GL, Mariani B, et al. Karyomapping: a universal method for genome wide analysis of genetic disease based on mapping crossovers between parental haplotypes. *J Med Genet* 2010;47:651-8.
29. Natesan SA, Bladon AJ, Coskun S, et al. Genome-wide karyomapping accurately identifies the inheritance of single-gene defects in human preimplantation embryos in vitro. *Genet Med* 2014;16:838-45.
30. Natesan SA, Handyside AH, Thornhill AR, et al. Live birth after PGD with confirmation by a comprehensive approach (karyomapping) for simultaneous detection of monogenic and chromosomal disorders. *Reprod Biomed Online* 2014;29:600-5.
31. Thornhill AR, Handyside AH, Ottolini C, et al. Karyomapping—a comprehensive means of simultaneous monogenic and cytogenetic PGD: comparison with standard approaches in real time for Marfan syndrome. *J Assist Reprod Genet* 2015;32:347-56.
32. Konstantinidis M, Prates R, Goodall NN, et al. Live births following karyomapping of human blastocysts: experience from clinical application of the method. *Reprod Biomed Online* 2015;31:394-403.
33. Rabinowitz M, Ryan A, Gemelos G, et al. Origins and rates of aneuploidy in human blastomeres. *Fertil Steril* 2012;97:395-401.
34. Zamani Esteki M, Dimitriadou E, Mateiu L, et al. Concurrent whole-genome haplotyping and copy-number profiling of single cells. *Am J Hum Genet* 2015;96:894-912.
35. Harper JC, Coonen E, De Rycke M, et al. ESHRE PGD consortium data collection X: cycles from January to December 2007 with pregnancy follow-up to October 2008. *Hum Reprod* 2010;25:2685-707.
36. Brezina PR, Kearns WG. The evolving role of genetics in reproductive medicine. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2014;41:41-55.
37. Scott RT Jr., Upham KM, Forman EJ, et al. Blastocyst biopsy with comprehensive chromosome screening and fresh embryo transfer significantly increases in vitro fertilization implantation and delivery rates: a randomized controlled trial. *Fertil Steril* 2013;100:697-703.
38. Forman EJ, Hong KH, Ferry KM, et al. In vitro fertilization with single euploid blastocyst transfer: a randomized controlled trial. *Fertil Steril* 2013;100:100-7.e1.
39. Yang Z, Liu J, Collins GS, et al. Selection of single blastocysts for fresh transfer via standard morphology assessment alone and with array CGH for good prognosis IVF patients: results from a randomized pilot study. *Mol Cytogenet* 2012;5:24.
40. Dahdouh EM, Balayla J, Garcia-Velasco JA. Comprehensive chromosome screening improves embryo selection: a meta-analysis. *Fertil Steril* 2015;104:1503-12.
41. Treff NR, Franasiak JM. Detection of segmental aneuploidy and mosaicism in the human preimplantation embryo: technical considerations and limitations. *Fertil Steril* 2017;107:27-31.
42. Greco E, Minasi MG, Fiorentino F. Healthy babies after intrauterine transfer of mosaic aneuploid blastocysts. *N Engl J Med* 2015;373:2089-90.
43. Jobanputra V, Sobrino A, Kinney A, et al. Multiplex interphase FISH as a screen for common aneuploidies in spontaneous abortions. *Hum Reprod* 2002;17:1166-70.

44. Wong KM, Repping S, Mastenbroek S. Limitations of embryo selection methods. *Semin Reprod Med* 2014;32:127-33.
45. Northrop LE, Treff NR, Levy B, et al. SNP microarray-based 24 chromosome aneuploidy screening demonstrates that cleavage-stage FISH poorly predicts aneuploidy in embryos that develop to morphologically normal blastocysts. *Mol Hum Reprod* 2010;16:590-600.
46. Fiegler H, Geigl JB, Langer S, et al. High resolution array-CGH analysis of single cells. *Nucleic Acids Res* 2007;35:e15.
47. Wells D, Alfarawati S, Fragouli E. Use of comprehensive chromosomal screening for embryo assessment: microarrays and CGH. *Mol Hum Reprod* 2008;14:703-10.
48. Li G, He N, Jin H, et al. The influence of single nucleotide polymorphism microarray-based molecular karyotype on preimplantation embryonic development potential. *PLoS One* 2015;10:e0138234.
49. Normand E, Qdaisat S, Bi W, et al. Comparison of three whole genome amplification methods for detection of genomic aberrations in single cells. *Prenat Diagn* 2016;36:823-30.
50. Munne S. Preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy and translocations using array comparative genomic hybridization. *Curr Genomics* 2012;13:463-70.
51. Gutierrez-Mateo C, Colls P, Sanchez-Garcia J, et al. Validation of microarray comparative genomic hybridization for comprehensive chromosome analysis of embryos. *Fertil Steril* 2011;95:953-8.
52. Scriven PN. The scope, limitations and interpretation of copy number detection in the early embryo using the array CGH technique. *Hum Reprod* 2013;28:2-5.
53. Brezina PR, Anchan R, Kearns WG. Preimplantation genetic testing for aneuploidy: what technology should you use and what are the differences? *J Assist Reprod Genet* 2016;33:823-32.
54. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 2008;3:1101-8.
55. Treff NR, Tao X, Ferry KM, et al. Development and validation of an accurate quantitative real-time polymerase chain reaction-based assay for human blastocyst comprehensive chromosomal aneuploidy screening. *Fertil Steril* 2012;97:819-24.
56. Capalbo A, Treff NR, Cimadomo D, et al. Comparison of array comparative genomic hybridization and quantitative real-time PCR-based aneuploidy screening of blastocyst biopsies. *Eur J Hum Genet* 2015;23:901-6.
57. Forman EJ, Hong KH, Franasiak JM, et al. Obstetrical and neonatal outcomes from the BEST trial: single embryo transfer with aneuploidy screening improves outcomes after in vitro fertilization without compromising delivery rates. *Am J Obstet Gynecol* 2014;210:157.e1-6.
58. Reuter JA, Spacek DV, Snyder MP. High-throughput sequencing technologies. *Mol Cell* 2015;58:586-97.
59. van Dijk EL, Auger H, Jaszczyszyn Y, et al. Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends Genet* 2014;30:418-26.
60. Precone V, Del Monaco V, Esposito MV, et al. Cracking the code of human diseases using next-generation sequencing: applications, challenges, and perspectives. *Biomed Res Int* 2015;2015:161648.
61. D'Argenio V, Frisso G, Precone V, et al. DNA sequence capture and next-generation sequencing for the molecular diagnosis of genetic cardiomyopathies. *J Mol Diagn* 2014;16:32-44.
62. D'Argenio V, Esposito MV, Telese A, et al. The molecular analysis of BRCA1 and BRCA2: next-generation sequencing supersedes conventional approaches. *Clin Chim Acta* 2015;446:221-5.
63. Wells D. Next-generation sequencing: the dawn of a new era for preimplantation genetic diagnostics. *Fertil Steril* 2014;101:1250-1.
64. Handyside AH. 24-chromosome copy number analysis: a comparison of available technologies. *Fertil Steril* 2013;100:595-602.
65. Martin J, Cervero A, Mir P, et al. The impact of next-generation sequencing technology on preimplantation genetic diagnosis and screening. *Fertil Steril* 2013;99:1054-61.e3.
66. Rubio C. Next-generation sequencing: challenges in reproductive genetics. *Fertil Steril* 2014;101:1252-3.
67. Treff NR, Fedick A, Tao X, et al. Evaluation of targeted next-generation sequencing-based preimplantation genetic diagnosis of monogenic disease. *Fertil Steril* 2013;99:1377-84.e6.
68. Yin X, Tan K, Vajta G, et al. Massively parallel sequencing for chromosomal abnormality testing in trophectoderm cells of human blastocysts. *Biol Reprod* 2013;88:69.
69. Fiorentino F, Biricik A, Bono S, et al. Development and validation of a next-generation sequencing-based protocol for 24-chromosome aneuploidy screening of embryos. *Fertil Steril* 2014;101:1375-82.
70. Fiorentino F, Bono S, Biricik A, et al. Application of next-generation sequencing technology for comprehensive aneuploidy screening of blastocysts in clinical preimplantation genetic screening cycles. *Hum Reprod* 2014;29:2802-13.
71. Vera-Rodriguez M, Michel CE, Mercader A, et al. Distribution patterns of segmental aneuploidies in human blastocysts identified by next-generation sequencing. *Fertil Steril* 2016;105:1047-55.
72. Bono S, Biricik A, Spizzichino L, et al. Validation of a semiconductor next-generation sequencing-based protocol for preimplantation genetic diagnosis of reciprocal translocations. *Prenat Diagn* 2015;35:938-44.
73. Aleksandrova N, Shubina E, Ekimov A, et al. Comparison of the results of preimplantation genetic screening obtained by a-CGH and NGS methods from the same embryos. *Gynecol Endocrinol* 2016;32:1-4.
74. van Echten-Arends J, Mastenbroek S, Sikkema-Raddatz B, et al. Chromosomal mosaicism in human preimplantation embryos: a systematic review. *Hum Reprod Update* 2011;17:620-7.
75. Marin D, Scott RT Jr., Treff NR. Preimplantation embryonic mosaicism: origin, consequences and the reliability of comprehensive chromosome screening. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2017;29:168-74.

Oncofertilità: dove siamo?

Roberta Vallone¹, Cira Buonfantino¹, Alessandro Conforti¹, Pasquale De Rosa¹, Federica Cariati^{2,3,4}, Silvia Picarelli¹, Francesco Caggiano¹, Emanuela Spadarella¹, Rossella Tomaiuolo^{2,3,4}, Carlo Alviggi¹, Giuseppe De Placido¹

¹Dipartimento di Neuroscience, Scienze Riproduttive e Odontostomatologiche e ²Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università di Napoli Federico II, Napoli

³CEINGE Biotecnologie Avanzate scarl, Napoli

⁴KronosDNA srl, spin-off dell'Università di Napoli Federico II, Napoli

ABSTRACT

An update about oncofertility. Over the last years we are experiencing an increased incidence of cancer in young population. Chemotherapy and radiotherapy often result in reduced fertility in these patients. With increasing survival rates, fertility is becoming an important quality-of-life concern for young cancer patients. They may be interested in parenthood, but the number of patients who access fertility preservation techniques before treatment is low. There is a need for improvements in clinical care to ensure patients about infertility risks and fertility preservation options and to support them in their reproductive decision-making before cancer treatment. Nowadays, many opportunities exist for fertility preservation. Sperm cryopreservation is a well-established method in male. In female, there are several strategies such as ovarian suppression with gonadotropin-releasing hormone analogues, ovarian tissue cryopreservation, *in vitro* maturation or *in vitro* fertilization after ovulation induction. Recently, developed ovarian stimulation protocols using tamoxifen and letrozole have been applied to increase the margin of safety in breast cancer patients. This review is focused on the effect of cancer treatments on fertility and on the assisted-reproduction innovations devoted to the cancer survivors.

INTRODUZIONE

Per molti pazienti in età riproduttiva affrontare una malattia oncologica con il conforto di poter diventare genitori, una volta concluso il percorso di cura, può fare la differenza: di questo avviso sono numerosi medici e psicologi e, naturalmente, tanti pazienti che si trovano ad affrontare una malattia oncologica prima dei 40 anni. L'attenzione alla fertilità va intesa, quindi, come uno dei bisogni essenziali del paziente oncologico a tutela della qualità della vita, poichè le strategie diagnosticoterapeutiche attuali esitano favorevolmente nell'aumento della sopravvivenza media.

L'esigenza di preservare la fertilità in questi pazienti nasce dalla correlazione fra danno alle cellule germinali e trattamenti antitumorali sistemici, radioterapia (particolarmente in sede pelvica o ipotalamo-ipofisaria) e/o trattamenti chirurgici, che comportano l'asportazione o un danno all'apparato riproduttivo maschile o femminile. Il percorso di preservazione della fertilità prevede un approccio multidisciplinare tra oncologi e specialisti in medicina della riproduzione: il "counselling" riproduttivo

deve essere proposto subito dopo la diagnosi e la stadiazione della malattia per definire le strategie di preservazione in relazione alla tempistica delle terapie oncologiche.

Questa rassegna propone una panoramica sulle cause iatrogene di infertilità e sugli attuali strumenti terapeutici di tutela della fertilità.

EPIDEMIOLOGIA DEI TUMORI NEI GIOVANI ADULTI

L'incidenza delle neoplasie in Italia è in aumento (1). I tumori rappresentano la seconda causa di morte (29% di tutti i decessi) dopo le malattie cardiovascolari (38%). Ogni giorno sono diagnosticati 30 nuovi casi di tumore tra i giovani al di sotto dei 40 anni. Le stime dell'Associazione Italiana dei Registri Tumori (AIURTUM) e Associazione Italiana di Oncologia Medica (AIOM) nel 2016 prevedono poco più di 366.000 nuovi casi di tumore maligno (~1000 al giorno), di cui ~190.000 (54%) negli uomini e ~175.000 (46%) nelle donne (1). In particolare, nei giovani uomini i

Corrispondenza a: Roberta Vallone, Dipartimento di Neuroscience, Scienze Riproduttive e Odontostomatologiche, Università di Napoli Federico II, Via Pansini 5, 80131 Napoli. Tel. 0817462699, Fax 0817463747, E-mail robyvallone@hotmail.it

Ricevuto: 07.04.2017

Revisionato: 12.05.2017

Accettato: 15.05.2017

Publicato on-line: 15.11.2017

DOI: 10.19186/BC_2017.044

tumori più frequenti, escludendo i tumori epiteliali della cute, sono quelli del testicolo (12% del totale), i melanomi (9%), il linfoma non-Hodgkin (8%), quelli localizzati al colon-retto (8%) e alla tiroide (7%); tra le giovani donne, al primo posto si trovano i tumori della mammella (41%), seguiti da quelli della tiroide (14%), dai melanomi (7%), dai tumori del colon-retto (5%) e della cervice uterina (4%). Il tumore della mammella rappresenta, anche in età giovanile, la neoplasia a più elevata incidenza, con una maggiore frequenza dopo i 30 anni. Per tale motivo è considerato il "big killer" nel sesso femminile. Negli uomini, il tumore del testicolo costituisce la neoplasia di maggior rilievo in questa fascia di età. I linfomi di Hodgkin, pur avendo un minor grado di letalità rispetto ai linfomi non-Hodgkin, assumono un rilievo particolare tra i giovani rispetto alle età successive. Anche per le leucemie emerge che è soprattutto il sesso maschile a esserne colpito.

I tassi di mortalità mostrano, invece, una diminuzione sistematica, riconducibile sia ai programmi di screening (ad es., quelli organizzati per il tumore della mammella, del colon-retto e della cervice uterina) sia ai progressi terapeutici della terapia oncologica (ad es., la recente introduzione di farmaci a bersaglio molecolare) (1). Anche la sopravvivenza a 5 anni è aumentata notevolmente rispetto a quella dei casi diagnosticati nei quinquenni precedenti sia per gli uomini (57% nel 2004-2007 vs. 39% nel 1990-1992) che per le donne (rispettivamente 63% vs. 53%). Su questo risultato positivo complessivo ha influito il miglioramento della sopravvivenza per alcune delle sedi tumorali più frequenti: colon-retto (attualmente 64% per gli uomini e

63% per le donne), mammella femminile (87%) e prostata (91%) (2).

GONADOTOSSICITÀ DA CHEMIOTERAPIA

Radioterapia e chemioterapia sono associate a un variabile rischio di infertilità in relazione a classe, dose e posologia del farmaco impiegato, estensione e sede del campo di irradiazione, dose erogata e suo frazionamento, età e sesso del/la paziente e anamnesi di pregressi trattamenti per infertilità (3). Nelle donne il trattamento chemioterapico spesso è fortemente gonadotossico perché può comportare una perdita follicolare. I follicoli primordiali (ossia il 90% del pool totale), che contengono un ovocita arrestato in profase I della prima divisione meiotica, si riducono da 2 milioni alla nascita a 500.000 al momento del menarca (4, 5); a 37-38 anni il numero totale di follicoli primordiali si riduce ulteriormente a 25.000, con un'accelerazione della perdita degli stessi e a un incremento della difficoltà a concepire spontaneamente (6). Pertanto, l'età della paziente, la dose cumulativa di chemioterapico e il tipo di agente citotossico sono fattori predittivi di un fallimento ovarico precoce (POF) (Tabella 1) (7-9).

Gli effetti comuni della terapia antiblastica includono amenorrea temporanea o permanente a seconda se a essere lesa sia, rispettivamente, la coorte di follicoli in accrescimento o di quelli residuali (10, 11). La chemioterapia causa deplezione follicolare in maniera dose e farmaco-dipendente (12), anche se non è tuttora chiaro se la durata e la dose del farmaco possano considerarsi fattori indipendenti di rischio di fallimento

Tabella 1

Danno gonadotossico e trattamenti chemioterapici antineoplastici. Modificato da rif. 9

Grado del rischio	Trattamento
Rischio elevato (>80%)	Trapianto di cellule staminali ematopoietiche con ciclofosfamide/irradiazione corporea totale o con ciclofosfamide/busulfano Radioterapia esterna che includa nel campo d'irradiazione le ovaie CMF, CAF, CEF (6 cicli in una donna con età >40 anni)
Rischio intermedio	CMF, CAF, CEF (6 cicli in una donna con età tra 30 e 39 anni) AC (4 cicli in una donna con età ≥40 anni) AC o EC
Rischio basso (<20%)	ABVD (doxorubicina/bleomicina/vinblastina/dacarbazina) CHOP (ciclofosfamide/doxorubicina/vincristina/prednisone) per 4-6 cicli CVP (ciclofosfamide/vincristina/prednisone) AML (antracicline/citarabina) ALL (polichemioterapia) CMF, CAF, CEF (6 cicli in una donna con età <30 anni) AC (4 cicli in una donna di età <40 anni)
Rischio molto basso o assente	Vincristina Metotrexate Fluorouracile
Rischio sconosciuto	Taxani Oxaliplatino Irinotecani Anticorpi monoclonali (trastuzumab, bevacizumab, cetuximab) Inibitori delle tirosino-chinasi (erlotinib, imatinib)

CMF, ciclofosfamide – methotrexate – 5-fluorouracile; CAF, ciclofosfamide – doxorubicina/adriamicina – 5-fluorouracile; CEF, ciclofosfamide – epirubicina – 5-fluorouracile; AC, adriamicina – ciclofosfamide; EC, epirubicina – ciclofosfamide.

gonadico. Gli agenti alchilanti, come busulfano o ciclofosfamide, sono quelli maggiormente tossici per il tessuto ovarico in quanto, non essendo ciclo-specifici, ledono sia le cellule in attiva replicazione sia quelle quiescenti e possono, quindi, danneggiare la riserva follicolare ovarica rappresentata in massima parte dai follicoli primordiali. Al contrario, agenti ciclo-specifici, come methotrexate e 5-fluorouracile, non presentano un rischio significativo di compromissione della riserva ovarica. In uno studio condotto su giovani donne sono state messe a confronto giovani esposte ad agenti alchilanti e donne non esposte (13). È stato calcolato un "odds ratio" (OR) di 4,0 di fallimento ovarico con l'uso di alchilanti rispetto a un OR di 1,8 per il platino e di 1,2 per gli alcaloidi della vinca (13). Tuttavia, uno dei maggiori limiti degli studi sull'impatto degli agenti alchilanti (ciclofosfamide) sulla fertilità è quello di essere basati sullo sviluppo dell'amenorrea (14, 15), sottostimando l'incidenza di POF, poichè dopo l'assunzione a lungo termine di farmaci antitumorali molte donne presentano una ridotta riserva ovarica nonostante un'apparente regolarità mestruale (16).

Per testare la riserva ovarica (ORT) ed eventualmente fare diagnosi di POF, oltre al dosaggio degli ormoni follicolo-stimolante (FSH), luteinizzante (LH), dell'estradiolo e, soprattutto, dell'ormone anti-Mülleriano (AMH), è necessario eseguire la conta dei follicoli antrali (AFC) attraverso ecografia transvaginale

(17): un declino della riserva ovarica è segnalato da alte concentrazioni di FSH almeno in due misurazioni, basse concentrazioni circolanti di estradiolo, AMH prodotti dalle cellule della granulosa e da una riduzione del numero dei follicoli antrali.

Nei giovani pazienti maschi, l'infertilità può essere secondaria alla malattia stessa (neoplasie del testicolo, linfoma di Hodgkin), al danno anatomico (eiaculazione retrograda o aneiaculazione), a insufficienza ormonale primaria o secondaria e all'esaurimento delle cellule staminali germinali (3). Il danno gonadico e la riduzione del potenziale riproduttivo possono essere indagati tramite l'analisi del liquido seminale, che valuti la compromissione del numero di spermatozoi nell'eiaculato, della loro motilità, della morfologia e dell'integrità del DNA (3). L'epitelio germinale del testicolo dell'adulto è più sensibile al danno da chemioterapia rispetto all'epoca prepuberale e, in caso di danno, la possibilità di una ripresa dell'attività gonadica aumenta con il tempo intercorso dalla fine del trattamento (18). Come per il sesso femminile, anche per il maschile il maggior rischio gonadotossico è associato agli agenti alchilanti ed è probabilmente dose-dipendente (19); altrettanto noto è l'effetto negativo di carboplatino e cisplatino. Al contrario, un basso rischio è associato a metotrexate, fluorouracile, vincristina, vinblastina, bleomicina e dactinomicina (Tabella 2).

Nei maschi lungo sopravvissuti dopo il linfoma

Tabella 2

Spermatogenesi e trattamenti chemioterapici antineoplastici. Modificato da rif. 9

Agente (dose cumulativa)	Effetto
Clorambucil (1,4 g/m ²) Procarbazine (4 g/m ²) Melfalan (140 mg/m ²) Cisplatino (500 mg/m ²)	Azoospermia prolungata
Carmustina (1 g/m ²) Lomustina (500 mg/m ²)	Azoospermia nell'età adulta dopo trattamento in età prepuberale
Busulfano (600 mg/kg) Ifosfamide (42 g/m ²) Carmustina (300 mg/m ²) Mostarde azotate Actinomicina D	Azoospermia probabile, in genere data da altri agenti altamente sterilizzanti associati
Carboplatino (2 g/m ²)	Azoospermia prolungata (non sempre osservata a questa dose)
Doxorubicina (adriamicina) (770 mg/m ²) Tiotepa (400 mg/m ²) Citosina arabinoside (1 g/m ²) Vinblastina (50 g/m ²) Vincristina (8 g/m ²)	Tossicità additiva con i farmaci precedenti nel determinare un'azoospermia prolungata; se non combinati con i farmaci precedenti, causano solo una riduzione temporanea della conta spermatica
Amsacrina, bleomicina, dacarbazina, daunorubicina, epirubicina, etoposide, fludarabina, fluorouracile, 6-mercaptopurina, metotrexate, mitoxantrone, tioguanina	Riduzione temporanea nella conta spermatica nella dose usate negli schemi convenzionali, ma sono possibili effetti additivi
Prednisone	Improbabile che riduca la produzione spermatica
Interferone α	Nessun effetto sulla produzione spermatica
Nuovi agenti: oxaliplatino, irinotecan, anticorpi monoclonali (trastuzumab, bevacizumab, cetuximab), inibitori della tirosino-chinasi (erlotinib, imatinib), taxani	Rischi sconosciuti sulla produzione spermatica

sembra opportuno un monitoraggio del livello sierico degli ormoni sessuali nel corso del "follow up", specialmente se trattati con chemioterapia ad alte dosi (20). Nel 25% dei pazienti fertili trattati con chemioterapia compare azoospermia dopo 2-5 anni (21). Il tasso di infertilità permanente sembra prevedibile sulla base della dose cumulativa di cisplatino somministrata: a dosi <400 mg/m² gli effetti a lungo termine sono improbabili, mentre dosi maggiori sono associate a una disfunzione endocrino-gonadica permanente (22, 23).

Infine, in assenza di una sindrome neoplastica ereditaria, non esiste alcuna evidenza scientifica che una precedente storia di cancro aumenti il tasso di anomalie congenite o di cancro nella prole (24), mentre è noto un transitorio aumento del rischio di aneuploidia dopo trattamento chemioterapico e radiante (25).

GONADOTOSSICITÀ DA RADIOTERAPIA

Le gonadi umane sono molto sensibili alla radioterapia: le radiazioni ionizzanti, inducendo apoptosi, interrompono il ciclo proliferativo cellulare provocando un'estesa distruzione cellulare a livello ovarico. La radiosensibilità varia rispetto alla fase di crescita follicolare, i follicoli primordiali sembrando essere più radioresistenti di quelli maturi (26). Per quanto l'elevato numero di follicoli in epoca prepuberale e in giovane età possa rendere meno vulnerabili le pazienti più giovani rispetto alle donne in età riproduttiva avanzata, il rischio di fallimento ovarico precoce è ancora alto, poiché è alterata la funzionalità dell'asse ipotalamo-ipofisario (irradiazione encefalica) oppure è danneggiato l'utero (irradiazione addominale o pelvica) (27, 28).

Le radiazioni ionizzanti possono danneggiare direttamente il DNA, portando ad atrofia follicolare e riducendo quindi la riserva ovarica. Ciò può accelerare il declino fisiologico del numero dei follicoli e alterare la produzione ormonale con riduzione dei livelli di estradiolo, maggiore responsabile di mancato trofismo endometriale e della sintomatologia propria della menopausa precoce. In pazienti sottoposte a radioterapia, la deplezione dei follicoli ovarici è valutata indirettamente attraverso l'età di comparsa del menarca (per le donne in età prepubere) e soprattutto attraverso dosaggi ormonali (FSH, estradiolo, AMH) ed esame ecografico per AFC. A seguito di numerosi studi sono stati identificati differenti fattori significativi in grado di determinare un POF: dose di irradiazione, età al momento dell'esposizione alla fonte di radiazioni ionizzanti ed estensione del campo di irradiazione (29-31). Un modello matematico ha dimostrato che la dose richiesta per distruggere il 50% degli ovociti immaturi (LD50) è <2 Gy (32). Anche l'età della paziente sottoposta a radioterapia e la dose di irradiazione sono predittivi della latenza di comparsa di un POF (32).

Quando il testicolo viene esposto a radiazioni, la conta spermatica comincia a ridursi in misura proporzionale al dosaggio ricevuto, con conseguente sterilità temporanea (dose <6 Gy) o permanente (per

dosi superiori) (33). Con le moderne tecniche di irradiazione conformazionale su sede lombo-aortica, con dosi <30 Gy e appropriata schermatura testicolare, l'infertilità radioindotta è un'evenienza rara nei pazienti sottoposti a radioterapia profilattica per seminoma (22). La conta spermatica è più bassa a 4-6 mesi per poi tornare tipicamente ai livelli pretrattamento in 10-24 mesi (34); solo 3-6% dei soggetti rimane azoospermico a 2 anni dal trattamento (35). A differenza dell'epitelio germinale, le cellule di Leydig sono meno suscettibili al danno radioindotto, soprattutto in età adulta (36). In un recente studio su pazienti sottoposti a "total-body irradiation" (TBI) nell'ambito di trattamenti combinati ad alte dosi, una disfunzione delle cellule di Leydig è comparsa nel 23% dei casi, mentre il danno sulla linea germinale era molto rilevante, presente fino al 80% dei pazienti (37). La tossicità gonadica può essere studiata mediante determinazione del livello plasmatico degli ormoni sessuali, analisi del seme e biopsia testicolare. Quando l'infertilità è secondaria a deficit ormonale è sufficiente una terapia sostitutiva (38).

PRESERVAZIONE DELLA FERTILITÀ

La possibile comparsa di sterilità o infertilità secondaria ai trattamenti oncologici e il disagio psicosociale a esse legato sono temi di importanza crescente, non solo in considerazione del miglioramento della prognosi nei pazienti oncologici di età pediatrica e giovanile, ma anche a causa dello spostamento in avanti dell'età alla prima gravidanza nei paesi occidentali (39).

La preservazione della fertilità può essere realizzata attraverso la protezione delle gonadi dalla tossicità dei regimi terapeutici utilizzati o mediante tecniche di fecondazione assistita (ad es., crioconservazione del liquido seminale, embrionaria, ovocitaria o del tessuto ovarico).

Strategie nell'uomo

La crioconservazione del seme rappresenta una strategia efficace, in quanto nell'uomo la protezione gonadica attraverso la manipolazione ormonale non risulta efficace (9). Per i pazienti in età pediatrica sono in fase di sperimentazione la crioconservazione del tessuto testicolare o degli spermatogoni con reimpianto e lo xenotrapianto testicolare (40). La crioconservazione del seme non richiede tempi lunghi e dovrebbe essere offerta a tutti gli uomini prima di iniziare trattamenti potenzialmente gonadotossici, in quanto la qualità del campione e l'integrità del DNA degli spermatozoi possono essere compromessi anche dopo un solo ciclo di trattamento (41). Tuttavia, nei pazienti oncologici che si rivolgono alle banche del seme è stata riportata una percentuale di azoospermia variabile (3,9-13%) in cui la crioconservazione non è possibile (42). Nei pazienti azoospermici, prima di iniziare la terapia, è possibile effettuare un prelievo chirurgico di spermatozoi dai testicoli ("testicular sperm extraction", TESE), efficace solo nel 50% dei casi. Sebbene l'efficacia della

crioconservazione è stata dimostrata dai tassi di successo dell'"intracytoplasmic sperm injection" (ICSI) (20-50% per ciclo) (43-45), solo il 5-16% dei pazienti utilizza il seme crioconservato prima dei trattamenti (46).

Strategie nella donna

Preservazione farmacologica con agonisti del "gonadotropin-releasing hormone" (GnRH)

Poiché la chemioterapia colpisce maggiormente i tessuti con rapido "turnover" cellulare, uno stato indotto di inibizione dell'attività ovarica durante la terapia antitumorale potrebbe proteggere le ovaie (47). Pertanto, è stato proposto il trattamento con agonisti del GnRH (triptorelin, goserelin, buserelin, leuprolide) prima e durante la terapia antitumorale. La somministrazione cronica degli agonisti del GnRH, riducendo la secrezione di FSH, sopprime la funzione ovarica e potrebbe, quindi, ridurre l'effetto tossico della chemioterapia (42, 49, 50). Sono stati valutati diversi meccanismi attraverso cui può avvenire la protezione gonadica: interruzione della secrezione di FSH, riduzione del reclutamento ovocitario, riduzione della perfusione utero-ovarica e attivazione dei recettori GnRH (48).

Gli agenti alchilanti possono determinare un aumento della distruzione/apoptosi dei follicoli attivi; la conseguente riduzione della secrezione degli steroidi sessuali, delle inibine e dell'AMH determinerà una riduzione della loro concentrazione plasmatica e, per feedback negativo sull'ipotalamo e sull'ipofisi, aumenteranno le concentrazioni di FSH. L'incrementata secrezione di FSH può determinare un accelerato reclutamento dei follicoli preantrali, che vengono stimolati a entrare nella fase di differenziazione e maturazione, con conseguente maggiore sensibilità all'effetto gonadotossico della chemioterapia. La somministrazione dell'agonista consente di interrompere questo circolo vizioso.

Lo stato di ipoestrogenismo indotto dalla terapia provoca una ridotta perfusione ovarica, una dose cumulativa più bassa dei chemioterapici e quindi una minore gonadotossicità (50). Studi, principalmente di fase II o osservazionali, supportano al momento questa indicazione, pur con l'incertezza derivante dalla mancanza di ampi studi clinici randomizzati che abbiano come "end-point" il numero di gravidanze piuttosto che la ripresa del ciclo mestruale (51, 52).

Le metanalisi pubblicate sull'argomento evidenziano in maniera uniforme il beneficio della somministrazione degli agonisti del GnRH nella preservazione della funzione ovarica, anche perché le alterazioni del metabolismo osseo non sono di solito clinicamente significative per somministrazioni <6 mesi (53-55). Recentemente, gli agonisti del GnRH sono stati inseriti nell'elenco dei medicinali erogabili a totale carico del Servizio Sanitario Nazionale, per la preservazione della funzionalità ovarica nelle donne in premenopausa (Nota 51, Gazzetta Ufficiale 22 luglio 2016).

La soppressione ovarica con analoghi durante la

chemioterapia e le strategie di crioconservazione non sono tecniche mutuamente esclusive; infatti, possono essere usate in maniera sinergica per aumentare le possibilità di preservazione della fertilità (54).

Preservazione di natura meccanica

La trasposizione ovarica o ovaropessia consiste nello spostamento delle ovaie al di fuori del campo di irradiazione diretta. Questa è una metodica con un'estrema variabilità di successo (16-90%), poiché le ovaie possono essere danneggiate dalla dose dispersa di radiazioni ionizzanti (56, 57). Inoltre, bisogna considerare le possibili complicanze, che includono dolore pelvico cronico, insulto vascolare, infarto delle tube di Falloppio e migrazione ovarica (56) e la conseguente difficoltà per l'accessibilità delle ovaie per un eventuale "pick-up" (58). Quindi, l'ovaropessia può essere utilizzata nei casi di irradiazione addominale, sia monolaterale sia bilaterale, con incerti effetti a lungo termine. La protezione della funzione ovarica è efficace in meno del 50% delle pazienti adulte e non vi sono dati clinici a sostegno di successo nelle adolescenti. Quando i campi di irradiazione sono delineati si può ricorrere alla schermatura delle gonadi, meno invasiva rispetto alla trasposizione ovarica, ma di minore efficacia (3).

Preservazione attraverso procedure di procreazione medicalmente assistita (PMA)

La crioconservazione degli embrioni ha ottimi tassi di successo, paragonabili alla crioconservazione degli spermatozoi, in quanto gli embrioni dopo lo scongelamento hanno potenziale di impianto paragonabile agli embrioni freschi, con tassi di gravidanza sovrapponibili. Inoltre, la vitrificazione mostra un miglioramento dei tassi di sopravvivenza embrionaria e degli "outcome" riproduttivi rispetto al congelamento lento (59). Questo approccio può essere proposto quando è disponibile il partner maschile o sia consentito l'uso di spermatozoi da donatore anonimo. Inoltre, data la necessità di eseguire una stimolazione ovarica, può essere proposto quando è possibile posticipare la chemio/radioterapia di almeno 15-20 giorni. Tale procedura non è permessa dalla legge italiana (Legge 40/2004) pur rappresentando lo standard meglio codificato per il sesso femminile (3). Infatti, le modificazioni all'applicazione della Legge 40 introdotte dalla sentenza della Corte Costituzionale n° 51 del 2009, pur avendo ampliato le eccezioni al divieto di crioconservazione di embrioni soprannumerari derivanti dall'applicazione delle tecniche riproduttive, non hanno abolito il comma 1 dell'articolo 14, lasciando inalterato il divieto a produrre embrioni per la crioconservazione.

La crioconservazione degli ovociti, dichiarata procedura standard dall'"American Society Reproductive Medicine" (ASRM) nel 2012, ha tassi di gravidanza per transfer del ~15-30%, in relazione all'uso della vitrificazione e al numero di ovociti prelevati (60, 61). Poiché all'aumentare dell'età materna aumenta anche il

numero di ovociti aneuploidi (62), si cerca di ottimizzare un singolo ciclo ovarico per recuperare il massimo numero di ovociti (63). Questo è cruciale per le pazienti oncologiche che hanno un'unica finestra temporale da sfruttare prima dell'inizio dei trattamenti antitumorali. L'obiettivo, quindi, è quello di recuperare un numero di ovociti congruo, che in media si attesta tra 8 e 10 al di sotto dei 35 anni (64).

I protocolli di stimolazione ovarica standard non sono applicabili quando chemioterapia e/o radioterapia devono essere iniziate precocemente e non sono considerate sicure per le neoplasie ormono-correlate. Per queste pazienti è indicato effettuare una stimolazione con modulatori selettivi del recettore estrogenico (SERM) (ad es., tamoxifene) o con inibitori delle aromatasi (ad es., letrozolo). Il tamoxifene presenta un'azione selettiva antiestrogenica a livello del tessuto mammario ed è per questo tra i principali farmaci antitumorali utilizzati per gli stadi precoci del carcinoma della mammella con recettori degli estrogeni e del progesterone positivi (ER+ e PR+). Per quanto i dati non siano ancora conclusivi, diversi studi hanno sperimentato il tamoxifene in regimi di stimolazione ovarica controllata paragonando la sua efficacia al clomifene, altro modulatore selettivo dei recettori estrogenici (65). Grazie alla sua doppia azione, sia antitumorale che di farmaco induttore dell'ovulazione, è stata dimostrata che il tamoxifene può essere utilizzato nei protocolli di stimolazione ovarica in donne affette da tumore mammario con sicurezza ed efficacia (66, 67).

