

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA  
*Corso di Laurea Magistrale in Medicina e Chirurgia*

Dipartimento di Medicina – DIMED  
Direttore: Prof. Paolo Simioni

U.O.C. Andrologia e Medicina della Riproduzione  
Direttore: Prof. Alberto Ferlin

TESI DI LAUREA

**Analisi dei fattori determinanti l'utilizzo di gameti maschili crioconservati  
nell'ambito del programma di preservazione della fertilità**

RELATORE:  
**Ch.mo Prof. Alberto Ferlin**

CORRELATORI:  
**Dott. Michel Martin**

LAUREANDO: **Paolo Bottarel**

A.A. 2022-2023

## SOMMARIO

I.	RIASSUNTO .....	1
	Abstract.....	3
II.	PRESERVAZIONE DELLA FERTILITÀ.....	5
	1. Pazienti candidati alla preservazione .....	6
	1.1 Pazienti infertili.....	6
	1.2 Neoplasie.....	22
	2. Excursus storico sulla preservazione della fertilità.....	23
	3. Procreazione Medicalmente Assistita (PMA).....	26
	4. Gameti maschili utilizzati per la crioconservazione e successive PMA ...	28
III.	OBBIETTIVI.....	30
IV.	MATERIALI E METODI .....	31
	1. Popolazione oggetto dello studio .....	31
	2. Indicazioni alla preservazione.....	33
	3. Età della popolazione .....	34
	4. Origine del materiale crioconservato .....	36
	5. Analisi statistica .....	37
V.	RISULTATI.....	38
VI.	DISCUSSIONE .....	54
VII.	CONCLUSIONI .....	57
VIII.	BIBLIOGRAFIA .....	59

## I. RIASSUNTO

*Presupposti dello studio:* la crioconservazione degli spermatozoi è stata ampiamente utilizzata negli ultimi decenni come supporto terapeutico all'infertilità maschile e alla preservazione della fertilità. Ha trovato affermazione in particolare in due categorie di pazienti: i pazienti infertili doventi intraprendere un percorso di procreazione medicalmente assistita e i pazienti con diagnosi di neoplasia doventi intraprendere un trattamento potenzialmente gonadotossico.

*Obiettivi:* l'obiettivo che si è posto questo studio è quello di analizzare l'andamento temporale nel Centro Regionale Specializzato di Crioconservazione dei Gameti Maschili dell'Azienda Ospedale Università di Padova della preservazione della fertilità e l'esistenza di fattori determinanti l'utilizzo di gameti crioconservati. In particolare, abbiamo analizzato tre variabili: l'età dei pazienti il giorno della crioconservazione, la diagnosi, che poneva l'indicazione alla crioconservazione, e la percentuale di ritiri successivi e infine le modalità di raccolta (da liquido seminale, biopsia testicolare, agoaspirato o urine) dei gameti maschili.

*Materiali e metodi:* sono stati analizzati, retrospettivamente, 7044 pazienti che hanno crioconservato gameti maschili nel periodo compreso tra il novembre 1991 e il novembre 2023. Per ognuno di questi pazienti sono state raccolte le informazioni riguardanti: la diagnosi, l'età al momento della crioconservazione, il metodo con cui è avvenuta la raccolta, l'eventuale eliminazione del materiale crioconservato o il decesso del paziente, il numero ritiri per il loro utilizzo in PMA e la data a cui è avvenuto il ritiro. I pazienti sono stati suddivisi successivamente sulla base del criterio anagrafico dell'età e sulla base della indicazione alla crioconservazione (sono stati per questo individuati tre sottogruppi di diagnosi diversa: neoplasia, infertilità o altra diagnosi).

Tutte le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando il software SPSS (Versione 14, SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Valori di  $p < 0.05$  sono stati considerati statisticamente significativi. I risultati sono stati espressi come frequenze (percentuali) e come media  $\pm$  deviazione standard della media. Nell'ambito dell'analisi statistica condotta sulle variabili categoriche di

questo studio, ci siamo avvalsi del test del chi-quadro per valutare le disparità tra le distribuzioni di frequenza osservate e attese. La differenza tra variabili continue è stata fatta mediante l'utilizzo di test di  $t$  di student e ANOVA.

