

## Significato clinico della determinazione dell'ormone follicolo-stimolante nel plasma in relazione ai parametri seminali

Carlo Foresta<sup>1</sup>, Andrea Lenzi<sup>2</sup>, Mario Plebani<sup>3</sup>, Andrea Garolla<sup>1</sup>, Riccardo Selice<sup>1</sup>, Antonio F. Radicioni<sup>2</sup>, Alberto Ferlin<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Cattedra di Patologia Clinica, Centro di Crioconservazione dei Gameti Maschili, Dipartimento di Istologia, Microbiologia e Biotecnologie Mediche, Università di Padova

<sup>2</sup>Cattedra di Endocrinologia, Dipartimento di Fisiopatologia Medica, Università di Roma "La Sapienza"

<sup>3</sup>Cattedra di Biochimica Clinica, Servizio di Medicina di Laboratorio, Università di Padova

### ABSTRACT

**Clinical significance of determination of plasma follicle-stimulating hormone (FSH) in relation to seminal parameters.** FSH is a key hormone for qualitatively and quantitatively spermatogenesis and its plasma concentrations are considered marker of Sertoli cells function. However, the predictive power of FSH plasma concentrations is generally low in identifying oligo-azoospermic subjects (sperm count <20 mil/mL). Previous studies showed differences in the FSH cutoffs, with different sensitivity rates and different features of the control groups. Only one study compared idiopathic oligo-azoospermic subjects to fertile subjects with normal sperm count, showing that FSH concentrations cannot predict a seminal damage. In this study we analyzed 379 consecutive non obstructive azoospermic or oligospermic subjects compared to 271 normozoospermic controls of unknown fertility. FSH was measured by a chemiluminometric method. FSH plasma concentrations showed a negative correlation with sperm count and higher values in patients ( $12.9 \pm 11.4$  UI/L) in comparison to controls ( $4.0 \pm 2.0$  UI/L,  $P < 0.0001$ ). Median FSH was 3.6 UI/L in controls, with 1.5 and 7.7 UI/L as 5<sup>th</sup> and 95<sup>th</sup> percentile values, respectively. We identified a cutoff of 7.6 UI/L defining a specificity of 95% and a sensitivity of 60%, respectively.

### INTRODUZIONE

L'ormone follicolo-stimolante (FSH) risulta fondamentale per iniziare e mantenere una spermatogenesi quantitativamente e qualitativamente fisiologica. Le concentrazioni plasmatiche di FSH vengono considerate indicatori di spermatogenesi e di funzionalità delle cellule del Sertoli (1-4) ed una correlazione tra concentrazioni plasmatiche di FSH e parametri seminali è stata riscontrata in diversi studi (5, 6). Tuttavia il valore predittivo del dosaggio dell'FSH non è adeguato. Per esempio, uno studio su 349 uomini danesi infertili ha evidenziato una correlazione negativa con la concentrazione spermatica, ma il valore predittivo per identificare una concentrazione spermatica <20 milioni/mL (valore soglia per la normozoospermia secondo le linee guida WHO) nei soggetti con FSH >10 UI/L era 85,7% (5). Analogamente uno studio su 47 soggetti infertili ha evidenziato una sensibilità del 74% per valori di FSH >10 UI/L (6). In uno studio su 145 soggetti fertili erano ottenuti risultati simili (il 77% dei soggetti oligozoospermici presentava valori di FSH >10 UI/L) (2). Un altro recente studio, utilizzando sempre un valore di 10 UI/L come cutoff, ha mostrato valori di sensibilità ancora inferiori (55%) nell'identificare i soggetti con concentrazione spermatica <20 milioni/mL (7).