Il letrozolo, inibitore delle aromatasi di III generazione, presenta un'azione antiestrogenica pura, in quanto inibisce la tappa limitante la sintesi degli estrogeni attraverso un antagonismo competitivo sul sito attivo dell'aromatasi (68, 69). Inoltre, il letrozolo, potenziando l'effetto delle gonadotropine, è in grado di aumentare il numero di follicoli preovulatori e, allo stesso tempo, di ridurre le dosi di gonadotropine richieste (70, 71). Gli inibitori di aromatasi aumentano, pertanto, la risposta ovulatoria con un meccanismo sia centrale, attraverso la riduzione del "feedback" negativo estrogenico, che periferico, incrementando la sensibilità follicolare alle gonadotropine. A fronte di una dimostrata validità, il letrozolo in giovani donne con carcinoma mammario può essere utilizzato per la sua capacità di modulare il picco di estradiolo e, quindi, ridurre i rischi associati alla stimolazione (71-74).

Sebbene ci siano numerosi studi in letteratura che confermano la validità dei protocolli del letrozolo associato a basse dosi di FSH ricombinante, va considerato come l'impiego del farmaco ai fini dell'induzione dell'ovulazione sia da considerarsi, a oggi, "off-label" ossia al di fuori delle indicazioni terapeutiche per le quali il farmaco risulta registrato. D'altro canto, diversi studi hanno escluso la possibilità per il letrozolo di essere dannoso per gli ovociti (12, 73). Per le pazienti oncologiche, quindi, il rischio di teratogenicità è trascurabile: il transfer avviene ~2-5 anni dopo l'assunzione del letrozolo e non c'è una concreta possibilità di esposizione embrionaria al farmaco (12).

In merito ai regimi di stimolazione ovarica con letrozolo sono emersi spunti di ricerca anche sulle possibili ricadute sulla fase luteale. In particolare, non vi sono chiare evidenze scientifiche in relazione ai livelli di progesterone in corso di stimolazione con inibitore di aromatasi in fase luteale. Tale ambito andrebbe indagato, considerando gli studi che ne sottolineano l'impatto sulla prognosi del carcinoma della mammella per il suo ruolo nella regolazione della proliferazione delle cellule mammarie, normali e tumorali (75). È stato recentemente pubblicato uno studio che confronta il profilo ormonale delle pazienti stimolate con l'aggiunta del letrozolo rispetto alle pazienti in PMA standard (76). In questa seppur esigua casistica non è stata ritrovata differenza statisticamente significativa tra i livelli di progesterone dei due gruppi. Presso il Centro di Oncofertilità dell'Università degli Studi di Napoli Federico II sono state invece riscontrate concentrazioni elevate di progesterone (170-227 µg/L) in pazienti oncologiche sottoposte a stimolazione ovarica con letrozolo (77). La differenza potrebbe essere dovuta al tipo di "triggering". Infatti, la maggior parte delle pazienti del Centro di Napoli sono state indotte con agonisti del GnRH, in linea con i più recenti protocolli in uso in pazienti oncologiche per la prevenzione della sindrome da iperstimolazione ovarica (78). Altra differenza rispetto allo studio di Goldrat è data dall'utilizzo in alcune pazienti degli agonisti del GnRH per la protezione gonadica, effettuato pochi giorni dopo il prelievo ovocitario.

Due sono le possibili spiegazioni dell'eccessivo incremento dei livelli di progesterone in fase luteale in pazienti trattate con letrozolo. La prima è da ricercarsi nell'aumento del LH secondario al forte clima ipoestrogenico indotto dal letrozolo; in tal modo, viene a mancare l'effetto di feedback negativo sull'asse ipofisario. Una seconda ipotesi è che l'inibizione dell'aromatasi favorisca un accumulo di substrato a monte del "pathway" enzimatico, portando indirettamente all'incremento del progesterone (77).

Va sottolineato, comunque, che il ruolo del progesterone nella patogenesi del cancro mammario è ancora poco chiaro. Pur essendo considerato da lungo tempo un fattore protettivo, diversi studi hanno dimostrato che il progesterone è in grado di espandere una popolazione di cellule staminali delle ghiandole mammarie (79, 80). Inoltre, può attivare il pool di cellule staminali e accelerare la formazione di tumori, tra cui quello mammario. È possibile che questo effetto possa essere mediato da un meccanismo paracrina attraverso l'attivatore del recettore del fattore nucleare kappa - B ligando (RANKL). Sono tuttavia necessari studi più ampi per confermare il dato e soprattutto comprenderlo meglio. In tal modo si potrebbe far luce su un tema ancora poco studiato e che potrebbe avere una ricaduta in termini di sicurezza sui protocolli di stimolazione da utilizzare in pazienti affette da carcinoma della mammella.

Una recente novità introdotta per i programmi di congelamento ovocitario, inizialmente rivolta alle pazienti oncologiche, è rappresentata dall'uso del

protocollo "random start", che non vincola l'inizio della stimolazione all'attesa della mestruazione. In tal modo non è necessario iniziare la stimolazione in fase follicolare precoce. Tali protocolli possono essere iniziati in qualsiasi fase del ciclo (follicolare avanzata e luteale) senza sostanziali differenze rispetto ai programmi di stimolazione standard. In uno studio retrospettivo di coorte è stata confrontata la stimolazione classica e la "random start" (81). A parità di risultati (numero di ovociti recuperati, embrioni congelati), le pazienti oncologiche nel caso del protocollo d'emergenza hanno potuto iniziare in tempi brevi le terapie antiblastiche senza quindi dover modificare l'iter terapeutico oncologico/ematologico. In uno studio retrospettivo comparativo sono stati paragonati i due protocolli, ma non sono emerse differenze statisticamente significative in termini di dosaggio delle gonadotropine e ovociti recuperati (82). L'unica eccezione era rappresentata da un maggior tasso di maturità ovocitaria del gruppo che aveva eseguito il protocollo d'emergenza. Pertanto erano confermate fattibilità ed efficacia di tale approccio terapeutico.

Prima di intraprendere una stimolazione ovarica controllata bisogna valutare, attraverso un'approfondita consulenza pretrattamento, i potenziali vantaggi e limiti e informare la paziente della necessità di ripetute valutazioni ematologiche e monitoraggi ecografici in corso di stimolazione, dei rischi connessi alla stessa stimolazione ovarica e al prelievo ovocitario, delle probabilità effettive di successo e dei costi.

La crioconservazione di ovociti immaturi sarebbe indicata per le pazienti per le quali non è possibile procrastinare l'inizio della chemio/radioterapia o in caso di controindicazione all'esecuzione di una stimolazione ovarica controllata. Questa metodica, ad oggi ancora sperimentale, consiste nel prelievo di follicoli immaturi e nella successiva maturazione *in vitro* (IVM) degli ovociti (83, 84). Tale metodica non comporta una stimolazione ovarica, ma prevede il prelievo di ovociti in fase follicolare precoce (entro 8°-10° giorno del ciclo) con dimensioni follicolari non superiori a 12 mm di diametro. I tassi di gravidanza sono sovrapponibili alle procedure effettuate con ovociti congelati, anche se la maggior parte dei dati riguarda pazienti non oncologiche. I tassi di anomalie congenite nei nati sono anch'essi comparabili ai cicli "*in vitro* fertilization and embryo transfer/intracytoplasmic sperm injection" (FIVET/ICSI) standard (85). Alcuni studi considerano possibile l'esecuzione del prelievo dei follicoli immaturi non solo nella classica fase follicolare, ma anche in fase luteale. Ciò è vantaggioso per quelle pazienti che debbano iniziare in tempi brevi la chemio/radioterapia antitumorale e non sono in un'adeguata fase del ciclo ovarico (86).

La crioconservazione del tessuto ovarico è indicata quando non possono essere attesi i 15-30 giorni impiegati per l'induzione dell'ovulazione e nei casi di neoplasie ormono-sensibili (87). Con questa metodica sono state ottenute nel mondo più di 60 gravidanze (88). A differenza della crioconservazione ovocitaria o

embrionale, l'uso del tessuto ovarico è possibile anche nelle bambine e adolescenti prepubere, in quanto a essere crioconservati sono principalmente i follicoli primordiali della corticale ovarica. È una tecnica di rapida esecuzione, finalizzata al congelamento di un elevato numero di follicoli primordiali che, data la loro migliore resistenza all'insulto del congelamento/scongelo rispetto alle cellule mature, sopravvivono in altissima percentuale. Infatti, tali follicoli contengono ovociti immaturi allo stadio di profase I con una maggiore resistenza alle basse temperature grazie alle ridotte dimensioni, alla bassa attività metabolica, allo scarso numero di organelli cellulari e all'assenza della zona pellucida, che è maggiormente esposta ai danni della crioconservazione (89, 90). I campioni di corticale ovarica da crioconservare sono prelevati attraverso tecnica laparoscopica prima dell'inizio del trattamento radio e/o chemioterapico. In letteratura sono riportate due metodiche. La prima prevede l'asportazione di ~50% di un ovaio oppure biopsie multiple (5/10) della corticale ovarica con prelievo di frammenti di ~5 mm³ (91). La seconda tecnica, rappresentata dall'asportazione di un ovaio *in toto*, è quella che può garantire migliori probabilità di successo soprattutto in quelle pazienti che effettuano chemioterapia ad alte dosi, irradiazione pelvica o trapianto di midollo osseo (92, 93).

Nella scelta della tecnica bisogna considerare che la soglia di fallimento gonadico sembra essere uguale per tutto l'ovaio in quanto il danno è omogeneamente distribuito all'intera gonade. Da ciò la teoria che l'ovariectomia totale possa rappresentare il compromesso migliore per preservare il maggior numero possibile di follicoli primordiali dalla chemio/radio tossicità. A ulteriore sostegno di tale procedura, gli studi non hanno mostrato differenze statisticamente significative in termini di età di inizio della menopausa in soggetti con un solo ovaio (92).

Secondo il modello in uso nel nostro Centro, il tessuto corticale va diviso in parti uguali e la corteccia di ciascuna metà va ulteriormente divisa in frammenti più piccoli di spessore di ~3-5 mm, usando una soluzione isotonica per lavare il sangue presente. Parte dei frammenti corticali deve essere inviata a laboratori specializzati per le analisi istologiche e immunoistochimiche, prima di procedere alla crioconservazione. Il protocollo ottimale di congelamento dovrebbe consentire la preservazione dell'integrità strutturale delle singole cellule e dei rapporti intercellulari con le circostanti cellule della teca e della granulosa necessarie per l'attività funzionale del follicolo. Inoltre, è importante che tale procedura non induca stress biofisici e osmotici che potrebbero compromettere i processi metabolici necessari per la sua ripresa funzionale.

Il tessuto ovarico congelato/scongelo prima di essere reimpiantato nella paziente deve essere attentamente testato a mezzo d'indagini *in vitro* (istologiche-istochimiche) e soprattutto *in vivo*, attraverso il trapianto delle sezioni ovariche in topi affetti da immunodeficienza severa combinata (SCID). Tale

procedura di validazione *in vivo* è l'unica in grado di garantire risultati appropriati e sicuri. Infatti, lo xenotrapianto di frammenti ovarici umani è impiegato solitamente per valutare la capacità di ripristino della funzione del tessuto ovarico dopo il trapianto (Figura 1). Sulla base dei risultati ottenuti nei modelli sperimentali *in vivo*, alcuni autori hanno intrapreso programmi di autotrapianto di tessuto ovarico in pazienti oncologiche in fase di remissione (92, 94-97).

Sono state proposte due tipologie di trapianto del tessuto ovarico: ortotopica ed eterotopica. Nel primo caso, i frammenti, precedentemente congelati, vengono impiantati in corrispondenza di una tasca sottocorticale dell'ovaio residuo, necessariamente controlaterale nel caso di precedente prelievo di ovaio *in toto*. Con tale tecnica è riportata in letteratura una buona percentuale di ripristino della funzione ovarica e una duratura funzionalità dell'innesto (12, 98). L'autotrapianto eterotopico può effettuarsi in numerosi siti vascolarizzati diversi dalla sede ovarica originaria: al di sotto della borsa omentale, in corrispondenza di una tasca intraperitoneale, sulla superficie anteriore dell'utero, sulla superficie del muscolo deltoide o del muscolo retto dell'addome (89, 99). Tuttavia, l'impiego dei siti sottocutanei e intramuscolari non ha portato a risultati validi. Sebbene, infatti, si sia osservato un ripristino della funzione endocrina in una percentuale elevata di casi, non altrettanto incoraggianti sono stati i risultati in termini di tassi di gravidanze.

Donnez et al. (91) hanno valutato i tassi di attecchimento e ripristino della funzione ovarica in trapianti intraperitoneali. Questa procedura prevede che debbano essere effettuati due interventi laparoscopici: nel corso del primo è creata la tasca peritoneale; dopo 7 giorni di attesa, durante i quali fattori neoangiogenetici portano allo sviluppo di una fitta rete vascolare a livello della tasca peritoneale, si procede al reimpianto vero e proprio dei frammenti tissutali. Anche per questo metodo, spesso utilizzato in associazione al trapianto ortotopico, sono stati riportati risultati confortanti in termini di ripristino della funzione endocrina (91). Tale procedura ha dato origine anche a una gravidanza biochimica (100). La stima del successo dell'innesto è effettuata attraverso il dosaggio dei livelli di FSH ed estradiolo, la valutazione ecografica della crescita follicolare e il recupero del ciclo mestruale. Sono indice di ripresa, concentrazioni di estradiolo al di sopra del limite di rilevazione del metodo (0,04 nmol/L) e la riduzione dei livelli di FSH, che possono raggiungere valori <20 UI/L (91). I tempi di attecchimento possono variare in relazione al tipo di tecnica utilizzata sia per il prelievo ovarico che per il reimpianto. Lo studio storico del gruppo di Andersen condotto nel 2009 su un campione di 6 donne ha mostrato una riduzione delle concentrazioni di FSH a valori <20 UI/L a ~25 settimane dal trapianto (93).

Per ogni reimpianto è possibile una ripresa della ciclicità ovarica e mestruale di ~1-2 anni. Durante tale periodo è possibile stimolare la paziente con una "mild stimulation" (FSH ricombinante a basse dosi associato

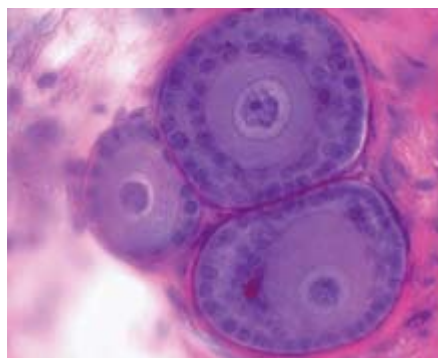


Figura 1

Sviluppo follicolare del tessuto ovarico trapiantato in topi affetti da immunodeficienza severa combinata.

ad antagonista del GnRH) per procedere con PMA di II livello (101). Un recente studio riporta i tassi di gravidanza ottenuti dopo autotrapianto del tessuto ovarico in 41 donne (102). Sono stati effettuati 53 trapianti, in quanto, per alcune pazienti, è stato necessario e/o richiesto ripeterlo. In questa casistica sono state ottenute 13 gravidanze e una descritta ancora in corso al momento della pubblicazione. È interessante osservare come per alcune pazienti, oltre alle gravidanze secondarie a procedure di PMA di II livello, siano stati descritti concepimenti spontanei o associati al solo uso della gonadotropina corionica umana (HCG) per l'induzione dell'ovulazione (102).

Va sottolineato che il principale obiettivo dell'autotrapianto del tessuto ovarico è rappresentato dalla ripresa della fertilità e dall'incremento delle probabilità di concepimento, poiché per il ripristino della funzionalità endocrina risulta sicuramente più vantaggiosa la terapia ormonale sostitutiva. La comunità scientifica ha, pertanto, focalizzato le proprie attenzioni sulle tecniche di autotrapianto più efficaci al raggiungimento di tale scopo. Di qui la prevalenza di studi in letteratura sui trapianti ortotopici, maggiormente efficaci in tal senso, rispetto agli eterotopici.

Il "timing" dell'autotrapianto dovrebbe essere vagliato da un team multidisciplinare e discusso con la paziente stessa. Il trapianto può essere attuato più volte in differenti momenti della vita della paziente se non si raggiunge da subito il successo sperato o se si desiderano più gravidanze (96, 102). Per tale procedura, i limiti sono rappresentati dalla necessità di sottoporsi a un intervento chirurgico con i rischi a esso connessi, seppur eseguito in laparoscopia, e dalla natura ancora sperimentale della procedura utilizzata in ambito clinico soltanto in pochi centri internazionali.

Bisogna ricordare che a oggi non ci sono trattamenti che possano garantire al 100% la preservazione della fertilità; si tratta comunque di procedure con una variabile percentuale di successo e di questo deve essere accuratamente informata la paziente. Inoltre, è necessario effettuare un'attenta valutazione dei potenziali rischi, che si traducono nella possibilità di

reintrodurre cellule neoplastiche attraverso l'autotrapianto del tessuto ovarico, dopo la completa remissione della malattia. Tale problematica acquista maggior rilievo nel caso di malattie ematologiche.

Meirow et al. hanno proposto un iter diagnostico da attuare per salvaguardare *in primis* la salute delle pazienti e poi rendere quanto più sicure possibili le tecniche di preservazione della fertilità (103). Le tecniche di "imaging" più avanzate sono in grado di individuare metastasi ovariche o pelviche, sconsigliando di procedere alla laparoscopia per il prelievo del tessuto ovarico. Durante lo stesso intervento laparoscopico, l'osservazione diretta può escludere la compromissione macroscopica dell'ovaio. Lo studio riporta come terzo step la necessità, per ciascuna paziente, di valutare alcuni frammenti di corticale ovarica prima del congelamento con tecniche istologiche e immunoistochimiche per la ricerca di metastasi non rilevabili con la diagnostica per immagini. Inoltre, è consigliato anche effettuare dopo lo scongelamento ulteriori indagini istologiche e immunoistochimiche per individuare eventuali indicatori di malattia minima residua: per il linfoma di Hodgkin può essere effettuata la ricerca specifica del CD30 e la caratterizzazione delle cellule di Reed-Stemberg; per i linfomi a cellule T e B, la ricerca di alterazioni molecolari del recettore delle cellule T o delle immunoglobuline di membrana; infine, per la leucemia mieloide cronica, la presenza del riarrangiamento BCR-ABL (cromosoma Philadelphia). Lo studio di Meirow da un lato ha confermato concretamente il rischio di metastasi occulte nel tessuto ovarico, ma d'altra parte ha rassicurato sulla possibilità di rilevarle adeguatamente attraverso differenti esami, prima di effettuare l'autotrapianto (103).

Infine, importante ai fini di una valutazione del rapporto rischi/benefici è il tipo di neoplasia riscontrata, classificandole in base al rischio di reintrodurre cellule neoplastiche dopo l'autotrapianto: ad alto rischio sono le leucemie, mentre linfomi e tumore mammario sono da considerarsi a basso rischio. Ciò può guidare il team multidisciplinare nel "counselling" e nell'analisi dei rischi con l'obiettivo ultimo di guidare la paziente alla migliore scelta terapeutica per il suo caso (104).

APPROCCIO MULTIDISCIPLINARE E PERCORSO DIAGNOSTICO TERAPEUTICO-ASSISTENZIALE (PDTA)

Per programmare la strategia di preservazione della fertilità più idonea, è importante analizzare attentamente il singolo paziente, considerandone il tipo di patologia, la sua gravità e prognosi, l'eventuale necessità di iniziare quanto prima la terapia antineoplastica e, soprattutto, il desiderio di genitorialità, tenendo conto che la possibilità di non dover rinunciare *a priori* alla maternità/paternità aiuta, spesso, psicologicamente i pazienti ad affrontare la patologia (105). Per ogni singolo caso, infatti, è prioritario valutare svantaggi e vantaggi da differenti punti di vista all'interno di un team idoneo costituito da un ginecologo/andrologo, un oncologo/ematologo, un

embriologo e uno psicologo.

Come per la popolazione generale, anche nelle pazienti oncologiche, l'ORT rappresenta un momento fondamentale del percorso medico-assistenziale, in quanto consente di avere una stima della probabilità di danno gonadico chemio/radioindotto e della probabilità di successo delle differenti strategie di preservazione della fertilità, in particolar modo della capacità di risposta ovarica alla stimolazione ovarica controllata. Seppur l'età di una donna sia il principale fattore che influenza la riserva ovarica, sia per quanto concerne la qualità che la quantità degli ovociti, è anche vero che l'età anagrafica non sempre corrisponde all'età biologica di una donna, che è definita dai suoi profili ormonali e funzionali. Per tale motivo, l'utilizzo di marcatori ormonali e funzionali risulta essere di maggiore accuratezza.

Il principale marcatore ormonale è l'AMH, utilizzato come misura diretta della riserva follicolare. Questo ormone è prodotto dai follicoli preantrali e dai piccoli follicoli antrali e correla con il numero di ovociti primordiali presenti allo stadio di sviluppo della cosiddetta fase gonadotropino-indipendente. Un valore di AMH <0,5-1,1 µg/L rientra tra i criteri fissati dalla Società Europea di Riproduzione Umana ed Embriologia (ESHRE) per la definizione di una paziente come "poor responder" ovvero con scarsa possibilità di successo a una stimolazione ovarica controllata con l'utilizzo di dosaggi standard di gonadotropine (106). Va tenuto conto che l'interpretazione dei valori deve essere attentamente rapportata alla metodica utilizzata dal laboratorio di riferimento, considerata l'ampia variabilità dei kit presenti in commercio.

Il miglior marcatore funzionale è rappresentato dall'AFC. AFC viene effettuata con un'ecografia pelvica transvaginale entro il 5° giorno del ciclo e rappresenta attualmente il migliore fattore predittivo della risposta ovarica a un ciclo di stimolazione e correla con il numero di ovociti prelevati. Uno dei problemi legati all'utilizzo dell'AFC è la standardizzazione della metodica. Solo nel 2010, Broekmans et al. (107) hanno proposto una serie di raccomandazioni al fine di ridurre le variabilità inter- e intraoperatore e tra i diversi centri. Tali raccomandazioni sono di ordine clinico e tecnico; in primis è necessario che le pazienti non siano affette da condizioni cliniche che determinino alterazione della ciclicità mestruale o che possano interferire con una corretta conta dei follicoli antrali (ad es., storia di endometriosi ovarica, pregresso intervento chirurgico a livello ovarico), che la conta venga effettuata in fase follicolare precoce (entro il 5° giorno del ciclo mestruale o di un ciclo di contraccettione orale) e devono essere inclusi nella conta i follicoli del diametro compreso tra 2 e 10 mm. Tra le raccomandazioni di ordine tecnico ricordiamo che a effettuare tale misurazione deve essere una figura che abbia esperienza nell'esecuzione della stessa. La metodica transvaginale è da preferire a quella transaddominale, in quanto permette di ottenere una maggiore precisione; bisogna inoltre effettuare la misurazione sia sul piano longitudinale che in quello trasversale e identificando per prima cosa il follicolo di

diametro maggiore. Tali procedure vanno effettuate bilateralmente sommando il numero dei follicoli per ottenere un numero totale. Secondo l'ESHRE un'AFC <5-7 è indicativa di una scarsa riserva ovarica (106).

Anche per le pazienti oncologiche la valutazione dei suddetti biomarcatori (AMH, AFC) rappresenta uno strumento di fondamentale importanza per poter valutare le effettive possibilità di successo di una stimolazione ovarica controllata e orientare nel modo più corretto nonché etico la scelta della paziente. D'altra parte, gli aspetti prognostici e le priorità dovranno essere sempre esaminati e discussi con i pazienti, che hanno diritto a un opportuno "counseling". Nell'ambito dei PDTA dedicati, i pazienti sono indirizzati dai centri oncoematologici all'ambulatorio di oncofertilità, utilizzando canali preferenziali. Laddove possibile, i pazienti sono accompagnati dagli stessi oncologi o presentano epirisi utili ai fini delle opzioni di preservazione della fertilità da preferire. Nei primi contatti con la struttura, il paziente incontra il team dedicato. Successivamente il paziente può beneficiare di uno spazio che prevede la presenza esclusiva dello psicologo per poter affrontare la propria malattia, esponendo il proprio disagio, le paure, le emozioni provate e le modalità di gestione della problematica.

Sebbene nel corso degli anni si sia instaurata, in un clima di entusiasmo scientifico, una fiducia crescente nei metodi disponibili, non bisogna tralasciare il problema della sicurezza e degli eventuali rischi connessi alle suddette tecnologie. Il centro focale dell'inquadramento clinico dei singoli casi è rappresentato da un'attenta valutazione del rapporto rischi (costi)/benefici attribuendo priorità alla sicurezza della paziente nel rispetto del *primum non nocere* ippocratico. Tale obiettivo può essere ottenuto soltanto attraverso un approccio multidisciplinare atto a diversificare in maniera razionale e personalizzata le strategie attualmente disponibili.

CONFLITTO DI INTERESSI

Alessandro Conforti dichiara compensi per consulenza scientifica ricevuti da Merck. Carlo Alviggi dichiara onorari ricevuti da Merck.

BIBLIOGRAFIA

1. AIOM – AIRTUM. I nuovi numeri del cancro 2016. http://www.registri-tumori.it/PDF/AIOM2016/I_numeri_del_cancro_2016.pdf
2. AIOM – AIRTUM. I nuovi numeri del cancro 2015. http://www.registri-tumori.it/PDF/AIOM2015/I_numeri_del_cancro_2015.pdf
3. Lee SJ, Schover LR, Partridge AH, et al. American Society of Clinical Oncology recommendations on fertility preservation in cancer patients. *J Clin Oncol* 2006;24:2917-31.
4. Lass A, Silye R, Abrams DC, et al. Follicular density in ovarian biopsy of infertile women: a novel method to assess ovarian reserve. *Hum Reprod* 1997;12:1028-31.
5. Oktay K, Nugent D, Newton H, et al. Isolation and characterization of primordial follicles from fresh and cryopreserved human ovarian tissue. *Fertil Steril* 1997; 67:481-6.
6. Faddy MJ, Gosden RG, Gougeon A, et al. Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: Implications for forecasting menopause. *Hum Reprod* 1992;7:1342-6.
7. Meirou D, Lewis H, Nugent D, et al. Subclinical depletion of primordial follicular reserve in mice treated with cyclophosphamide: clinical importance and proposed accurate investigative tool. *Hum Reprod* 1999;14:1903-7.
8. Sonmezer M, Oktay K. Fertility preservation in female patients. *Hum Reprod Update* 2004;10:251-66.
9. Linee Guida AIOM. Preservazione della fertilità nei pazienti oncologici, 2016. [http://www.aiom.it/C_Common/Download.asp?file=/Site\\$/files/doc/LG/2016_LG_AIOM_Preserv_fertil.pdf](http://www.aiom.it/C_Common/Download.asp?file=/Site$/files/doc/LG/2016_LG_AIOM_Preserv_fertil.pdf)
10. Oktay K, Hourvitz A, Sahin G, et al. Letrozole reduces estrogen and gonadotropin exposure in women with breast cancer undergoing ovarian stimulation before chemotherapy. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:3885-90.
11. Oktay K, Oktem O, Reh A, et al. Measuring the impact of chemotherapy on fertility in women with breast cancer. *J Clin Oncol* 2006;24:4044-6.
12. Sonmezer M, Oktay K. Fertility preservation in young women undergoing breast cancer therapy. *Oncologist* 2006;11:422-34.
13. Meirou D. Reproduction post-chemotherapy in young cancer patients. *Mol Cell Endocrinol* 2000;169:123-31.
14. Stone ER, Slack RS, Vioielli A, et al. Rate of chemotherapy related amenorrhea associated with adjuvant adriamycin and cytoxan and adriamycin and cytoxan followed by taxol in early stage breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2000;64:61a.
15. Nabholz J, Pienkowski T, Mackey J, et al. Phase III trial comparing TAC (docetaxel, doxorubicin, cyclophosphamide) with FAC (5-fluorouracil, doxorubicin, cyclophosphamide) in the adjuvant treatment of node positive breast cancer (BC) patients: interim analysis of the BCIRG 001 study. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2002;21:36a.
16. de Bruin JP, Dorland M, Spek ER, et al. Age-related changes in the ultrastructure of the resting follicle pool in human ovaries. *Biol Reprod* 2004;70:419-24.
17. Venturella R, Lico D, Sarica A, et al. OvAge: a new methodology to quantify ovarian reserve combining clinical, biochemical and 3D-ultrasonographic parameters. *J Ovarian Res* 2015;8:21.
18. Howell SJ, Shalet SM. Spermatogenesis after cancer treatment: damage and recovery. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2005;34:12-7.
19. Hoshi M, Takami M, Ieguchi M, et al. Fertility following treatment of high-grade malignant bone and soft tissue tumors in young adults. *Mol Clin Oncol* 2015;3:367-74.
20. Kiserud CE, Fosså A, Bjørø T, et al. Gonadal function in male patients after treatment for malignant lymphomas, with emphasis on chemotherapy. *Br J Cancer* 2009;100:455-63.
21. Chaudhary UB, Haldas JR. Long-term complications of chemotherapy for germ cell tumours. *Drugs* 2003;63:1565-77.
22. DeSantis M, Albrecht W, Höltl W, et al. Impact of cytotoxic treatment on long-term fertility in patients with germ-cell cancer. *Int J Cancer* 1999;83:864-5.
23. Falorio S, Biasoli I, Luminari S, et al. Risk factors for impaired gonadal function in female Hodgkin lymphoma survivors: final analysis of a retrospective multicenter joint study from Italian and Brazilian institutions. *Hematol Oncol*

- 2013;31:72-8.
24. van der Kaaij MA, van Echten-Arends J, Heutte N, et al. Cryopreservation, semen use and the likelihood of fatherhood in male Hodgkin lymphoma survivors: an EORTC-GELA Lymphoma Group cohort study. *Hum Reprod* 2014;29:525-33.
 25. Tempest HG, Ko E, Chan P, et al. Sperm aneuploidy frequencies analysed before and after chemotherapy in testicular cancer and Hodgkin's lymphoma patients. *Hum Reprod* 2008;23:251-8.
 26. Ogilvy-Stuart AL, Shalet SM. Effect of radiation on the human reproductive system. *Environ Health Perspect* 1993;101(suppl 2):109-16.
 27. Wallace WH, Thomson AB, Saran F, et al. Predicting age of ovarian failure after radiation to a field that includes the ovaries. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005;62:738-44.
 28. Morice P, Uzan C, Gouy S, et al. Effects of radiotherapy (external and/or internal) and chemotherapy on female fertility. *Bull Acad Natl Med* 2010;194:481-92.
 29. Lushbaugh CC, Casarett GW. The effects of gonadal irradiation in clinical radiation therapy: a review. *Cancer* 1976;37(suppl 2):1111-25.
 30. Wallace WH, Shalet SM, Hendry JH, et al. Ovarian failure following abdominal irradiation in childhood: The radiosensitivity of the human oocyte. *Br J Radiol* 1989;62:995-8.
 31. Bath LE, Critchley HO, Chambers SE, et al. Ovarian and uterine characteristics after total body irradiation in childhood and adolescence: Response to sex steroid replacement. *Br J Obstet Gynaecol* 1999;106:1265-72.
 32. Wallace WH, Thomson AB, Kelsey TW. The radiosensitivity of the human oocyte. *Hum Reprod* 2003;18:117-21.
 33. Yarbro CH, Pery MC. The effect of cancer therapy on gonadal function. *Semin Oncol Nurs* 1985;1:3-8.
 34. Simon B, Lee SJ, Partridge AH, et al. Preserving fertility after cancer. *CA Cancer J Clin* 2005;55:211-28.
 35. Gandini L, Sgrò P, Lombardo F, et al. Effect of chemo- or radiotherapy on sperm parameters of testicular cancer patients. *Hum Reprod* 2006;21:2882-9.
 36. Soloway CT, Soloway MS, Kim SS, et al. Sexual, psychological and dyadic qualities of the prostate cancer "couple". *BJU Int* 2005;95:780-5.
 37. Borgmann-Staudt A, Rendtorff R, Reinmuth S, et al. Fertility after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation in childhood and adolescence. *Bone Marrow Transplant* 2012;47:271-6.
 38. Gradishar WJ, Schilsky RL. Effects of cancer treatment on the reproductive system. *Crit Rev Oncol Hematol* 1988;8:153-71.
 39. Loren AW, Mangu PB, Nohr Beck L, et al. Fertility preservation for patients with cancer: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline update. *J Clin Oncol* 2013;31:2500.
 40. Picton HM, Wyns C, Anderson RA, et al. A European perspective on testicular tissue cryopreservation for fertility preservation in prepubertal and adolescent boys. *Hum Reprod* 2015;30:2463-75.
 41. Williams DH. Sperm banking and the cancer patient. *Ther Adv Urol* 2010;2:19-34.
 42. Linee Guida AIOM. Preservazione della fertilità nei pazienti oncologici, 2015. [http://www.aiom.it/C_Common/Download.asp?file=/Site\\$/files/doc/LG/2015_LG_AIOM_Preserv_Fertil.pdf](http://www.aiom.it/C_Common/Download.asp?file=/Site$/files/doc/LG/2015_LG_AIOM_Preserv_Fertil.pdf)
 43. Bizet P, Saias-Magnan J, Jouve E, et al. Sperm cryopreservation before cancer treatment: a 15-year monocentric experience. *Reprod Biomed Online* 2012;24:321-30.
 44. Botchan A, Karpol S, Lehavi O, et al. Preservation of sperm of cancer patients: extent of use and pregnancy outcome in a tertiary infertility center. *Asian J Androl* 2013;15:382-6.
 45. Freour T, Mirallie S, Jean M, et al. Sperm banking and assisted reproductive outcome in men with cancer: a 10 years' experience. *Int J Clin Oncol* 2012;17:598-603.
 46. Ferrari S, Paffoni A, Filippi F, et al. Sperm cryoconservation and reproductive outcome in male cancer patients: a systematic review. *Reprod Biomed Online* 2016;33:29-38.
 47. Rivkees SA, Crawford JD. The relationship of gonadal activity and chemotherapy-induced gonadal damage. *JAMA* 1988;259:2123-5.
 48. Blumenfeld, Z. How to preserve fertility in young women exposed to chemotherapy? The role of GnRH agonist cotreatment in addition to cryopreservation of embryos, oocytes, or ovaries. *The oncologist* 2007;12:1044-54.
 49. Ataya K, Rao LV, Lawrence E, et al. Luteinizing hormone releasing hormone agonist inhibits cyclophosphamide induced ovarian follicular depletion in rhesus monkeys. *Biol Reprod* 1995;52:365-72.
 50. Blumenfeld Z, Eckman A. Preservation of fertility and ovarian function and minimization of chemotherapy-induced gonadotoxicity in young women by GnRH-a. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2005;34:40-3.
 51. Imai A, Sugiyama M, Furui T, et al. Direct protection by a gonadotropin-releasing hormone analog from doxorubicin-induced granulosa cell damage. *Gynecol Obstet Invest* 2007;63:102-6.
 52. Blumenfeld Z, Katz G, Evron A. An ounce of prevention is worth a pound of cure: the case for and against GnRH-agonist for fertility preservation. *Ann Oncol* 2014;25:1719-28.
 53. Del Mastro L, Ceppi M, Poggio F, et al. Gonadotropin-releasing hormone analogues for the prevention of chemotherapy-induced premature ovarian failure in cancer women: systematic review and meta-analysis of randomized trials. *Cancer Treat Rev* 2014;40:675-83.
 54. Del Mastro L, Lambertini M. Temporary ovarian suppression with gonadotropin-releasing hormone agonist during chemotherapy for fertility preservation: toward the end of the debate? *Oncologist* 2015;20:1233-5.
 55. Lambertini M, Del Mastro L, Viglietti G, et al. Ovarian function suppression in premenopausal women with early-stage breast cancer. *Curr Treat Options Oncol* 2017;18:4.
 56. Wo JY, Viswanathan AN. Impact of radiotherapy on fertility, pregnancy, and neonatal outcomes in female cancer patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2009;73:1304-12.
 57. Tomao F, Corrado G, Peccatori FA, et al. Fertility-sparing options in young women with cervical cancer. *Curr Treat Options Oncol* 2016;17:5.
 58. Dursun P, Doğan NU, Ayhan A. Oncofertility for gynecologic and non-gynecologic cancers: fertility sparing in young women of reproductive age *Crit Rev Oncol Hematol* 2014;92:258-67.
 59. Rienzi L, Gracia C, Maggiulli R, et al. Oocyte, embryo and blastocyst cryopreservation in ART: systematic review and meta-analysis comparing slow-freezing versus vitrification to produce evidence for the development of global guidance *Human Reproduction Update* 2017;23:139-55.
 60. Borini A, Cattoli M, Bulletti C, et al. Clinical efficiency of oocyte and embryo cryopreservation *Ann N Y Acad Sci* 2008;1127:49-58.
 61. Tomasi-Cont N, Lambertini M, Hulsbosch S, et al. Strategies for fertility preservation in young early breast cancer patients. *Breast* 2014;23:503-10.
 62. Munné S, Chen S, Colls P et al. Maternal age, morphology, development and chromosome abnormalities