*Risultati:* i risultati ottenuti hanno evidenziato un'associazione significativa tra alcuni dei fattori propri al paziente al momento della crioconservazione e il ritiro futuro dai gameti crioconservati. In particolare, si è osservata una correlazione tra l'indicazione alla crioconservazione, la metodica di recupero dei gameti e il successivo utilizzo futuro degli stessi. La solidità di questi risultati è supportata dall'analisi statistica multivariata.

*Conclusioni:* l'indicazione alla crioconservazione, l'età al momento della stessa e la tipologia di prelievo dei gameti maschili possono rappresentare una metodica semplice ed efficace per valutare il probabile utilizzo futuro dei gameti crioconservati. Questo studio, mettendo in evidenza le diverse frequenze di utilizzo di queste classi di pazienti, pone le basi per una più ampia valutazione sull'utilità della crioconservazione e sulle sue indicazioni.

## Abstract

*Background:* cryopreservation has been widely used in the recent decades as a therapeutic treatment for male infertility. It has mainly been applied to two categories of patients: infertile patients, who have to undertake a medically assisted reproduction process, and patients who get a diagnosis of neoplasm and have to undertake a potentially gonadotoxic therapy. The analysis of the usefulness of this procedure must take into consideration the psychological impact towards these patients.

*Aim of the study:* the objective of this project is to analyze the temporal trend at the Regional Center for the Specialized Cryopreservation of Male Gametes at the University Hospital of Padova regarding fertility preservation and the existence of factors determining the usage of cryopreserved gametes. More precisely, three variables were examined: the age of the patients who are doing cryopreservation, the diagnosis that determines as the reason to do the cryopreservation and the percentage of subsequent collections and finally, it is evaluated whether the collection methods (from seminal fluid, biopsy, needle aspiration, and urine) of male gametes.

*Materials and methods:* this project retrospectively identifies 7044 patients who cryopreserved male gametes between November 1991 and November 2023. For each of these patients, it has been collected information regarding the diagnosis, the age at the time of cryopreservation, the method with which the collection took place, the possible elimination of the cryopreserved material or the death of the patient, the number of collections for use in PMA and the date it occurred. Furthermore, the patients were divided on the basis of the age and of the diagnosis, that justifies the cryopreservation (for this reason, the analysis is divided into three subgroups of patients with different diagnoses: neoplasia, infertility or other diagnosis).

The statistical analysis is done using SPSS software (Version 14, SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Only the values of  $p < 0.05$  were considered statistically significant. Results are expressed as frequencies (percentages) and as  $\pm$  standard deviation of the mean. As part of the statistical analysis that was conducted on the categorical variables, the “chi-quadro” test was used to evaluate the disparities between the observed and the expected frequency distribution. The difference between the continuous variables was done using student t-tests and ANOVA.

*Results:* From the obtained results it stands out a relevant association between some of the patient’s characteristics at the time of cryopreservation and the future cryopreserved gametes collection. Above all, it can be observed a connection between the indication for cryopreservation, the method to obtain gametes and their future usage. The solidity of these results is supported by a multivariate statistical analysis.

*Conclusions:* the indication for cryopreservation, the age at the time of the procedure, and the type of collection of male gametes can represent a simple and effective method for assessing the likely future use of cryopreserved gametes. This study, highlighting the varied frequencies of usage among these patient groups, lays the groundwork for a broader evaluation of the utility of cryopreservation and its indications.

