

## Ormone anti-mülleriano seminale durante il trattamento con FSH ricombinante in uomini affetti da oligoastenoteratozoospermia idiopatica sottoposti ad ICSI

D. MELE, G. DE BIASIO, E. LA VERDE, L. ZURZOLO, A. TARTAGLIONE, N. COLACURCI

**RIASSUNTO:** Ormone anti-mülleriano seminale durante il trattamento con FSH ricombinante in uomini affetti da oligoastenoteratozoospermia idiopatica sottoposti ad ICSI.

D. MELE, G. DE BIASIO, E. LA VERDE, L. ZURZOLO, A. TARTAGLIONE, N. COLACURCI

*L'oligoastenoteratozoospermia idiopatica (iOAT) colpisce circa un terzo degli uomini infertili, riducendone drammaticamente la capacità riproduttiva. L'ICSI è attualmente considerata il trattamento di scelta per pazienti affetti da grave OAT. Tuttavia, la qualità dello sperma di tali soggetti può inficiare i risultati di tale procedura a causa di alterazioni morfologiche e funzionali degli spermatozoi. Constatando che l'FSH svolge il ruolo predominante nella regolazione della spermatogenesi, l'iOAT è stata empiricamente trattata con la somministrazione di gonadotropine esogene, ma i risultati in letteratura appaiono contrastanti. È stato suggerito che subset di pazienti infertili potrebbero trarre benefici dal trattamento con FSH esogeno ed è anche stata enfatizzata la necessità di identificare markers predittivi di risposta al trattamento. Il nostro studio è stato disegnato con lo scopo di verificare se l'AMH può essere adoperato come indice per pazienti con iOAT che possono rispondere al trattamento con rFSH. Da aprile 2007 sono state scelte per lo studio 39 coppie sterili i cui partner maschili erano affetti da iOAT ed erano candidati ad ICSI. Ai soggetti maschili sono stati prescritti 75 IU di rFSH al giorno per almeno tre mesi, prima di ricorrere alla tecnica di fecondazione assistita (ART). Le scoperte più importanti del nostro studio dimostrano che negli uomini affetti da iOAT e candidati ai cicli ICSI, un prettattamento con rFSH aiuta a migliorare i parametri seminali nei pazienti che mostrano livelli basali più alti di AMH nel liquido seminale.*

**SUMMARY:** Seminal anti-müllerian hormone during recombinant follicle-stimulating hormone treatment in men with idiopathic oligoastenoteratozoospermia undergoing intracytoplasmic sperm injection.

D. MELE, G. DE BIASIO, E. LA VERDE, L. ZURZOLO, A. TARTAGLIONE, N. COLACURCI

*Idiopathic oligoastenoteratozoospermia (iOAT) affects approximately one-third of all infertile men and dramatically reduces their reproductive capacity. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) is actually the treatment of choice for patients with severe iOAT. Nevertheless, sperm quality of these subjects may impair ICSI outcomes because of morphological and functional alterations. Since follicle-stimulating hormone (FSH) plays a pivotal role in regulating spermatogenesis, iOAT has been empirically treated with exogenous gonadotrophin administration. It is said that patients' subset infertility could draw benefits from the treatment with FSH. We have used the Anti-Müllerian Hormone (AMH) as an indicator for the patients who could respond to the treatment with rFSH. Since April 2007, 39 sterile couples, whose male partners were affected by iOAT, have been enrolled as eligible for the study. The enrolled subjects were prescribed 75 IU of rFSH daily for at least three months prior to perform ART. The main findings of our study show that in iOAT men candidates to ICSI cycles, a pre-treatment with rFSH may improve semen parameters in a quota of patients who also experience a significant increase in their seminal AMH values. Our preliminary findings suggest that human rFSH may be a valuable pretreatment for iOAT patients undergoing ICSI by improving sperm parameters in the patients that show higher basal levels of AMH in the seminal liquid.*

**KEY WORDS:** Oligoastenoteratozoospermia idiopatica - ICSI - AMH - rFSH.  
Idiopathic oligoastenoteratozoospermia - ICSI - AMH - rFSH