- in over 6000 cleavage-stage embryos *Reprod Biomed Online* 2007;14:628-34.
63. Alviggi C, Andersen CY, Buehler K, et al. A new more detailed stratification of low responders to ovarian stimulation: from a poor ovarian response to a low prognosis concept. *Fertil Steril* 2016;105:1452-3.
 64. Cobo A, García-Velasco JA, Coello A, et al. Oocyte vitrification as an efficient option for elective fertility preservation. *Fertil Steril* 2016;105:755-64.e8.
 65. Boostanfar R, Jain JK, Mishell DR Jr, et al. A prospective randomized trial comparing clomiphene citrate with tamoxifen citrate for ovulation induction. *Fertil Steril* 2001;75:1024-6.
 66. Oktay K, Buyuk E, Davis O, et al. Fertility preservation in breast cancer patients: IVF and embryo cryopreservation after ovarian stimulation with tamoxifen. *Hum Reprod* 2003;18:90-5.
 67. Kim J, Turan V, Oktay K. Long-term safety of letrozole and gonadotropin stimulation for fertility preservation in women with breast cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2016;101:1364-71.
 68. Santen RJ. Recent progress in development of aromatase inhibitors. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1990;37:1029-35.
 69. Pfister CU, Martoni A, Zamagni C, et al. Effect of age and single versus multiple dose pharmacokinetics of letrozole (Femara) in breast cancer patients. *Biopharm Drug Dispos* 2001;22:191-7.
 70. Mitwally MF, Casper RF. Aromatase inhibition improves ovarian response to follicle-stimulating hormone in poor responders. *Fertil Steril* 2002;77:776-80.
 71. Mitwally MF, Casper RF. Aromatase inhibition reduces the dose of gonadotropin required for controlled ovarian hyperstimulation. *J Soc Gynecol Investig* 2004;11:406-15.
 72. Akar M, Oktay K. Restoration of ovarian endocrine function by ovarian transplantation. *Trends Endocrinol Metab* 2005;16:374-80.
 73. Reddy J, Oktay K. Ovarian stimulation and fertility preservation with the use of aromatase inhibitors in women with breast cancer. *Fertil Steril* 2012;98:1363-9.
 74. Domingo J, Garcia-Velasco JA. Oocyte cryopreservation for fertility preservation in women with cancer. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2016;23:465-9.
 75. Daniel AR, Hagan CR, Lange CA. Progesterone receptor action: defining a role in breast cancer. *Expert Rev Endocrinol Metab* 2011;6:359-69.
 76. Goldrat O, Gervy C, Englert Y, et al. Progesterone levels in letrozole associated controlled ovarian stimulation for fertility preservation in breast cancer patients. *Hum Reprod* 2015;30:2184-9.
 77. Alviggi C, Marci R, Vallone R, et al. High progesterone levels during the luteal phase related to the use of an aromatase inhibitor in breast cancer patients. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2017;21:3134-8.
 78. Conforti A, Strina I, Mollo A, et al. The efficacy of modified luteal phase support with intramuscular progesterone in IVF/ICSI cycles: a retrospective observational study. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2017;21:657-61.
 79. Joshi PA, Jackson HW, Beristain AG, et al. Progesterone induces adult mammary stem cell expansion. *Nature* 2010;465:803-7.
 80. Axlund SD, Sartorius CA. Progesterone regulation of stem and progenitor cells in normal and malignant breast. *Mol Cell Endocrinol* 2012;357:71-9.
 81. Cakmak H, Katz A, Cedars MI, et al. Effective method for emergency fertility preservation: random-start controlled ovarian stimulation. *Fertil Steril* 2013;100:1673-80.
 82. Kim JH, Kim SK, Lee HJ, et al. Efficacy of random-start controlled ovarian stimulation in cancer patients. *J Korean Med Sci* 2015;30:290-5.
 83. Oktay K, Buyuk E, Rodriguez-Wallberg KA, et al. In vitro maturation improves oocyte or embryo cryopreservation outcome in breast cancer patients undergoing ovarian stimulation for fertility preservation. *Reprod Biomed Online* 2010;20:634-8.
 84. Ellenbogen A, Shavit T, Shalom-Paz E. IVM results are comparable and may have advantages over standard IVF. *Facts Views Vis Obgyn* 2014;6:77-80.
 85. Shalom-Paz E, Almog B, Shehata F, et al. Fertility preservation for breast-cancer patients using IVM followed by oocyte or embryo vitrification. *Reprod Biomed Online* 2010;21:566-71.
 86. Maman E, Meirou D, Brengauz M, et al. Luteal phase oocyte retrieval and in vitro maturation is an optional procedure for urgent fertility preservation. *Fertil Steril* 2011;95:64-7.
 87. Partridge AH, Gelber S, Peppercorn J, et al. Web-based survey of fertility issues in young women with breast cancer. *J Clin Oncol* 2004;22:4174-83.
 88. Andersen CY. Success and challenges in fertility preservation after ovarian tissue grafting. *Lancet* 2015;385:1947-8.
 89. Cittadini E, Barraco G, Benigno M, et al. Strategie e tecniche per la preservazione della fertilità nel paziente oncologico. Palermo: Cofese Edizioni, 2007.
 90. Muñoz M, Santaballa A, Seguí MA, et al. SEOM clinical guideline of fertility preservation and reproduction in cancer patients. *Clin Transl Oncol* 2016;18:1229-36.
 91. Donnez J, Squifflet J, Van Eyks As, et al. Restoration of ovarian function in orthotopically transplanted cryopreserved ovarian tissue: a pilot experience. *Reprod Biomed Online* 2008;16:694-704.
 92. Andersen CY, Rosendahl M, Byskov AG, et al. Two successful pregnancies following autotransplantation of frozen/thawed ovarian tissue. *Human Reproduction* 2008;23:2266-72.
 93. von Wolff M, Donnez J, Hovatta O, et al. Cryopreservation and autotransplantation of human ovarian tissue prior to cytotoxic therapy--a technique in its infancy but already successful in fertility preservation. *Eur J Cancer* 2009;45:1547-53.
 94. Donnez J, Dolmans MM, Demylle D, et al. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet* 2004;364:1405-10.
 95. Donnez J, Martinez-Madrid B, Jadane P, et al. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: a review. *Hum Reprod Update* 2006;12:519-53.
 96. Schmidt KL, Andersen CY, Loft A, et al. Follow-up of ovarian function post-chemotherapy following ovarian cryopreservation and transplantation. *Hum Reprod* 2005;20:3539-46.
 97. Demeestere I, Simon P, Buxant F, et al. Ovarian function and spontaneous pregnancy after combined heterotopic and orthotopic cryopreserved ovarian tissue transplantation in a patient previously treated with bone marrow transplantation: case report. *Hum Reprod* 2006;21:2010-6.
 98. Suzuki N, Yoshioka N, Takae S, et al. Successful fertility preservation following ovarian tissue vitrification in patients with primary ovarian insufficiency. *Hum Reprod* 2015;30:608-15.
 99. De Vos M, Smits J, Woodruff TK. Fertility preservation in women with cancer. *Lancet* 2014;384:1302-10.
 100. Rosendahl M, Loft A, Byskov AG, et al. Biochemical pregnancy after fertilization of an oocyte aspirated from a heterotopic autotransplant of cryopreserved ovarian tissue: case report. *Hum Reprod* 2006;21:2006-9.

101. Donnez J, Dolmans MM, Pellicer A, et al. Restoration of ovarian activity and pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue: a review of 60 cases of reimplantation. *Fertil Steril* 2013;99:1503-13.
102. Jensen AK, Kristensen SG, Macklon KT, et al. Outcomes of transplantations of cryopreserved ovarian tissue to 41 women in Denmark. *Hum Reprod* 2015;30:2838-45.
103. Meirou D, Hardan I, Dor J, et al. Searching for evidence of disease and malignant cell contamination in ovarian tissue stored from hematologic cancer patients. *Hum Reprod* 2008;23:1007-13.
104. Rosendahl M, Greve T, Andersen CY. The safety of transplanting cryopreserved ovarian tissue in cancer patients: a review of the literature. *J Assist Reprod Genet* 2013;30:11-24.
105. Zurlo MC, Vallone F. Crioconservazione dei gameti e patologie oncologiche femminili: i dilemmi della maternità. *Mimesis, Quaderni di bioetica* 2015:273-88. <http://hdl.handle.net/11588/615131>.
106. Ferraretti AP, La Marca A, Fauser BC, et al., ESHRE working group on poor ovarian response definition. ESHRE consensus on the definition of 'poor response' to ovarian stimulation for in vitro fertilization: the Bologna criteria. *Hum Reprod* 2011;26:1616-24.
107. Broekmans FJ, de Ziegler D, Howles CM, et al. The antral follicle count: practical recommendations for better standardization. *Fertil Steril* 2010;94:1044-51.

The role of the laboratory in the evaluation of male factor in couple infertility

Rosario Pivonello^{1*}, Donatella Paoli^{2*}, Ciro Salzano¹, Francesco Pallotti², Cristina de Angelis³, Mariano Galdiero³, Giulia Senofonte², Giacomo Galdiero¹, Davide Menafra¹, Francesco Garifalos¹, Annamaria Colao¹, Andrea Lenzi²

¹Dipartimento di Medicina Clinica e Chirurgia, Sezione di Endocrinologia, Centro di Andrologia e Medicina della Riproduzione e della Sessualità Maschile e Femminile, Università Federico II di Napoli, Napoli

²Laboratorio di Seminologia e Banca del Seme, Dipartimento di Medicina Sperimentale, Università di Roma "La Sapienza", Roma

³I.O.S. & Coleman Srl, Napoli

*Authors equally contributed to the manuscript

ABSTRACT

The evaluation of male factor in couple infertility aims at identifying risk factors and treatable causes of male infertility to offer an adequate counselling and to choose the best treatment options to improve fertility outcomes, including either the chance of a spontaneous conception or the outcome of assisted reproduction. The first approach to the infertile man requires an accurate assessment of medical history as well as a general and andrological anamnesis and physical examination. The evaluation is based on a series of laboratory procedures, comprising semen analysis, the assessment of hormone profile, the eventual microbiological tests for the investigation of urogenital tract infections and genetic testing. These laboratory procedures are associated with scrotal ultrasound, aimed at investigating the structure of testis, funiculus, epididymis, vasa and pampiniform plexus, and transrectal ultrasound, aimed at providing information on prostate and seminal vesicles. Semen analysis, performed according to WHO 2010 guidelines, is fundamental to assess the male fertility potential. Hormone profile assessment evaluates the function of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis and is useful to establish a diagnosis of primary or secondary testis failure and to choose the most appropriate therapeutic approach. Microbiological assessment can be useful in case of clinical suspicion of urogenital tract infections, which might exert a detrimental effect on male fertility. Genetic testing, in particular karyotype analysis, and the assessment of Y chromosome microdeletions should be performed in case of clinical suspicion or in case of a severe reduction of sperm count.

INTRODUCTION

Couple infertility is defined as the inability of a couple to procreate, despite unprotected sexual intercourse, over a period of 12-24 months. The WHO estimates that ~15-20% of couples experience fertility problems in industrialized countries (1). Couple infertility is related to a female factor in 35%, a male factor in 30% and both female and male factors in 20% of cases, whereas in 15% of cases the cause of infertility remains unknown (1). Couple infertility can be classified as primary, if the couple has never achieved conception, or secondary, if the couple has previously achieved a conception (2).

Regarding the male partner, it is estimated that >50 millions of men suffer from infertility (2, 3); nevertheless, <10% of men seek medical assistance for fertility-related

problems (4). Male infertility might be due to pre-testicular (hypothalamic-pituitary dysfunction), testicular (testis disease) and post-testicular (urogenital obstructions, accessory gland disease, vasectomy) factors (2). The main factors associated to male infertility are congenital or acquired urogenital abnormalities or diseases, neoplastic diseases, endocrine disturbances, genetic disorders and immunological or iatrogenic factors (5); moreover, risk factors also include aging, stress, obesity and metabolic disorders, exposure to physical and chemical agents and abuse of voluptuary substances (6). In 30-40% of cases, infertility remains unexplained (idiopathic infertility); this condition is assumed to be determined by a complex coexistence of several factors or by factors that are difficult to identify, such as environmental pollution, oxidative stress damage and

Correspondence to: Rosario Pivonello, Dipartimento di Medicina Clinica e Chirurgia, Sezione di Endocrinologia, Centro di Andrologia e Medicina della Riproduzione e della Sessualità Maschile e Femminile, Università "Federico II" di Napoli, Via Sergio Pansini 5, 80131 Napoli. Tel. 0817464983, Fax 0817464983, E-mail rosario.pivonello@unina.it

Ricevuto: 12.06.2017

Revisionato: 01.08.2017

Accettato: 01.09.2017

Pubblicato on-line: 15.11.2017

DOI: 10.19186/BC_2017.048

genetic or epigenetic disorders (7). The type of infertility, the duration of infertility, the results of semen analysis and both age and fertility status of the female partner are considered the main prognostic factors and should be always considered during the evaluation of male factor in the couple infertility (7).

THE EVALUATION OF MALE FACTOR

The evaluation of male factor in couple infertility and the diagnosis of male infertility should be started after the diagnosis of couple infertility is established and aims at identifying and removing infertility risk factors, in order to improve the chance of a spontaneous conception, or to ameliorate the outcome of assisted reproductive techniques (ART).

The first approach to the infertile man requires an accurate medical anamnesis and a general and andrological physical examination. The anamnesis should provide information regarding duration and type of infertility, history or presence of chronic diseases or andrological disease, lifestyle habits, previous or actual concomitant medication use and abuse, exposure to specific environmental pollutants or toxic agents, as well as female partner age and cofactors of infertility (8).

The andrological physical examination involves the evaluation of urogenital system, as well as secondary sexual characteristics (8). The assessment of testis volume by orchidometer provides an important clinical predictive factor for semen quality (8). Furthermore, the digital rectal examination might provide information on prostate disease, whereas penile examination might suggest the presence of infections (8). Scrotal and, eventually, transrectal ultrasound are complementary to the andrological examination, as they provide a better definition of the structure of the entire urogenital system, mainly testes and accessory glands (8).

Semen analysis and the assessment of hormone profile are necessary to complete the initial evaluation (8). Semen analysis is the first step and the cornerstone of the laboratory evaluation of the infertile man and offers an estimation of the fertility potential by the assessment of the classical macroscopic (pH, volume, appearance, liquefaction, viscosity) and microscopic (concentration, motility, morphology) semen parameters (9). Moreover, semen analysis provides additional useful information concerning the possible presence of a concomitant hypogonadism, as well as inflammation, obstruction and autoimmunity (9). Semen analysis may identify oligozoospermia (reduction of sperm concentration), asthenozoospermia (reduction of sperm motility) and teratozoospermia (alteration of sperm morphology) (9). Defects in sperm concentration, motility and/or morphology can coexist (e.g. oligoasthenozoospermia or oligoasthenoteratozoospermia) or can be found as isolated defects (7). At least two evaluations are required to confirm the diagnosis of an impairment of semen quality. In case of lack of spermatozoa detection, semen sample should be centrifuged and pellet should be checked for the presence or absence of spermatozoa (9);

if spermatozoa are found after semen sample centrifugation, the diagnosis is cryptozoospermia, whereas the complete absence of spermatozoa is defined as azoospermia (9). In case of azoospermia or severe oligozoospermia, further investigation should evaluate obstructive or non-obstructive causes (7). Additional tests on semen samples, such as the evaluation of DNA integrity and reactive oxygen species (ROS), as well as the assessment of anti-spermatozoa antibodies, are not considered as routine procedures, but can give additional important information on the causative process underlying the infertility (9). The evidence of physiological semen parameters, namely parameters above the 5th centile of the WHO laboratory manual distribution of semen samples of fertile subjects, which is shown in Table 1, can induce the temporarily suspension of the investigations on the male partner and focus on female partner.

The second step in the laboratory evaluation of male infertility is represented by the assessment of hormone profile. The quantification of serum follicle-stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH) and total testosterone (T) concentrations, together with prolactin (PRL) levels in specific cases, allows the differentiation between primary and secondary testiculopathy and can suggest the presence of specific endocrine disease (10).

The basic laboratory evaluation is generally associated with scrotal and transrectal ultrasound. Scrotal ultrasound should be proposed to all infertile men. The examination is conducted by using a high-resolution linear ultrasound probe, 7.5-12 MHz, and should evaluate testis volume, shape, firmness and structure. Scrotal scans may be useful to clarify ambiguous findings on clinical examination, to obtain further information regarding funiculus, testis and epididymis structures, vasa and pampiniform plexus, to find signs of obstruction, including dilatation of rete testis, enlarged epididymis with cystic lesions or absent vas deferens, and to demonstrate signs of testicular dysgenesis (11). Transrectal ultrasound is indicated in case of azoospermia or in case of a severe oligozoospermia, associated to a reduction of semen volume and pH, in order to perform a diagnosis of obstructive disease (11). Transrectal ultrasound signs of obstruction are prostatic and seminal vesicle congestion, prostatic and periprostatic retention cysts, midline prostate cysts and dilated seminal vesicles (11).

Table 1
Lower reference limits for semen parameters (WHO, 2010)

Parameter	5 th centile (95% CI)
Semen volume (mL)	1.5 (1.4-1.7)
Total sperm count (10 ⁶ per ejaculate)	39 (33-46)
Sperm concentration (10 ⁶ per mL)	15 (12-16)
Total motility (PR + NP, %)	40 (38-42)
Progressive motility (%)	32 (31-34)
Normal morphology (%)	4 (3-4)

CI, confidence intervals; PR, progressive; NP, not progressive.

Moreover, transrectal ultrasound is indicated in case of suspicion of prostatic inflammation and/or seminal vesiculitis (11).

The laboratory evaluation of the infertile man may include the microbiological assessment and the genetic testing in specific clinical situations. The microbiology assessment for the evaluation of urogenital tract infections, which might exert a detrimental effect on fertility, can be useful in case of specific clinical suspicion, although many of those infections are asymptomatic (7, 8). Semen culture and/or urethral swab represent the standard procedures to assess the presence of pathogens in semen and in the urogenital tract and to monitor the efficacy of antibiotic treatment.

Genetic testing should be performed in case of specific clinical suspicion or in case of a severe reduction of sperm concentration or absence of spermatozoa at semen analysis (7, 8). The three most common genetic factors known to be related to infertility are: 1) chromosomal abnormalities associated with an impairment of spermatogenesis, 2) Y-chromosome microdeletions generally associated with a severe impairment of spermatogenesis, and 3) cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (*CFTR*) gene mutations, possibly associated with congenital monolateral or bilateral absence of the vas deferens, cryptozoospermia or azoospermia (7, 8). These analyses are recommended for men with a sperm concentration <5 million/mL, since severe oligozoospermia or azoospermia are frequently associated to genetic alterations (7, 8). Lastly, microsurgical or aspiration procedures should be offered to evaluate the presence of spermatozoa within the testis

or epididymis in case of azoospermia (7). Simplified diagnostic flowcharts for male infertility, according to semen parameters alterations, are shown in Figures 1 to 3.

SEMEN ANALYSIS

Semen analysis should be considered as the first laboratory investigation to assess fertility potential, since it may suggest the requirement for medical or surgical treatment or the enrolment in ART programs. Semen analysis consists of 3 phases: pre-analytical, analytical and post-analytical (9). The pre-analytical phase consists on the verification of correct application of the procedures for sample processing. The semen sample must be collected by masturbation after 2-7 days of sexual abstinence, in a sterile urine sample container, which must be placed in an incubator at 37 °C to allow the liquefaction of semen, and subsequently transferred to a graduated conical tube (9). The analytic phase comprises two different steps, the macroscopic and microscopic evaluation of semen sample. During the macroscopic examination, semen volume, pH, appearance, liquefaction and viscosity are evaluated. Reference limits for semen characteristics are the following: semen volume 1.5-6.8 mL; pH >7, appearance grey-opalescent, liquefaction should be complete within 15 min to 1 h, viscosity should be evaluated with a plastic disposable pipette allowing the semen sample to drop by gravity (a normal semen sample leaves the pipette in small discrete drops, without forming any thread) (9). Volume examination can suggest specific diseases: in particular, a severe reduction in semen volume (<1.5 mL) might be

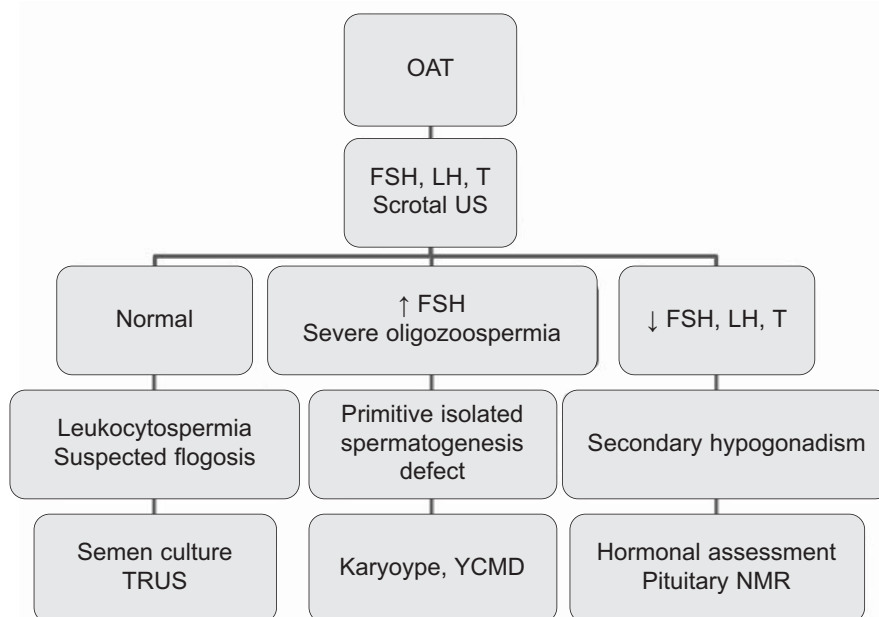


Figure 1

Diagnostic flowchart of oligo-astheno-teratozoospermia (OAT).

FSH, follicle-stimulating hormone; LH, luteinizing hormone; T, testosterone; US, ultrasound; TRUS, transrectal ultrasound; YCMD, Y chromosome microdeletion; NMR, nuclear magnetic resonance.

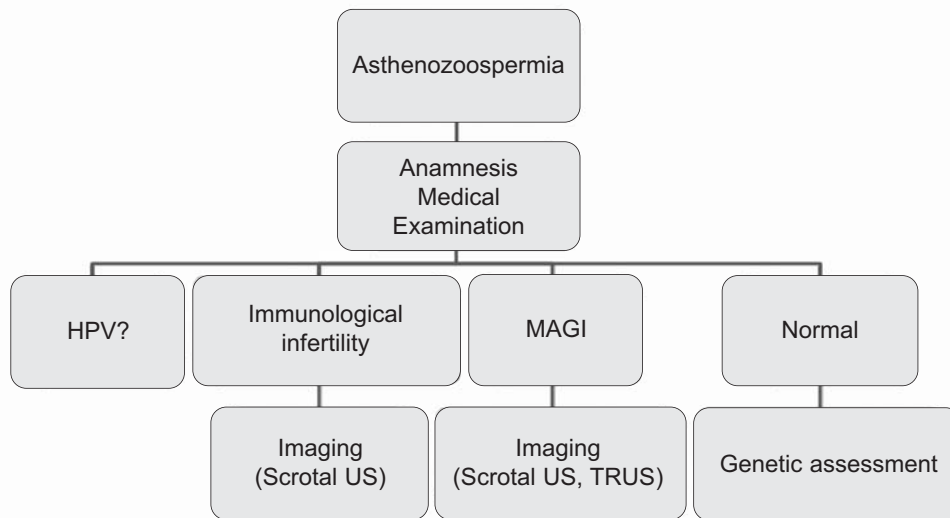


Figure 2

Diagnostic flowchart of asthenozoospermia.

HPV, Human papillomavirus; MAGI, male-accessory gland infections; US, ultrasound; TRUS, transrectal ultrasound.

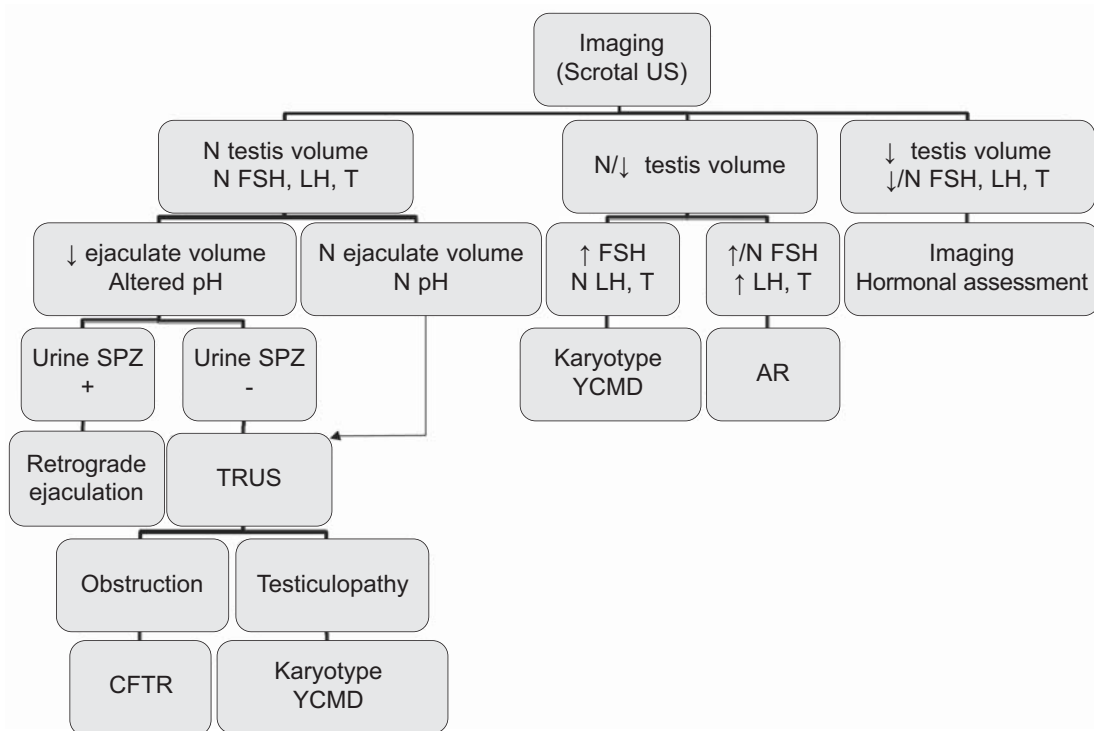


Figure 3

Diagnostic flowchart of azoospermia.

N, normal; FSH, follicle-stimulating hormone; LH, luteinizing hormone; T, testosterone; SPZ, spermatozoa; YCMD, Y chromosome microdeletion; AR, androgen receptor; TRUS, transrectal ultrasound; CFTR, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene.

suggestive of obstruction, congenital absence of vas deferens or seminal vesicles hypoplasia, or hypogonadism; conversely, increased semen volume (>6.8 mL) may be suggestive of inflammatory disease. Semen pH is important to suggest obstructive disease or seminal vesicles disease: a pH value <7, associated with a low semen volume, may be indicative a hyposecretive

disease of seminal vesicles or a bilateral obstruction of ejaculatory ducts and/or vas deferens; a pH value >8 may be indicative of a hypersecretive or flogistic disease of seminal vesicles (9). The semen physiological appearance is grey-opalescent; otherwise, it may be clear if the cell component (spermatozoa, leucocytes, epithelial cells) is poor, red-brown in the presence of

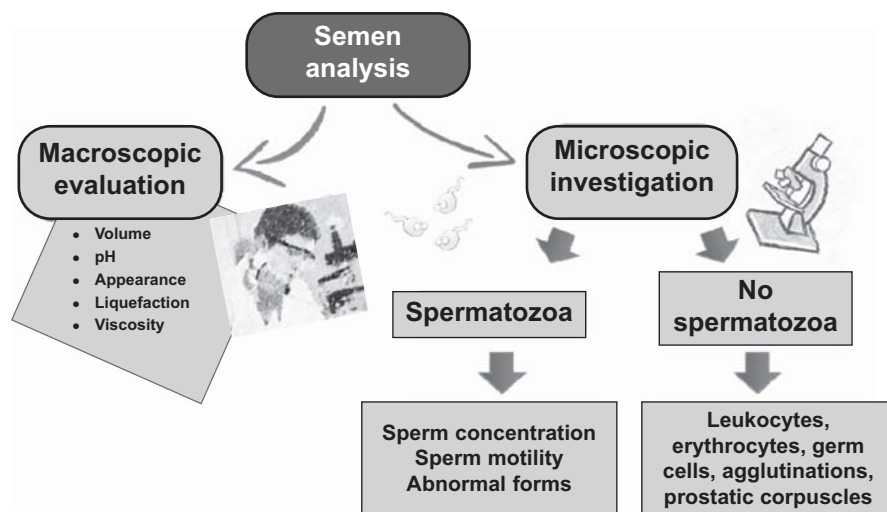


Figure 4
Semen analysis pathway.

hemospermia, whitish if composed exclusively by prostate secretion and yellowish if blood pigments are present, or following drug intake or in case of pyospermia. Lastly, the macroscopic evaluation of both liquefaction and viscosity is indicative of acute or chronic inflammatory disease or congenital alterations of ancillary gland secretive function (9). During the microscopic phase, the cell and non-cell components are evaluated. The evaluation of spermatozoa includes the assessment of sperm concentration, motility and morphology (9). Oligozoospermia can be due to a wide spectrum of diseases, caused by primary or secondary testis failure (7, 8). Instead, azoospermia can be due to obstructive or non-obstructive diseases. Azoospermia, associated to a whitish semen appearance, low semen volume and pH <7.0, is almost always due to urogenital tract obstruction, whereas azoospermia associated to a normal volume and pH >7.2 is probably non-obstructive (7-9). Sperm motility is described in terms of percentage of progressive, non-progressive and immotile spermatozoa. Reduced motility is related to almost all known andrological conditions. Conversely, spermatozoa akinesia may be linked to specific alterations of the microtubules located to the tail (e.g., immotile cilia syndrome associated with Kartagener syndrome) (7, 8). The evaluation of sperm morphology, expressed as percentage of spermatozoa with normal morphology, can suggest altered cell structure involving the different regions of the spermatozoa, head, neck or tail; however, specific types of morphological alterations cannot be directly linked to specific andrological diseases (9). Among the non-spermatogenic components of semen, leukocytes, erythrocytes, germline elements, epithelial cells, spermatozoa agglutinations and prostate corpuscles should be evaluated. Increased seminal leukocyte concentration ($>1 \times 10^9/L$) suggests a genital inflammation; the presence of erythrocytes suggests microhemorrhage or inflammatory disease (9). Germline

elements are always present in the ejaculate and can increase after hormone treatment or in case of testis damage. In case of inflammatory disease, increased exfoliation of the urogenital tract can determine an increase in the number of epithelial cells in semen (9). Spermatozoa agglutinations are aggregates composed of spermatozoa or mixed cells (spermatozoa and leukocytes and/or other cells) and can be suggestive of autoimmunity. Lastly, prostate corpuscles can be found in semen, although their clinical significance is not yet clear (12); nevertheless, the presence of prostate corpuscles in seminal fluid might suggest an excessive desquamation of prostate epithelium, which might indicate an alteration of secretory function (12). The semen analysis report should include patient data, findings derived from semen analysis and reference values according to the 2010 edition of the WHO Laboratory Manual for the examination and processing of human semen (Table 1) (13). A schematic representation of procedures and methods for semen analysis is provided in Figure 4.

ASSESSMENT OF HORMONE PROFILE

The assessment of hormone profile is a crucial step in the laboratory evaluation of male infertility, although endocrine causes of infertility are considered uncommon (8). The evaluation of the hormone profile allows the differential diagnosis of a primary testis failure, which accounts for ~75% of cases and directly involves the spermatogenesis, or of a secondary testis failure, accounting for 4-5% of cases, determined by a hypothalamus-pituitary disease (8). Furthermore, hormone profile allows estimating the entity of damage of the seminiferous tubules system (8). The evaluation of hormone profile mainly includes the measurement of serum FSH, LH and T levels, which are considered sufficient as a first-line approach in all infertile men, since the alteration of these hormones may suggest specific

clinical conditions. Increased concentrations of FSH and LH, associated with reduced T concentrations, indicate a primary hypogonadism and testis failure, whereas normal/low FSH and LH and reduced T concentrations suggest a secondary hypogonadism, therefore requiring a complete evaluation of pituitary function (8). It is noteworthy that T concentrations should be considered in association with sex-hormone binding globulin (SHBG) concentrations in order to determine the levels of free T, which represents its biologically active form (8). In specific cases, adrenal or thyroid hormones evaluation can also be considered to exclude rare male infertility-related disease, such as congenital adrenal hyperplasia, Cushing's syndrome or thyroid disease (8). Although it is important to perform a complete evaluation of hormone concentrations in men with impaired fertility, hormone profile is usually unaltered and is found to be abnormal only in specific endocrine diseases (7).

Serum FSH concentrations are a useful marker of Sertoli cells function and appear to be an indirect marker of spermatogenic function. An increase in FSH concentrations (>7-8 UI/L) is indicative of a reduction of germ cells and total sperm count and testis volume, suggesting a primary testiculopathy (7, 8). Nevertheless, physiological serum FSH concentrations do not guarantee the presence of intact spermatogenesis. FSH concentrations correlate with the number of spermatogonia; in case of significantly reduced number or absence of spermatogonia, FSH concentrations are usually increased, whereas FSH values are generally physiological in case of normal number of spermatogonia, even if maturation arrest during spermatogenesis has occurred (7). Therefore, FSH concentrations in relation to the status of spermatogenesis should be interpreted with caution. Furthermore, it is important to consider that serum FSH concentrations are a useful predictive factor for FSH treatment response (14).

Inhibin B, a glycoprotein produced by Sertoli cells, but also by spermatocytes and spermatids, can be considered a useful marker of Sertoli cell function. Inhibin B is positively correlated with Sertoli cell number and negatively correlated with FSH concentrations, as an effect of the negative feedback exerted by inhibin B on FSH production (15). Therefore, inhibin B concentrations are low or undetectable in men with primary testis failure, in the Sertoli cell only syndrome and in the early maturation arrest of spermatogenesis, whereas physiological concentrations are found in case of late maturation arrest and in obstructive disease (15). Unfortunately, the overlap of inhibin B concentrations between fertile and infertile men, as well as between subjects with normal or inadequate semen quality, limits the reliability of inhibin B assessment in the clinical work-up of infertility (15).

Lastly, the evaluation of different testis products, such as anti-Müllerian hormone (AMH) and insulin-like factor-3 (INSL3), should not be considered as first-level test in the evaluation of hormone profile of infertile men. AMH is produced by foetal Sertoli cells and induces regression of

Müllerian structures during male foetal development, but its role in the adult men is uncertain (16). Nevertheless, AMH is a useful marker in the differentiation between anorchia and cryptorchidism, since it is absent in men affected by anorchia and generally detectable in men with bilateral cryptorchidism (16). AMH concentrations in serum are low in men with primary testis failure, but are not useful to discriminate between men with or without oligozoospermia or in the evaluation of azoospermic men (16). INSL3 is secreted by Leydig cells and is positively correlated with T levels. The role of INSL3 in adult men is largely unknown, however, low concentrations of INSL3 are observed in men with Leydig cell dysfunction (primary hypogonadism), as well as in men with hypothalamus-pituitary dysfunction (secondary hypogonadism) (17).