## II. PRESERVAZIONE DELLA FERTILITÀ

La crioconservazione è una tecnica che permette di congelare e mantenere in azoto liquido, anche a lungo termine, sia gameti maschili che femminili, andando a preservare la fertilità in quei pazienti che, in caso di ricerca di una gravidanza, dovranno far ricorso alle tecniche di procreazione medicalmente assistita<sup>1</sup>. Per quanto riguarda il lato maschile, questa metodica trova indicazione essenzialmente per le seguenti popolazioni di pazienti: coloro che vengono inseriti in un programma di preservazione della fertilità prima di affrontare terapia genotossiche (radioterapia o chemioterapia) o interventi chirurgici che potrebbero compromettere in modo irreversibile la fertilità; i soggetti infertili, ovvero quei pazienti che presentano una ridotta capacità riproduttiva, per una insufficiente produzione di spermatozoi e/o per anomalie nella qualità degli spermatozoi stessi; le persone transgender AMAB ed infine fra coloro che svolgono delle professioni che presentino rischi per la fertilità<sup>2</sup>.

Soprattutto per quei pazienti che debbono iniziare terapie o sottoporsi ad interventi chirurgici, è fondamentale che il campione di liquido seminale venga raccolto in un periodo antecedente l'inizio del percorso. Il numero di dispositivi (paillettes) che si decide di congelare dipende dalla qualità del campione, ma nella migliore delle ipotesi, per massimizzare le possibilità di ottenere una gravidanza, dovrebbero essere conservate un numero di paillettes sufficienti per 10 o più procedure, al fine di garantire una buona possibilità di gravidanza<sup>3</sup>.

Data la complessità intrinseca al processo di crioconservazione, essa andrebbe svolta in centri di riferimento ad opera di personale altamente qualificato.

Tutti i pazienti, prima di iniziare il percorso di crioconservazione, devono eseguire uno screening infettivologico. I marcatori richiesti sono quelli relativi alle epatiti B e C, all'HIV 1 e 2, alla LUE e al CMV. Queste indagini hanno lo scopo di ridurre al minimo il rischio di contaminazione tra i vari campioni successivamente stoccati nelle apposite banche. Qualora un paziente dovesse risultare positivo ad un determinato antigene, il suo campione verrà conservato in una banca dedicata<sup>3</sup>.

## 1. Pazienti candidati alla preservazione

La crioconservazione di gameti maschili trova le sue principali indicazioni e utilizzi in due popolazioni di pazienti: i pazienti infertili, che vogliono intraprendere una procreazione medicalmente assistita e i pazienti che si sottopongono a terapie gonadotossiche<sup>4</sup>.

### 1.1 Pazienti infertili

L'infertilità è definita dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) come l'incapacità di una coppia di concepire un figlio dopo un anno di rapporti sessuali regolari e non protetti<sup>5</sup>. Da queste definizioni traspare come l'infertilità sia dipendente da un periodo temporale prolungato e come spesso possa riguardare la coppia e non il singolo individuo. Questa condizione ha un impatto notevole dal punto di vista sociosanitario, in quanto coinvolge un numero compreso tra 8 e 12% delle coppie infertili<sup>6</sup>.

Data la coesistenza di cause di infertilità maschili e femminili, è necessario condurre un'osservazione su entrambi i partner per poterla trattare in maniera adeguata, evitando di soffermarsi su di un unico partner nel momento in cui venga individuata un'alterazione in uno dei due.