Tutti questi studi appaiono tuttavia limitati nella scelta del gruppo di controllo. Il gruppo di riferimento per le concentrazioni degli ormoni riproduttivi può essere teoricamente scelto tra una popolazione di soggetti fertili e/o una

popolazione di soggetti normozoospermici. È ben noto che la fertilità non è sinonimo di normozoospermia, essendoci soggetti normozoospermici infertili e soggetti fertili pur in presenza di alterazioni seminali. È altrettanto ovvio che un'alterazione seminale, pur in presenza di un normale stato di fertilità, può rappresentare una patologia testicolare o delle vie riproduttive. Pertanto, i valori di riferimento per gli ormoni riproduttivi possono anche essere determinati su popolazioni di soggetti normozoospermici a fertilità ignota, se lo scopo è quello di identificare i limiti di riferimento della "funzione testicolare". Il confronto invece di una popolazione fertile con una popolazione infertile, senza conoscenza della produzione spermatica, darà esclusivamente informazioni sullo stato di "fertilità". Il confronto di una popolazione di soggetti fertili e normozoospermici rispetto ad una popolazione di soggetti infertili azoo-oligozoospermici darà infine informazioni sui limiti di riferimento per i parametri "fertilità" e "patologia del sistema riproduttivo".

È stato pubblicato solamente uno studio dove erano confrontate le concentrazioni di FSH di soggetti azoo-oligozoospermici idiopatici con quelle di controlli fertili con concentrazione di spermatozoi >20 milioni/mL o controlli sani della popolazione generale a concentrazione seminale e fertilità ignota (8). In questo studio le concentrazioni di FSH sono risultate significativamente più elevate negli infertili rispetto ai soggetti fertili e ai soggetti della popolazione generale. Tuttavia, solo il 50,5% dei soggetti infertili mostrava concentrazioni di FSH superiori al

97,5 percentile della distribuzione dei valori dei soggetti fertili, dimostrando come le concentrazioni di FSH non siano predittive di danno spermatogenetico. In questo lavoro, gli Autori hanno calcolato il cutoff per le concentrazioni di FSH che meglio discriminava i soggetti fertili dagli infertili, associandolo ad una specificità del 95% per i soggetti fertili (rischio del 5% di avere un risultato falsamente positivo): tale cutoff risultava essere 6,86 UI/L. Con tale valore però la sensibilità risultava del 57% (8). Risulta quindi evidente che un valore di FSH entro i limiti di riferimento non è sufficiente ad escludere una patologia testicolare.

In questo lavoro abbiamo voluto valutare tali aspetti in una popolazione giunta alla nostra osservazione presso il Centro Specialistico dell'Università di Padova.

## MATERIALI E METODI

### Soggetti

Abbiamo valutato 379 soggetti con azoospermia non ostruttiva e oligozoospermia (concentrazione spermatica <20 milioni/mL) che si sono presentati consecutivamente al nostro centro negli ultimi 3 anni. L'unico criterio di esclusione era rappresentato dalla azoospermia ostruttiva, valutata mediante citologia testicolare per agoaspirazione. I soggetti inclusi sono stati valutati con almeno due esami standard del liquido seminale secondo i criteri WHO (9), effettuati a tre mesi di distanza. Come popolazione di controllo abbiamo considerato 271 soggetti volontari tra i donatori di sangue del Centro Trasfusionale che presentavano una concentrazione di spermatozoi >20 milioni/mL in seguito a donazione di sperma effettuata appositamente per questo studio. Uno specifico Consenso Informato era ottenuto per ciascuno di questi soggetti. L'analisi è stata quindi eseguita su un totale di 650 soggetti il cui stato di fertilità non era noto.

In base alle caratteristiche seminali sono state individuate le seguenti categorie: 1. soggetto di controllo con concentrazione spermatica >20 milioni/mL (n=271); 2. soggetti con concentrazione spermatica compresa tra 5 e 20 milioni/mL (oligozoospermia moderata, n=96); 3. soggetti con concentrazione spermatica compresa tra 1 e 5 milioni/mL (oligozoospermia grave, n=99); 4. soggetti con concentrazione spermatica <1 milione/mL (criptozoospermia, n=59); 5. soggetti con azoospermia non ostruttiva (n=125). L'età media dei soggetti con azoo-oligozoospermia era  $30,5 \pm 4,3$  anni, quella dei controlli  $30,7 \pm 5,1$  anni.