### Introduzione

L'oligoastenoteratozoospermia idiopatica (iOAT) colpisce circa un terzo di uomini infertili e riduce drammaticamente la loro capacità riproduttiva. L'ICSI è effettivamente il trattamento di scelta per pazienti affetti da grave OAT. Ciononostante, la qualità del-

lo sperma di tali soggetti può inficiare i risultati di tale procedura a causa di alterazioni morfologiche e funzionali degli spermatozoi. Dato che l'FSH ha un ruolo predominante nella regolazione della spermatogenesi, l'iOAT è stata empiricamente trattata con la somministrazione di gonadotropine esogene con risultati contrastanti (1). Di recente la ricerca ha rivolto l'attenzione allo studio di molecole che regolano la spermatogenesi. Tra queste sembra promettente l'ormone anti-mulleriano (AMH) (2). L'AMH è una glicoproteina dimerica composta da due monomeri di 72 kD secreta dalle cellule del Sertoli ed è responsabile della regressione dei dotti di Muller nel feto maschile (3). La produzione di AMH nel plasma seminale è elevata durante la vita fetale (4, 5), rimane alta fino alla pubertà per poi diminuire perché inibita dalla secrezione di testosterone (6-9). Le concentrazioni di AMH diminuiscono nel caso di spermatogenesi alterata e non sono riscontrabili nel caso di azoospermia ostruttiva. Queste scoperte suggeriscono che l'AMH seminale sia indice di spermatogenesi. Il nostro studio è stato condotto con lo scopo di verificare se l'AMH può essere adoperato come indice in pazienti con iOAT che possono rispondere al trattamento con rFSH.

## Materiali e metodi

Da aprile 2007 sono state arruolate per lo studio 39 coppie sterili i cui partner maschili erano affetti da iOAT ed erano candidati ad ICSI. I criteri di inclusione erano i seguenti: storia di infertilità maschile idiopatica da più di due anni, numero di spermatozoi che variano da  $1$  a  $10 \times 10^6$ /mL; FSH, LH, prolattina e testosterone a livelli normali e nessun tipo di criptorchidismo, varicocele, trauma dei testicoli, infezioni genitali, anticorpi antispermatozoi, anomalie del cariotipo, mutazioni genetiche CFTR, malattie sistemiche croniche. Fattori di infertilità femminile sono stati esclusi. Ai pazienti sono stati prescritti 75 IU di rFSH al giorno per almeno tre mesi, prima della procedura di ART. I campioni del seme sono stati ottenuti con la masturbazione, dopo 3-5 giorni di astinenza, e analizzati secondo le guide OMS. Una frazione del seme è stata centrifugata immediatamente dopo la liquefazione a temperatura ambiente e congelata a  $-80^\circ\text{C}$  fino alla determinazione di AMH. Tutte le partner femminili dei pazienti studiati sono eumenorroiche e sono state avviate a stimolazione ovarica in *long-protocol* (azzerramento ipofisario con triptorelina/die +FSH 150 U.I./die). Tutti i partecipanti hanno dato il consenso allo studio per iscritto.

## Risultati

Il trattamento con rFSH ha avuto una durata di  $98.4 \pm 16.9$  giorni ed è stato tollerato bene da tutti i soggetti senza rilevanti effetti collaterali. Sono stati identificati due sottoinsiemi di pazienti. In sedici dei 39 soggetti si è notato un miglioramento nella conta dei loro spermatozoi che è raddoppiata rispetto ai valori di base (da  $7.7 \pm 2.9$  a  $19.1 \pm 7.6 \times 10^6$ /mL; gruppo A: gruppo sensibile), mentre nei restanti pazienti non si è rilevata alcuna modifica nei parametri seminali dopo il trattamento con rFSH (da  $7.9 \pm 2.7$  a  $6.8 \pm 3.4 \times 10^6$ /mL). Alla fine del trattamento in entrambi i gruppi non si sono registrate variazioni significative di altri parametri seminali, quali motilità e morfologia. I livelli di AMH seminali sono aumentati in modo significativo dopo il trattamento con rFSH (dal valore di base  $42.2 \pm 25.5$  a  $56.1 \pm 45.5$  pmol/L;  $p < 0.05$ ) mostrando una differenza significativa tra i due gruppi. Le concentrazioni seminali di AMH del gruppo A erano più alte rispetto a quelle osservate nel gruppo B ( $53.0 \pm 30.6$  vs  $34.6 \pm 18.5$  pmol/L;  $p = 0.02$ ). A seguito del trattamento ormonale è stata trovata una correlazione positiva e statisticamente molto significativa tra le concentrazioni seminali di AMH e la conta degli spermatozoi. Tale relazione è stata molto più evidente nel gruppo A. Due donne i cui partner appartenevano al gruppo A hanno avuto una gravidanza spontanea (entrambe alla fine del terzo mese di terapia). Nel gruppo A il miglioramento dei parametri seminali permise di procedere con IVF-ET in otto su quattordici restanti casi, mentre i soggetti del gruppo B sono stati sottoposti a ICSI. Dopo ART si sono verificate tre gravidanze nelle pazienti del gruppo A (21.4%) e quattro gravidanze in quelle del gruppo B. Dopo 12 settimane di gestazione tutte e tre le gravidanze del gruppo A sono andate avanti, mentre due donne i cui partner appartenevano al gruppo B hanno abortito una all'ottava e l'altra alla nona settimana di gestazione.