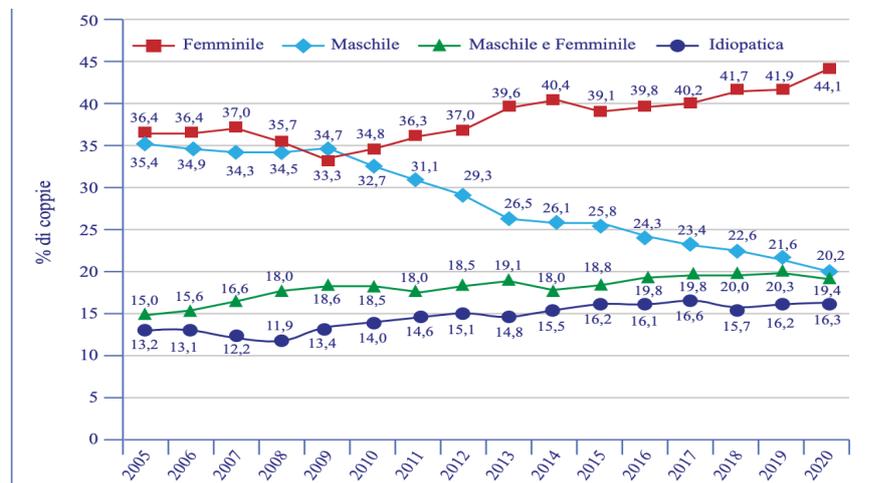


Figura 1: distribuzione temporale delle cause di infertilità tra i pazienti che hanno effettuato cicli di procreazione medicalmente assistita a fresco (2005-2007)<sup>7</sup>.

La fertilità maschile può venire meno per svariate ragioni, alcune reversibili altre, al contrario, irreversibili. La valutazione dell'infertilità maschile deve quindi avere come obiettivo l'identificazione dei fattori che la determinano e, successivamente

la messa in atto dei trattamenti necessari per correggere quelli reversibili. Qualora non vi siano possibilità mediche o chirurgiche di ripristino della fertilità, sarà indicato il ricorso a tecniche di PMA. Alcune forme di infertilità possono celare delle severe patologie sottostanti: ciò risulta quindi un'ulteriore indicazione allo svolgimento di indagini supplementari con il fine di identificare le cause dell'infertilità riscontrata<sup>8</sup>.

### ***1.1.1 La diagnosi di infertilità***

#### *La diagnosi di infertilità: anamnesi ed esame obiettivo*

Nel contesto di una infertilità maschile è fondamentale prendere in considerazione tutti i fattori che possono aver avuto un ruolo nel determinare tale stato, a partire dalla nascita del paziente. L'anamnesi consiste nel recuperare i dati generali del paziente; la storia familiare, l'infertilità, aborti, patologie genetiche, metaboliche ed endocrinologiche; integrata con l'eventuale anamnesi patologica, che permetterà di individuare pregressi interventi chirurgici e malattie dell'apparato urogenitale, con attenzione al criptorchidismo, traumi testicolari, orchiti, epididimiti, prostatiti, varicocele, malattie sessualmente trasmesse, patologie ostruttive e esposizione a sostanze gonadotossiche (tra cui ricordiamo le fonti di calore)<sup>9</sup>.

L'anamnesi deve essere affiancata da un accurato esame obiettivo, che permetta di valutare l'apparato genitourinario. Nello specifico, sarà fondamentale valutare il volume testicolare, la consistenza e la morfologia di testicoli, epididimi, deferenti, strutture funicolari e prostata; la morfologia del paziente, BMI ed eventuale presenza di ginecomastia; e i caratteri sessuali secondari<sup>10</sup>. Risulterà inoltre importante escludere la presenza di masse e varicocele.

#### *La diagnosi di infertilità: indagini di laboratorio*

Per il corretto inquadramento dell'infertilità maschile non si potrà prescindere da una valutazione endocrinologica con misurazione del testosterone, delle gonadotropine (FSH e LH) e dall'analisi del liquido seminale<sup>11</sup>.

Le indagini di laboratorio e di diagnostica strumentale possono essere suddivise in primo, secondo e terzo livello<sup>11</sup>.

Indagini di I livello:

- *Esame del liquido seminale*, consiste nella valutazione delle caratteristiche macroscopiche e microscopiche dell'eiaculato. Rappresenta il primo esame di laboratorio da svolgere in pazienti maschi che richiedano una valutazione per infertilità<sup>12</sup>. Le principali variabili che vengono analizzate sono il numero di spermatozoi e il volume di liquido seminale, oltre che parametri qualitativi spermatozoari come la motilità e la morfologia<sup>13</sup>. Questo esame è composto da tre fasi: una pre-analitica, una analitica e una post-analitica. La fase pre-analitica, fondamentale per la standardizzazione dei risultati, fornisce le informazioni relative alla raccolta del liquido seminale e alla sua processazione in laboratorio<sup>11</sup>. In questa fase è fondamentale indicare al paziente il numero di giorni di astinenza (che possono essere o più restrittivi e richiedere un'astinenza compresa tra i 3-5 giorni o alternativamente permettere una maggior variabilità tra i 2-7 giorni), le modalità con le quali effettuare la raccolta oltre alle istruzioni sulla consegna. Il campione viene successivamente processato mediante il trasferimento in una provetta conica graduata a temperatura controllata (35-37 °C)<sup>14</sup>. L'eiaculato è formato da una sospensione composta in primis dagli spermatozoi che vanno ad unirsi con il liquido prostatico ed il secreto proveniente dalle vescichette seminali e dalle ghiandole bulbouretrali di Cowper<sup>11</sup>. Risulta quindi composto in parte dagli spermatozoi prodotti dai testicoli e per la restante parte dal fluido prodotto dalle ghiandole accessorie. In numero di spermatozoi dipende quindi dalla produzione testicolare, ma anche dalla pervietà delle vie spermatiche, dalla contrazione muscolare a livello di epididimi e nei vasi deferenti oltre che dalle capacità erettili ed eiaculatorie. Nella seconda fase, quella analitica, vengono osservate le caratteristiche degli spermatozoi eiaculati, ovvero la loro vitalità, la loro motilità e la loro morfologia; si distingue al suo interno un'analisi macroscopica e una microscopica<sup>3</sup>. Nell'analisi macroscopica viene inizialmente calcolato il volume, espresso in millilitri, che permette successivamente di valutare il numero di spermatozoi presenti nel prelievo. Il volume di liquido seminale può inoltre indirizzare il clinico verso una possibile diagnosi; in particolare un volume

ridotto può indicare un'ostruzione a livello delle vie spermatiche e al contrario un volume seminale aumentato può indirizzare verso una condizione di infiammazione<sup>3</sup>. Si prosegue con la misurazione del pH: il riscontro di un pH basso (<7,2) può sottendere una problematica delle vescichette seminali, dato che il loro secreto è alcalino o un'eventuale contaminazione urinaria; al contrario il riscontro di pH superiori ad 8 faranno propendere per patologie infiammatorie<sup>1516</sup>. La fase microscopica si basa sull'analisi della componente cellulare (gametica e non) e di quella non cellulare. L'analisi della componente gametica valuta: il numero, la vitalità, la motilità e la morfologia degli spermatozoi. Il numero viene calcolato sia per millilitro di liquido seminale che per la quantità totale di eiaculato. Questo valore si ottiene utilizzando come valori di partenza quelli del volume e della concentrazione per poi moltiplicarli tra loro. Il numero di spermatozoi dipende in maniera preponderante dalla produzione testicolare e dalla pervietà delle vie spermatiche. È effettuata inizialmente una conta a fresco seguita da una conta in una camera di conta cellulare<sup>3</sup>. Nel caso in cui venga riscontrata un'assenza di spermatozoi è possibile formulare la diagnosi di azoospermia, che andrà verificata con un successivo prelievo. Il numero totale di spermatozoi e la loro concentrazione sono in correlazione con il tempo atteso per il concepimento e la possibilità di gravidanza<sup>41 42</sup>.

La vitalità viene analizzata mediante l'integrità delle membra cellulari degli spermatozoi, quest'analisi assume tutta la sua importanza nel momento in cui la percentuale degli spermatozoi mobili sia inferiore al 40%. Al di sotto di questa percentuale risulterà infatti importante riuscire a distinguere le forme di spermatozoi immobili morti da quelle di spermatozoi immobili vivi. Il test di riferimento è quello basato sul test con eosina-nigrosina. Gli spermatozoi immobili morti a causa della loro tipica lesione di membrana permettono l'ingresso del colorante, per il quale sarebbero normalmente impermeabili, a differenza al contrario degli immobili e vivi che non si colorano con la colorazione tipica<sup>3</sup>.