### Determinazioni del FSH

In tutti i soggetti è stata misurata la concentrazione plasmatica di FSH mediante un prelievo eseguito tra le 8 e le 10 del mattino utilizzando una metodica in elettrochemiluminescenza (Elecsys FSH immunoassay, Roche Diagnostics), il cui intervallo di riferimento è riportato essere 1-14 UI/L. Il CV interassay era <6%. Il limite di rilevabilità è 0,2 UI/L.

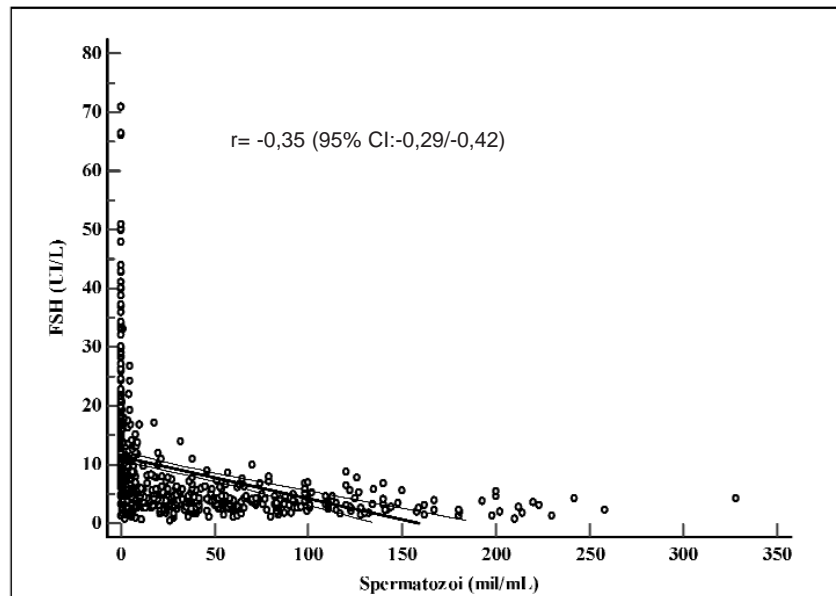
### Analisi statistica

Le concentrazioni di FSH nei diversi gruppi di soggetti sono riportate come  $media \pm DS$ . I valori analizzati presentavano distribuzione normale secondo il test di Kolmogorov-Smirnov. I dati sono stati inoltre espressi come mediana e percentili per consentire un confronto con i dati degli studi precedentemente pubblicati. Il test t di Student per dati non appaiati è stato utilizzato per verificare le differenze nelle concentrazioni di FSH tra i gruppi. La correlazione tra le concentrazioni di FSH e concentrazione spermatica è stata effettuata mediante il test di Spearman. L'analisi della curva ROC è stata eseguita per valutare l'efficienza del FSH nel discriminare i soggetti azoo-oligozoospermici dai soggetti normozoospermici. L'area sotto la curva (AUC) ROC è una misura dell'efficienza di un marcatore nel classificare correttamente i campioni del gruppo dei soggetti azoo-oligozoospermici e normozoospermici: più ampia è l'area, migliore è l'efficienza. La sensibilità è definita come la percentuale di soggetti azoo-oligozoospermici con valori di FSH superiori al valore di cutoff, mentre la specificità è definita come la percentuale di soggetti normozoospermici con valori di FSH inferiori al valore di cutoff. Sono stati infine calcolati il valore predittivo positivo (percentuale di soggetti in una popolazione con FSH superiore al cutoff che viene correttamente diagnosticata come azoo-oligozoospermico) ed il valore predittivo negativo (percentuale di soggetti in una popolazione con FSH inferiore al cutoff che viene correttamente diagnosticata come normozoospermico), che sono funzione della prevalenza dei soggetti con alterazioni seminali nella popolazione. A questo scopo i valori predittivi sono stati calcolati per prevalenze di 0,05, 0,1 e 0,5. L'analisi statistica è stata eseguita con programma Statistica 7 (Copyright Stat Soft Inc., 2004).