## Discussione

I risultati principali del nostro studio dimostrano che negli uomini affetti da iOAT e candidati ai cicli ICSI, un pretrattamento con rFSH aiuta a migliorare i parametri seminali nei pazienti in cui si osserva un importante aumento di AMH nel liquido seminale, suggerendo che l'AMH è coinvolto nella spermatogenesi. Inoltre abbiamo trovato le concentrazioni seminali di base di AMH molto più elevate nei pazienti che hanno manifestato una risposta al trattamento con rFSH rispetto al gruppo che non ha mostrato modifiche seminali dopo rFSH. Mentre una bassa concentrazione

ne di AMH nel plasma seminale sembra collegata alla disfunzione spermatogenica, una bassa concentrazione può suggerire anche l'imaturità delle cellule di Sertoli. La concentrazione seminale di AMH è utile per determinare il grado di associazione dell'imaturità delle cellule di Sertoli con l'alterazione della spermatogenesi. Su queste basi è possibile ipotizzare che una concentrazione seminale dell'AMH più elevata trovata nei soggetti con risposta all'rFSH, sia dovuta ad un microambiente testicolare più competente. A supporto di tale ipotesi abbiamo visto che dopo il trattamento con rFSH, l'aumento di AMH seminale era più evidente nel gruppo responder e i valori, in modo significativo, erano correlati alla conta degli spermatozoi. Sinisi et al. (10) hanno riferito che negli uomini con ipogonadismo ipogonadotropo il trattamento con rFSH e con hCG ha provocato l'aumento dei livelli seminali di AMH, i quali risultavano conseguentemente più elevati che con il solo trattamento con hCG. Inoltre, l'Autore ha dimostrato che un precoce aumento di AMH in questi pazienti è indice di una buona risposta alla terapia gonadotropinica. Quindi, i livelli post-trattamento di AMH potrebbero essere conseguenza di attività paracrina testicolare in risposta a stimoli esogeni di rFSH, associata ad un microambiente testicolare competente. Il meccanismo preciso con il quale la somministrazione di rFSH migliora i parametri dello sperma non è del tutto compreso. Il nostro studio suggerisce che il trattamento con rFSH stimola la spermatogenesi e migliora la conta degli spermatozoi. Questi risultati coincidono con quelli di alcuni Autori ma non con quelli di altri. Tali discrepanze potrebbero essere dovute alle diverse popolazioni esaminate e al protocollo differente del trattamento con FSH. Considerato che l'aumento del numero di spermatozoi non significa sempre l'aumento di gravidanze, le gravidan-

ze spontanee che abbiamo sperimentato noi ed altri Autori implicano che dopo la somministrazione di rFSH debbano migliorare altre funzioni. Lopes et al. (11) hanno dimostrato che l'FSH ha un ruolo fondamentale nello stimolare la divisione mitotica e meiotica del DNA negli spermatozoi e spermatoziti attraverso la propria azione sulle cellule di Sertoli e immunizzare gli uomini con rFSH induce un bagaglio cromatinico deficitario, mentre il trattamento con rFSH promuove una condensazione del DNA spermatico. Abbastanza interessante, anche se statisticamente non rilevante, è il fatto che la metà delle pazienti che avevano raggiunto una gravidanza nel gruppo non-responder abbiano abortito, mentre tutte le donne i cui partner maschili avevano avuto una risposta al trattamento rFSH hanno continuato le gravidanze almeno fino alla visita nella dodicesima settimana. Nel presente studio, il miglioramento dei parametri seminali dei pazienti reattivi ha permesso di procedere con IVF-ET in quasi metà dei casi.