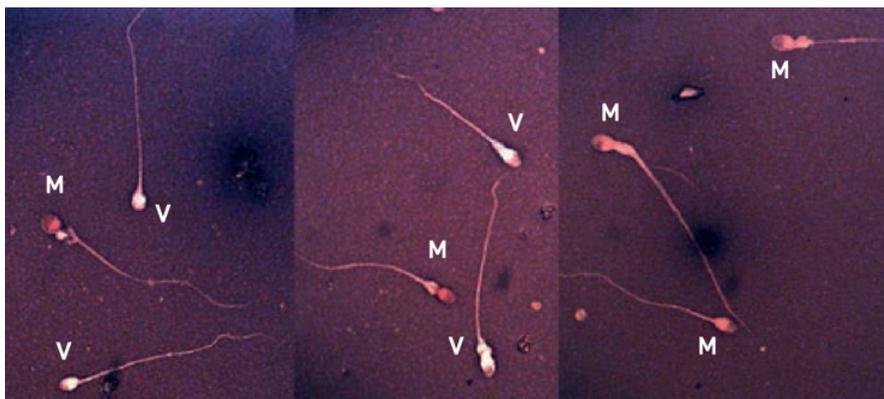


Figura 2: spermatozoi morti (M) e vitali (V)<sup>3</sup>

Lo sfondo di colore scuro è determinato dalla nigrosina, grazie alla quale è possibile una più facile identificazione degli spermatozoi. Come è possibile osservare nella figura 3 gli spermatozoi vivi presentano la testa chiara, al contrario di quelli morti che si coloreranno di rosa<sup>3</sup>.

La motilità verrà definita come: motilità progressiva rapida, progressiva lenta, non progressiva ed assenza di motilità. La possibilità che vi sia una gravidanza sarà strettamente legata al numero di spermatozoi con motilità progressiva presenti nel liquido seminale, questo giustifica l'importanza di determinare tale valore nell'analisi del liquido seminale<sup>17</sup>.

CATEGORIE DI MOVIMENTO NEMASPERMICO	DESCRIZIONE DEL MOVIMENTO
<b>Progressiva rapida</b>	Gli spermatozoi si muovono attivamente, linearmente o circolarmente, percorrendo una distanza superiore a 25 $\mu$ /s
<b>Progressiva lenta</b>	Gli spermatozoi si muovono attivamente, linearmente o circolarmente, percorrendo una distanza compresa tra i 5 $\mu$ /s e i 25 $\mu$ /s
<b>Non progressiva</b>	Tutti i movimenti attivi del flagello che non determinano un movimento progressivo di almeno 5 $\mu$ /s
<b>Immobile</b>	Non vi è alcun movimento attivo del flagello

Tabella 1: Categorie di movimento nemaspermico

L'analisi della morfologia andrà a ricercare le diverse atipie che potranno essere localizzate a livello dei diversi segmenti dello spermatozoo ovvero: testa, collo o coda. Il riscontro di alterate morfologie sarà importante per identificare un'alterata funzionalità degli organi genitali maschili, specialmente testicoli ed epididimi. Nell'analisi del liquido spermatico non sarà infatti sufficiente osservare la percentuale di spermatozoi con morfologia normale ma sarà necessario analizzare la tipologia di atipia e la sua localizzazione<sup>18</sup>. Le alterazioni di morfologia e motilità non sono patognomoniche di una determinata patologia andrologica, ma risultano comunque fondamentali per indirizzare il clinico. Le anomalie morfologiche vengono classificate in quattro categorie: testa, collo e parte intermedia, coda ed infine eccesso di citoplasma residuo.

	N	Percentili									
		2,5°	5°	(95% CI)	10°	25°	50°	75°	90°	95°	97,5°
Volume del liquido seminale (ml)	3.586	1,0	1,4	(1,3-1,5)	1,8	2,3	3,0	4,2	5,5	6,2	6,9
Concentrazione nemaspermica (106 per ml)	3.587	11	16	(15-18)	22	36	66	110	166	208	254
Numero totale di spermatozoi (106 per eiaculato)	3.584	29	39	(35-40)	58	108	210	363	561	701	865
Motilità totale (PR + NP, %)	3.488	35	42	(40-43)	47	55	64	73	83	90	92
Motilità progressiva (PR, %)	3.389	24	30	(29-31)	36	45	55	63	71	77	81
Motilità non progressiva (NP, %)	3.387	1	1	(1-1)	2	4	8	15	26	32	38
Spermatozoi immobili (IM, %)	2.800	15	20	(19-20)	23	30	37	45	53	58	65
Vitalità (%)	1.337	45	54	(50-56)	60	69	78	88	95	97	98
Forme normali (%)	3.335	3	4	(3,9-4,0)	5	8	14	23	32	39	45