## RISULTATI

La concentrazione spermatica e le concentrazioni di FSH nei 650 soggetti analizzati correlavano inversamente in modo significativo ( $P < 0,001$ ) (Figura 1). Le concentrazioni plasmatiche di FSH riscontrate nei diversi gruppi di soggetti sono riportate nella Tabella 1. Le concentrazioni plasmatiche di FSH nei soggetti con azoo-oligozoospermia erano significativamente più elevate rispetto a quelle nei soggetti con concentrazione spermatica >20 milioni/mL ( $P < 0,0001$ ). Sebbene le concentrazioni di FSH nelle diverse categorie di soggetti oligozoospermici siano significativamente diverse tra loro, si nota come le distribuzioni dei valori di FSH siano parzialmente sovrapposte tra le diverse categorie (Figura 2).

Il valori mediano di FSH nei soggetti normozoospermici era 3,6 UI/L, (intervallo 5°-95° percentile, 1,5-7,7 UI/L). Solo lo 0,7% dei soggetti normozoospermici mostrava concentrazioni di FSH <1,0 UI/L. D'altra parte, solo lo 0,5% dei soggetti azoo-oligozoospermici aveva valori di FSH <1,0 UI/L e solo il 2,1% aveva concentrazioni di FSH <1,5 UI/L. In particolare, solo 1 soggetto con criptozoospermia e nessuno dei soggetti con azoosper-

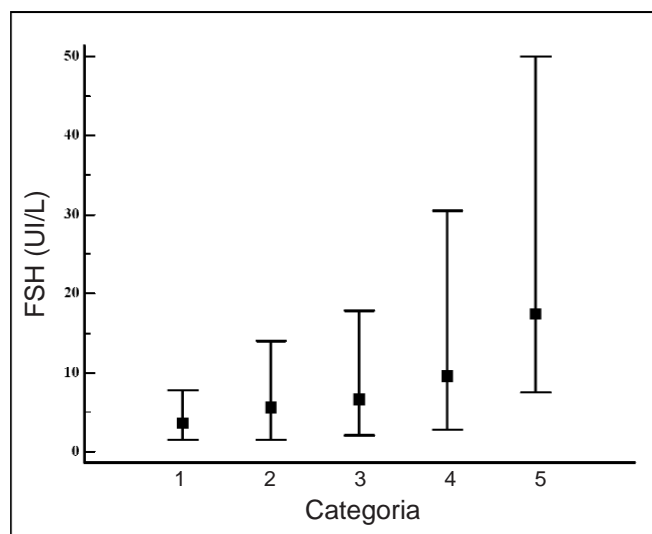


**Figura 1**  
 Correlazione tra le concentrazioni di FSH plasmatico e le concentrazioni di spermatozoi nei 650 soggetti studiati. CI, intervallo di confidenza.

**Tabella 1**  
 Risultati dell'analisi di 271 soggetti normozoospermici e 379 soggetti con diversi gradi di alterazione seminale

Categoria	n	Concentrazione spermatozoi (mil/mL)	FSH (UI/L)	Intervallo FSH (UI/L)
>20 mil/mL	271	73,8±52,1	4,0±2,0*	0,5-14,0
5-20 mil/mL	96	9,5±4,1	6,6±3,9#	0,7-17,1
1-5 mil/mL	99	2,8±1,2	7,7±5,1§	0,9-26,8
<1 mil/mL	59	0,4±0,2	13,5±9,6^	1,3-50,0
Azoospermia non ostruttiva	125	Assenti	21,8±13,7°	4,9-71,0
Totale azoo-oligozoospermia	379	3,4±4,5	12,9±11,4	0,7-71,0

\*P <0,0001 vs tutte le categorie di azoo-oligozoospermici; #P <0,05 vs infertili 1-5 mil/mL e P <0,0001 vs le altre categorie di azoo-oligozoospermici; §P <0,05 vs infertili 5-20 mil/mL e P <0,0001 vs le altre categorie di azoo-oligozoospermici; ^P <0,0001 vs le altre categorie di azoo-oligozoospermici; °P <0,0001 vs le altre categorie di azoo-oligozoospermici.