## Conclusioni

Le nostre scoperte preliminari, che dovrebbero essere avvalorate da uno studio più ampio, fanno pensare che l'rFSH possa essere un utile pretrattamento per pazienti affetti da iOAT che si sottopongono a procedure di ART migliorando i parametri dello sperma. Il comportamento dell'AMH seminale prima e dopo il trattamento fa pensare ad un miglioramento dovuto all'influenza che la terapia ormonale esercita sull'attività paracrina testicolare. Infine, l'AMH seminale sembra essere un indicatore promettente per selezionare quei soggetti maschi che potrebbero beneficiare del pretrattamento rFSH prima di procedure di ART.

## Bibliografia

1. CAROPPO E, NIEDERBERGER C, VIZZIELLO GM, D'AMATO G. *Recombinant human follicle-stimulating hormone as a pretreatment for idiopathic oligoasthenoteratozoospermic patients undergoing intracytoplasmic sperm injection*. Fertil Steril. 2003 Dec;80(6):1398-403.
2. FALLAT ME, SIOW Y, BELKER AM, BOYD JK, YOFFE S, MACLAUGHLIN DT. *The presence of müllerian inhibiting substance in human seminal plasma*. Hum Reprod. 1996 Oct; 11(10):2165-9.
3. FÉNICHEL P, REY R, POGGIOLI S, DONZEAU M, CHEVALLIER D, POINTIS G. *Anti-Müllerian hormone as a seminal marker for spermatogenesis in non-obstructive azoospermia*. Hum Reprod. 1999 Aug;14(8):2020-4.
4. FUJISAWA M, YAMASAKI T, OKADA H, KAMIDONO S. *The significance of anti-Müllerian hormone concentration in seminal plasma for spermatogenesis*. Hum Reprod. 2002 Apr; 17(4):968-70.
5. AL-QAHTANI A, MUTTUKRISHNA S, APPASAMY M, JOHNS J, CRANFIELD M, VISSER JA, THEMMEEN AP, GROOME NP. *Development of a sensitive enzyme immunoassay for anti-Müllerian hormone and the evaluation of potential clinical applications in males and females*. Clin Endocrinol (Oxf). 2005 Sep;63(3):267-73.
6. VOUTILAINEN R, MILLER WL. *Human müllerian inhibitory factor messenger ribonucleic acid is hormonally regulated in the fetal testis and in adult granulosa cells*. Mol Endocrinol. 1987 Sep;1(9):604-8.
7. KURODA T, LEE MM, HAQQ CM, POWELL DM, MANGANARO TF, DONAHOE PK. *Müllerian inhibiting substance ontogeny and its modulation by follicle-stimulating hormone in the rat testes*. Endocrinology. 1990 Oct;127(4): 1825-32.
8. SWEENEY T, SAUNDERS PT, MILLAR MR, BROOKS AN. *Ontogeny of anti-müllerian hormone, 3 beta-hydroxy-*

- steroid dehydrogenase and androgen receptor expression during ovine total gonadal development. *J Endocrinol.* 1997 Apr;153(1):27-32.
9. FÉNICHEL P, REY R, POGGIOLI S, DONZEAU M, CHEVALLIER D, POINTIS G. *Anti-Müllerian hormone as a seminal marker for spermatogenesis in non-obstructive azoospermia.* *Hum Reprod.* 1999 Aug;14(8):2020-4.
10. SINISI AA, ESPOSITO D, MAIONE L, QUINTO MC, VISCONTI D, DE BELLIS A, BELLASTELLA A, CONZO G, BELLASTELLA G. *Seminal anti-Müllerian hormone level is a marker of spermatogenic response during long-term gonadotropin therapy in male hypogonadotropic hypogonadism.* *Hum Reprod.* 2008 May;23(5):1029-34. Epub 2008 Mar 13.
11. LOPES S, SUN JG, JURISICOVA A, MERIANO J, CASPER RF. *Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection.* *Fertil Steril.* 1998 Mar;69(3):528-32.
-