MICROBIOLOGICAL ASSESSMENT

Infections of the male urogenital tract are potentially curable causes of infertility (8); nevertheless, male infertility has frequently a multifactorial etiology, therefore making it challenging to establish the relative clinical significance of infections in the urogenital tract. Both extracellular and intracellular pathogens are responsible for common urogenital tract infections and have been investigated in relation to their potential detrimental effect on male fertility (18). Extracellular pathogens contaminate semen plasma and, therefore, might be detected by semen culture; conversely, the detection of intracellular pathogens usually requires urethral swab and microscope analysis of samples, but semen culture may be occasionally useful in case intracellular pathogen contamination of semen has occurred (18). The clinical manifestations of urogenital tract infections mainly include prostatic-vesiculitis and epididymo-orchitis; these conditions may present in both acute and chronic form, and are associated with a clinical syndrome, which mainly include abdominal or scrotal pain, pollakiuria and dysuria (18). Prostatitis is the most frequent clinical manifestation of urogenital tract infections. Indeed, ~10% of men experience symptoms or signs of prostate inflammation; pelvic pain and urinary discomfort are symptoms of acute and chronic inflammation, whereas hematospermia and fever, associated with severe pelvic pain, could manifest in case of severe acute prostatitis. Nevertheless, only 5-10% of patients manifesting these symptoms are diagnosed with microbial prostatitis. Vesiculitis are isolated or associated with prostatitis, as prostatic-vesiculitis, with clinical manifestations, which are not clearly distinguishable from prostatitis. Acute and chronic epididymitis usually manifest with abdominal and scrotal pain; moreover, acute epididymitis is also typically associated with severe pain and swelling of the epididymis. Acute and chronic orchitis usually manifests with scrotal and abdominal pain; moreover, acute orchitis is often associated with testis swelling, but may be asymptomatic in ~25% of cases (8, 18). Epididymitis and orchitis are often associated in a unique clinical disease, known as epididymo-orchitis (18). Testicular atrophy, with permanent loss of spermatogenesis, is an important

complication of chronic epididymo-orchitis (18). The identification of bacteriospermia ($\geq 10^3$ cfu/mL of bacteria in the ejaculate) or leukocytospermia ($> 10^6$ leukocytes/mL in the ejaculate) and/or increased bacteria or leukocytes in prostate secretions, detected by Stamey Mears test, either in presence or absence of glans lesions, can suggest the presence of infections and require microbiological semen culture and urethral swab (8, 9). The most common alterations of semen quality associated to infections of the urogenital tract are represented by pH > 8 and increased semen viscosity, together with asthenozoospermia; nevertheless, some urogenital pathogens may determine an impairment of sperm morphology and severely reduce total sperm concentration, and might also result in azoospermia (9). An impairment of spermatogenesis and spermatozoa function, and/or agglutination of motile spermatozoa, were described as related to infections. Furthermore, the inflammation and the oxidative stress related to infections can cause spermatozoa apoptosis, impairment of sperm motility and reduction of fertilization potential (19).

The common diagnostic laboratory approaches aimed at identifying infections possibly related to the impairment of male fertility are shown in Table 2. Enterobacteriaceae, Gram-positive cocci and *Gardnerella vaginalis* represent the major classes of bacteria isolated from semen or urethral swab samples (20). Enterobacteriaceae are the most common cause of non-sexually transmitted epididymo-orchitis, which contribute for 65-80% of the total cases of acute or chronic prostatitis (20). The effects of enterobacteriaceae and Gram-positive cocci on semen quality have been

clearly investigated, in particular for *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis*, which are extracellular bacteria involved in both acute and chronic prostatitis and epididymo-orchitis (20, 21). Both infections are associated to a reduction of sperm concentration and motility and impairment of acrosomal reaction. *Gardnerella vaginalis* is an extracellular bacterium involved in acute urethritis and is very commonly detected in semen samples from men of infertile couples, although its effect on semen quality and fertility is still debated (22). Among sexually transmitted pathogens, *Neisseria gonorrhoeae* (*N. gonorrhoeae*), *Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*), *Mycoplasma spp.*, *Ureaplasma spp.* and *Treponema pallidum* (*T. pallidum*) were associated to male infertility (19). The prevalence of *N. gonorrhoeae* infections in infertile men is ~6.5%. *N. gonorrhoeae* is an extracellular bacterium mainly responsible for both acute and chronic urethritis, but the effect on semen quality and fertility has not been specifically addressed (23). The prevalence of *C. trachomatis* infections in male partners of infertile couples varies from 0.4% to 42.3% (24). *C. trachomatis* is an intracellular bacterium mainly responsible for both acute and chronic urethritis; moreover, *C. trachomatis* infections may also cause retrograde acute epididymitis and orchitis and are increasingly accepted as a causative agent of chronic prostatitis and seminal vesiculitis (23). *C. trachomatis* infections are associated to an impairment of semen quality, in particular, a reduction of total sperm concentration, which may occasionally result in azoospermia during severe infections, and reduced sperm motility, sperm morphology and sperm viability (23,

Table 2

Pathogens and corresponding laboratory diagnostic approaches

Pathogen	Laboratory assay
Enterobacteriaceae	Cultural methods
Gram-positive cocci	Cultural methods
<i>Gardnerella vaginalis</i>	Cultural methods
<i>Chlamydia trachomatis</i>	DFA, PCR, EIA
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Cultural methods, PCR
Mycoplasmas	Cultural methods, PCR
Ureaplasmas	Cultural methods, PCR
<i>Treponema pallidum</i>	Dark-field microscopy, PCR, FTA, FTA-ABS, EIA
<i>Candida albicans</i>	Cultural methods, PCR
<i>Trichomonas vaginalis</i>	Wet mount microscopy, PCR
Human immunodeficiency virus (HIV)	EIA, immunoblotting, PCR
Hepatitis B virus (HBV)	DFA, PCR, EIA
Hepatitis C virus (HCV)	PCR, EIA
Herpes virus (HSV-1, HSV-2)	Cultural methods, DNA hybridization, PCR, EIA
Human papilloma virus (HPV)	DNA hybridization, PCR
Human cytomegalovirus (HCMV)	PCR, EIA

DFA, direct fluorescent antibody; PCR, polymerase chain reaction; EIA, enzyme immunoassay; FTA, fluorescent treponema antibody; FTA-ABS, fluorescent treponema antibody absorption test.

25). Moreover, *C. trachomatis* infection is associated to reduced spermatozoa DNA integrity, as well as premature capacitation and spermatozoa apoptosis (23, 25-27). The prevalence of *Mycoplasma genitalium* (*M. genitalium*) infections in infertile men is up to 25% (23, 28). *M. genitalium* is an intracellular mycobacterium that colonizes the reproductive tract and may be responsible for acute and chronic urethritis and chronic prostatovesiculitis (26). *M. genitalium* interacts with spermatozoa by inducing agglutination and impairment of sperm motility (21). The prevalence of *Ureaplasma urealyticum* (*U. urealyticum*) infections in infertile men varies from 5% to 42% (29). *U. urealyticum* is an intracellular mycobacterium that colonizes urethra and may be responsible for acute and chronic urethritis (29). Few studies reported negative effects of *U. urealyticum* infection on sperm motility (21, 29, 30), mediated by ROS production, spermatozoa DNA damage and apoptosis (28). The prevalence of *T. pallidum* infections in infertile men is 0.5%. *T. pallidum* is an intracellular bacterium and causative agent of syphilis; the diagnosis of infection is established by Venereal Disease Research Laboratory (VDRL) test and *T. pallidum* hemagglutination (TPHA) test. *Syphilis gummatous* lesions may cause obstruction of the epididymis and testis infiltration, therefore reducing fertility potential (22).

Fungi, parasites and viruses represent additional groups of pathogens, which can exert detrimental effects on male fertility potential (20). *Candida albicans* is the most common intracellular fungus detected in both semen culture and urethral swab samples. The prevalence of *Candida albicans* infections is 1-5% (31). *Candida albicans* is responsible for acute and chronic urethritis and was found to inhibit sperm motility and to decrease sperm viability, by inducing both agglutinations and spermatozoa ultrastructural damages (32). Few data are available regarding the role of parasites, in particular the intracellular parasite *Trichomonas vaginalis*, on male fertility potential. Trichomoniasis is most often associated with acute urethritis, but also acute and chronic epididymitis and prostatovesiculitis (33). Several studies demonstrated that trichomoniasis increases semen viscosity and reduces sperm motility and/or affects sperm morphology, probably by inducing damage to spermatozoa membrane (33).

Chronic viral infections represent a further risk factor for male infertility (34). Human immunodeficiency virus (HIV), hepatitis B virus (HBV) and hepatitis C virus (HCV), as well as herpes simplex virus (HSV), cytomegalovirus (CMV) and human papilloma virus (HPV), have been demonstrated to exert a detrimental effect on semen quality and fertility potential (35-40). HIV has been demonstrated to induce chronic urogenital tract inflammation and semen infection and to impair sperm morphology and motility (35). HBV induces spermatozoa mitochondrial dysfunction, oxidative stress and spermatozoa apoptosis (36), resulting in impaired sperm concentration, motility, morphology and viability (23). HCV infection may involve urogenital tract and was demonstrated to reduce total sperm concentration, sperm

motility and sperm morphology (23); moreover, spermatozoa mitochondrial dysfunction and increased spermatozoa DNA fragmentation were reported (23, 37). The prevalence of HSV type 1 (HSV-1) and 2 (HSV-2) infections is 5-20%. HSV-1 and HSV-2 infections were found to be associated to reduced sperm concentration and sperm motility (23, 36, 38). CMV may determine chronic urogenital inflammation and was demonstrated to infect both immature germ cells and spermatozoa; in particular, CMV may directly bind spermatozoa membrane and was demonstrated to reduce sperm motility (23, 39). HPV infection is the most common sexually transmitted disease worldwide; the majority of HPV genotypes mostly determine subclinical infections or benign condylomas, a precancerous lesion, whereas others are high-risk cancer-inducing viruses, which mostly determine cervical cancer in women and have been associated to penis cancer in men, although few data are available in regards of male HPV infection-induced cancer (40, 41). HPV was recently demonstrated to exert a role on male infertility. The prevalence of HPV infection in semen ranges between 2% and 31% in men from the general population and between 10% and 36% in men affected by idiopathic infertility (40, 41). HPV was demonstrated to bind to spermatozoa head and tail and to reduce sperm motility (36). Noteworthy, several cases of idiopathic asthenozoospermia do not present any known risk factor except for the HPV-DNA spermatozoa detection (41). A putative molecular mechanism underlying the effect of HPV infection on sperm motility might be represented by spermatozoa DNA fragmentation and apoptosis (41). Nevertheless, the clear role of HPV infection on male fertility is still questioned; HPV-positive spermatozoa have been shown to retain the fertilizing potential in natural and artificial conception, although the penetration rate was lower, compared to HPV-negative spermatozoa (41). Considering the high prevalence of HPV male genital tract infection and the role of HPV on semen quality and the risk for cancer, early diagnosis of HPV infection in semen and urethral swab samples is of major relevance (41). Recently, a high efficacy of prophylactic HPV vaccination has been demonstrated to reduce genital condyloma and HPV mean clearance time in semen of patients with HPV infection (42).

Treatment of bacterial infections aims at eradicating pathogenetic bacteria from the ejaculate or prostate-vesicles secretions, at normalizing inflammatory parameters, at improving abnormal semen parameters and at controlling the clinical syndrome. Antibiotic treatment of asymptomatic urogenital tract infections in infertile patients follows the recommendations for symptomatic conditions (18, 43). In particular, in acute prostatovesiculitis parenteral administration of high doses of antibiotics is required and is considered a life-saving treatment; after remission of infection, oral therapy can be continued for a total of 2-4 weeks. In chronic prostatovesiculitis, relatively high doses of antibiotics should be administered for 4-6 weeks after diagnosis and oral administration represents the preferred route of

treatment (43, 44). Few studies assessed the penetration of antibiotics into the epididymis and testis and, therefore, their efficacy in epididymo-orchitis; however, antibiotics should be administered for at least 2 weeks (43). In case a sexually transmitted infection is detected, antibiotic therapy is always required and treatment program should include the partner of the patient. The follow-up of treatment for infections of the urogenital tract includes the control of eradication of pathogens, which is based on bacterial counts and resistance testing (20), and the assessment of the remission or persistence of symptoms, after completion of therapy. Positivity for inflammatory parameters in the ejaculate (in absence of pathogens or after antibiotic therapy) suggests administering treatment with nonsteroidal anti-inflammatory drugs (18). Patients should be properly instructed to abstain from unprotected sexual intercourse during therapy and until symptoms have resolved and sexual partner has been adequately treated (43). It should be noted that the occurrence of persistent subfertility or infertility remains unpredictable, even if eradication of the pathogen is achieved with antibiotic treatment, and conception rate does not necessarily improve after treatment (18). Despite reports on negative effects of antibiotics on spermatogenesis or semen quality, irreversible damages are unlikely to occur (18); therefore, the most appropriate choice in case of urogenital infections should be tailored according to the severity of infection and the related risks for subfertility or infertility, the fertility potential of patient and the eventual desire or timing of parenthood. Concerning viral infections, screening of male patients seeking parenthood and specific semen washing procedures for each semen infection is strongly recommended, in order to avoid the transmission of infection to female partner and newborns and to ameliorate ART outcome.

GENETIC TESTING

Genetic disorders are responsible for ~15–30% of cases of male infertility; nevertheless, a genetic disorder might represent the underlying etiological factor of several cases of idiopathic infertility (7). The highest incidence of genetic disorders is found in patients with azoospermia and severe oligozoospermia (45). Genetic causes of infertility include chromosomal alterations, gene mutations and epigenetic disorders (45). Chromosomal alterations are determined by anomalous recombination or segregation of chromosomes during meiosis and include deletions, insertions or inversions of sections of DNA. These alterations, in particular aneuploidy, have a higher incidence (2–15%) in infertile, compared to fertile men (45). Karyotype analysis is indicated according to sperm concentration, in case of azoospermia or severe oligozoospermia (8). The most frequent syndromes associated to male infertility due to chromosomal alterations involve sex chromosomes and mainly include Klinefelter syndrome (47XXY), de la Chapelle syndrome (46XX male) and 45X/46XY mosaics; nevertheless, different chromosomal alterations, such as

autosomal translocations (Robertsonian translocations) and inversions, can be found (45–47).

The most common genetic cause of male infertility is Klinefelter syndrome, a form of primary hypogonadism associated to reduced testis volume and severe progressive tubular damage, leading to severe oligozoospermia or azoospermia. Klinefelter syndrome occurs in ~1–2/1000 of male newborns and it is diagnosed in 15% of azoospermic men (45), in ~10% of men with non-obstructive azoospermia and in ~0.6% of men with severe oligospermia (46, 47). In azoospermic men suffering from Klinefelter syndrome, TESE (Testicular Sperm Extraction) is indicated for the recovery of spermatozoa directly from the testis (45). De la Chapelle syndrome is a rare syndrome with an incidence of 1/20,000/year male, consistently determining azoospermia; therefore, TESE is not indicated in patients suffering from this syndrome (45). Y chromosome long arm microdeletions (YCMD) are the most frequent known genetic causes of severe impairment of spermatogenesis, accounting for ~10% of cases of non-obstructive azoospermia and 3–5% of severe oligozoospermia (45). YCMD involve a region of the Y chromosome containing the azoospermia factor (AZF). The assessment of YCMD is indicated in severe oligozoospermic (<5 million/mL) or azoospermic patients, since it is associated with a severe reduction of sperm concentration (45). AZF region includes genes critical for spermatogenesis, which are grouped in 3 subregions designated as AZFa, AZFb and AZFc; microdeletions in these regions are detected in ~10% of cases of non-obstructive azoospermia and in 5% of severe oligozoospermia, although the incidence and phenotype vary in different geographic areas or by ethnicity (48). AZFa, AZFb and AZFc microdeletions represent 3%, 15% and 60% of all YCMD, respectively; combined AZFb+AZFc deletions may occur. YCMD represent an important predictive negative factor for spermatozoa retrieval by TESE; indeed, in more than half of AZFc microdeletions cases, spermatozoa can be retrieved by TESE, whereas in AZFa, AZFb and combined AZFb+AZFc deletions, Sertoli cells only syndrome or maturation arrest are found by TESE (47, 48).

Mutations of single genes can rarely explain infertility. In case of specific clinical suspicion, investigation of *CFTR*, androgen receptor (*AR*), genes associated to hypogonadotropic hypogonadism (i.e., *KAL1/ANOS1*, *FGFR1*) and of mutations or deletions of *DPY19L2*, *SPATA16* and *PICK1* genes, associated to globozoospermia, can be performed (47, 48). *CFTR* gene mutations are found in up to 70% of patient with bilateral absence of the vas deferens; furthermore, obstructive azoospermia has been reported in >95% of men with cystic fibrosis (45). *AR* mutations should be investigated in severe oligozoospermic or azoospermic patients, with suspected partial androgen insensitivity syndrome; this clinical condition should be suspected in patients with high androgen sensitivity index (LH x T) and low androgenization (45). *KAL1/ANOS1* and *FGFR1* genes should be investigated in order to identify the etiology of

hypogonadotropic hypogonadism with or without anosmia (49). *DPY19L2*, *SPATA16* and *PICK1* mutations are found in infertile patients with globozoospermia, a rare alteration of sperm morphology characterized by increased spermatozoa head volume (50). Epigenetic modifications were proposed to be the underlying cause of some idiopathic male infertility conditions; epigenetic changes involve DNA methylation, post-translational histone modifications, chromatin remodeling and microRNAs up-regulation and down-regulation (51, 52). Nevertheless, the investigation of epigenetic modifications has not to be considered in the work up of male infertility.

CONCLUSIONS

The evaluation of male factor in couple infertility and the diagnosis of male infertility require a multidisciplinary approach comprising clinical and laboratory evaluations, supported by ultrasound findings. A correct diagnosis is aimed at identifying risk factors, andrological diseases and treatable causes of infertility, and contributes to provide an adequate counselling and choose the best treatment options to improve the rate of spontaneous conception or to ameliorate ART outcome. The laboratory plays a pivotal role in the diagnosis of male infertility, in particular for semen analysis and assessment of hormone profile. Practitioners should always consider that: 1) the first approach to the infertile man requires an accurate medical history and an andrological physical examination; 2) semen analysis is the cornerstone of laboratory assessment of infertility and requires expertise and controlled standardized procedures; 3) scrotal ultrasound evaluation and hormone assessment can suggest specific clinical conditions; 4) investigation of urogenital infections is useful in case of specific clinical suspicion, although many pathogens can impair fertility by inducing asymptomatic damage, and 5) genetic testing has to be performed in case of a severe reduction of sperm concentration or in case of clinical suspicion of genetic diseases associated to infertility.

CONFLICTS OF INTEREST

None.

REFERENCES

- Sharma R, Biedenharn KR, Fedor JM, et al., Lifestyle factors and reproductive health: taking control of your fertility. *Reprod Biol Endocrinol* 2013;11:66.
- Right Diagnosis.com. Statistics by country for infertility. Health Grades Inc. 2014 http://www.rightdiagnosis.com/m/male_infertility/stats-country.htm
- US Census Bureau Population estimates. US Census Bureau, Methodology and Standards Council 2011. <http://www.census.gov>
- Vital and Health Statistics. Center for Disease Control (CDC) 2006; Series 23, number 26. <http://www.cdc.gov>
- Dohle GR, Diemer T, Kopa Z, et al. European Association of Urology guidelines on vasectomy. *Eur Urol* 2012;61:159-63.
- Swan SH, Elkin EP, Fenster L. The question of declining sperm density revisited: an analysis of 101 studies published 1934-1996. *Environ Health Perspect* 2000;108:961-6.
- Jungwirth A, Giwercman A, Tournaye H, et al. European Association of Urology guidelines on male infertility: the 2012 update. *Eur Urol* 2012;62:324-32.
- Kliesch S. Diagnosis of male infertility: diagnostic work-up of the infertile man. *Eur Urol Suppl* 2014;13:73-82.
- World Health Organisation WHO. Laboratory manual for the examination and processing of human semen, 5th ed. Geneva, Switzerland: WHO Press, 2010.
- Cheer K, Trainer PJ. Evaluation of pituitary function. *Handb Clin Neurol* 2014;124:141-9.
- Lotti F, Maggi M. Ultrasound of the male genital tract in relation to male reproductive health. *Hum Reprod Update* 2015;21:56-83.
- Gandini L, Lombardo F, Paoli D, et al. Diagnostica per immagini dello spermatozoo umano. Roma: Carocci Editore, 2010.
- Gandini L, Paoli D, Lenzi A. Esame del liquido seminale. In: Antonozzi I, Gulletta E, eds. *Medicina di laboratorio, logica e patologia clinica*, 2^a ed. Padova: Piccin Editore, 2015.
- Foresta C, Selice R, Ferlin A, et al. Recombinant FSH in the treatment of oligozoospermia. *Expert Opin Biol Ther* 2009;9:659-66.
- Foresta C, Bettella A, Rossato M, et al. Inhibin B plasma concentrations in oligozoospermic subjects before and after therapy with follicle stimulating hormone. *Hum Reprod* 1999;14:906-12.
- Matuszczak E, Hermanowicz A, Komarowska M, et al. Serum AMH in physiology and pathology of male gonads. *Int J Endocrinol* 2013;2013:128907.
- Ferlin A, Garolla A, Rigon F, et al. Changes in serum insulin-like factor 3 during normal male puberty. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:3426-31.
- Schuppe HC, Pilatz A, Hossain H, et al. Urogenital infection as a risk factor for male infertility. *Dtsch Arztebl Int* 2017;114:339-346.
- Ochsendorf FR. Sexually transmitted infections: impact on male fertility. *Andrologia* 2008;40:72-5.
- Pellati D, Mylonakis I, Bertoloni G, et al. Genital tract infections and infertility. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2008;140:3-11.
- Moretti E, Capitani S, Figura N, et al. The presence of bacteria species in semen and sperm quality. *J Assist Reprod Genet* 2009;26:47-56.
- Andrade-Rocha FT. Colonization of *Gardnerella vaginalis* in semen of infertile men: prevalence, influence on sperm characteristics, relationship with leukocyte concentration and clinical significance. *Gynecol Obstet Invest* 2009;68:134-6.
- Gimenes F, Souza RP, Bento JC, et al., Male infertility: a public health issue caused by sexually transmitted pathogens. *Nat Rev Urol* 2014;11:672-87.
- Mackern-Oberti JP, Motrich RD, Breser ML, et al. Chlamydia trachomatis infection of the male genital tract: an update. *J Reprod Immunol* 2013;100:37-53.
- Joki-Korpela P, Sahrakorpi N, Halttunen M, et al. The role of Chlamydia trachomatis infection in male infertility. *Fertil Steril* 2009;91:1448-50.
- Gdoura R, Kchaou W, Ammar-Keskes L, et al. Assessment of Chlamydia trachomatis, Ureaplasma urealyticum, Ureaplasma parvum, Mycoplasma hominis, and Mycoplasma genitalium in semen and first void urine specimens of asymptomatic male partners of infertile couples. *J Androl* 2008;29:198-206.

27. Eley A, Pacey AA, Galdiero M, et al. Can Chlamydia trachomatis directly damage your sperm? *Lancet Infect Dis* 2005;5:53–7.
28. Wikstrom A, Jensen JS. Mycoplasma genitalium: a common cause of persistent urethritis among men treated with doxycycline. *Sex Transm Infect* 2006;82:276–9.
29. Wang Y, Sun G, Pan JG, et al. Correlation of Ureaplasma urealyticum and Chlamydia trachomatis infections with male sterility: a meta-analysis of randomized control trials. *Zhonghua Nan KeXue* 2006;12:615–8.
30. Reichart M, Kahane I, Bartoov B. In vivo and in vitro impairment of human and ram sperm nuclear chromatin integrity by sexually transmitted Ureaplasma urealyticum infection. *Biol Reprod* 2000;63:1041–8.
31. Etienne M, Caron F. Management of fungal urinary tract infections. *Presse Med* 2007;36:1899-906.
32. Tian YH, Xiong JW, Hu L, et al. Candida albicans and filtrates interfere with human spermatozoal motility and alter the ultrastructure of spermatozoa: an in vitro study. *Int J Androl* 2007;30:421-9.
33. Mielczarek E, Blaszkowska J. Trichomonas vaginalis: pathogenicity and potential role in human reproductive failure. *Infection* 2016;44:447-58.
34. La Vignera S, Vicari E, Condorelli RA, et al. Male accessory gland infection and sperm parameters. *Int J Androl* 2011;34:330–47.
35. van Leeuwen E, Wit FW, Prins JM, et al. Semen quality remains stable during 96 weeks of untreated human immunodeficiency virus-1 infection. *Fertil Steril* 2008;90:636–41.
36. Garolla A, Pizzol D, Bertoldo A, et al. Sperm viral infection and male infertility: focus on HBV, HCV, HIV, HPV, HSV, HCMV, and AAV. *J Reprod Immunol* 2013;100:20-9.
37. Bourlet T, Levy R, Maertens A, et al. Detection and characterization of hepatitis C virus RNA in seminal plasma and spermatozoon fractions of semen from patients attempting medically assisted conception. *J Clin Microbiol* 2002;40:3252–5.
38. Neofytou E, Sourvinos G, Asmarianaki M, et al. Prevalence of human herpes virus types 1–7 in the semen of men attending an infertility clinic and correlation with semen parameters. *Fertil Steril* 2009;91:2487–94.
39. Fode M, Fusco F, Lipshulz L, et al. Sexually transmitted disease and male infertility: a systematic review. *Eur Urol Focus* 2016;2:383-93.
40. Kaspersen MD, Larsen PB, Ingerslev HJ, et al. Identification of multiple HPV types on spermatozoa from human sperm donors. *PLoS One* 2011;6:e18095.
41. Foresta C, Noventa M, De Toni L, et al. HPV-DNA sperm infection and infertility: from a systematic literature review to a possible clinical management proposal. *Andrology* 2015;3:163–73.
42. Foresta C, Garolla A, Parisi S. HPV prophylactic vaccination in males improves the clearance of semen infection. *EBioMedicine* 2015;2:1487–93.
43. Grabe M, Bartoletti R, Bjerklund Johansen TE, et al. Guidelines on urological infections. European Association of Urology, 2015. https://uroweb.org/wp-content/uploads/19-Urological-infections_LR2.pdf
44. Liu B, Li J, Li P. Transurethral seminal vesiculoscopy in the diagnosis and treatment of intractable seminal vesiculitis. *J Int Med Res* 2014;42:236-42.
45. Tournaye H, Krausz C, Oates RD, Novel concepts in the aetiology of male reproductive impairment. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2017;5:544-53.
46. Aston KI. Genetic susceptibility to male infertility: news from genome-wide association studies. *Andrology* 2014;2:315-21.
47. Ferlin A, Raicu F, Gatta V, et al. Male infertility: role of genetic background. *Reprod Biomed Online* 2007;14:734-45.
48. Neto FTL, Bach PV, Najari BB, et al. Genetics of male infertility. *Curr Urol Rep* 2016;17:70.
49. Topaloglu AK, Kotan LD. Genetics of hypogonadotropic hypogonadism. *Endocr Dev* 2016;29:36-49.
50. Kosciński I, Elinati E, Fossard C, et al. DPY19L2 deletion as a major cause of globozoospermia. *Am J Hum Genet* 2011;88:344-50.
51. Dada R, Kumar M, Jesudasan R, et al. Epigenetics and its role in male infertility. *J Assist Reprod Genet* 2012;29:213-23.
52. Wu W, Hu Z, Qin Y, et al. Seminal plasma microRNAs: potential biomarkers for spermatogenesis status. *Mol Hum Reprod* 2012;18:489-97.

Validazione preclinica della tecnologia “next generation sequencing” per l’identificazione di embrioni a mosaico durante l’analisi genetica preimpianto

Francesca Spinella¹, Anil Biricik¹, Sara Bono¹, Maria Giulia Minasi², Alessandra Ruberti², Ermanno Greco², Francesco Fiorentino¹

¹Molecular Genetics Laboratory, GENOMA Group, Roma

²Reproductive Medicine, European Hospital, Roma

ABSTRACT

Preclinical validation of the next generation sequencing for the identification of mosaic embryos during preimplantation genetic screening. Aneuploidy screening of embryos at blastocyst stage can be jeopardized by the presence of chromosomal mosaicism, which is a phenomenon characterized by the presence a mixture of diploid and aneuploid cell lines in embryos. Although its significance for implantation and the developmental potential of embryos is still unclear, it is reasonable to assume that mosaicism is likely to influence *in vitro* fertilization success rates. In this study, we investigated whether next generation sequencing (NGS) technologies applied for preimplantation genetic screening (PGS) purposes have the potential to improve mosaicism detection in human embryos over conventional methods. The study was organized into two steps. The first involved 126 samples from mixing experiments with different ratios of euploid and aneuploid single cells, to mimic chromosomal mosaicisms. The aim was to determine the minimum ratio of aneuploid to euploid cells that is needed to detect a copy number variation by NGS. The second step was a retrospective blinded assessment of 18 whole genome amplification products, selected from previously performed clinical PGS cycles, including embryos with mosaic aneuploidy results. Reconstitution experiments results demonstrated that chromosomal mosaicism can be consistently identified by NGS, with the lower representation of detectable aneuploid cells being at 10% level. In addition, NGS was able to detect all 18 embryos with mosaicism, accounting for a total of 31 chromosomes involved by mosaicism. In conclusion, NGS is a reliable methodology capable to detect mosaic embryos with low percentage of aneuploidy. NGS has the potential to improve chromosomal diagnosis on embryos, allowing the discrimination between aneuploidy and mosaic embryos.

INTRODUZIONE

Le aneuploidie sono alterazioni cromosomiche caratterizzate da un numero maggiore o minore di cromosomi rispetto al numero fisiologico. La presenza di aneuploidie cromosomiche all’interno di un embrione è una delle principali cause di fallimento di impianto o di aborto spontaneo nei trattamenti di procreazione medicalmente assistita (PMA). È stato ampiamente dimostrato che l’incidenza delle aneuploidie aumenta proporzionalmente all’età della donna, con conseguente riduzione della potenzialità riproduttiva (1).

Lo studio dell’assetto cromosomico mediante screening delle aneuploidie cromosomiche (“preimplantation genetic screening”, PGS) per il trattamento delle coppie infertili che si sottopongono a

programmi di concepimento assistito viene effettuato nel tentativo di migliorare le percentuali di successo delle tecniche di fertilizzazione *in vitro* (IVF). Per decenni la selezione dell’embrione con maggiori potenzialità di successo si è basata sull’analisi di alcuni parametri morfologici e di sviluppo dell’embrione. Oggi, però, vi sono numerose evidenze scientifiche che dimostrano che tale tipo di valutazione, soprattutto se effettuata nei primi giorni di sviluppo, è alquanto inefficace nell’identificare embrioni con maggiori potenzialità di impianto (1, 2). Questi studi hanno dimostrato che non c’è una correlazione tra aspetti morfologici e presenza di aneuploidia nell’embrione. Infatti, una parte significativa di embrioni valutati con una buona morfologia erano aneuploidi e, al contrario, parte degli embrioni aneuploidi avevano un aspetto morfologico subottimale. Questa

Corrispondenza a: Francesca Spinella, Molecular Genetics Laboratory, GENOMA, Via di Castel Giubileo 11, 00138 Rome, Italy, E-mail spinella@laboratoriogenoma.it

Ricevuto: 19.04.2017

Revisionato: 06.06.2017

Accettato: 19.06.2017

Pubblicato on-line: 15.11.2017

DOI: 10.19186/BC_2017.045

scarsa correlazione dell'aspetto morfologico con la presenza di aneuploidie ha portato all'introduzione delle metodologie di PGS in un sempre più vasto numero di centri di PMA.

Con la diagnosi preimpianto, la selezione degli embrioni da trasferire nell'utero della paziente si basa non più sull'aspetto morfologico degli stessi, ma sul loro assetto cromosomico, che riflette la possibilità di dare origine a una gravidanza a termine (3, 4). In questi casi, la PGS permette di selezionare e trasferire in utero gli embrioni che all'analisi genetica risulteranno privi di anomalie cromosomiche, cioè euploidi. Numerosi studi clinici hanno riportato che nei trattamenti di PMA in combinazione con l'analisi PGS si ha un significativo aumento delle nascite e una diminuzione degli aborti rispetto ai trattamenti di PMA senza PGS, dimostrando che l'analisi preimpianto aumenta le possibilità di successo dei trattamenti di fecondazione assistita (5-7). Nonostante ciò, questa tecnica non ha raggiunto fino a oggi i risultati sperati. Infatti, selezionando l'embrione senza aneuploidie ci si aspetterebbe che questi embrioni siano tutti in grado di continuare a svilupparsi e impiantarsi. Recenti pubblicazioni scientifiche riportano, invece, che solo il 50-60% degli embrioni euploidi trasferiti in utero da origine a gravidanze a termine (5, 6). Le cause per cui un embrione diagnosticato euploide possa non impiantarsi o non proseguire nello sviluppo di una gravidanza sono ancora poco note. Alcune potrebbero essere attribuibili al fatto che alcuni degli embrioni ottenuti in cicli PMA possano avere un corredo cromosomico non uniforme, possano cioè essere formati da una combinazione di cellule aneuploidi e cellule euploidi. Questi embrioni vengono definiti aneuploidi "a mosaico". Il mosaicism cromosomico è un fenomeno molto diffuso sia negli embrioni ottenuti da fecondazione spontanea sia da quelli ottenuti mediante IVF e coinvolge ~15-90% degli embrioni allo stadio di morula e 30-40% di quelli allo stadio di blastocisti (8). Nonostante la maggior parte di questi embrioni non abbiano potenzialità di impianto, alcuni possono tuttavia svilupparsi e dare origine a bambini sani (9, 10).

Non tutte le metodologie di PGS sono in grado di identificare accuratamente gli embrioni a mosaico e, in alcuni casi, questi embrioni vengono diagnosticati euploidi, portando al trasferimento in utero di embrioni con basso potenziale di sviluppo; in altri casi, gli embrioni a mosaico sono classificati come aneuploidi e pertanto vengono scartati. L'"array-comparative genomic hybridization" ("array-CGH") rappresenta una delle tecnologie più diffuse per lo screening delle aneuploidie dell'embrione con la capacità di identificare embrioni a mosaico, ma ha alcune limitazioni dovute agli alti costi di analisi e alle basse capacità risolutive quando il livello del mosaicism è <30% (11-13). Recentemente, è stata introdotta una nuova metodologia per l'analisi delle aneuploidie cromosomiche embrionali basata sul sequenziamento massivo parallelo (MPS) dell'intero genoma, chiamata "next generation sequencing" (NGS). Questa tecnica, quantificando il numero di copie di cromosomi, permette di identificare le aneuploidie con

maggiore risoluzione rispetto alle metodologie convenzionali (14-18).

In questo studio ci siamo proposti di validare l'uso di NGS per l'identificazione di embrioni a mosaico e analizzare il limite di rilevamento minimo ("limit of detection", LOD) di aneuploidia che la metodologia può accuratamente identificare in un campione a mosaico.

MATERIALI E METODI

Disegno dello studio

Lo studio è stato condotto in due fasi, di cui la prima ha previsto la realizzazione di un modello sperimentale di mosaicism cromosomico. La seconda fase ha previsto la rianalisi di DNA ottenuti da precedenti casi clinici analizzati mediante array-CGH (9).

Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico interno del Laboratorio Genoma e del Centro di Riproduzione Assistita dell'European Hospital. È stata rispettata e applicata la Dichiarazione di Helsinki del 1975, emendata nel 1996 (<http://www.wma.net/e/humanrights/policymeetings.htm>). Inoltre, tutte le pazienti arruolate nello studio hanno firmato un specifico consenso informato prima di effettuare la PGS e, quindi, il trasferimento in utero dell'embrione.

Modello sperimentale di mosaicism cromosomico

Il modello è stato realizzato utilizzando misture di cellule in coltura (amniociti) con diverso assetto cromosomico, come precedentemente descritto (9). Brevemente, cellule euploidi (46, XY) e cellule aneuploidi (45, XX,-13, o 47,XX,+18) sono state combinate in diverse proporzioni (9:1; 8:2; 7:3; 6:4; 5:5; 4:6; 3:7; 2:8; 1:9) per ottenere diverse percentuali di mosaicism cromosomico. Ciascuna miscela è stata ripetuta 6 volte. Inoltre, sono stati preparati campioni composti esclusivamente da cellule aneuploidi o euploidi in modo da essere utilizzati come controllo. In totale sono stati ottenuti 126 campioni (Tabella 1). Le cellule sono state isolate utilizzando il FACS Aria II SE (BD Biosciences).