**Figura 2**  
 Concentrazioni plasmatiche di FSH nei 271 soggetti normozoospermici (categoria 1) e nei 379 soggetti con diversi gradi di alterazione seminale (categorie 2-5). Per la definizione delle categorie, vedere la sezione Materiali e metodi. Il quadrato rappresenta il valore mediano e l'intervallo contiene il 90% dei valori (5°-95° percentile).

mia non ostruttiva aveva FSH <1,5 UI/L e solo 7/195 (3,6%) soggetti con concentrazione spermatica 1-20 milioni/mL aveva FSH <1,5 UI/L. Il 59,2% dei soggetti azoo-oligozoospermici aveva valori di FSH oltre il 95° percentile dei soggetti normozoospermici (7,7 UI/L). Fra questi, il 91% dei soggetti con azoospermia non ostruttiva, il 70% dei soggetti con concentrazione spermatica 5-20 milioni/mL, il 43% dei soggetti con concentrazione spermatica 1-5 milioni/mL e il 30% dei soggetti con concentrazione spermatica <1 milione/mL.

L'efficacia della misurazione delle concentrazioni di FSH nel discriminare tra soggetti normozoospermici e azoo-oligozoospermici era valutata mediante analisi della curva ROC (Figura 3). L'AUC (0,83) mostrava una discreta efficienza diagnostica da parte del FSH. L'analisi ROC permetteva di identificare un valore di FSH di 7,6 UI/L al quale si associava una specificità del 95%. Ciò significa che il 95% dei soggetti normozoospermici aveva valori di FSH <7,6 UI/L, mentre il 5% dei soggetti normozoospermici aveva valori di FSH >7,6 UI/L. A questo cutoff corrisponde una sensibilità del 60%: ciò significa che il 60% dei soggetti azoo-oligozoospermici aveva concentrazioni di FSH >7,6 UI/L, mentre il 40% ha valori di FSH <7,6 UI/L (falsi negativi). I corrispondenti valori di sensibilità per le diverse categorie di soggetti con azoo-oligozoospermia sono presentati nella Tabella 2. Si nota come la sensibilità sia diversa nei diversi gruppi, essendo ottima nei soggetti con azoospermia non ostruttiva, discreta nei soggetti con criptozoospermia, ma molto limitata nei soggetti con oligozoospermia grave o moderata.

La Tabella 3 mostra i valori predittivi positivo e negativo calcolati per prevalenze di 0,05, 0,1 e 0,5.

## DISCUSSIONE

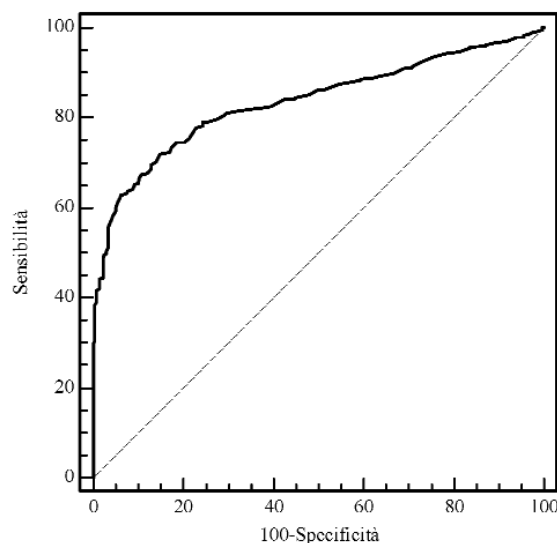
I risultati ottenuti dal nostro studio sono molto simili in termini di sensibilità, specificità e valori predittivi a quelli riportati nel lavoro di Andersson et al. eseguito su soggetti fertili e infertili idiopatici (8). Nel nostro caso, valutando la concentrazione spermatica come variabile, abbiamo ottenuto un valore di cutoff per FSH di 7,6 UI/L, mentre nel lavoro citato tale cutoff era 6,86 UI/L. Questa differenza può essere essenzialmente dovuta a due fattori: la diversa metodica utilizzata (elettrochemiluminometrica nel nostro studio, immunofluorimetrica nello studio di Andersson) e i diversi soggetti esaminati (infertili idiopatici azoo-oligozoospermici vs. fertili normozoospermici nello studio di Andersson, normozoospermici a fertilità ignota vs. azoo-oligozoospermici a fertilità ignota nel nostro studio).