Tabella 2: distribuzione dei risultati dell'esame del liquido seminale di uomini le cui partner hanno ottenuto una gravidanza spontanea da concepimento naturale entro un anno di rapporti sessuali non protetti<sup>3</sup>

- *Ecocolordoppler testicolare*, ovvero una metodica diagnostica non invasiva che permette di descrivere i volumi testicolari (ed eventuali dismetrie testicolari), la loro ecostruttura, la loro sede e la loro mobilità. Durante tale procedura andranno inoltre ricercate eventuali lesioni focali a livello testicolare. Tale metodica permette di operare una accurata descrizione degli epididimi, dei dotti deferenti e del funicolo spermatico, oltre ai parametri dinamici arteriosi e venosi dai quali si può individuare la possibile presenza di varicocele<sup>19</sup>.

### Indagini di II livello:

- *Esami ormonali*, con i quali vengono dosati il testosterone totale e il testosterone libero e le gonadotropine (FSH e LH). Ciò permette di distinguere l'ipogonadismo primario testicolare (ipergonadotropo) da quello secondario ipofisario (ipogonadotropo). Può inoltre essere utile il dosaggio dell'Inibina B, della prolattina e dell'estradiolo<sup>11</sup>.
- *Esami infettivologici*, utili anche per un eventuale crioconservazione. In particolare, verranno ricercate le malattie sessualmente trasmissibili; HBV, HCV, HIV, il Treponema Pallidum, CMV, Chlamydia Trachomatis, Neisseria Gonorrhoea<sup>20</sup>
- *Ricerca ASA* (anticorpi antispermatozoo), che possono interferire con varie fasi della riproduzione e, proprio per questo, vanno ricercati in modo tale da poter mettere in atto il trattamento più idoneo<sup>9</sup>.
- *Ultrasonografia transrettale*, la quale trova indicazione nel caso di emospermia, eiaculazione dolorosa, uretriti/prostatiti, sintomi ostruttivi o irritativi delle vie urinarie, interventi dell'apparato urogenitale, azoospermia e alterazioni del fruttosio seminale, aneiaculazione ed eiaculazione retrograda, oltre che nel sospetto clinico di forme ostruttive di A/oligozoospermia. I dotti eiaculatori durante questa valutazione devono risultare non visibili, in caso contrario si può supporre la presenza di una patologia occlusiva, spesso post-infiammatoria<sup>21</sup>.

### Indagini di III livello:

*Analisi genetica*, i pazienti infertili hanno una probabilità aumentata di presentare anomalie cromosomiche. L'azoospermia è la condizione in cui si osserva la più elevata percentuale di mutazioni genetiche (25%), sebbene il numero di anomalie genetiche presenti nelle altre condizioni di infertilità maschile stiano gradualmente aumentando<sup>22</sup>. L'analisi genetica trova quindi indicazione sia nel caso si riscontri una azoospermia, sia se presente una severa oligo-asteno-teratospermia oltre ai casi di poliabortività. L'infertilità maschile è infatti una patologia complessa in cui i fattori genetici possono avere un ruolo determinante e in cui, proprio per questo motivo, l'analisi

genetica risulta fondamentale, oltre che per il suo valore diagnostico, per indirizzare il clinico nelle sue decisioni e per poter garantire al paziente un'adeguata consulenza genetica. L'analisi del cariotipo dovrebbe essere il primo test da eseguire in un paziente con un'alterazione quantitativa del liquido seminale<sup>23</sup>. La sindrome di Klinefelter è la più frequente anomalia genetica nei pazienti con azoospermia non ostruttiva; invece le anomalie degli autosomi saranno maggiormente presenti nei casi di oligozoospermie<sup>22</sup>. Le anomalie genetiche potranno quindi essere legate al cromosoma Y, al cromosoma X o alternativamente agli autosomi.