Amplificazione genomica

Per l'amplificazione genomica ("whole genome amplification", WGA), le cellule sono state lisate e il DNA genomico frammentato e amplificato mediante il kit SurePlex DNA Amplification System (Illumina Inc.). La tecnologia si basa sulla frammentazione del DNA genomico e amplificazione attraverso "polymerase chain reaction" (PCR) (15, 16, 19). Brevemente, le cellule vengono lisate con 5 µL di tampone di estrazione SurePlex, incubate a 75 °C per 10 min e successivamente a 95 °C per 4 min. Quindi si procede con le fasi di amplificazione mediante PCR: un ciclo di 95 °C per 2 min, seguito da 12 cicli a 95 °C per 15 s, 15 °C per 50 s, 25 °C per 40 s, 35 °C per 30 s, 65 °C per 40

Tabella 1

Campioni utilizzati nella validazione della tecnologia "next generation sequencing"

Campione	Cellule aneuploidi
46,XY	0%
47,XX+18/46,XY	10%
47,XX+18/46,XY	20%
47,XX+18/46,XY	30%
47,XX+18/46,XY	40%
47,XX+18/46,XY	50%
47,XX+18/46,XY	60%
47,XX+18/46,XY	70%
47,XX+18/46,XY	80%
47,XX+18/46,XY	90%
47,XX+18	100%
45,XX-13/46,XY	10%
45,XX-13/46,XY	20%
45,XX-13/46,XY	30%
45,XX-13/46,XY	40%
45,XX-13/46,XY	50%
45,XX-13/46,XY	60%
45,XX-13/46,XY	70%
45,XX-13/46,XY	80%
45,XX-13/46,XY	90%
45,XX-13	100%

s e 75 °C per 40 s, seguiti da una temperatura di 4 °C. Successivamente, 60 µL di Sureplex Amplification cocktail vengono aggiunti a 15 µL del prodotto di amplificazione in ciascun campione. La miscela viene quindi amplificata mediante PCR alle seguenti condizioni: un ciclo a 95 °C per 2 min, seguito da 14 cicli di 95 °C per 15 s, 65 °C per 1 min e 75 °C per 1 min, seguiti da 4 °C. Come controllo della reazione, 5 µL di ciascun amplificato è analizzato attraverso elettroforesi su gel di agarosio 1,5% in soluzione 1x di Tris borato EDTA. Il prodotto di amplificazione, WGA, è successivamente quantificato mediante Qubit dsDNA HS assay kit (Life Technologies Corporation).

Sequenziamento NGS

I prodotti di WGA sono stati analizzati mediante NGS. L'analisi è stata eseguita secondo il protocollo VeriSeq PGS (Illumina Inc.), come descritto in precedenza (15, 16). Il DNA è stato sequenziato utilizzando il protocollo VeriSeq (Illumina) e analizzato con il sequenziatore MiSeq (Illumina). Il processo di sequenziamento attraverso MiSeq prevede la lettura di ~24 milioni di corti frammenti di DNA chiamati "reads" per ciascuna corsa.

Queste sequenze vengono utilizzate per ottenere il numero di copie del cromosoma. Prima della lettura i frammenti di DNA vengono legati a dei codici di riconoscimento chiamati "barcoded", che consentono l'analisi contemporanea nella stessa corsa di diversi campioni. Circa 60-70% di "reads" possono cadere in una singola parte del genoma e sono quindi adeguate per determinare la quantità di DNA per ciascun cromosoma. In un tipico esperimento in cui 24 campioni sono analizzati in parallelo vengono ottenute ~600.000–900.000 "reads" per campione. L'analisi dei dati è stata effettuata utilizzando il "software" Blufuse (BlueFuse Multi v3Illumina), che restituisce la conta del numero di copie di ciascun cromosoma. Un cromosoma con due copie è considerato euploide, un cromosoma con una copia monosomico e uno con tre copie trisomico.

Analisi statistica

La concordanza tra NGS e cariotipo cellulare è stata calcolata usando la seguente classificazione: veri positivi (VP), campioni con mosaicismi rilevati da NGS; veri negativi (VN), campioni completamente euploidi o completamente aneuploidi rilevati da NGS; falsi negativi (FN), mancata identificazione dei mosaicismi; falsi positivi (FP), incorretta identificazione di mosaicismi. La sensibilità è stata calcolata come la proporzione di campioni con mosaicismi cromosomici correttamente identificati da NGS; la specificità come la proporzione di campioni euploidi o aneuploidi correttamente identificati da NGS.

Per ogni campione euploide, aneuploide o a mosaico sono stati effettuati 3 ripetizioni. La differenza tra i valori medi di ciascun "copy number" del cromosoma a mosaico in esame è stata confrontata con i valori medi dello stesso cromosoma nei campioni euploidi. La significatività statistica è stata calcolata utilizzando il test di Fisher, usando il "software" PRISM (GraphPad Software Inc.).

RISULTATI

Validazione della tecnologia NGS mediante modelli di mosaicismo cromosomico

Per la validazione del NGS sono stati utilizzati dei modelli di mosaicismo in cui cellule euploidi (46, XY) e cellule aneuploidi (47 XX, +18 o 45 XX,-13) sono state combinate con differenti rapporti in modo da ottenere crescenti livelli di aneuploidia (da 10% a 90%) (Tabella 1). Nella Figura 1 sono riportati alcuni risultati ottenuti dopo l'analisi con NGS di campioni euploidi (A), aneuploidi (B) e a mosaico (C e D). Come si può osservare, nel campione costituito da sole cellule euploidi tutti i cromosomi mostrano un valore di "copy number" di 2, mentre nel campione con una singola trisomia (Figura 1 B) il valore del cromosoma 18 è 3. Nei campioni costituiti da una miscela di cellule euploidi e aneuploidi, il cromosoma 18 ha un valore intermedio compreso tra 2 e 3 (Figura 1 C e D).

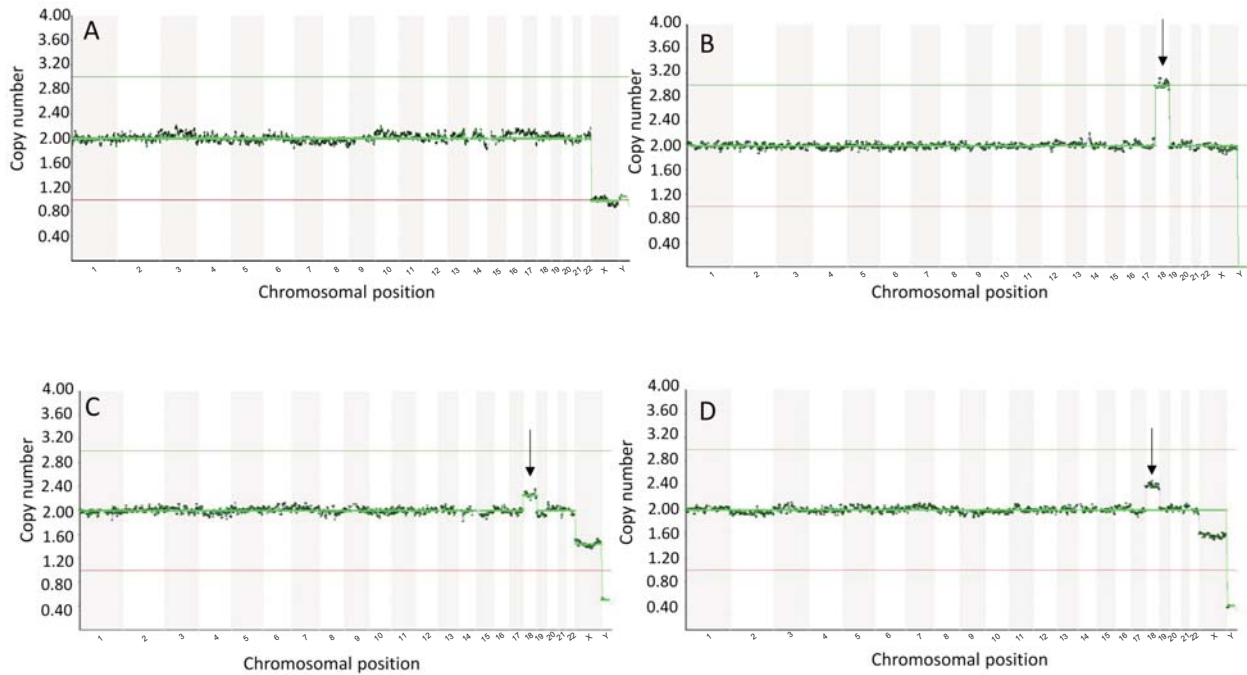


Figura 1

Risultati delle analisi effettuate mediante “next generation sequencing” (NGS). Sono riportati esempi di risultati ottenuti dall’analisi di campioni euploidi (A), aneuploidi (B) e a mosaico (C e D). Nel campione euploide (46XY) tutti i valori relativi ai cromosomi autosomici mostrano un “copy number” di ~2 (corrispondente allo stato di diploidia). I cromosomi sessuali mostrano un valore di 1. Nel campione aneuploide (47 XX, +18) il cromosoma 18 è presente in 3 copie e mostra un valore di “copy number” 3 (trisomia) (freccia). Nei campioni a mosaico (C e D) ottenuti da miscele di cellule 46XY e 47 XX, +18, il valore del cromosoma 18 è compreso tra 2 e 3 (freccia).

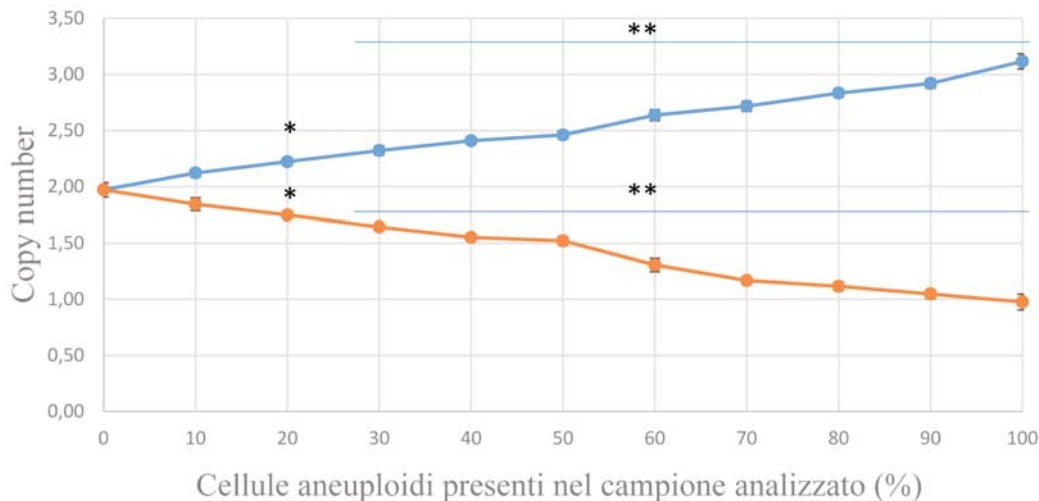


Figura 2

Nel grafico sono rappresentati i valori medi±DS dei “copy number” ottenuti dall’analisi con “next generation sequencing” (NGS) dei campioni composti da differenti percentuali di cellule aneuploidi/euploidi. Sull’asse x sono riportate le percentuali di mosaicismo, mentre sull’asse y sono indicati i valori del “copy number” ottenuti dopo l’analisi con NGS. La curva in blu rappresenta i valori ottenuti per la trisomia 18, mentre la curva in arancione rappresenta i valori ottenuti per la monosomia 13.

*P < 0,05 e **P < 0,001 nel confronto con il campione euploide.

Dall’analisi di tutti i campioni euploidi e aneuploidi è stato ottenuto un valore medio di “copy number” pari a $1,99 \pm 0,02$ per ciascun cromosoma euploide, $3,05 \pm 0,05$ per quelli trisomici e $1 \pm 0,05$ per la monosomia (Figura 2). Questi valori sono stati utilizzati per definire i parametri

entro i quali un determinato cromosoma può essere definito rispettivamente euploide (“copy number”, $1,99 \pm 0,02$) o aneuploide (“copy number”, $3,05 \pm 0,05$ per le trisomie e $1 \pm 0,05$ per le monosomie). Tutti i valori di “copy number” che non rientravano in questi intervalli,

ma che si posizionavano tra i valori euploidi e aneuploidi sono stati definiti a mosaico. L'analisi dei campioni a mosaico ha rivelato che i valori di "copy number" per il cromosoma 18 aumentavano proporzionalmente all'aumento della percentuale di cellule aneuploidi presenti nel campione, mentre quelli per il cromosoma 13 diminuivano progressivamente con l'aumentare della percentuale di cellule aneuploidi presenti nel campione (Figura 2).

Tutti i campioni euploidi sono stati classificati correttamente dal NGS e non è stato rilevato nessun cromosoma aneuploide (assenza di FP). Tutti i campioni aneuploidi sono stati rilevati (assenza di FN) e non è stato rilevato nessun cromosoma aneuploide oltre a quello per il quale il campione era stato caratterizzato (assenza di FP). Questo dimostra che la specificità e sensibilità di NGS per le aneuploidie sono entrambe pari al 100%, come riportato anche in nostri precedenti studi (15, 16).

Tutti i campioni a mosaico sono stati identificati da NGS, ad eccezione dei campioni composti dal 10% di cellule aneuploidi, che mostravano un valore $<1,99 \pm 0,02$. Questo ha dimostrato che NGS è in grado di identificare i cromosomi a mosaico quando presenti a un livello di mosaicismo $>10\%$, definendo a questo valore il LOD della NGS. La sensibilità ottenuta è stata del 90% [95% intervallo di confidenza (CI): 83,2%-

94,7%) e la specificità del 100% (CI: 73,5%-100%).

Questa analisi ci ha permesso di costruire una curva di riferimento per i diversi livelli di mosaicismo cromosomico (Figura 2). Tale curva consente di ricavare la percentuale di mosaicismo in base al valore di "copy number" del cromosoma aneuploide del campione in esame.

Validazione della tecnologia NGS su casi clinici

La rianalisi con NGS dei 18 prodotti di amplificazione genica ottenuti da biopsie di embrioni precedentemente diagnosticati a mosaico con array-CGH (9) è stata effettuata senza conoscere la natura degli embrioni. Le caratteristiche degli embrioni e la loro composizione cromosomica sono riassunti nella Tabella 2. L'analisi con NGS ha rivelato 31 cromosomi a mosaico. La percentuale di mosaicismo per ciascun cromosoma, determinata mediante la curva di riferimento ottenuta attraverso le prove sperimentali, variava da 25% a 50%. Delle 31 aneuploidie, 16 erano monosomie, 13 trisomie e 2 aneuploidie segmentali. Il confronto tra i risultati di NGS e array-CGH ha rivelato una concordanza del 100%, sia al livello di diagnosi embrionale (18/18) sia al livello dei cromosomi (31/31). I livelli di mosaicismo cromosomico rilevati dalle due metodologie non mostravano differenza significativa.

Tabella 2

Confronto dei risultati ottenuti dalla metodologia "array-comparative genomic hybridization" (array-CGH) e "next generation sequencing" (NGS) su blastocisti a mosaico

ID	Array-CGH	NGS		
	Composizione cromosomica	Mosaicismo	Composizione cromosomica	Mosaicismo
1	arr(4)x1,(10)x1	40%	arr(4)x1,(10)x1	45%
2	arr(6)x1,(15)x1	50%	arr(6)x1,(15)x1	45%
3	arr(2)x1	40%	arr(2)x1	38%
4	arr(2)x1	35%	arr(2)x1	40%
5	arr(5)x1	50%	arr(5)x1	55%
6	arr(5)x1,(7)x1	40%	arr(5)x1,(7)x1	45%
7	arr(11)x1,(20)x3,(21)x3	30%	arr(11)x1,(20)x3,(21)x3	35%
8	arr(1)x1,(6)x3,(10)x3,(12)x3,(13)x3,(14)x3,(21)x3	50%	arr(1)x1,(6)x3,(10)x3,(12)x3,(13)x3,(14)x3,(21)x3	46%
9	arr(3)x1,(10)x3,(21)x3	35%	arr(3)x1,(10)x3,(21)x3	38%
10	arr(1)x3	50%	arr(1)x3	46%
11	arr 9p21.2q34.3(26,609,645-140,499,771)x3	45%	arr 9p21.2q34.3(26,609,645-140,499,771)x3	48%
12	arr(15)x3	30%	arr(15)x3	25%
13	arr(18)x1	50%	arr(18)x1	45%
14	arr(18)x1	50%	arr(18)x1	50%
15	arr(18)x1	40%	arr(18)x1	50%
16	arr(4)x1	50%	arr(4)x1	45%
17	arr(5)x3	40%	arr(5)x3	40%
18	arr 10q21.3q26.3(67,216,644-134,326,648)x3	50%	arr 10q21.3q26.3(67,216,644-134,326,648)x3	45%

DISCUSSIONE

Questo studio dimostra che l'applicazione della metodologia NGS per l'analisi di aneuploidie cromosomiche consente di identificare in maniera accurata gli embrioni con aneuploidie a mosaico. I risultati dell'analisi hanno dimostrato una concordanza del 100% con quelli ottenuti con la tecnica "array-CGH", che attualmente rappresenta il metodo di riferimento per l'analisi cromosomica degli embrioni. NGS, inoltre, ha permesso di evidenziare aneuploidie cromosomiche a mosaico con un livello di mosaicismo >10%.

Poiché i mosaicismi cromosomici possono influenzare il successo di un trattamento di PMA, il processo di validazione diventa un passaggio essenziale affinché nuove tecnologie di analisi dell'assetto cromosomico possano entrare nell'uso clinico. La validazione con modelli cellulari di assetti cromosomici noti permette di definire i valori soglia per la classificazione di un embrione come euploidi, aneuploide o a mosaico. Inoltre, questi studi preclinici permettono di definire i limiti di risoluzione della metodologia per il mosaicismo cromosomico e quindi di ridurre gli errori diagnostici (FN o FP), aumentando l'efficacia dei test.

Uno studio recente suggerisce che la percentuale di mosaicismo possa influenzare le potenzialità di sviluppo dell'embrione a mosaico (20). Modelli sperimentali di mosaicismo in embrioni murini hanno dimostrato che embrioni composti dal 30% di cellule euploidi possono impiantarsi e svilupparsi. In questi modelli sperimentali, attraverso la manipolazione di cellule aneuploidi, gli autori hanno anche dimostrato che la percentuale di embrioni che si impianta e dà origine a feti aumenta con l'aumentare dei livelli di cellule euploidi presenti nell'embrione (20).

In un nostro precedente studio, in cui sono stati trasferiti embrioni a mosaico in donne che non avevano ottenuto, dopo IVF, embrioni euploidi, abbiamo riscontrato che la maggior parte delle blastocisti che hanno dato esito alla nascita di bambini erano embrioni con un livello di mosaicismo compreso tra 30% e 40%, suggerendo che bassi livelli di aneuploidia siano associati a una maggiore potenzialità di sviluppo dell'embrione (9).

Queste osservazioni, se confermate da studi più ampi, potrebbero avere un impatto clinico molto importante, soprattutto in quei casi in cui alla paziente che si sottopone alla PGS vengano diagnosticati più embrioni a mosaico. Infatti, in questo caso la percentuale di mosaicismo potrebbe essere utile per indirizzare verso la scelta di uno specifico embrione a mosaico. La validazione e la determinazione di una curva di riferimento per i mosaicismi cromosomici diventa, quindi, essenziale per la valutazione della potenzialità di sviluppo dell'embrione.

È molto importante sottolineare che la strategia offerta del trasferimento di un embrione a mosaico deve essere accompagnata da un'accurata consulenza genetica, in cui le pazienti vengano informate su tutte le

procedure della PGS, il significato dei risultati ottenuti e i rischi e benefici legati all'analisi dell'assetto cromosomico dell'embrione (21). Durante il colloquio, le pazienti dovranno essere informate sulle potenzialità di successo del trattamento in seguito al trasferimento di embrioni aneuploidi a mosaico, sulla conseguenza di un loro trasferimento e sulla necessità di effettuare delle analisi prenatali nel caso in cui si arrivasse a una gravidanza.

A questo proposito, le recenti linee guida pubblicate dalla società internazionale di diagnosi genetica preimpianto ("Preimplantation genetic diagnosis international society", PGDIS) suggeriscono di trasferire un embrione a mosaico solo in casi in cui non sia presente nessun embrione euploide (22). Nel caso di più embrioni a mosaico, le linee guida indicano di privilegiare quelli con bassa percentuale di aneuploidia e, tra questi, quelli che presentano delle monosomie.

Poiché il numero di donne, e l'età in cui esse si sottopongono al trattamento di IVF, sono in continuo aumento, diventa sempre più importante identificare gli embrioni a mosaico e comprendere quali caratteristiche possano influenzare le loro potenzialità di impianto e di sviluppo. Questo consentirebbe non soltanto di evitare l'eliminazione non etica di embrioni potenzialmente vitali, ma anche di non ridurre le possibilità di successo per pazienti che si sottopongono a trattamenti di IVF. Con l'introduzione di metodologie PGS altamente avanzate, come NGS, l'identificazione delle aneuploidie cromosomiche diventa sempre più affidabile permettendo la diagnosi di embrioni con differenti livelli di mosaicismo. Queste informazioni sono estremamente necessarie non solo per migliorare la percentuali di successo di un trattamento di PMA, ma anche per fornire maggiori informazioni alle pazienti durante la consulenza genetica preimpianto e aiutare i clinici nell'adottare la strategia di intervento più adeguata.

Il numero delle coppie che in Italia ricorre alla PMA incrementa costantemente ogni anno; nel 2012 sono state più di 55.000 e più del 70% erano donne di età >35 anni (23), quindi soggette ai rischi legati all'incremento del tasso di anomalie del numero dei cromosomi negli embrioni. Di conseguenza, molti centri di PMA in tutto il territorio nazionale si sono attrezzati e, attualmente, già offrono sia la diagnosi che la PGS degli embrioni alle pazienti. Attualmente, la PMA in combinazione con la PGS è offerta da 20 centri italiani distribuiti sul territorio nazionale, anche se la maggior parte è presente nelle regioni del centro Italia. Le metodologie per la PGS sono differenti; alcune di esse sono basate su PCR e altre su polimorfismi ["single nucleotide polymorphism" (SNP)-array], ma prevalgono i centri che utilizzano array-CGH e NGS. Alla luce delle recenti ricerche, si può prevedere che le metodologie array-CGH e NGS sostituiranno a breve le altre. Inoltre, con la possibilità della metodologia NGS di eseguire più analisi contemporaneamente riducendo costi e tempi di analisi, è possibile ipotizzare che in breve la PGS basata su NGS potrà rappresentare il principale metodo di screening preimpianto con la possibilità di far accedere ai trattamenti di PMA un più

ampio numero di pazienti.

In conclusione, il nostro studio mette in risalto l'importanza di identificare in maniera accurata gli embrioni a mosaico attraverso metodologie PGS basate su tecnologia NGS. Tale metodologia potrebbe rappresentare una strategia per aumentare il successo della PMA, permettendo il trasferimento di embrioni a mosaico in quelle donne con nessun embrione euploide a disposizione per il transfer oppure il trasferimento preferenziale di un embrione interamente euploide rispetto a un embrione a mosaico.

RINGRAZIAMENTI

Si ringraziano Teresa Sessa e Elisa Calì per la preparazione delle culture cellulari di amniociti.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

- Lathi RB, Westphal MD, Milki AA. Aneuploidy in the miscarriages of infertile women and the potential benefit of preimplantation genetic diagnosis. *Fertil Steril* 2008;89:353-7.
- Fragouli E, Alfarawati S, Daphnis DD, et al. Cytogenetic analysis of human blastocysts with the use of FISH, CGH and aCGH: scientific data and technical evaluation. *Hum Reprod* 2011;26:480-90.
- Minasi MG, Colasante A, Riccio T, et al. Correlation between aneuploidy, standard morphology evaluation and morphokinetic development in 1730 biopsied blastocysts: a consecutive case series study. *Hum Reprod* 2016;31:2245-54.
- Wilton L. Preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in early human embryos: a review. *Prenat Diagn* 2002;22:512-8.
- Yang Z, Liu J, Collins GS, et al. Selection of single blastocysts for fresh transfer via standard morphology assessment alone and with array CGH for good prognosis IVF patients: results from a randomized pilot study. *Mol Cytogenet* 2012;5:24.
- Scott RT Jr, Upham KM, Forman EJ, et al. Blastocyst biopsy with comprehensive chromosome screening and fresh embryo transfer significantly increases IVF implantation and delivery rates: a randomized controlled trial. *Fertil Steril* 2013;100:697-703.
- Fiorentino F, Rienzi L, Bono S, et al. Preimplantation genetic screening on day 3 embryos using array comparative genomic hybridization in patients with advanced maternal age: a prospective double blinded randomized controlled trial. *Hum Reprod* 2013;28(suppl 1):49-50.
- Taylor TH, Gitlin SA, Patrick JL, et al. The origin, mechanisms, incidence and clinical consequences of chromosomal mosaicism in humans. *Hum Reprod Update* 2014;20:571-81.
- Greco E, Minasi MG, Fiorentino F. Healthy babies born after intrauterine transfer of mosaic aneuploid blastocyst. *N Engl J Med* 2015;373:2089-90.
- Gleicher N, Vidali A, Braverman J, et al.; International PGS Consortium Study Group. Accuracy of preimplantation genetic screening (PGS) is compromised by degree of mosaicism of human embryos. *Reprod Biol Endocrinol* 2016;14:54.
- Wells D, Alfarawati S, Fragouli E. Use of comprehensive chromosomal screening for embryo assessment: microarrays and CGH. *Mol Hum Reprod* 2008;14:703-10.
- Johnson DS, Gemelos G, Baner J, et al. Preclinical validation of a microarray method for full molecular karyotyping of blastomeres in a 24 h protocol. *Hum Reprod* 2010;25:1066-75.
- Novik V, Moulton EB, Sisson ME, et al. The accuracy of chromosomal microarray testing for identification of embryonic mosaicism in human blastocysts. *Mol Cytogenet* 2014;7:18.
- Martin J, Cervero A, Mir P, et al. The impact of next-generation sequencing technology on preimplantation genetic diagnosis and screening. *Fertil Steril* 2013;99:1054-61.
- Fiorentino F, Biricik A, Bono S, et al. Development and validation of a next generation sequencing (NGS)-based protocol for 24-chromosome aneuploidy screening of embryos. *Fertil Steril* 2014;101:1375-82.
- Fiorentino F, Bono S, Biricik A, et al. Application of next-generation sequencing technology for comprehensive aneuploidy screening of blastocysts in clinical preimplantation genetic screening cycles. *Hum Reprod* 2014;29:2802-13.
- Wells D, Kaur K, Grifo J, et al. Clinical utilisation of a rapid low-pass whole genome sequencing technique for the diagnosis of aneuploidy in human embryos prior to implantation. *J Med Genet* 2014;51:553-62.
- Vera-Rodriguez M, Michel CE, Mercader A, et al. Distribution patterns of segmental aneuploidies in human blastocysts identified by next-generation sequencing. *Fertil Steril* 2016;105:1047-1055.e2.
- Fiorentino F, Spizzichino L, Bono S, et al. PGD for reciprocal and Robertsonian translocations using array comparative genomic hybridization. *Hum Reprod* 2011;26:1925-35.
- Bolton H, Graham SJ, Van der Aa N, et al. Mouse model of chromosome mosaicism reveals lineage-specific depletion of aneuploid cells and normal developmental potential. *Nat Commun* 2016;7:11165.
- Munné S, Grifo J, Wells D. Mosaicism: "survival of the fittest" versus "no embryo left behind". *Fertil Steril* 2016;105:1146-9.
- PGDIS Position Statement on chromosome mosaicism and preimplantation aneuploidy testing at the blastocyst stage. http://www.pgdis.org/docs/newsletter_071816.html
- Dati Registro Nazionale PMA. <http://www.iss.it/rpma/index.php?lang=1&tipo=2>

The improvement of oocyte selection for social freezing application

Federica Cariati^{1,2,3}, Francesca Bagnulo⁴, Stefania Ramona Peluso⁴, Marialaura De Simone⁴, Alessandro Conforti⁴, Rosario Pivonello⁵, Antonella Vaccina⁶, Carlo Alviggi⁴

¹CEINGE-Biotecnologie Avanzate scarl, Napoli

²KronosDNA s.r.l., spin-off dell'Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli

³Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, ⁴Dipartimento di Neuroscienze, Scienze Riproduttive e Odontostomatologiche e ⁵Dipartimento di Medicina Clinica e Chirurgia, Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli

⁶IBM Italia S.p.A.

ABSTRACT

Lifestyle, educational opportunities, career choices and new unions lead to pregnancy in more advanced age, increasing the emerging preventive solution to freeze oocytes at a young age for later use. In this scenario, the oocyte selection has a great importance in order to choose the best ones capable of a good subsequent embryo development and implantation. The aim of this study was to develop a decision support system, able to classify oocytes according to a score based on morphological features and patients' clinical data. The approach would offer a more effective selection method because it is not dependent on the doctor's experience or on an "at-first-sight" impression. As a first step, a prototype system able to support embryologists in oocyte selection was presented and an experimental evaluation on a real set of data provided. The developed pipeline included the identification of main morphological features influencing oocyte quality and the assignment of a weight and of a better way of measuring them. After that, a standard data format collecting in an organized way all morphological features of oocytes, zygote and embryos and patients' clinical data was developed. More than 150 oocytes images, taken in standard and comparable conditions, from 35 women were collected. Morphological features were extracted manually and automatically. A preliminary version of the scoring algorithm was tested on these data.

INTRODUCTION

The number of women requesting oocytes cryopreservation is increasing, because it represents a precautionary measure to preserve fertility (1). In fact, through the application of the traditional techniques for the oocytes cryopreservation, the later access to assisted reproductive technology (ART) procedures is possible. Taking into account changes in lifestyle, educational opportunities, career choices and unions, the "social oocytes freezing" appears a good solution for a young woman who is not ready for a pregnancy and projects for later (2). Furthermore, the oocytes cryopreservation may be offered to those women who have to undergo chemotherapy, radiotherapy or surgery that irreversibly affect the reproductive capacity (3). Finally, it is also indicated in the case of a family history of premature menopause (4).

The oocytes cryopreservation is the final stage of an

articulated procedure that includes the hormonal profile for the assessment of ovarian reserve and transvaginal ultrasound in menstrual phase with the measurement of ovarian volume and the count of the antral follicles, the induction and ovulation monitoring, which allows the simultaneous maturation of several follicles, and the oocytes pick-up. Many are the variables that interfere with the whole process of obtaining a pregnancy by ART, but the crucial points are the preliminarily evaluation of the ovarian reserve, the definition of an appropriate stimulation protocol to obtain an adequate number of oocytes and their culture conditions and, finally, the identification of the oocytes with high probability to develop in a good embryo.

Before the ART procedure, a hormone stimulation protocol on the female patient is carried out, which, in the majority of women, causes mild effects connected with the hormone therapy, even if the ovarian hyperstimulation syndrome can rarely occur (5). Therefore, it is mandatory

Correspondence to: Carlo Alviggi, Dipartimento di Neuroscienze, Scienze Riproduttive e Odontostomatologiche, Università degli Studi di Napoli Federico II, Via Sergio Pansini 5, 80131 Napoli. Tel. 0813737890, Fax 0813737808, E-mail alviggi@unina.it

Ricevuto: 07.04.2017

Revisionato: 07.06.2017

Accettato: 08.06.2017

Pubblicato on-line: 15.11.2017

DOI: 10.19186/BC_2017.046

to perform a preliminary assessment of the number and quality of oocytes, due to age and ovarian reserve of the patient, by the evaluation of anti-Müllerian hormone (AMH), follicle-stimulating hormone (FSH) and 17β -estradiol in menstrual phase, the count of antral follicles and the measurement of ovarian volume. Furthermore, clinicians can adopt different stimulation protocols according to their experience and, more importantly, according to the patients' health conditions (5).

After the *in vitro* fertilization (IVF), the oocyte is placed in cell culture and checked during the following day for signs of fertilization. The fertilized oocyte develops into embryo in laboratory in one to 5 days, then it is transferred in the woman's uterus. However, it is possible that the oocyte may not develop into an embryo even after it is injected with sperm or the embryo may stop the development, so that the transfer cannot be performed.

The oocyte and embryo quality can be determined by genetic alterations (6). For this scope, the preimplantation genetic screening (PGS) for the identification of chromosomes abnormalities is the most effective selection method (7). Recent data show that the analysis is also applicable on frozen-thawed embryo (8).

Many studies discuss about the topic of oocytes and embryos non-invasive evaluation showing a set of morphology parameters to be examined for both oocytes and embryos. Regarding the oocyte, these parameters include oocyte and cytoplasm dimension, perivitelline space (PS) and zona pellucida (ZP) thickness, first polar body (FPB) conformation, and more subtle abnormalities (dysmorphisms) of cytoplasm, such as central granularity, inclusions and vacuolation, features that can influence the assisted fertilization process (9). It has been suggested that regular patterns of granularity are related to oocyte maturity (10-13) and in a pronuclear stage oocyte score based on cytoplasmic substructures has been addressed by considering abnormalities such as excessive granularity (14).

It is clear that there are numerous factors that contribute to determining a good oocyte quality. Consequently, the choice of the most suitable oocyte is based on various parameters. The embryologists are recording a score about each oocyte to freeze to perform the selection of the best oocytes to thaw, but to date this evaluation is based on subjective experience. Hence, it could be useful to have at clinicians' disposal a system able to support them in both processes of defining a therapeutic plan for patients, with the aim of obtaining a great number of oocytes, and of selecting the most promising ones obtained after the stimulation process, with the goal of improving the success rate of fertilization and implantation. In particular, a computer-assisted system, able to exploit past experiences and to provide suggestions about the oocyte quality, could be useful to support embryologists in making decisions for selecting the best quality oocytes.

The aim of this work was the application of a pipeline to support oocyte selection (SOS) for social freezing application.

MATERIAL AND METHOD

Samples

158 metaphase-II oocytes data were collected from 37 patients encountered at the IVF center of Federico II University of Naples from January 2009 to November 2010. From each patient, the following data were registered to be inserted in the system: patient's reference number, age, weight, height, body mass index (BMI), basal follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) levels, female and male physical state, stimulation protocol parameters [levels of gonadotropin-releasing hormone (GnRH), recombinant FSH (rFSH), recombinant LH (rLH), human menopausal gonadotropin (HMG), FSH]. All patients provided informed consent to anonymous use their clinical and laboratory data for scientific purposes.

The oocyte related data of interest for scoring and evaluation were: diameter, refractal body (number and dimensions), ZP thickness, vacuoles (number and dimensions), PS thickness, FPB (fragmented or not), cytoplasm polarity (if present), cytoplasm granularity classification, intracytoplasmic sperm injection (ICSI) information (if done), zygote and embryo information. Oocyte images were acquired by a Nikon Eclipse TE200 inverted microscope; each image has a size of 1280x960 pixels.

The SOS pipeline

As detailed below, it includes 3 different sections: 1) insert and search data, 2) features extraction and 3) scoring system.

Insert and search data

This module allows inserting all data related to a patient, searching for an existing one and eventually add new information in a relational data base that has been designed to contain the heterogeneous kind of data required by the system to perform analysis. Finally, it allows storing all the oocyte images to be analyzed. In this way, this module allows creating an exhaustive patient's record that will constitute the base for the analysis and the next steps for the system control flow.

Features extraction

It aims to automatically extract some morpho-structural features from oocyte images by means of image processing and machine learning techniques, as previously described (15). The module develops in cascade: morphological operators to extract the oocyte diameter from the image (16), the Hough transform to exactly delineate the cytoplasm region of the oocyte (17) and finally the Haar transform to represent the texture of a rectangular central region of the oocyte by means of statistical measures with the aim of analyzing the cytoplasm central granularity (18). Then, machine learning techniques and, specifically, a k-means clustering algorithm is performed to obtain a clustering model of these regions and to classify new unseen

extracted central regions according to the learned model to provide a label for the central granularity of the new incoming oocytes.

Scoring system

This system has been developed from data available in literature (19-22) and experience of embryologists. It evaluates 8 morphological features measured from oocytes microscope images. According to the experience of clinicians, these parameters have been divided into 8 different weight classes according to a priority index (Table 1); each of them should satisfy particular conditions or fit in a particular range of values.

Table 1
Oocytes morphological features and related weights

Parameter	Weight
Oocyte diameter	1
Refractal body	2
Zona pellucida thickness	3
Vacuoles	4
Perivitelline space	5
First polar body	6
Cytoplasm polarity	7
Cytoplasm granularity	8

Table 2 summarizes feature values related to both positive and negative contribution; we assumed a tolerance equal to ±10% to feature values. Each parameter contributes differently to the calculation of the score. For this reason, in accordance with the clinicians, we assigned a different weight in case of positive/negative value for each of them, as reported in Table 3. The score was evaluated as a weighted average on standardized parameters as follows:

$$S_k = \frac{\sum_i C_{P_k}(i)}{\sum_i C_p(i)}$$

where C_{P_k} is the weight of the feature (i) for the oocyte k normalized to the sum of all values of C_p .