**Tabella 3**

Valori predittivi positivo e negativo per le concentrazioni di FSH come indicatori di azoo-oligozoospermia (cutoff, 7,6 UI/L).

Valore predittivo positivo			Valore predittivo negativo		
Prev. 0,05	Prev. 0,1	Prev. 0,5	Prev. 0,05	Prev. 0,1	Prev. 0,5
38,0%	56,4%	92,1%	97,8%	95,5%	70,4%

Prev., prevalenza delle alterazioni seminali nella popolazione valutata.



**Figura 3**  
Curva ROC per l'efficienza diagnostica della determinazione del FSH nel discriminare i soggetti azoo-digozoospermici.

**Tabella 2**

Sensibilità del FSH al valore di cutoff (7,6 UI/L) corrispondente ad una specificità del 95%

Categoria	Sensibilità
5-20 mil/mL	29%
1-5 mil/mL	44%
<1 mil/mL	68%
Azoospermia non ostruttiva	91%
Totale azoo-oligozoospermici	60%

La problematica relativa alle diverse tecniche di dosaggio del FSH è un argomento estremamente importante soprattutto in relazione alla definizione dei limiti della popolazione di riferimento e del livello decisionale. Dai nostri dati si ricava che con la metodica Roche un intervallo di riferimento pari a 1,5-7,7 UI/L potrebbe essere adeguato. Da notare inoltre la sovrapposizione tra il limite superiore di questo intervallo ed il livello decisionale ottenuto mediante l'analisi ROC (7,6 UI/L). Tale cutoff permette di identificare in modo sufficientemente accurato i soggetti con criptozoospermia o azoospermia non ostruttiva, mentre ha una sensibilità mediocre nell'identificare i soggetti con una oligozoospermia moderata. Ulteriori studi sono necessari per chiarire la patogenesi

dell'infertilità o delle alterazioni seminali nei casi con FSH non aumentato, condizione definita come ipogonadismo ipogonadotropo funzionale, che si può associare a valori di inibina bassi o fisiologici (8).

#### BIBLIOGRAFIA

1. Mabeck LM, Jensen MS, Toft G, et al. Fecundability according to male serum inhibin B-A prospective study among first pregnancy planners. *Hum Reprod* 2005;20:2909-15.
2. Uhler ML, Zinaman MJ, Brown CC, et al. Relationship between sperm characteristics and hormonal parameters in normal couples. *Fertil Steril* 2003;79(suppl 3):1535-42.
3. Pierik FH, Burdorf A, de Jong FH, et al. Inhibin B: a novel marker of spermatogenesis. *Ann Med* 2003;35:12-20.
4. Jensen TK, Andersson AM, Jorgensen N, et al. Body mass index in relation to semen quality and reproductive hormones among 1,558 Danish men. *Fertil Steril* 2004;82:863-70.
5. Jensen TK, Andersson AM, Hjollund NH, et al. Inhibin B as a serum marker of spermatogenesis: correlation to differences in sperm concentration and follicle-stimulating hormone levels. A study of 349 Danish men. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:4059-63.
6. Mahmoud AM, Comhaire FH, Depuydt CE. The clinical and biologic significance of serum inhibins in subfertile men. *Reprod Toxicol* 1998;12:591-9.
7. Meeker JD, Godfrey-Bailey L, Hauser R. Relationships between serum hormone levels and semen quality among men from an infertility clinic. *J Androl* 2007;28:397-406.
8. Andersson AM, Petersen JH, Jorgensen N, et al. Serum inhibin B and follicle-stimulating hormone levels as tools in the evaluation of infertile men: significance of adequate reference values from proven fertile men. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:2873-9.
9. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. Cambridge: Cambridge University Press, 1999.