RESULTS

We tested the SOS pipeline by analyzing how the automatic evaluation was in agreement with the clinician evaluation for the task of oocyte scoring and features extraction. The results of applying the proposed SOS pipeline are presented in two case studies.

Table 2
Morphostructural feature values related to both positive and negative contribution

Parameter	Positive feature	Negative feature
Oocyte diameter	[115-δ; 165+δ] μm]115-δ; 165+δ[μm
Refractal body	Not present OR diameter <5 μm	Diameter ≥5 μm
Zona pellucida thickness	[15-δ; 20+δ] μm]15-δ; 20+δ[μm
Vacuoles	Not present OR diameter <9 μm	Diameter ≥9 μm
Perivitelline space	[14-δ; 16+δ] μm]14-δ; 16+δ[μm
First polar body	[14-δ; 16+δ] μm]14-δ; 16+δ[μm
Cytoplasm polarity	Present	Absent
Cytoplasm granularity	Homogeneous, bright, medium granularity	Not homogeneous, dark, high granularity

Table 3
Weights of positive and negative contribution of the features in the oocyte scoring

Parameter	Positive contribution	Negative contribution
Oocyte diameter	2	1
Refractal body	2	1
Zona pellucida thickness	2	1
Vacuoles	3	0
Perivitelline space	3	1
First polar body	4	3
Cytoplasm polarity	4	2
Cytoplasm granularity	4	1

Score evaluation (case study 1)

To test the scoring algorithm, we compared the oocyte score assigned by the system with the selection manually made by the clinicians and with the result of ICSI procedure and embryo growth in case of oocyte real selection for fertilization. Specifically, a threshold value t was defined and considered of good quality, and hence potentially able to give rise to a right cell development, for the oocytes that obtained a score value $s_k > t$. In this evaluation $t=0.5$ and, according to this value, 77 out of 157 oocytes (49%) obtained a score >0.5 and therefore considered of good quality, according to the automatic system. The remaining 80 (51%) obtained a score ≤ 0.5 and hence they were considered poor quality oocytes.

Based on the manual evaluation provided by the clinicians, oocytes were divided in 3 classes: C1, oocytes that were selected for the fertilization and that had a correct development after fertilization; C2, the ones that were selected for the fertilization, but that had not a correct development after fertilization; C3, the oocytes that were not fertilized and probably rejected by the embryologists. A deep analysis, which was performed according to further information provided by clinicians about the oocyte fertilization and growing, revealed that among the oocytes that the system considered good for fertilization according to the assigned score, i.e. $s_k > 0.5$, 37 belong to C1, 24 belong to C2 and 16 belong to C3. Among the oocytes that the system considered of poor quality and hence not appropriate for fertilization according to the assigned score, 43 belong to C1, 29 belong to C2 and 8 belong to C3.

Features extraction (case study 2)

The SOS system is able to automatically extract two oocyte morpho-structural features: diameter and cytoplasm texture. To test whether these measures were properly acquired by the system, we compared them with manual evaluations made by clinicians.

About oocytes diameter evaluation, we obtained that the automatic measure was in agreement with the manual one for 98 oocytes (62% of measure reliability). However, in the other cases, the SD of the difference between the automatic extracted measure and the real diameter was $\sim 11 \mu\text{m}$, representing the 0.06% of the real measure.

Regarding the central granularity evaluation, currently clinicians evaluate the morphology of the cytoplasm through visual inspection by considering the presence of a central area that is characterized by a low or medium degree of granularity as an important feature for good quality oocytes. In addition, the presence of a high not homogeneous central granularity is considered an indicator of not-good-quality oocytes. For these reasons, we aimed at obtaining two classes from the clustering step: homogeneous-clear-medium cytoplasmic granularity and non homogeneous-dark-high cytoplasmic granularity. Hence, the k-means algorithm was set to generate two clusters on the set of images representing the extract central region of the cytoplasm. A qualitative analysis of these clustered regions carried out by an

expert confirmed that they correspond to a good classification of the oocytes. Indeed, the resulting clustered images (i.e., oocytes with low-medium and high central granularity) have been submitted to the opinion of clinicians, who found the overall performance of the proposed method very satisfactory.

A quantitative validation was performed by comparing the automatic result with the manual evaluation provided by clinicians. As a result of this comparison, the system was able to correctly cluster oocytes with an error estimated at 30%. After this, the learned clustering model was saved and employed to automatically evaluate the new incoming oocyte images provided to the system. The new set of data was made up of 43 oocytes images from which the central region of the cytoplasm was automatically extracted and represented along with its first order statistical measures to obtain the feature-vector representation of the texture. Then, the clustering learned model was applied resulting in a correct classification of the central region in $\sim 85\%$ of the new analyzed oocytes.

DISCUSSION

All the collected data will constitute the system knowledge base accessed by an "Oocyte scoring" and a "Features extraction" modules. The first one assigns a score value to each oocyte according to a scoring metrics that takes in consideration 8 morphological features, some automatically extracted and some values manually inserted by technicians. By analyzing the results obtained by the score evaluation, it is possible to affirm that the SOS pipeline was right in 62% of the analyzed cases, being in accordance or disagreement with the clinicians' evaluation. Moreover, the SOS pipeline allowed selecting further 16 oocytes (21%) that were rejected by manual evaluation and rejecting 29 oocytes (36%) that were fertilized but did not generate embryos.

The second module automatically extracts some morphological features by means of image processing techniques. In the cases where the automatic measure did not work, we observed that the cause was in oocyte images having a not spherical shape, due to the holding pipette used to steady the cell during the observation and, mostly, to very noisy images (acquired according to different or not standard acquisition protocol by the microscope operator), in which the image background was confused with the oocyte region.

In a published paper, a simple and semiquantitative human oocyte scoring system was described, based on the assignment of points to the following morphological parameters: cumulus/corona expansion and appearance, amount of cumulus and oocyte appearance (14). The experimental results confirmed that the oocyte score was significantly correlated to maturity and fertilization rate. Hence, the oocyte scoring procedure can be useful for selecting oocytes for IVF and embryo transfer and also for training new laboratory personnel in recognizing the important characteristics of a mature oocyte. Following this direction, in a more recent work a system for the morphological scoring of human oocytes that consists of

central granularity, inclusions, vacuolations and the injection properties of the oocyte after the injection step, demonstrated that top quality oocytes had a significantly higher level of fertilization as compared to low scoring oocytes (23).

In the future, the SOS pipeline could also embed a knowledge learning step able to elaborate all collected data and define a model that will support the scoring metric in the oocyte evaluation and classification for fertilization.

CONCLUSION

The SOS pipeline, a prototypical computer-assisted system, is able to acquire images in consistent and standard conditions, to quickly collect data in a structured format and to finally provide a quantitative metric in order to support embryologists in oocyte objective scoring process and in oocyte selection at the thawing time. In addition, a database of all medical and biological information about each patient may help clinicians and researcher to have a clear picture of hormonal stimulation response to analyze or examine it in future studies. Moreover, it allows to compute and to assign a quality score to the acquired oocyte images exploiting morpho-structural features, some of which are automatically extracted by the system.

The SOS pipeline will be used to support embryologists in making decisions during their work and in evaluating and selecting the best quality oocytes. Future work would concern the extension of the clinical data by considering more parameters in the asset of ovarian reserve, in the stimulation protocol and in the description of health conditions and by providing a component for analyzing such data. Furthermore, the inclusion of the genetic data is planned with the aim of inferring new knowledge by putting in relation all the variables involved in the domain with genetic alterations, if any.

ACKNOWLEDGMENT

This work was supported by the Italian Project MIUR-FAR 08-09: Laboratorio di Bioinformatica per la Biodiversità Molecolare (MBLab-DM19410).

CONFLICTS OF INTEREST

None.

REFERENCES

- Practice Committees of American Society for Reproductive Medicine; Society for Assisted Reproductive Technology. Mature oocyte cryopreservation: a guideline. *Fertil Steril* 2013;99:37-43.
- Hodes-Wertz B, Druckenmiller S, Smith M, et al. What do reproductive-age women who undergo oocyte cryopreservation think about the process as a means to preserve fertility? *Fertil Steril* 2013;100:1343-9.
- Benard J, Calvo J, Comtet M, et al. Fertility preservation in women of the childbearing age: Indications and strategies. *J Gynecol Obstet Biol Reprod* 2016;45:424-44.
- Cartwright B, Grace J, Rymer J. A clinical dilemma: the potential use of egg freezing to preserve fertility in a young patient at risk of developing premature ovarian failure. *Menopause Int* 2010;16:65-7.
- Tsafrir A, Haimov-Kochman R, Margalioth EJ, et al. Ovarian stimulation for oocyte cryopreservation for prevention of age-related fertility loss: one in five is a low responder. *Gynecol Endocrinol* 2015;31:779-82.
- Wells D. Embryo aneuploidy and the role of morphological and genetic screening. *Reprod Biomed Online* 2010;21:274-7.
- Fragouli E, Wells D. Aneuploidy screening for embryo selection. *Semin Reprod Med* 2012;30:289-301.
- Coates A, Kung A, Mounts E, et al. Optimal euploid embryo transfer strategy, fresh versus frozen, after preimplantation genetic screening with next generation sequencing: a randomized controlled trial. *Fertil Steril* 2017;107:723-30.e3.
- Stalf T, Herrero J, Mehnert C, et al. Influence of polarization effects in ooplasm and pronuclei on embryo quality and implantation in an IVF program. *J Assist Reprod Genet* 2002;19:355-62.
- Serhal PF, Ranieri DM, Kinis A, et al. Oocyte morphology predicts outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1997;12:1267-70.
- Loutradis D, Drakakis P, Kallianidis K, et al. Oocyte morphology correlates with embryo quality and pregnancy rate after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1999;72:240-4.
- Suppinyopong S, Choavaratana R, Karavakul C. Correlation of oocyte morphology with fertilization rate and embryo quality after intracytoplasmic sperm injection. *J Med Assoc Thai* 2000;83:627-32.
- Plachot M, Selva J, Wolf JP, et al. Consequences of oocyte dysmorphism on the fertilization rate and embryo development after intracytoplasmic sperm injection. A prospective multicenter study. *Gynecol Obstet Fertil* 2002;30:772-9.
- Kahraman S, Yakin K, Donmez E, et al. Relationship between granular cytoplasm of oocytes and pregnancy outcome following intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 2000;15:2390-3.
- Basile TMA, Caponetti L, Castellano G, et al. A texture-based image processing approach for the description of human oocyte cytoplasm. *IEEE Transactions on Instrumentation and Measurement* 2010;59:2591-601.
- Haralick RM, Sternberg SR, Zhuang X. Image analysis using mathematical morphology. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence* 1987;9:532-49.
- Sklansky J. On the hough technique for curve detection. *IEEE Transactions on Computers* 1978;27:923-6.
- Gonzalez RC, Woods RE. *Digital image processing*, 3rd ed. Upper Saddle River, NJ: Prentice-Hall, 2006.
- Rienzi L, Ubaldi FM, Iacobelli M, et al. Significance of metaphase II human oocyte morphology on ICSI outcome. *Fertil Steril* 2008;90:1692-700.
- Ebner T, Moser M, Sommergruber M, et al. Developmental competence of oocytes showing increased cytoplasmic viscosity. *Hum Reprod* 2003;18:1294-8.
- de Cassia SFR, de Almeida Ferreira Braga DP, Semiao-Francisco L, et al. Metaphase II human oocyte morphology: contributing factors and effects on fertilization potential and embryo developmental ability in ICSI cycles. *Fertil Steril* 2010;94:1115-7.
- Coticchio G, Sereni E, Serrao L, et al. What criteria for the definition of oocyte quality? *Ann N Y Acad Sci* 2004;1034:132-44.
- Wilding M, Di Matteo L, D'Andretti S, et al. An oocyte score for use in assisted reproduction. *J Assist Reprod Genet* 2007;24:350-8.

Human papillomavirus infection and male infertility

Andrea Garolla, Adriano Presciutti, Elena Marcazzan, Massimo Menegazzo, Andrea Di Nisio, Carlo Foresta

Unit of Andrology and Reproductive Medicine, Department of Medicine, University of Padova, Padova

ABSTRACT

Human papillomavirus (HPV) is one of the most common sexually transmitted infection in females and males. More than 100 different HPV types have been isolated and they can be subgrouped in cutaneous or mucosal according to their ability to infect the skin or the mucosa of the genital tract. Recently, many studies have found an association between HPV infection and male infertility. The purpose of this study was to investigate the implication of HPV sperm infection on male fertility and the impairment of principal sperm parameters. Moreover, we evaluated the reproductive outcome of infertile couples undergoing assisted reproduction techniques in presence or absence of HPV in semen.

INTRODUCTION

Human papillomavirus (HPV) is one of the most common viral infections among sexually transmitted diseases and represents an important infertility and cancer development factor for both sexes. 50-80% of general population is thought to be infected during lifetime, but the infection is often asymptomatic and clears up spontaneously. Actually, >150 HPV genotypes are known and they have been divided in low-risk (LR) and high-risk (HR) types, because of their strong association with neoplasms (1). LR types are rarely carcinogenic and they are linked to benign papillomas, genital warts and mild dysplasia, whereas HR ones are the main responsible for cervical and anal cancers.

In males, HPV has been reported in the anal region, perianal area, scrotum, glans, penile shaft and urethra (2, 3). Moreover, studies support the evidence of HPV presence in reproductive system and in semen (4). HPV was found both in exfoliated cells and spermatozoa, where it can be mainly localized in the head of the sperm (5). It is now known that the presence of HPV is one of the most important causes of asthenozoospermia and idiopathic male infertility. The prevalence of HPV in semen has been estimated to be 10% in men of the general population and 16% in men affected by unexplained infertility (6). Detrimental effects of HPV infection on sperm parameters have been clearly reported, including abnormal count, production of antisperm antibodies (ASA) and, particularly, a reduction of motility (5, 7, 8). Furthermore, the infection appears to be increasingly important in infertile couples. A previous

study, performed on women undergoing *in vitro* fertilization (IVF), showed a significative reduction of pregnancies in the presence of HPV cervical infection compared with no infection (9). Moreover, studies with the use of the Hamster egg penetration test have been done to check the ability of infected spermatozoa to penetrate hamster oocytes and results showed that they are able to go inside the oocyte, though the number of penetrated sperm is lower than control (3). Finally, infected spermatozoa could act as carriers of HPV DNA (5, 10, 11). Oocytes penetrated by infected sperm seem to express the viral genes, maybe because of their active transcription (3). Other studies show that in infertile couples undergoing assisted reproduction technology (ART) cycles the pregnancy rate is lower with HPV infection and the rate of miscarriage is increased compared with those not infected (12, 13). The risk is higher when HPV DNA test is positive for both partners (12, 13).

The main goal of this study was to determine the rate of infection and localization of HPV in the sperm sample in infertile couples. We analyzed the results of both natural and assisted reproductive pregnancies in couples with or without HPV semen infection.

MATERIALS AND METHODS

Patients

The study was approved by the Institutional Review Board of Bruneck hospital (protocol no. 2336P). We enrolled a cohort of 226 infertile couples unsuccessfully

Correspondence to: Carlo Foresta, University of Padova, Department of Medicine, Unit of Andrology and Reproductive Medicine, Via Giustiniani 2, 35128 Padova. Tel. +390498216350, Fax +390498218520, E-mail carlo.foresta@unipd.it

Ricevuto: 22.02.2017

Revisionato: 10.08.2017

Accettato: 01.09.2017

Pubblicato on-line: 20.11.2017

DOI: 10.19186/BC_2017.052

trying to have a baby for ≥ 2 years and who planned to have intrauterine insemination (IUI) or IVF at the Human Reproductive Medicine and Gamete Cryopreservation Unit of the Gynecology and Obstetrics Clinic of our hospital from January 2013 to December 2014. At the moment of the recruitment, all patients were properly informed about the aim of the study and a written informed consent was obtained for both study and use of data according to the Italian privacy law.

We included in the study only normo-ovulatory 25 to 35 years old women with idiopathic/unexplained infertility, body mass index (BMI) 18-30 kg/m² and negative Pap smear and genital swab for the presence of *Trichomonas vaginalis*, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* and bacterial vaginosis. They also had to be "normal responders" according to the Bologna criteria (14). We excluded patients with the following characteristics: history of smoking, ovarian/tubal surgery, cervical dysplasia, endometriosis, pelvic inflammatory disease, tubal occlusion, polycystic ovarian syndrome, treatment for benign endouterine disease in the 6 months before IUI/IVF cycle. Patients with karyotype abnormalities, mutations of the cystic fibrosis gene, systemic disease (i.e. diabetes, adrenal disease, multiple sclerosis, hypogonadotropic or hypergonadotropic hypogonadism, thrombophilia and immunologic disorders), previous neoplasia, previous chemo- or radiotherapy or untreated uterine disease were also excluded from the study.

Considering male partners, we included 25 to 40 years old subjects with normal or altered sperm parameters according to the 2010 WHO guidelines (15). Patients with azoospermia, recent *Chlamydia trachomatis*, *Ureoplasma*, *Neisseria gonorrhoeae* or others sperm infection, seropositivity to human immunodeficiency virus type 1 or 2, human T-cell lymphotropic virus type 1 or 2, hepatitis B or C virus or *Treponema Pallidum* were excluded. We also excluded male partners with genetic alterations, karyotype abnormalities, Y-chromosome microdeletions or *CFTR* gene mutations. All male patients underwent fluorescent *in situ* hybridization (FISH) of their semen for the detection of HPV DNA in spermatozoa and exfoliated cells at recruitment and on IUI/IVF day.

Study design

At the recruitment, couples were divided into two groups according to positivity of HPV semen infection. Outcomes were recorded after two consecutive phases: the first was a period of 6 months (diagnosis period) from enrollment to the beginning of ART cycles, whereas the second one was a 12-month period (ART period), when couples underwent IUI/ICSI. First, the considered outcome was the prevalence of HPV tested on semen by FISH analysis at diagnosis and on the day of ART and clinical pregnancy rates during the two phases; then, we included also ongoing pregnancy rates, miscarriages and healthy born babies.

Semen processing

Semen samples were obtained by masturbation after 2-5 days of sexual abstinence in sterile containers. Samples were allowed to liquefy at room temperature and semen volume, pH, sperm concentration, viability, motility and morphology were determined following the WHO guidelines (15). In each sample, spermMar test was also performed to detect ASA IgG and IgA (FertiPro kit). Following the kit protocol, the test was considered positive when moving spermatozoa were partially or totally bound to latex particles, whereas freely moving spermatozoa uncovered by latex particles were considered negative. The reactivity of the test was confirmed by the agglutinate formation of latex particles themselves.

FISH for HPV

This analysis was performed at recruitment and repeated on the day of ART. Glass slides containing adhered sperm were fixed in a methanol-acetic acid solution for at least 1 h at -20 °C. To permeabilize, samples were digested with pepsin diluted 1:25,000 in 0.01 mol/L HCl for 5 min at room temperature. Permeabilization of the specimens was stopped with 5 min washes in phosphate-buffered saline solution (PBS) 1×; then samples were dehydrated in 70%, 80% and absolute ethanol for 1 min and finally air-dried. Samples were then overlaid with 10 μ L hybridization solution (Pan Path) containing biotin-labeled HPV DNA probe (a mix of total genomes containing the conserved HPV region). Each slide was covered with a glass coverslip and the edges were sealed with nail polish to prevent loss of the mixture during denaturation and hybridization. After denaturation of cellular DNA target and HPV DNA probe on a heating block for 5 min at 95 °C, hybridization was performed by incubating the samples at 37 °C overnight in a humidified chamber. Thereafter, the coverslips were carefully removed and the slides were washed in PBS 1× for 5 min. After 15 min of incubation at 37 °C with the differentiation reagent (Pan Path), the slides were washed 3 times in PBS 1×. The biotin-labeled HPV probe was detected by incubation with 1:500 Streptavidin Texas Red (Vector Laboratories) for 1 h at room temperature. After detection, the slides were washed in PBS 0.01% Triton and then in PBS and mounted with a solution containing 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) and antifade (Bioblue, Bioview). Samples were analyzed with the use of a fluorescent microscope (Nikon ViCo video confocal microscope) equipped with a triple band-pass filter set for fluorescein isothiocyanate (FITC), tetramethylrhodamine (TRITC) and DAPI. For each slide, at least 200 spermatozoa and 200 exfoliated cells were analyzed. When nuclei were completely and homogeneously stained and multiple small spots or single large signals were present, the sperm cells were classified as positive. The method was tested on control slides containing CaSki cells, a human cervical carcinoma cell line with stably integrated and transcriptionally active HPV genomes, serving as a

control for the specific probe. Cells smeared on polylisinated glass slides were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 10 min. After fixation, cells were washed for 5 min in PBS and then dehydrated in 70%, 80% and absolute ethanol for 5 min. Cell smears were then air-dried and stored at 4 °C until use.

Statistical analysis

The statistical analysis of the data was carried out using SPSS 21.0 for Windows. The results were expressed as mean±SD and categorical variables were expressed as a percentage. The Kolmogorov–Smirnov test was used to check the normality of distribution. Variables not showing normal distribution were log-transformed for subsequent statistical analyses. Comparisons between groups were performed with the use of unpaired Student’s t test after acceptance of normality according to Kolmogorov-Smirnov test. Comparisons of proportions were performed with a one-sided nonparametric resampling test. P values <0.05 were considered as statistically significant.

RESULTS

The analyzed group was composed of 226 couples. The mean age was 34.2±4.1 years for men and 31.3±3.2 years for women. After FISH analysis for HPV performed in semen sample, 54 out of 226 patients (23.9%) were positive to HPV. The presence of HPV was observed in sperm and/or exfoliated cells. In particular, 28 patients (51.9%) had infection confined to sperm, 8 (22.2%) confined to exfoliated cells and 14 (25.9%) in both sperm and exfoliated cells.

During the diagnosis period (6 months), we assisted to the spontaneous pregnancy of 14 out of 172 couples with no infection (8.1%), while in the ART period (12 months) 12 out of 60 couples (20%) had successful IUI and 40 out of 98 (40.8%) had successful ICSI treatment. On the other hand, infected couple had no natural pregnancy and, during the ART period, only 2 out of 21 (9.5%) and 6 out of 33 (18.2%) had successful IUI and ICSI treatments, respectively (Figure 1). It is important to underline that among infected patients with successful ART, both IUI cases showed HPV infection confined to exfoliated cells, while the 6 ICSI cases had different pattern: 3 cases with sperm infection, one with infected exfoliated cells and two cases with both sperm and exfoliated cells infection.

We observed a significant reduction in sperm motility in semen sample of infected vs. non-infected subjects. In particular, the percentage of motile sperm was significantly reduced (25.9±16.2%) compared to non-infected patients (34.3±14.9%) (P <0.001). Moreover, we reported a higher mean proportion of ASA-positive sperm cells (40.7%) in infected compared with non-infected (10.5%) subjects (P <0.001). The same trend was observed considering subjects from couples who had no pregnancy (sperm motility and ASA, 25.1±17.7% and 43.4% in infected vs. 32.7±15.1% and 12.2% in non-infected). No significative differences were found in groups with different outcome of fertility both in infected and non-infected subjects (Table 1).

Figure 2 reports the cumulative pregnancy rates recorded in non-infected and infected couples (38.4% vs. 14.2%). It is evident how the miscarriage rate was much higher for infected couples compared to non-

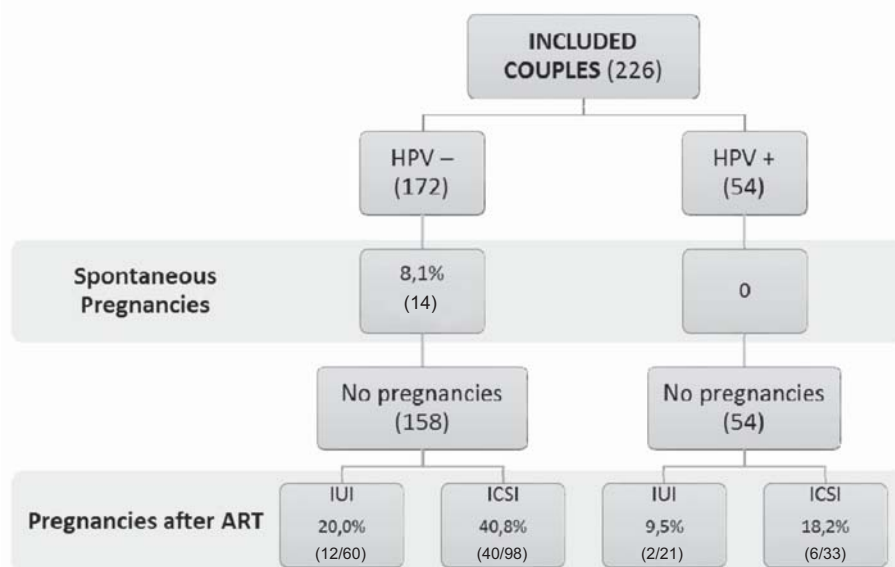


Figure 1
Main outcomes of the study.
HPV, human papillomavirus; ART, assisted reproduction technology; IUI, intrauterine insemination; ICSI, intracytoplasmic sperm injection.

Table 1
Sperm parameters and fertility outcome of subjects with human papillomavirus (HPV) infected and non-infected semen

	Fertility outcome	Semen volume (mL)	Sperm concentration (10 ⁶ /mL) ^a	Sperm count (×10 ⁶) ^a	Motility (A+B) (%)	Normal morphology (%) ^a	Sperm viability (%)	Sperm antibodies (%)
Non infected subjects	No pregnancy (n=105)	2.7±1.4	50.1±50.6	129.9±126.3	32.7±15.1	15.0±14.6	67.6±24.8	12.2
	Spontaneous pregnancy (n=14)	2.3±1.3	54.6±48.5	138.4±99.6	35.1±16.9	13.7±12.1	71.2±29.4	Absent
	IUI pregnancy (n=12)	2.7±1.1	61.3±57.9	145.5±131.3	33.9±12.6	14.3±13.2	68.4±31.6	Absent
	IVF pregnancy (n=40)	2.8±1.9	48.8±52.4	126.6±135.4	28.7±14.3	10.2±9.6	59.3±26.6	12.5
	All (n=172)	2.7±1.5	52.2±50.3	131.9±128.4	34.3±14.9	14.8±13.7	66.1±27.3	10.5
Infected subjects	No pregnancy (n=46)	2.3±1.7	67.2±48.0	146.6±125.6	25.1±17.7 ^b	16.1±14.0	65.1±34.7	43.4 ^b
	IUI pregnancy (n=2)	2.5±1.3	61.5±54.6	150.7±140.9	29.8±14.9	17.7±13.1	70.6±36.4	Absent
	IVF pregnancy (n=6)	2.4±1.5	51.7±43.9	123.8±128.2	24.6±15.3	14.9±15.4	60.6±38.2	33.3
	All (n=54)	2.3±1.6	58.9±48.8	145.6±131.5	25.9±16.2 ^c	16.2±14.1	65.2±35.8	40.7 ^c

^aData were log-transformed prior to statistical analyses due to not normal distribution.

^bP < 0.01 vs. non-infected subjects.

^cP < 0.001 vs. non-infected subjects.

IUI, intrauterine insemination; IVF, in vitro fertilization.

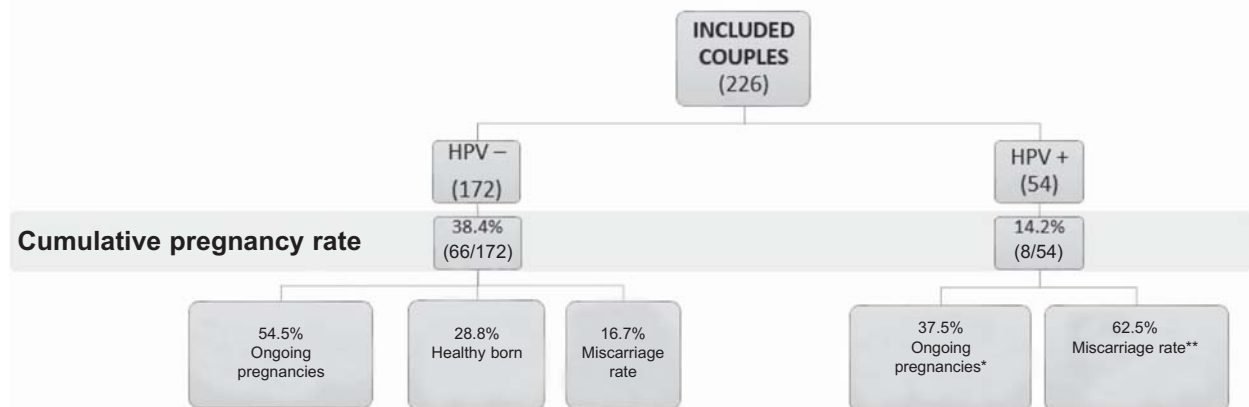


Figure 2
Comparison of cumulative pregnancy rates observed in human papillomavirus (HPV) non-infected and infected couples.

*HPV semen infection confined to exfoliated cells (two cases).

**HPV semen infection in sperm and exfoliated cells (two cases), confined to sperm (three cases) and confined to exfoliated cells (one case).

infected ones (62.5% vs. 16.7%). Pregnancy losses of the infected group took place very early (5th or 6th gestational week) and the localization of HPV semen infection was different in cases of ongoing pregnancies and miscarriage (Figure 2).

DISCUSSION

Recently, the human reproductive medicine has widely debated a possible role of HPV infection in fertility

impairment (12, 16, 17). Several studies show a higher prevalence of HPV semen infection in infertile patients compared to fertile controls (12, 16). In many of them, it has been highlighted a reduction of progressive motility and asthenozoospermia in semen (5, 8, 16). In addition to this, infertility seems to be also due to the presence of ASA that may compromise the motility apparatus of spermatozoa through an immune mechanism (18). It has been demonstrated that, thanks to its protein L1, HPV

binds the sperm's head along the equatorial region in a specific membrane-bound called proteoglycan sydecin-1 (3, 19). Moreover, it is not well understood if ASA in semen react directly to sperm surface or they bind to HPV linked to sperm cell.

In this study, some important results are confirmed, showing a higher prevalence of HPV semen infection (24%) in infertile couples undergoing ART and a significant reduction of sperm motility in patients with FISH analysis positive to the virus. Moreover, our data show that only couples without semen HPV infection had spontaneous pregnancy during the diagnosis period. In addition to alterations of sperm parameters, there is evidence suggesting that infected spermatozoa can act as carriers of viral genome into oocyte during conception and the effects of this infection could start from the viral active replication in fertilized oocyte and in trophoblastic cells to very early miscarriage events (3, 20). The data observed in our couples highlight a reduced success rate by ART in HPV infected individuals. In IUI group, the rate decreases from 20% in HPV negative to 9.5% in HPV positive subjects. In ICSI group, the rate goes down from 40.8% in HPV negative to 18.2% in HPV positive subjects. Interestingly, our findings show a significant reduction of cumulative pregnancy rates, both assisted and spontaneous, in HPV positives, possibly because of a HPV-linked reduction in penetration rate. During ART cycles, specifically in ICSI, reduction of the rate seems to be mainly due to impairment in blastocyst formation. For those HPV positive couples who had a successful pregnancy after ART, it should be pointed out that semen infection was restricted to exfoliated cells; on the contrary, all positive ones who had early miscarriages had the virus located on spermatozoa.

Concerning consequences of oocytes fertilized by HPV infected spermatozoa, the mechanisms are not well understood and need further evaluations. It is, however, clear that the virus presence on sperm leads to a reduction in blastocyst and trophoblast cells formation and an increase in apoptosis when trophoblast cells are transferred into maternal uterus. A reduction of implantation rate was found in several *in vitro* studies (20-22) and this confirms the significantly higher miscarriage rate observed in our study in HPV sperm infected ART couples. Our data are similar to those of a perspective study, which reported a miscarriage rate of 66.7% in couples undergoing ART with HPV semen infection (12).

In our opinion, a possible relationship between HPV sperm infection and infertility should not be underestimated, especially when couples undergo ART. Evidence suggests a role of HPV infection in alteration of sperm motility and presence of ASA, independently of the detected viral genotype. In particular, it has been shown that when the virus is located on the sperm's head surface instead of exfoliated cells, it can fertilize oocyte and blastocyst cells but the fertilization and implantation rates are lower. In the light of that, it could be useful to test couples for HPV presence and, in case of positive infection, to perform a FISH analysis of semen

to detect HPV at the sperm level, even if currently there is no effective treatment for infection. It is important to plan new clinical and laboratory studies aimed to definitively confirm the present data and to increase the knowledge of biological mechanisms of HPV-related infertility.

CONFLICTS OF INTEREST

None.

REFERENCES

1. Doorbar J, Quint W, Banks L, et al. The biology and life cycle of human papillomaviruses. *Vaccine* 2012;30:F55-70.
2. Giuliano AR, Tortolero-Luna G, Ferrer E, et al. Epidemiology of human papillomavirus in men, cancers other than cervical and benign conditions. *Vaccine* 2008;26(suppl 10):K17-28.
3. Foresta C, Patassini C, Bertoldo A, et al. Mechanism of human papillomavirus binding to human spermatozoa and fertilizing ability of infected spermatozoa. *PLoS One* 2011;6:e15036.
4. Rintala MA, Grénman SE, Pöllänen PP, et al. Detection of high risk HPV DNA in semen and its association with the quality of semen. *Int J STD AIDS* 2004;15:740-3.
5. Foresta C, Garolla A, Zuccarello D, et al. Human papillomavirus found in sperm head of young adult males affects the progressive motility. *Fertil Steril* 2010;93:802-6.
6. Laprise C, Trottier H, Monnier P, et al. Prevalence of human papillomaviruses in semen: a systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction* 2014;29:640-51.
7. Garolla A, Pizzol D, Bertoldo A, et al. Sperm viral infection and male infertility: focus on HBV, HCV, HIV, HPV, HSV, HCMV, and AAV. *J Reprod Immunol* 2013;100:20-9.
8. Lai Y, Lee F, Huang Y, et al. The effect of human papillomavirus infection on sperm cell motility. *Fertil Steril* 1997;6:1152-5.
9. Spandorfer SD, Bongiovanni AM, Fasioulotis S, et al. Prevalence of cervical human papillomavirus in women undergoing *in vitro* fertilization and association with outcome. *Fertil Steril* 2006;86:765-7.
10. Foresta C, Pizzol D, Moretti A, et al. Clinical and prognostic significance of human papillomavirus DNA in the sperm or exfoliated cells of infertile patients and subjects with risk factors. *Fertil Steril* 2010;5:1723-7.
11. Foresta C, Bertoldo A, Garolla A, et al. Human papillomavirus proteins are found in peripheral blood and semen CD20+ and CD56+ cells during HPV-16 semen infection. *BMC Infect Dis* 2013;13:593.
12. Perino A, Giovanelli L, Schillaci R et al. Human papillomavirus infection in couples undergoing *in vitro* fertilization procedures: impact on reproductive outcomes. *Fertil Steril* 2011;95:1845-8.
13. Garolla A, Engl B, Pizzol D, et al. Spontaneous fertility and *in vitro* fertilization outcome: new evidence of human papillomavirus sperm infection. *Fertil Steril* 2016;105:65-72.e1.
14. Ferraretti AP, La Marca A, Fauser BC, et al.; ESHRE Working Group on Poor Ovarian Response Definition. ESHRE consensus on the definition of "poor response" to ovarian stimulation for *in vitro* fertilizations: the Bologna criteria. *Human Reproduction* 2011;26:1616-24.
15. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical

- mucus interaction. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1999.
16. Yang Y, Jia CW, Ma YM, et al. Correlation between HPV sperm infection and male infertility. *Asian J Androl* 2013;15:529-32.
 17. Foresta C, Noventa M, de Toni L, et al. HPV-DNA sperm infection and infertility: from a systematic literature review to a possible clinical management proposal. *Andrology* 2015;3:163-73.
 18. Garolla A, Pizzol D, Bertoldo A, et al. Association, prevalence, and clearance of human papillomavirus and antisperm antibodies in infected semen samples from infertile patients. *Fertil Steril* 2013;99:125-31.
 19. Perez-Andino J, Buck CB, Ribbeck K. Adsorption of human papillomavirus 16 to live human sperm. *PLoS One* 2009;4:e5847.
 20. Gizzo S, Ferrari B, Noventa M, et al. Male and couple fertility impairment due to HPV-DNA sperm infection: update on molecular mechanism and clinical impact – systematic review. *Biomed Res Int* 2014;2014:230263.
 21. Hennenberg AA, Patton WC, Jacobson JD, et al. Human papilloma virus DNA exposure and embryo survival is stage-specific. *J Assist Reprod Genet* 2006;23:255-9.
 22. Boulouvar S, Weyn C, Van Noppen M, et al. Effect on HPV-16 E5, E6 and E7 proteins on survival, adhesion, migration and invasion of trophoblastic cells. *Carcinogenesis* 2010;31:473-80.

Male infertility and ageing: two faces of the same coin?

Massimo Alfano¹, Manuela Nebuloni², Pietro Zerbi², Andrea Salonia^{1,3}

¹Division of Experimental Oncology-Unit of Urology, Urological Research Institute, IRCCS Ospedale San Raffaele, Milan

²Pathology Unit, Department of Biomedical and Clinical Sciences, L. Sacco Hospital, Università degli Studi di Milano, Milan

³Università Vita-Salute San Raffaele, Milan

ABSTRACT

Couple infertility has become a common condition in Western societies, with important medical, psychological and socio-economical consequences. Female conditions related to infertility have been extensively investigated. On the contrary, despite infertility affects 7% of all men and 50% of cases are of idiopathic nature, there is still a lack in terms of knowledge about etiology and pathophysiology behind male factor infertility. Clinically, infertile men are sicker than fertile men, as they experience higher rate of developing neoplastic disease and age-related comorbidities. Moreover, histological modifications of testicular parenchima of elder men are very similar to that observed in younger infertile male. Thereof, infertile male could be considered as an individual characterized by a faster ageing process. As a whole, a poorer health status appears to be associated to a malfunctioning male reproductive system, with the worst clinical picture in azoospermic individuals. We could considerate that an infertile male is an individual who grows old sooner and speculate that the same mechanisms leading to clinical and testicular histopathological modification of the elder lead to infertility in the young man. On the whole, male infertility could be considered as a proxy of general male health, with the etiological factors for infertility possibly representing markers of male healthiness and therapeutic intervention. Better understanding of the pathological bases of one condition could lighten the comprehension of the other one.

MALE INFERTILITY

Infertility affects 7% of all men; notwithstanding, either congenital or acquired (including lifestyle, environmental and diet) factors have been associated with male infertility etiology, 50% of cases being of idiopathic nature (1-3).

Semen analysis is the main exam for the evaluation of infertile man. It assesses many parameters which are considered as main fertility index such as a) sperm concentration: under 15 million/mL the subject is considered oligospermic (if no spermatozoa are found in the ejaculate the subject is azoospermic); b) sperm motility: under 32% motile spermatozoa the subject has asthenozoospermia; c) sperm morphology: if <4% normal shapes are found, the subject has teratozoospermia. Azoospermia affects ~1% of men and 10-15% of infertile men (4, 5). With no sperm found at multiple semen analyses, non-obstructive azoospermia (NOA) is the most severe form of infertility (6). The "gold standard" diagnostic test in NOA is testicular biopsy; germ cell maturation arrest, hypospermatogenesis,

Sertoli-cell only syndrome, tubular sclerosis or combined patterns are the possible features at the basis of NOA found at histology examination. Microdissection testicular sperm extraction (microTESE) allows finding spermatozoa directly in the testis, because although spermatogenesis is highly defective, some foci of sperm production can be present on site. Positive sperm retrieval from microTESE represents the basis for any assisted reproductive technology (ART) approach in men with NOA. At the present state, however, finding spermatozoa with microTESE in these patients is little more likely than coin toss (7). There are no useful predictive biomarkers available for use in the everyday clinical practice that are suggestive for successful sperm retrieval at microTESE in NOA men undergoing *in vitro* fertilization programs (8); in fact, there is no association between a) preoperative testicular volume, b) follicular-stimulating hormone levels or c) testosterone response to hormonal therapy and microTESE sperm retrieval outcomes (8). Furthermore, in case of positive sperm retrieval, only 4-20% of fertilized oocytes had success uterine implantation (9).

Correspondence to: Massimo Alfano, Division of Experimental Oncology/Unit of Urology, IRCCS Ospedale San Raffaele, Via Olgettina 60, 20132 Milan. Tel. +390226436351, E-mail alfano.massimo@hsr.it

Ricevuto: 01.02.2016

Revisionato: 22.03.2017

Accettato: 24.03.2017

Pubblicato on-line: 17.11.2017

DOI: 10.19186/BC_2017.049

TESTICULAR HISTOLOGY AND SHARED MORPHOLOGY

The trend toward later fathering appears to go hand in hand with risks for diminished semen quality and fertility (10). From a histological point of view, it has been demonstrated that pathological changes occurred in aging testis were associated with degenerative alterations on both the seminiferous epithelium and the interstitial compartment, which contribute to lowering testis functions, spermatogenesis and testosterone production (11).

Histological modifications observed in the testicular parenchima of young infertile individuals are similar to those depicted in aged men (11, 12). Among those: a) widespread vacuoles within seminiferous epithelia; b) reduced spermatogenesis; c) heterogeneous spermatogenesis, with some seminiferous tubules that show spermatogenesis and the adjacent tubules showing complete lack of spermatogenesis, thus reflecting a progressive degenerative process of the testicular tissue; d) abnormal tissue modifications, including loose connections and abnormal Leydig cells aggregations, which may eventually ending with a reduced production of testosterone (11); e) fibrosis of the seminiferous tubules wall (12). The progressive degenerative process linked to male infertility outlines the existence of chronic etiological agents/pathways and the need to identify an adequate time-frame for potential therapeutic intervention.

Thereof, we could consider an infertile male as a man who grows old sooner and we could speculate that same mechanisms leading to clinical and testicular histopathological modification of the elder leads to infertility in the young man. Better understanding of the pathological bases of one condition could lighten the comprehension of the other one. These observations also seem to suggest a potential common pattern between infertility and mortality.

INFERTILITY AS COMORBIDITY

It has long been established the relationship between health status and male fertility, with a variety of diseases negatively impacting on male reproductive functioning (13): urogenital and systemic infections by *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* and *E. coli* (14), autoimmune disease (15), endocrinopathies, metabolic disorders and obesity (16, 17), chronic liver and kidney disease (18, 19) are all at least alleged and more than often confirmed conditions known to detrimentally influence fertility. As an example, metabolic syndrome, obesity per se and diabetes induce changes in the hormonal homeostasis, resulting in hypogonadism due to aromatization of testosterone into estrogen (e.g., male obesity-associated secondary hypogonadism, MOSH) (17, 20-25). Among others, in diabetic patients high D-glucose concentrations in plasma may lead to impairment of Sertoli cell function, which, given their significant role in spermatogenic

control, may compromise male fertility (26).

On the other hand, in the last few years the relationship between male infertility and increased incidence of co-morbidities in the years following the first infertility evaluation has been reported (27, 28).

MALE INFERTILITY AS PREDIPOSING FACTOR OF AGE-RELATED COMORBIDITIES

The process of early ageing of the seminiferous tubules of infertile men is also recapitulated at the systemic level. In the years following an infertility evaluation, the infertile men experience an increased incidence of comorbidities, which are usually peculiar of older individuals. Infertile men experience 3 times higher risk of developing testicular, brain and prostate cancer, lymphoma and melanoma, as well as cardiovascular disease and disorders linked with a condition of higher insulin resistance (27, 29) and have an increased mortality rate (13, 28, 30). Indeed, mortality decreased as the sperm parameters increase (e.g., sperm concentration increased up to a threshold of 40 million/mL, the percentages of motile and morphologically normal spermatozoa and semen volume) (31). The decrease in mortality among men with good semen quality was due to a decrease in a wide range of diseases and was found among men with and without children, thus indicating that the decrease in mortality could not be attributed solely to lifestyle and/or social factors (27, 31).

Infertile men were identified with 1.7 times more likely probability to develop testis and prostate cancers (32-39). Among the infertile classification, the azoospermic individuals had the highest incidence of solid cancer, with 2.9 fold increased risk vs. the fertile men at the same age. In other words, the risk of developing solid cancer for an azoospermic men is similar to that for a man 10 years older (39). It is unknown if a shared etiology occurs between azoospermia and carcinogenesis, although authors have provided some explanations both at the genomic and somatic level.

Many genetic causes have been associated with male infertility (40), although genetic defects are found in only 17-20% of non-obstructive azoospermic individuals (39, 41-43). Some studies have reported that defects in DNA repair proteins are at the cross-over of impaired spermatogenesis and likelihood of carcinogenesis (44-48). Single nucleotide polymorphism in the Lynch syndrome gene *MLH1* in Chinese men (49) or in murine models that are deficient of DNA repair genes *ERCC1* (excision repair cross-complementing gene 1), *MSH2* (MutS homolog 2) or *p53* have been reported. Defect in these genes are associated with the development of Sertoli Cells Only Syndrome in the context of azoospermia condition and lymphoid tumors early in the life (50, 51).

The clinical frame of infertile males is thus characterized by early ageing, at first evident at the testis level and later on at the systemic level. These

clinical features might represent the result of genetic precommitment induced by epigenetic factors. In support of the occurrence of epigenetic control of male infertility, there are some studies that have established the relevance of the somatic environment in sustaining spermatogonial stem cells differentiation into sperm. In animal models, data support the concept that germ cells of an infertile male subject or from aged mice retain their capability of generating functional spermatozoa for a long time (52, 53); likewise, upon their transplantation into a healthy or young recipient testis, they mature into functional spermatogonia. Conversely, spermatogonial stem cells from young mice transplanted into atrophied testes are unable to perform spermatogenesis (54). Similarly, preventing the ageing of the somatic environment prevents the loss of spermatogonial stem cells in aged *Drosophila melanogaster* (55). As a whole, these findings support the relevance of the extracellular microenvironment(s) over the process of spermatogenesis, thus indicating that restoring a proper niche might be of major importance in terms of recovering germ cell production and development. In support of a role of the somatic/local environment and irrespective of a genetic deficit, delayed orchiopexy for chytorchidism condition has been associated with the occurrence of an increased rate of cancer and infertility (56, 57).

CONCLUSIONS

Treating comorbidities such as metabolic syndrome with metformin in infertile men has resulted in improvement of metabolic, hormonal and seminal parameters (58). In agreement, weight loss in obese men resulted in increased serum concentrations of testosterone (59). On the other side, male infertility has been suggested as a proxy of the overall men's health status (27, 28). Clinical and histologic testicular features support the idea that infertile men are characterized by a faster process of ageing and that the lack of germ cells in young infertile men could be representative of an early manifestation of the effect of numerous altered pathways, underpinning the existence of a potential common chronic ground fostering both infertility and comorbid conditions. These observations also seem to suggest a potential common etiology between infertility and mortality.

We have recently reported that a low birth weight was more frequent in infertile subjects than fertile men and that infertile men with low birth weight had a higher rate of comorbidities and asthenozoospermia and teratozoospermia compared to other birth weight groups. In a multivariate analysis, low birth weight achieved independent predictor status for both lower sperm motility and pathologic sperm morphology (60). These findings seem to indicate that an unfavorable pattern occurs in low birth weight men, but also that male infertility is a chronic process that starts from the beginning of life. More research is needed for the identification of prognostic markers, ideally at the

systemic level, allowing to follow the degenerative processes ending into a compromised spermatogenesis.

Overall, male infertility could be eventually considered a proxy of general male health, with the same etiological factors for infertility possibly representing markers of male healthiness and therapeutic intervention. Male infertility and aging might represent two sides of the same coin, indicating that better understanding of the pathological bases of one condition could lighten the comprehension and treatment of the other one.

CONFLICTS OF INTEREST

None.

REFERENCES

1. Krausz C. Male infertility: pathogenesis and clinical diagnosis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2011;25:271-85.
2. <http://uroweb.org/guideline/male-infertility/>
3. Wosnitzer M, Goldstein M, Hardy MP. Review of azoospermia. *Spermatogenesis* 2014;4:e28218.
4. Stephen EH, Chandra A. Declining estimates of infertility in the United States: 1982-2002. *Fertil Steril* 2006;86:516-23.
5. World Health Organization. WHO Laboratory manual for the examination and processing of human semen, 5th ed. Geneva: World Health Organization, 2010.
6. http://uroweb.org/wp-content/uploads/17-Male-Infertility_LR1.pdf
7. Ishikawa T. Surgical recovery of sperm in non-obstructive azoospermia. *Asian J Androl* 2012;14:109-15.
8. Ramasamy R, Padilla WO, Osterberg EC, et al. A comparison of models for predicting sperm retrieval before microdissection testicular sperm extraction in men with nonobstructive azoospermia. *J Urol* 2013;189:638-42.
9. Nicopoulos JD, Gilling-Smith C, Almeida PA, et al. Use of surgical sperm retrieval in azoospermic men: a meta-analysis. *Fertil Steril* 2004;82:691-701.
10. Kidd SA, Eskenazi B, Wyrobek AJ. Effects of male age on semen quality and fertility: a review of the literature. *Fertil Steril* 2001;75:237-48.
11. Yi-chao XU, Jing LI, Wei-bao Liang, et al. Evaluation on changes of testicular histology in aging men. *J Reprod Contracept* 2014;24:199-204.
12. Kaden R. Testicular histology in the aging man. *Fortschr Med* 1975;93:1545-9.
13. Eisenberg ML, Li S, Behr B, et al. Relationship between semen production and medical comorbidity. *Fertil Steril* 2015;103:66-71.
14. Pellati D, Mylonakis I, Bertoloni G, et al. Genital tract infections and infertility. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2008;140:3-11.
15. Carp HJ, Selmi C, Shoenfeld Y. The autoimmune bases of infertility and pregnancy loss. *J Autoimmun* 2012;38:J266-74.
16. Michalakis K, Mintziori G, Kaprara A, et al. The complex interaction between obesity, metabolic syndrome and reproductive axis: a narrative review. *Metabolism* 2013;62:457-78.
17. Aggerholm AS, Thulstrup AM, Toft G, et al. Is overweight a risk factor for reduced semen quality and altered serum sex hormone profile? *Fertil Steril* 2008;90:619-26.
18. Iglesias P, Carrero JJ, Diez JJ. Gonadal dysfunction in

- men with chronic kidney disease: clinical features, prognostic implications and therapeutic options. *J Nephrol* 2012;25:31-42.
19. Hofny ER, Ali ME, Taha EA, et al. Semen and hormonal parameters in men with chronic hepatitis C infection. *Fertil Steril* 2011;95:2557-9.
 20. Corona G, Lee DM, Forti G, et al. Age-related changes in general and sexual health in middle-aged and older men: results from the European Male Ageing Study (EMAS). *J Sex Med* 2010;7:1362-80.
 21. Wild S, Roglic G, Green A, et al. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 2004;27:1047-53.
 22. MacDonald AA, Herbison GP, Showell M, et al. The impact of body mass index on semen parameters and reproductive hormones in human males: a systematic review with meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2010;16:293-311.
 23. Lotti F, Corona G, Degli Innocenti S, et al. Seminal, ultrasound and psychobiological parameters correlate with metabolic syndrome in male members of infertile couples. *Andrology* 2013;1:229-39.
 24. Leisegang K, Udodong A, Bouic PJ, et al. Effect of the metabolic syndrome on male reproductive function: a case-controlled pilot study. *Andrologia* 2014;46:167-76.
 25. La Vignera S, Condorelli R, Vicari E, et al. Diabetes mellitus and sperm parameters. *J Androl* 2012;33:145-53.
 26. Tavares RS, Portela JM, Sousa MI, et al. High glucose levels affect spermatogenesis: an in vitro approach. *Reprod Fertil Dev* 2016. doi: 10.1071/RD15475. Epub ahead of print.
 27. Ventimiglia E, Capogrosso P, Boeri L, et al. Infertility as a proxy of general male health: results of a cross-sectional survey. *Fertil Steril* 2015;104:48-55.
 28. Salonia A, Matloob R, Gallina A, et al. Are infertile men less healthy than fertile men? Results of a prospective case-control survey. *Eur Urol* 2009;56:1025-31.
 29. Ventimiglia E, Capogrosso P, Colicchia M, et al. Metabolic syndrome in white European men presenting for primary couple's infertility: investigation of the clinical and reproductive burden. *Andrology* 2016;4:944-51.
 30. Eisenberg ML, Li S, Behr B, et al. Semen quality, infertility and mortality in the USA. *Hum Reprod* 2014;29:1567-74.
 31. Jensen TK, Jacobsen R, Christensen K, et al. Good semen quality and life expectancy: a cohort study of 43,277 men. *Am J Epidemiol* 2009;170:559-65.
 32. Walsh TJ, Croughan MS, Schembri M, et al. Increased risk of testicular germ cell cancer among infertile men. *Arch Intern Med* 2009;169:351-6.
 33. Walsh TJ, Schembri M, Turek PJ, et al. Increased risk of high-grade prostate cancer among infertile men. *Cancer* 2010;116:2140-7.
 34. Jacobsen R, Bostofte E, Engholm G, et al. Risk of testicular cancer in men with abnormal semen characteristics: cohort study. *Br Med J* 2000;321:789-92.
 35. Eisenberg ML, Park Y, Brinton LA, et al. Fatherhood and incident prostate cancer in a prospective US cohort. *Int J Epidemiol* 2011;40:480-7.
 36. Giwercman A, Richiardi L, Kaijser M, et al. Reduced risk of prostate cancer in men who are childless as compared to those who have fathered a child: a population based case-control study. *Int J Cancer* 2005;115:994-7.
 37. Negri E, Talamini R, Bosetti C, et al. Risk of prostate cancer in men who are childless. *Int J Cancer* 2006;118:786-7; author reply:788.
 38. Ruhayel Y, Giwercman A, Ulmert D, et al. Male infertility and prostate cancer risk: a nested case-control study. *Cancer Causes Control* 2010;21:1635-43.
 39. Eisenberg ML, Betts P, Herder D, et al. Increased risk of cancer among azoospermic men. *Fertil Steril* 2013;100:681-5.
 40. O'Flynn O'Brien KL, Varghese AC, Agarwal A. The genetic causes of male factor infertility: a review. *Fertil Steril* 2010;93:1-12.
 41. Dohle GR, Halley DJ, Van Hemel JO, et al. Genetic risk factors in infertile men with severe oligozoospermia and azoospermia. *Hum Reprod* 2002;17:13-6.
 42. Stahl PJ, Masson P, Mielnik A, et al. A decade of experience emphasizes that testing for Y microdeletions is essential in American men with azoospermia and severe oligozoospermia. *Fertil Steril* 2010;94:1753-6.
 43. Oates R. Evaluation of the azoospermic male. *Asian J Androl* 2012;14:82-7.
 44. Matzuk MM, Lamb DJ. The biology of infertility: research advances and clinical challenges. *Nat Med* 2008;14:1197-213.
 45. Mukherjee S, Ridgeway AD, Lamb DJ. DNA mismatch repair and infertility. *Curr Opin Urol* 2010;20:525-32.
 46. Gonsalves J, Sun F, Schlegel PN, et al. Defective recombination in infertile men. *Hum Mol Genet* 2004;13:2875-83.
 47. Maduro MR, Casella R, Kim E, et al. Microsatellite instability and defects in mismatch repair proteins: a new aetiology for Sertoli cell-only syndrome. *Mol Hum Reprod* 2003;9:61-8.
 48. Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Main KM. Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Hum Reprod* 2001;16:972-8.
 49. Ji G, Long Y, Zhou Y, et al. Common variants in mismatch repair genes associated with increased risk of sperm DNA damage and male infertility. *BMC Medicine* 2012;10:49-59.
 50. Paul C, Povey JE, Lawrence NJ, et al. Deletion of genes implicated in protecting the integrity of male germ cells has differential effects on the incidence of DNA breaks and germ cell loss. *PLoS One* 2007;2:e989.
 51. Reitmair AH, Schmits R, Ewel A, et al. MSH2 deficient mice are viable and susceptible to lymphoid tumours. *Nat Genet* 1995;11:64-70.
 52. Ogawa T, Dobrinski I, Avarbock MR, et al. Transplantation of male germ line stem cells restores fertility in infertile mice. *Nat Med* 2000;6:29-34.
 53. Ryu BY, Orwig KE, Oatley JM, et al. Effects of aging and niche microenvironment on spermatogonial stem cell self-renewal. *Stem Cells* 2006;24:1505-11.
 54. Zhang X, Ebata KT, Robaire B, et al. Aging of male germ line stem cells in mice. *Biol Reprod* 2006;74:119-24.
 55. Boyle M, Wong C, Rocha M, et al. Decline in self-renewal factors contributes to aging of the stem cell niche in the *Drosophila* testis. *Cell Stem Cell* 2007;1:470-8.
 56. Pettersson A, Richiardi L, Nordenskjöld A, et al. Age at surgery for undescended testis and risk of testicular cancer. *N Eng J Med* 2007;356:1835-41.
 57. Goel P, Rawat JD, Wakhlu A, et al. Undescended testicle: An update on fertility in cryptorchid men. *Indian J Med Res* 2015;141:163-71.
 58. Morgante G, Tosti C, Orvieto R, et al. Metformin improves semen characteristics of oligo-terato-asthenozoospermic men with metabolic syndrome. *Fertil Steril* 2011;95:2150-2.
 59. Kaukua J, Pekkarinen T, Sane T, et al. Sex hormones and sexual function in obese men losing weight. *Obes Res* 2003;11:689-94.
 60. Boeri L, Ventimiglia E, Capogrosso P, et al. Low birth weight is associated with a decreased overall adult health status and reproductive capability - Results of a cross-sectional study in primary infertile patients. *PLoS One* 2016;11:e0166728.

Tutela della dignità umana e libertà di ricerca scientifica: una possibile soluzione al conflitto in tema di embrioni sovrannumerari

Valeria Marzocco, Barbara Salvatore

Dipartimento di Giurisprudenza, Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli

ABSTRACT

Human dignity and freedom of scientific research: a balancing approach for surplus embryos. The new challenges posed by biotechnology for legal science have led to unprecedented dilemmas as regards legal subjectivity and the beginning of life. Notably, biotechnology has rearticulated the existential project concerning procreation and parenting. In this process, biotechnology expands the existential prerogatives of the involved parties, but it also radicalizes ethical positions impinging on crucial issues posed by the need to define, in philosophical and legal terms, the status of entities produced but not necessarily involved in the procreative process, as in the case of embryos. This dilemma is crucial in the field of assisted reproductive techniques, as witnessed by the Italian regulatory framework (art. 1 co.1, L. 40/2004). The Italian "Rules Governing Assisted Fertilization" have been extensively modified by the Constitutional Court that, in recent years, declared many of its parts unconstitutional. The Court's judgment finally permits a diagnostic survey of the health of the embryo, thereby allowing couples to transfer only "healthy" embryos in the uterus. The production of surplus embryos (so-called because they exceed the number of embryos transferred to the uterus) poses ethical and legal dilemmas about their destiny, especially in the case of embryos whose growth is arrested *in vitro* or who are affected by a severe disease and thus are excluded from becoming individuals. Considering the recent Constitutional Court's judgment on art. 13 L. 40/2004 (84/2016), this paper analyses the current open dilemma on the destiny of the surplus embryos, even in the light of the European framework offered both by National legislations and Higher European Courts on this topic.

Le sfide poste dalle biotecnologie alla scienza del diritto pongono dilemmi inediti, sia sotto il profilo dello statuto giuridico della soggettività, che per quanto riguarda la ridefinizione di fatti che il giurista annoverava tradizionalmente come fatti naturali, l'inizio e la fine della vita. Soprattutto per quanto riguarda l'inizio della vita, l'impatto delle biotecnologie è stato decisivo, perché ha progressivamente riarticolato l'aspettativa riferita al progetto esistenziale riguardante la procreazione e la genitorialità, ampliando le prerogative dei soggetti coinvolti, ma anche radicalizzando le posizioni etiche che si confrontano su questioni difficili, poste dalla necessità di definire filosoficamente e giuridicamente lo statuto di entità, come l'embrione, che sono prodotte, ma non necessariamente coinvolte nel perfezionarsi del processo procreativo (1-4).

Nel quadro definito dell'evoluzione scientifica e tecnologica, in cui il corpo si conferma essere per il giurista «un oggetto giuridico nuovo» (5), la questione dello statuto dell'embrione umano segna una pagina eticamente e giuridicamente complessa. Particolarmente

nella materia delle tecniche di procreazione medicalmente assistita (PMA), questo dilemma si fa critico, come dimostra il quadro normativo italiano. In Italia la legge che disciplina le tecniche di PMA, entrata in vigore nel 2004 (L. 40/2004), ha subito significative modifiche al suo impianto originario a opera della Corte Costituzionale, che in molte occasioni ha avuto modo di dichiararne i profili di incostituzionalità. Nel quadro di regolazione che può ancora desumersi dalla legge, così come ridisegnata negli ultimi anni – quadro su cui si è da ultimo pronunciata la Corte Costituzionale con la sentenza 84/2016 –, particolarmente significativa è stata la sentenza 229/2015, con cui la Corte ha dichiarato l'illegittimità costituzionale degli artt. 13 comma 4 lettera B e 4 "nella parte in cui contempla come ipotesi di reato la condotta di selezione degli embrioni anche nei casi in cui questa sia esclusivamente finalizzata a evitare l'impianto nell'utero della donna di embrioni affetti da malattie genetiche trasmissibili" e "rispondenti ai criteri di gravità di cui all'art. 6 comma 1 lettera B, della legge 22 maggio 1978, n. 194 ...accertate da apposite strutture pubbliche

Corrispondenza a: Barbara Salvatore, Dipartimento di Giurisprudenza, Università degli Studi di Napoli Federico II, Via Porta di Massa 32, Napoli. Tel. 0812534311. E-mail: barbara.salvatore@unina.it

Ricevuto: 08.02.2017

Revisionato: 03.05.2017

Accettato: 04.05.2017

Pubblicato on-line: 20.11.2017

DOI: 10.19186/BC_2017.053

(Norme per la tutela sociale della maternità e sulla interruzione volontaria della gravidanza)". È un punto decisivo che apre definitivamente alla possibilità di effettuare un'indagine diagnostica sullo stato di salute dell'embrione, che consenta alla coppia, nei limiti dati dalla legge, di procedere ad autorizzare il trasferimento in utero dei soli embrioni "sani".

La produzione di embrioni in sovrannumero, definiti così perché prodotti in numero maggiore rispetto a quelli trasferiti in utero, pone, quindi, il dilemma sia etico che giuridico circa la sorte di quelli tra loro che abbiano arrestato il loro sviluppo *in vitro* ovvero siano portatori di anomalie genetiche incompatibili con la vita. Da ciò la necessità di riflettere sullo statuto teorico del "prodotto del concepimento" e sulla sua tutela (6). Si tratta di una questione teorica essenziale, alla quale è stata riservata in questi anni attenzione da più parti, tutte alla ricerca di una definizione giuridica ed etica dell'embrione volta a tutelarne per un verso la dignità e per l'altro a bilanciarne il principio con la libertà di ricerca scientifica (7).

Le possibilità di utilizzazione degli embrioni sovrannumerari (prodotti in numero maggiore rispetto a quelli utilizzati in ciascun ciclo di fecondazione assistita e non utilizzati per il trasferimento in utero) ricadono nell'area di una scelta che investe il legislatore, sia in ordine alle questioni che possono riguardare la fissazione di un termine per la loro conservazione, sia con riguardo a ipotesi che consentano l'adozione o la donazione per la nascita, che, ancora, nel caso in cui queste ultime non siano possibili, per quanto attiene alla loro eventuale destinazione alla ricerca scientifica (8).

Con riferimento esclusivo alla categoria di embrioni che, per ragioni di ordine biologico, non possano essere più destinati alla vita, è probabilmente opportuno interrogarsi, in assenza di un'espressa previsione normativa sul punto, su ipotesi che siano in grado di superare una condizione di oggettiva "impasse" oggi rappresentata dall'obbligo di conservazione *sine die*, anche attraverso il perseguimento di fini di solidarietà sociale a beneficio della salute collettiva (9). Sul punto, la legge 40/2004 appare molto chiara, da un lato nel consentire la ricerca clinica e sperimentale su ciascun embrione umano "esclusivamente a condizione che si perseguano finalità terapeutiche e diagnostiche a essa collegate volte alla tutela della salute e allo sviluppo dell'embrione stesso", e dall'altro nel negare qualsiasi possibilità che gli embrioni possano essere oggetto di sperimentazioni (art. 13 L. 40/2004). Si tratta di un tema molto delicato, la cui problematicità etica è stata posta in luce nel 2007 dal Comitato Nazionale di Bioetica (Parere sul destino degli embrioni derivanti da PMA e non impiantabili) e sulla quale si è di recente pronunciata la Corte Costituzionale italiana, con la sentenza 84/2016, che segue la di poco precedente pronuncia della Corte Europea dei Diritti dell'Uomo del 2015 (10, 11).

Sotto un profilo di politica del diritto, l'attenzione rispetto alla ricerca scientifica e al progresso delle conoscenze sulle cellule staminali embrionali è nell'agenda della stessa Unione Europea che, nell'ambito della valorizzazione della ricerca e dello sviluppo

tecnologico, ha confermato il finanziamento alla ricerca sperimentale non solo sulle cellule staminali adulte, ma anche sulle linee cellulari derivanti da embrioni già esistenti (12, 13).

Le questioni aperte dallo sviluppo delle biotecnologie pongono il dilemma dello statuto dell'embrione umano in termini radicali, sia sotto il profilo filosofico che giuridico (14, 15). Soprattutto sul fronte aperto dalla ricerca scientifica e dalla sperimentazione, che incrocia la più ampia questione della brevettabilità, definire l'embrione si mostra tutt'altro che un'interrogazione astratta quanto, piuttosto, un'importante e cruciale linea di demarcazione dei confini che si pongono tra il diritto e la scienza – ma anche tra ordine pubblico e mercato – nella determinazione e nella giustificazione delle definizioni da adottare sul vivente. In questi termini, la varietà delle posizioni sono testimoniate dalla diversità delle legislazioni nazionali sul punto: a mero titolo esemplificativo si può osservare come solo già nel contesto europeo le definizioni e le tutele offerte al "prodotto del concepimento" possano essere diametralmente opposte. In Spagna, la legge 14/2006 [sobre tecnica de reproduccion humana asistada] e la legge 14/2007 [de investigacion biomedica] demarcano una netta distinzione, quanto alla tutela offerta, tra il pre-embrione (gruppo di cellule risultanti dalla divisione progressiva dell'ovulo dalla sua fecondazione fino al 14° giorno) e l'embrione (dall'impianto in utero fino all'organogenesi), mentre nel Regno Unito, che è tra gli Stati che offrono una più ampia possibilità di intervento per finalità di ricerca scientifica sugli embrioni, ai sensi dello "Human Fertilisation and Embriology Act" del 1990, come modificato nel 2008, è considerato embrione umano l'ovulo in corso di fecondazione o soggetto ad altro procedimento idoneo a produrre un embrione (16).

La Corte Costituzionale italiana, chiamata a pronunciarsi nel 2016 proprio in ordine alla possibilità di destinare gli embrioni soprannumerari (non più destinati a un impianto in utero) alla ricerca scientifica, si mostra consapevole della difficoltà etica e scientifica della questione, nonché dell'eterogeneità della legislazione europea sul punto. La Corte sceglie quindi di non pronunciarsi, rigettando il ricorso, sulla base della considerazione che spetta al legislatore e non all'interprete effettuare sulla base della propria discrezionalità il bilanciamento tra i valori fondamentali in conflitto (il principio della vita dell'embrione, che ha una sua "dignità antropologica" anche se affetto da patologie e la libertà di ricerca scientifica) (Corte Costituzionale 13 aprile 2016, n. 84) (17).

Sotto altro versante, particolarmente interessante appare lo sforzo interpretativo della Corte di Giustizia europea chiamata, con la vicenda apertasi a partire dal caso *Brüstle vs. Greenpeace* del 2011 (causa C-34/10), a offrire, in senso restrittivo, una definizione dell'embrione umano ritenuta necessaria per la individuazione dei limiti di ammissibilità della brevettabilità del vivente. In questi termini, e particolarmente sull'interpretazione del divieto di brevettabilità dell'embrione posto dall'art. 6 comma 2 lettera C della Direttiva 98/44, la giurisprudenza della

Corte di Lussemburgo ha ridefinito la nozione più ampia che ne era stata data nella sentenza del 2011 ("è da considerarsi embrione umano l'ovulo umano non fecondato in cui sia stato impiantato il nucleo di una cellula umana matura e l'ovulo umano non fecondato indotto a dividersi e a svilupparsi attraverso la partenogenesi"), attestandosi su una determinazione finalistica più restrittiva, fondata su un distinto e più complesso riferimento alle acquisizioni offerte dalla conoscenza scientifica. La stessa Corte, nel 2014, pur affermando una continuità con la precedente sentenza, ha però chiarito che quando, secondo le attuali conoscenze della Scienza, un ovulo non fecondato, pur se indotto a svilupparsi, non può evolversi in individuo, in quanto manca di talune componenti genetiche necessarie al suo sviluppo, e per il quale siano esclusi ulteriori interventi di ingegneria genetica, non può essere considerato embrione umano. Ciò che la Corte intende rimarcare è che non sia sufficiente a qualificare come embrione un organismo "tale da dare avvio al processo di sviluppo di un essere umano", ma che esso "deve necessariamente avere la capacità intrinseca di svilupparsi in essere umano". Di conseguenza, nell'ipotesi in cui un ovulo umano non fecondato non soddisfi tale condizione, il solo fatto che tale organismo inizi un processo di sviluppo non basta di per sé a considerarlo un embrione umano ai sensi e ai fini della Direttiva 98/44 (18, 19).

La rideterminazione dell'impostazione finalistica del concetto di embrione offerta nel 2014 dal Giudice di Lussemburgo è estremamente interessante da considerare, non solo nella prospettiva che ne emerge in tema di individuazione di uno statuto dell'embrione che si produce come soggettività morale meritevole di tutela in misura mutevole e dinamica, ma anche con riguardo al modello di validazione che ne è affidato, per la formulazione di questo giudizio, a un ruolo coproduttivo che affida alla Scienza, e non solo e tanto al legislatore, la responsabilità della sua costruzione. Nel registro di una visione teleologica della natura umana e della qualificazione della soggettività dell'embrione all'interno di essa, come parte di un processo in divenire, il meritevole di tutela si giustifica nel senso dell'appartenenza finalistica a tale sviluppo, che esclude così la possibilità di una determinazione data in termini statici (come nel caso del modello adottato dal legislatore spagnolo sia nel 2006, in materia di PMA, che nel 2007, con riguardo alla ricerca biomedica), ma apre anche a delle prospettive nuove che potevano entrare nel ragionamento della Corte Costituzionale. Con ciò si vuole sottolineare come l'adozione di questo principio finalistico da parte della Corte Costituzionale italiana ma, oggi forse ancor di più, da parte dello stesso legislatore, che, nella prospettiva di modifica della L. 40/2004, dovrà preoccuparsi della questione cruciale del destino degli embrioni sovrannumerari, potrebbe condurre a escludere dalla definizione di embrione umano e dalla tutela forte a esso offerta in ragione della sua dignità, quei "prodotti del concepimento" per i quali sia arrestato il processo di crescita ovvero per i quali siano accertate anomalie

incompatibili con lo sviluppo in individuo. L'adozione di questo principio finalistico sollecita a verificare l'utilizzabilità di un principio teleologico che assegni tutela alla vita in potenza anche in relazione alla possibilità verificabile in base alle conoscenze scientifiche di concreto sviluppo della vita stessa.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

- Alpa G. Lo statuto dell'embrione tra libertà, responsabilità, divieti. *Sociologia del diritto* 2004;1:13-42.
- Cortesi C, Faralli C, eds. *Nuove maternità*. Bologna: Diabasis, 2005.
- D'Avack L. Diritti dell'uomo e biotecnologie. Un conflitto da arbitrare. *Rivista di filosofia del diritto* 2013;9:9-30.
- Chieffi L. Ricerca scientifica e tutela della persona. *Bioetica e garanzie costituzionali*. Napoli: Edizioni Scientifiche Italiane, 1993.
- Rodotà S. Ipotesi sul corpo 'giuridificato'. *Riv Crit Dir Priv* 1994:467-90.
- Oppo G. L'inizio della vita umana. *Rivista di diritto civile* 1982;1:499-529.
- Caulfield T, Brownsword R. Human dignity: a guide to policy making in the biotechnology era? *Nat Rev Genet* 2006;7:72-6.
- Salvatore B. Tutela dell'embrione umano e ricerca scientifica: un conflitto davvero insanabile?, *Aspetti etici della sperimentazione biomedica*. In: Buccelli C, ed. *Evoluzione, criticità, prospettive*. Napoli: Comitato etico Federico II, 2015:170-4.
- D'Avack L. L'ordinanza 7 dicembre 2012 del Tribunale Civile di Firenze. *Il diritto di famiglia e delle persone* 2013;4:1276-95.
- Corte Europea dei Diritti dell'Uomo, Parrillo vs. Italia. Ricorso n. 46470/11 del 27 agosto 2015.
- Marzocco V. In potenza o in atto? La Corte Costituzionale e lo statuto normativo dell'embrione. *Biolaw Journal - Rivista di Biodiritto* 2016;2016:183-96.
- Seventh Framework Programme of the European Community for Research, Technological Development and Demonstration Activities (2007-2013). Regulation 1291/2013 of the European Parliament and of the Council of 11 December 2013 establishing Horizon 2020 - the Framework Programme for Research and Innovation (2014-2020).
- Penasa S. La questione delle cellule staminali. Il quadro giuridico. In: Rodotà S, Zatti P, eds. *Trattato di biodiritto. Il governo del corpo*, Tomo I. Milano: Giuffrè 2011;1101-17.
- Busnelli FD. L'inizio della vita umana. *Rivista di diritto civile* 2004;1:533-68.
- Zatti P. La tutela della vita prenatale. *Nuova giurisprudenza civile commentata* 2001;17:149-60.
- Casonato C, Frosini TE, eds. *La fecondazione assistita nel diritto comparato*. Torino: Giappichelli, 2016.
- Casonato C. Sensibilità etica e orientamento costituzionale. Note critiche alla sentenza della Corte Costituzionale n. 84 del 2016. *Biolaw Journal - Rivista di Biodiritto* 2016;2016:157-69.
- Aristotele. *Metafisica*. Milano: Bompiani, 2014.
- Kant I. *Die Metaphysik der Sitten* (1797). Traduzione italiana di Vidari G. *La metafisica dei costumi*. Bari: Laterza, 1970.

La legge sulla procreazione medicalmente assistita: dall'emanazione alla demolizione

Filomena Gallo, Francesca Re

Associazione Luca Coscioni per la libertà di ricerca scientifica, Roma

ABSTRACT

The assisted reproductive technology law: from enactment to demolition. 13 years after the enactment of the law no. 40/2004 regulating the assisted reproductive technologies in Italy, this paper focuses on the current status of the law after a number of National and International judgments that have modified the nature and the structure of the law. This paper discusses not only the positive amendments introduced by the Courts, but also the catastrophic effects produced by the law from 2004 up today. Several Italian couples have been forced to expatriate to overcome illegitimate and unfair legislative limits. One of the major limits is the production of a maximum of 3 embryos per cycle and then the contextual implantation in the uterus of all 3 embryos, without considering the differences among patients, with the risk of serious injuries. The Italian Constitutional Court has established that the choice of the number of embryos to be implanted should be made by physicians on a case-by-case basis, depending on the patient's condition. This amendment produced several benefits, like the decrease of number of miscarriages and diseases and the increase of successful pregnancies. The hope is that the remaining unfair limits will be quickly fixed by the Italian Parliament instead of keeping on delegating legislative functions to National and International Courts.

INTRODUZIONE

La legge 19 febbraio 2004 n. 40 regolando la materia della procreazione medicalmente assistita (PMA) ha colmato un vuoto normativo con un testo organico. Infatti, fino all'entrata in vigore della legge, la materia era regolata da Decreti e Ordinanze Ministeriali di carattere frammentario e contingente, che dettavano regole tassative relativamente a specifici temi di volta in volta trattati, oltre che da un rigido Codice Deontologico per i medici che applicavano tali tecniche (1). In quella fase è stato fondamentale l'intervento dei giudici, che, attraverso sentenze poi divenute storiche, hanno consentito una corretta applicazione delle tecniche.

La legge 40 è intervenuta rigidamente in ogni ambito relativo alla PMA tanto che, nonostante fosse ormai necessario un livello minimo di tutela, a causa delle forti restrizioni introdotte, ci si è autorevolmente domandato se "a una disciplina lacunosa e contraddittoria oltre che dominata dall'ideologia, fosse preferibile il vuoto normativo" (2). Sicuramente sarebbe stato auspicabile un intervento organico in materia che si limitasse a regolamentare le tecniche di PMA astenendosi da incursioni moralistiche ed eticamente orientate.

Sin dall'entrata in vigore della legge la disapprovazione è stata forte, mancando un consenso che legittimasse socialmente la disciplina, non essendo prerogativa del diritto precedere la vita, ma seguirla e assecondarla nella complessità del suo fluire (3). La legge sulla PMA non ha determinato un'accettazione spontanea della regola, ma una vera e propria fuga da essa. Le coppie infertili, infatti, hanno continuato a fare quello che prima della legge potevano fare anche in Italia, ovvero rivolgersi a centri specializzati, con l'unica differenza che a seguito della legge 40 hanno potuto farlo, per la maggior parte delle pratiche, solo all'estero, dando vita a quel fenomeno conosciuto con l'orribile espressione di "turismo procreativo", che implica naturalmente una discriminazione di natura socio-economica piuttosto intuibile (4).

I DIVIETI INTRODOTTI DALLA LEGGE 40/2004

La legge in materia di PMA ha introdotto una serie di divieti per lo più puniti con sanzioni penali, ovvero applicando le sanzioni più gravi e restrittive di cui un ordinamento disponga. Il forte e spietato ricorso allo strumento penale, che di norma dovrebbe rappresentare

Corrispondenza a: Filomena Gallo, Associazione Luca Coscioni, Via di Torre Argentina 76, 00186 Roma. E-mail info@associazionelucacoscioni.it.

Ricevuto: 23.02.2017

Revisionato: 14.04.2017

Accettato: 21.04.2017

Pubblicato on-line: 17.11.2017

DOI: 10.19186/BC_2017.050

l'*estrema ratio*, preannuncia già un'impostazione autoritaria e dispotica che rispecchia perfettamente la volontà di un legislatore di certo non ispirato ai principi di laicità e pluralismo etico.

I divieti più controversi, che da subito hanno attirato l'attenzione di giuristi, personale sanitario e chiunque entrasse in contatto con questa normativa sono i seguenti:

- divieto di accesso alla PMA per le coppie dello stesso sesso (art. 5);
- divieto di applicazione di tecniche eterologhe (art. 4, comma 3);
- divieto di sperimentazione e ricerca sugli embrioni umani e donazione di embrioni per la ricerca scientifica (art. 14, comma 1 e art. 13);
- divieto di produzione di più di 3 embrioni e obbligo di unico e contestuale impianto di tutti gli embrioni prodotti (art. 14, comma 2);
- divieto di crioconservazione degli embrioni (art. 14, comma 1);
- divieto di revoca del consenso dopo la fecondazione (art. 6, comma 3);
- divieto di accesso alle tecniche di PMA per le coppie fertili e portatrici di malattie genetiche (artt. 1 e 4).

Tali divieti rivelano un atteggiamento di condanna implicita che il legislatore ha manifestato nei confronti delle tecniche, identificate come soluzioni da adottare in *extremis*, come strumento residuale per quelle coppie che - come dispone l'art. 2 - per cause "patologiche, psicologiche, ambientali e sociali" non sono in grado di generare. Il legislatore è entrato con prepotenza nelle faccende procreative prima sostituendosi al medico nelle scelte terapeutiche e poi facendosi giudice nello stabilire chi ha e chi non ha "l'idoneità a procreare", giustificando limiti e divieti sulla base dell'esigenza di tutelare il nascituro.

A seguito dell'introduzione di tali divieti, evidenti e importanti sono state le conseguenze sulla vita e la salute delle coppie bisognose di accedere alle tecniche di PMA. Come anticipato, la conseguenza più visibile è stata caratterizzata da una fuga all'estero, in base alla quale si è registrato un aumento delle coppie che si sono rivolte a centri europei per sottoporsi a fecondazione eterologa, produrre più embrioni (anziché solo 3 come imposto dalla legge 40) e crioconservare quelli sovrannumerari (nel caso in cui il contestuale impianto di tutti gli embrioni prodotti non fosse stato possibile), evitare gravidanze plurime (spesso collegate, appunto, all'impianto contestuale dei 3 embrioni), effettuare diagnosi preimpianto (soprattutto per oltrepassare il limite che consentiva, secondo la norma di sbarramento della legge 40, un accesso alle tecniche solo a coppie infertili e non anche a coppie fertili, ma portatrici di gravi malattie genetiche).

Oltre al più popolare fenomeno del "turismo procreativo", un altro importante effetto direttamente dovuto ai divieti introdotti dalla legge è stato l'aumento delle gravidanze a rischio e una contestuale diminuzione delle gravidanze (non per tutti, infatti, la possibilità di recarsi all'estero era un'alternativa praticabile). Inoltre,

come chiarito di seguito, i divieti della legge 40 hanno determinato un enorme ricorso ai tribunali italiani da parte delle coppie danneggiate dalla norma.

LA DEMOLIZIONE DELLA LEGGE 40/2004

Tra gli effetti dell'applicazione della legge sulla PMA vi fu, dunque, anche un aumento dei procedimenti giudiziari aventi a oggetto di volta in volta articoli e disposizioni della legge 40. Le coppie, spesso sostenute da associazioni "no profit", personalmente colpite da uno o diversi divieti della legge, cominciarono a interpellare i giudici per ripristinare la legalità violata da questa normativa.

L'attivazione delle giurisdizioni in questi anni ha prodotto una giurisprudenza in tema di tutela di diritti fondamentali della persona che sta contribuendo a creare ordine in materie che, in virtù della loro dimensione intima e personale, avrebbero richiesto un approccio più cauto e laico.

In 13 anni di legge 40, vi sono state ben 38 decisioni dei tribunali, di cui 4 sentenze della Corte Costituzionale con dichiarazione di incostituzionalità e una sentenza della Corte europea dei diritti dell'uomo (EDU) (5). In particolare, la Corte Costituzionale con sentenze di incostituzionalità ha cancellato le parti più lesive della legge sulla PMA.

Sentenza 151/2009

La sentenza 151/2009 è stato il primo intervento attraverso il quale la Corte Costituzionale ha iniziato l'opera di "restyling" della legge 40 (6). La Corte ha infatti dichiarato l'illegittimità costituzionale dei commi 2 e 3 dell'art. 14, più precisamente ha espunto dal testo normativo il limite di produzione di 3 embrioni, nonché l'obbligo del loro contestuale impianto esigendo che il trasferimento avvenisse senza pregiudizio per la salute della donna. Secondo i giudici, tali commi contrastavano con i principi costituzionali di cui agli articoli 2, 3, 13 e 32, in quanto i trattamenti invasivi (di stimolazione ormonale), oltre a ledere il diritto alla salute della donna, ne compromettevano dignità sociale e libertà di autodeterminazione, prevedendo un'uniformità di trattamento per situazioni tra loro dissimili (7).

Sentenza 162/2014

Con la sentenza 162/2014, che ha cancellato divieto di applicazione tecniche eterologhe, la Corte ha rilevato che l'abrogazione delle disposizioni oggetto del quesito non fa venir meno un livello minimo di tutela costituzionalmente necessario (8). Pertanto non vi è vuoto normativo, tanto è vero che la legge 40 - al capo III, artt. 8 e 9 - prevede che i figli nati da eterologa sono figli legittimi della coppia, non hanno alcun rapporto giuridico con i donatori dei gameti, la coppia che accede alla donazione dei gameti non può disconoscere il nato e i donatori sono anonimi. In questo modo sono affermate le tutele per tutti i soggetti coinvolti nelle

tecniche di PMA come previsto dalla legge stessa.

Sotto il profilo scientifico, invece, i centri di fecondazione medicalmente assistita che posseggono tutti i requisiti tecnico scientifici necessari per poter immediatamente applicare tecniche con gameti donati hanno dovuto riaprire le loro porte ai pazienti che richiedano l'applicazione di tale tecnica. L'Italia infatti ha recepito le direttive comunitarie su conservazione, donazione, lavorazione, tracciabilità e sicurezza (Direttive 2004/23/CE; 2006/17/12/CE; 2006/86/CE) con i decreti legislativi 191/07-16/10-85/12 e del 10 ottobre 2012. Tali norme una volta in vigore hanno trasformato i centri di fecondazione in istituti dei tessuti, obbligati ad attenersi a tutte le prescrizioni e regole che sono previste a livello europeo, tra cui il divieto di commercializzazione di gameti e embrioni, consentendo solo un rimborso spese.

La cancellazione del divieto di eterologa ha ripristinato il rispetto del principio di uguaglianza gravemente leso dalla circostanza che la coppia sterile aveva possibilità terapeutiche differenti a seconda della gravità dell'infertilità di cui era affetta. Mentre nel caso di utilizzabilità del proprio materiale genetico, la coppia poteva ricorrere alle tecniche di PMA, nel caso di sterilità radicale, paradossalmente, questa possibilità le veniva preclusa con ogni implicazione consequenziale sulla discriminazione di cui diveniva vittima.

Sentenza n. 96/2015

La sentenza del 14 maggio 2015 n. 96 ha consentito l'accesso alle tecniche di PMA alle coppie fertili portatrici di patologie genetiche (artt. 1 e 4, legge 40) (9). La Corte Costituzionale ha dichiarato l'illegittimità costituzionale dell'art. 1, commi 1 e 2, e dell'art. 4, comma 1, della legge 40, nella parte in cui non consentono il ricorso alle tecniche di PMA alle coppie fertili portatrici di malattie genetiche trasmissibili, rispondenti ai criteri di gravità di cui all'art. 6, comma 1, lettera b), della legge 22 maggio 1978, n. 194, accertate da apposite strutture pubbliche. Paradossalmente, proprio le coppie che avrebbero avuto la necessità maggiore di conoscere lo stato di salute dei propri embrioni, stante il rischio che questi siano portatori delle stesse malattie da cui sono affetti e/o portatori i genitori (o uno dei due), non erano autorizzate a effettuare diagnosi preimpianto degli embrioni prodotti. Nonostante si sia accolta con grande soddisfazione una decisione preannunciata dal buon senso, gli 11 anni di vigore di questo limite hanno causato tante non-nascite e ingiuste discriminazioni.

Sentenza n. 229/2015

La Corte Costituzionale con decisione del 21/10/2015 n. 229 ha dichiarato l'illegittimità costituzionale dell'art. 13, comma 3, lettera b), e comma 4 della legge 40, nella parte in cui contempla come ipotesi di reato la condotta di selezione degli embrioni anche nei casi in cui questa sia esclusivamente finalizzata a evitare l'impianto nell'utero della donna di embrioni affetti da malattie genetiche trasmissibili (10).

CONCLUSIONI

Quelle riportate rappresentano le decisioni fondamentali che hanno modificato (*rectius*: demolito) la legge 40/2004, la quale oggi presenta una conformazione del tutto nuova, essendo stata "depurata" di molte storture antidemocratiche e lesive dei diritti fondamentali della persona. Tali pronunce hanno dunque introdotto nuovi principi, ma soprattutto prodotto nuovi effetti direttamente per le coppie. Sin dalla sentenza 151/2009 i giudici hanno chiarito che la diagnosi preimpianto è esperibile dalle coppie infertili che ne chiedano applicazione. Tale possibilità è stata definitivamente sancita con la sentenza 96/2015 grazie alla quale ora le coppie portatrici di patologie genetiche hanno accesso alle tecniche di PMA e nello specifico alla diagnosi preimpianto. L'abbattimento del divieto di procreazione eterologa, inoltre, ha ripristinato la possibilità per le coppie italiane di accedere a tale tecnica nel proprio Paese affrontando spese sicuramente più sopportabili. La Corte Costituzionale ha dunque ristabilito fondamenti che riportano alla buona pratica medica, poiché tali tecniche di PMA sono applicate in base alle esigenze terapeutiche della coppia, prevedendo se necessario la produzione di più embrioni. Da ciò deriva la deroga prevista dalla legge 40 alla crioconservazione degli embrioni per motivi di salute della donna, per cui oggi è possibile trasferire il numero di embrioni idoneo (e non determinato dal legislatore) per una gravidanza sicura e procedere alla crioconservazione degli altri embrioni.

I giudici della Corte costituzionale in questi anni hanno affermato principi fondamentali in base ai quali "in materia di pratica terapeutica, la regola di fondo deve essere l'autonomia e la responsabilità del medico, che, con il consenso del paziente, opera le necessarie scelte professionali".

Rimangono altri irragionevoli divieti previsti dalla legge 40 da affrontare, come il divieto di utilizzo degli embrioni per la ricerca scientifica e il divieto di accesso alle tecniche anche per le persone attualmente escluse. Si auspica che il legislatore intervenga anziché continuare a delegare le sue funzioni alla Corte Costituzionale, come fatto fino ad ora, in tema di PMA. Per alcune fattispecie, come la gestazione per altri (maternità surrogata), l'intervento del legislatore non è solo auspicabile, ma necessario affinché una buona legge consenta di evitare qualsiasi forma di abuso e permetta di tutelare le coppie, le gestanti e i nati.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Gallo F. Il vuoto normativo in materia di fecondazione medicalmente assistita. In: De Filippis B, ed. Le controversie in materia di filiazione. Padova: CEDAM, 2010.

2. Rescigno P. Note in margine alla legge sulla procreazione medicalmente assistita. In: AA.VV. La fecondazione assistita, riflessioni di otto grandi giuristi. Milano: Ed. Corriere della Sera, 2005.
3. Rodotà S. La vita e le regole. Tra diritto e non diritto; Milano: Feltrinelli, 2006.
4. Re F. Profili penali della procreazione medicalmente assistita. Riv Pen 2008;4:349.
5. Indice pronunce: http://www.associazionelucacoscioni.it/sites/default/files/documenti/Elenco%20decisioni%20legge%204004%20%20aggiornato%20aprile%202014_0.pdf
6. <http://www.cortecostituzionale.it/actionSchedaPronuncia.do?anno=2009&numero=151>
7. Re F. La Corte Costituzionale ridisegna i confini della procreazione medicalmente assistita lecita. Riv Pen 2009;9:948.
8. <http://www.cortecostituzionale.it/actionSchedaPronuncia.do?anno=2014&numero=162>
9. <http://www.cortecostituzionale.it/actionSchedaPronuncia.do?anno=2015&numero=96>
10. <http://www.cortecostituzionale.it/actionSchedaPronuncia.do?anno=2015&numero=229>

LabTestsOnline (LTO) Italia



Gianni Messeri

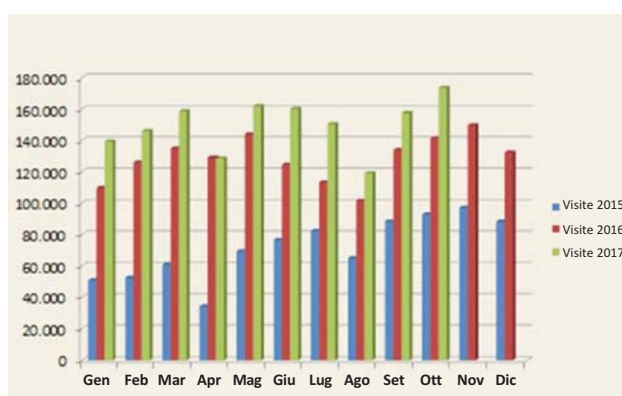
Responsabile SIBioC di LTO

Le informazioni fornite dai laboratori influenzano oggi, in maniera decisiva, la maggior parte delle decisioni cliniche. È anche evidente che la complessità e l'introduzione sempre più frequente di nuovi esami determinano la necessità di migliorare e aggiornare continuamente le relative conoscenze. Come noto, la seconda ragione, in ordine di frequenza, di accesso a siti internet è oggi rappresentata dalla richiesta di informazioni sulla salute.

Nel 2001, l'American Association for Clinical Chemistry (AACC) ha lanciato un progetto finalizzato a informare il cittadino sugli esami di laboratorio che gli possono venir prescritti e sulle patologie a loro correlate, con la creazione di un apposito sito web. La versione italiana di questo sito (www.labtestsonline.it) nasce grazie a un accordo tra AACC, che lo ha sviluppato grazie al contributo dei più qualificati esperti internazionali della materia, e SIBioC – Medicina di Laboratorio, che ne cura la traduzione e l'adattamento alla realtà italiana. LTO, facilmente accessibile dal sito della Società, descrive più di 300 esami di laboratorio e oltre 100 patologie di prevalenza elevata nella popolazione e collega fra loro queste informazioni.

Per garantire che il sito sia riconosciuto come fonte affidabile di informazione medica, gli autori aderiscono ai principi esposti dalla "Health On the Net Foundation", un'organizzazione internazionale no-profit che si propone di "fornire "on-line" agli utenti non muniti di cultura medica ed ai medici curanti, informazioni mediche e sanitarie utili e affidabili". La certificazione dell'adesione a questi principi, periodicamente rinnovata, è testimoniata dal marchio apposto in calce alla "home page".

Dal momento del suo lancio, LTO ha aiutato milioni di utenti ad acquisire informazioni sui propri esami e a facilitare il dialogo con i medici curanti. In particolare, il numero di accessi è in crescente aumento e ha raggiunto nel primo semestre di quest'anno la ragguardevole cifra di 894.231 (+35,9% rispetto al 2016), testimoniando il successo sempre maggiore di questa iniziativa (Figura).



Ringraziamento

Il Direttore e l'Editore della rivista ringraziano i componenti del Comitato Editoriale e i seguenti colleghi per la collaborazione nella revisione dei manoscritti inviati a Biochimica Clinica nel corso del 2017.

Acknowledgement

The Editor-in-Chief and the Publisher would like to thank the members of the Editorial Board and the following colleagues for their kind assistance in reviewing articles submitted to Biochimica Clinica in 2017.

*Gaetano Bernardi, Milano
Marco Besozzi, Milano
Tiziana Biagioli, Firenze
Federica Braga, Milano
Sabrina Buoro, Bergamo
Ettore Capoluongo, Roma
Roberto Caporali, Pavia
Floriana Carbone, Napoli
Federica Cariati, Napoli
Ferruccio Ceriotti, Milano
Valeria D'Argenio, Napoli
Giorgio Da Rin, Bassano del Grappa, VI
Cristina De Angelis, Napoli
Pasquale De Franciscis, Napoli
Alberto Ferlin, Padova
Daniele Gianfrilli, Roma
Davide Giavarina, Vicenza
Maria Stella Graziani, Verona
Roberto Guerranti, Siena
Giuseppe Lippi, Verona
Fulvio Magni, Milano
Alessandra Marini, Lido di Camaiore, LU
Davide Menafra, Napoli
Giampaolo Merlini, Pavia
Benedetto Morelli, Legnano, MI
Giovanna Muscogiuri, Napoli
Cosimo Ottomano, Monza
Roberta Pacifici, Roma
Giuseppe Perruolo, Napoli
Simona Pichini, Roma
Claudia Pivonello, Napoli
Ettore Rizzo, Pavia
Barbara Salvatore, Napoli
Maria Teresa Sandri, Milano
Anna Scotti, Napoli
Manuela Seia, Milano
Francesca Spinella, Roma
Alberto Tosetto, Vicenza
Tommaso Trenti, Modena
Roberta Venturella, Catanzaro*

Volume 41, 2017

Indice dei contenuti

Index of contents

EDITORIALI - EDITORIALS

Ricordo di Carlo Franzini	119	Prenatal screening in pregnancies achieved through assisted reproductive technologies	306
Il laboratorio nella medicina della riproduzione	292	Indicazioni e limiti della diagnosi genetica preimpianto	314

RASSEGNE - REVIEWS

Vitamina D: aspetti clinici e di laboratorio	12	Oncofertilità: dove siamo?	322
Marcatori di rimodellamento e fibrosi cardiaca	23	The role of the laboratory in the evaluation of male factor in couple infertility	335
La sindrome dell'ovaio policistico	39		
Aggiornamenti in tema di diagnostica della carenza di ferro	120		
Trombocitosi e rischio trombotico nelle neoplasie mieloproliferative	128		
Il ruolo del laboratorio di citogenetica in oncoematologia	134		
Obesità, microbiota e stress ossidativo	199		
Anemia acquisita da ospedalizzazione: il ruolo delle perdite di sangue a scopo diagnostico	208		
Il laboratorio clinico nelle indagini tossicologiche	216		
Individualization of treatment in controlled ovarian stimulation: myth or reality?	294		

CONTRIBUTI SCIENTIFICI - SCIENTIFIC PAPERS

Validazione del dosaggio delle metanefrine plasmatiche mediante cromatografia liquida associata alla spettrometria di massa tandem	50
Sviluppo di un metodo in cromatografia liquida associata alla spettrometria di massa tandem per valutare la permeabilità intestinale nella pratica clinica	60
Valutazione dell'esattezza della misura della fosfatasi alcalina sierica in un gruppo di laboratori italiani	64
Correlazione tra dati istologici e profili immunofenotipici in pazienti affetti da mieloma multiplo in differente tipo di trattamento	72
Verifica dell'accuratezza di tre glucometri "point-of-care" per l'utilizzo in ambito ospedaliero	79

INDICE

Indagine conoscitiva su matrice biologica e gestione della fase preanalitica nei laboratori clinici	142	The improvement of oocyte selection for social freezing application	353
Accuratezza dell'immunonefelometria come metodo di screening per la determinazione della proteinuria di Bence Jones	148	Human papillomavirus infection and male infertility	358
<hr/>			
OPINIONI - OPINIONS			
<hr/>			
Analisi dei profili della troponina T cardiaca ottenuti con spettrometria di massa MALDI nel siero di soggetti sani e malati	154	Linee guida per la valutazione del rischio cardiovascolare: siamo a rischio di confusione?	85
False negative results in urinary cocaine drug testing	161	Ruolo e finalità dei laboratori di farmacotossicologia forense	258
Intervalli di riferimento standardizzati della fosfatasi alcalina sierica in soggetti pediatrici	166	Male infertility and ageing: two faces of the same coin?	364
Espressione e valore prognostico del ciclo cellulare e delle aneuploidie nel mieloma multiplo e nella gammopatia monoclonale di significato indeterminato	228	Tutela della dignità umana e libertà di ricerca scientifica: una possibile soluzione al conflitto in tema di embrioni sovranumerari	368
Durata della fibrinolisi post-operatoria e rischio trombotico dopo somministrazione di acido tranexamico negli interventi di protesi d'anca e ginocchio	235	La legge sulla procreazione medicalmente assistita: dall'emanazione alla demolizione	371
<hr/>			
DOCUMENTI - DOCUMENTS			
<hr/>			
Il microRNA-135b nella caratterizzazione molecolare del carcinoma della mammella "triplo negativo"	239	Attività di SIBioC - Medicina di Laboratorio e soddisfazione dei soci: risultati di un questionario	96
Utilità dell'elettroforesi urinaria come metodo di screening per la ricerca della proteina di Bence Jones	245	Le revisioni della letteratura biomedica	175
Verso l'armonizzazione dell'analisi delle urine con striscia reattiva: il ruolo di un programma di VEQ	248	Appropriatezza della richiesta di esami ed esiti clinici: il caso delle malattie renali, tiroidee e della celiachia	266
<hr/>			
DOCUMENTI SIBioC - SIBioC DOCUMENTS			
<hr/>			
Validazione preclinica della tecnologia "next generation sequencing" per l'identificazione di embrioni a mosaico durante l'analisi genetica preimpianto	346	Esami di laboratorio in Pronto Soccorso: una proposta di consenso SIBioC-Medicina di Laboratorio e Academy of Emergency Medicine and Care	183

IL MEGLIO DI CLINICAL CHEMISTRY - CLINICAL CHEMISTRY HIGHLIGHTS

Validazione di nuovi marcatori di neoplasia: la posizione ufficiale dell'European Group on Tumor Markers 102

Un caso di mieloma multiplo IgG kappa in cui la misura delle catene leggere libere ha evidenziato precocemente una ripresa di malattia di tipo "light chain escape" e22

Gravidanza gemellare dizigotica in una donna affetta da diabete MODY3 e25

LETTERE ALL'EDITORE - LETTERS TO THE EDITOR

Validazione per l'impiego clinico delle determinazioni di emoglobina ed ematocrito sull'emogasanalizzatore GEM Premier 4000 189

NOTIZIE SIBioC - SIBioC NEWS

In ricordo di un grande Amico e Maestro 192

In ricordo di Silvana Penco 194

LabTestsOnline (LTO) Italia 375

CASI CLINICI - CASE REPORTS

Gestire il rischio clinico in medicina di laboratorio: un'inaspettata piastrinopenia e1

Presenza concomitante di anticorpi tipo Lupus e malattia di von Willebrand: una condizione reale? e4

Conteggio e contenuto di emoglobina reticolocitario in un caso di grave anemia e9

Utilità della spettroscopia all'infrarosso per l'analisi dei calcoli urinari e13

Un caso camaleontico di porpora trombotica trombocitopenica (sindrome di Moschcowitz) e15

Incremento acuto di troponina I in assenza di malattia coronarica ostruttiva: un caso di sindrome di Takotsubo e19

CONVEGNI E CONGRESSI - SCIENTIFIC MEETINGS

ISCCA II Riunione Nazionale Riassunti Sessioni Scientifiche S4

ISCCA II Riunione Nazionale Riassunti Poster S23

ISCCA II Riunione Nazionale Indice degli Autori S27

49° Congresso Nazionale SIBioC Riassunti Sessioni Scientifiche S3

49° Congresso Nazionale SIBioC Riassunti Poster S31

49° Congresso Nazionale SIBioC Indice degli Autori S158

Volume 41, 2017

Indice degli autori

Index of authors

Agnello L.	e19	Bortolotti F.	258
Agostini M.	161	Bosello O.	199
Alfano M.	364	Bosi A.	e22
Aloisio E.	64, 79, 189, 208	Bossuyt P.M.M.	102
Alviggi C.	294, 322, 353	Braga F.	64
Amodeo R.	228	Brogi M.	e22
Angius A.	239	Bruzzone M.	235
Bagnulo F.	353	Buda G.	72
Balboni F.	e1	Buonfantino C.	322
Balestra V.	216	Buoro S.	96, e9
Banfi G.	175	Caggiano F.	322
Barak V.	102	Caldarella M.	228
Barzon E.	216	Caldini A.	e22
Beggiato E.	e4	Camarda V.	235
Bellia C.	e19	Camaschella C.	120
Berardi M.	e22	Cariati F.	294, 314, 322, 353
Bernardini S.	183	Carra D.	148
Biagioli T.	e22	Carraro P.	183
Biricik A.	346	Carrozza R.	245
Birindelli S.	189	Carru C.	239
Bitterman O.	e25	Carulli G.	72
Bivona G.	e19	Casagrande I.	183
Bolner A.	199	Cassani F.	e22
Bonfanti L.	183	Cavazza M.	183
Bonin C.	39	Cecconi N.	72
Bonini P.	192	Cerioti F.	64, 96, 166, 183, 266
Bono S.	346	Cerutti L.	e9
Borrillo F.	314	Cervellin G.	183

INDICE

Cetani G.	72	Ferraro P.M.	e13
Cevenini G.	166	Fiorentino F.	346
Ciaccio M.	96, 183, e19	Forese P.	e15
Ciancia E.M.	72	Foresta C.	358
Clerico A.	23	Franzini M.	23
Coen D.	183	Fringuelli L.	245
Colao A.	335	Frusciante E.	64, 79
Conforti A.	294, 314, 322, 353	Galdiero G.	335
Cossu-Rocca P.	239	Galdiero M.	335
Costa E.	154	Gallo F.	371
Crippa A.	e9	Gambaro G.	e13
Cucinelli M.R.	148	Garifalos F.	335
D'Amelio L.	228	Garolla A.	358
D'Argenio V.	314	Gervasi F.	228
D'Uonno N.	314	Gervasoni J.	60, e13
Dall'Olio G.	216	Giaccherini C.	128
De Angelis C.	335	Giavarina D.	142, 183, 216
De Miglio M.R.	239	Giostra F.	183
de Placido G.	294, 322	Gironi A.	e22
De Rosa P.	314, 322	Giussani U.	134
De Sanctis P.	e25	Gottardo R.	258
De Simone M.	353	Graziani M.S.	85
Demicheli M.S.	e4	Greco E.	346
Di Nisio A.	358	Guerra E.	64, 166
Di Serio F.	266	Guerra F.	e15
Diamandis E.P.	102	Hayes D.F.	102
Dolci A.	79, 189, 208	Iafusco D.	e25
Domenichini C.	72	Iazzetta R.	306
Dominoni P.	e9	Incardona S.	50
Duffy M.J.	102	Infusino I.	64
Epifani M.G.	248	La Gioia A.	e1
Erroi L.	235	Laposata C.	258
Falanga A.	128	Lenzi A.	335
Fania C.	154	Leoncini R.	166

Lepori T.	e1	Natali P.	148
Lippi G.	142, 183	Nazzaro G.	306
Lo Sasso B.	e19	Nebuloni M.	364
Lobreglio G.	e15	Nonnato A.	50
Locci M.	306	Nordera G.	199
Loi F.	239	Novo G.	e19
Lucato P.	12	Nozzoli C.	e22
Lucchiari M.	50	Nunziato M.	314
Manenti B.	e9	Orrù S.	239
Manzato E.	12	Pagani A.	120
Marcazzan E.	358	Pallotti F.	335
Marchetti M.	128	Palmieri T.	306
Martinelli F.	50	Pansa A.	134
Marzocco V.	368	Panteghini M.	64, 79, 119, 166, 183, 189, 208, 291, 292
Masotti S.	23	Panzeri A.	189
Mayer F.	e1	Paoli D.	335
Melita D.	161	Paolillo C.	183
Menafra D.	335	Papa P.	216
Menegazzo M.	358	Pasqualetti S.	208
Mengozi G.	50	Pasquini V.	e1
Meral Inelmen E.	12	Passino C.	23
Messeri G.	375	Patelli G.	148
Migliardi M.	235, e4	Pecoraro V.	175
Minasi M.G.	346	Pellegrini M.	216
Miranda M.	306	Peluso S.R.	353
Moggetti P.	39	Persichilli S.	60, e13
Molina R.	102	Petrini M.	72
Montaruli B.	235, e4	Pezzati P.	175
Morrocchi B.	e1	Picarelli S.	322
Mosca A.	194	Pigozzo S.	12
Muratore M.T.	245	Pira G.	239
Murgia L.	239	Pirozzi D.	e25
Muroni M.R.	239	Pivonello R.	335, 353
Napoli A.	e25		

Plebani M.	183, 248, 266	Spadarella E.	322
Presciutti A.	358	Spinella F.	346
Primiano A.	60, e13	Staderini M.	e22
Prontera C.	23	Sturgeon C.M.	102
Rampoldi B.	154	Tagliaro F.	258
Re F.	371	Tagliavini S.	148
Renzoni C.	161	Terreni A.	e22
Ricci G.	183	Testino G.	216
Rigolini R.	154	Tinto N.	e25
Rossetto P.	e4	Tomaiuolo R.	292, 314, 322
Rossi R.	235	Tomei A.	e1
Ruberti A.	346	Torcia F.	e25
Salonia A.	364	Torreni L.	e22
Salvatore B.	368	Tozzoli R.	266
Salzano C.	335	Trenti T.	148, 216, 266
Salzano E	306	Uva P.	239
Sammuri P.	72	Vaccina A.	353
Sanges F.	239	Vallone R.	294, 314, 322
Sanzio Colloca I.	228	Valpreda A.	e4
Schiattarella A.	60, e13	Vanzo A.	199
Secchiero S.	248	Varani M.	148
Seghezzi M.	e9	Veronesi A.	216
Senofonte G.	335	Vitale A.R.	50
Sergi G.	12	Vitali S.	50
Simone P.	e4	Zanolla L.	85
Sivera P.	235, e4	Zerbi P.	364
Sölétormos G.	102	Zuppi C.	60, e13



SIBioC-Medicina di Laboratorio è su Facebook!

Seguici cliccando "MI PIACE" nella pagina

www.facebook.com/SIBioCmedicinadilaboratorio

**per rimanere sempre aggiornato con news, attività formative,
progetti e tante altre iniziative sulla
Medicina di Laboratorio**

**TI ASPETTIAMO!
*SIBioC-Medicina di Laboratorio***



BIO MEDIA
editore

...news

Consulta il

Catalogo editoriale...

Cosa c'è

di nuovo in Libreria?

scopri lo su www.biomedica.net

segui ci su



save the date

50° Congresso Nazionale SIBioC-Medicina di Laboratorio

Società Italiana di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica



NAPOLI, 16-18 Ottobre 2018

Città della Scienza