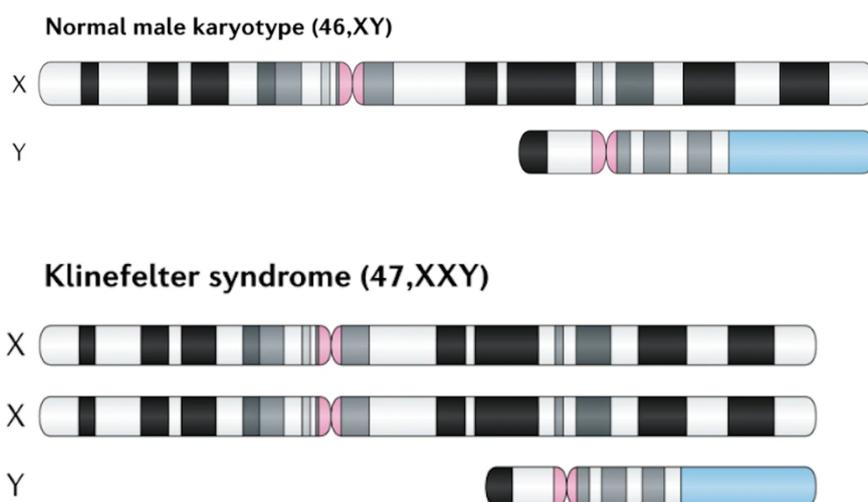


Figura 3: Normale cariotipo (46, XY), sindrome di Klinefelter (47, XXY)<sup>24</sup>

- *Biopsia testicolare e citoaspirato con ago sottile*. La biopsia ritenuta per anni imprescindibile nelle diagnosi di condizioni di azoospermia, nelle teratozoospermie e nelle oligozoospermie è stata gradualmente rimpiazzata dal citoaspirato con ago sottile; trova al contrario indicazione nel contesto della crioconservazione e nelle tecniche di PMA.

### 1.1.2 Eziologia delle cause di infertilità maschile

L'infertilità maschile può essere classificata in base alla diversa eziologia che la determina. Tra le principali cause si ritrovano quelle legate alle cause genetiche, idiopatiche, infettive e alle anomalie del tratto urogenitale<sup>9</sup>.

### *Cause genetiche*

Un' alterazione genetica è riscontrabile in oltre il 20% dei pazienti con azoospermia o oligozoospermia<sup>11</sup>. Nella maggior parte dei casi l'infertilità è associata a mutazioni *de novo* che originano durante la gametogenesi in uno dei due genitori. La Sindrome di Klinefelter (cariotipo 47, XXY) rappresenta una delle più frequenti mutazioni genetiche in grado di determinare un'infertilità nel paziente<sup>25</sup>. Il cromosoma soprannumerario presente in questa sindrome è frutto di una non-disgiunzione, che può avere origine o durante la meiosi, che avviene nel corso della gametogenesi, o in una delle mitosi nelle prime fasi dell'embriogenesi. È una condizione diffusa tra i pazienti infertili, con una prevalenza stimata tra 1/500 e 1/700<sup>26</sup>. Si manifesta con ridotto volume testicolare, azoospermia, ridotta massa muscolare, riduzione della peluria e alterazione dei livelli di gonadotropine sieriche (aumentate) e testosterone (diminuito). Fino alla fine degli anni Novanta l'infertilità dei pazienti affetti da sindrome di Klinefelter era considerata come completa e definitiva. Questa condizione è cambiata grazie all'introduzione della ICSI (IntraCytoplasmatic Sperm Injection) che ha permesso, in particolare tramite tecniche di estrazione testicolare degli spermatozoi (TESE), di superare parzialmente le problematiche di infertilità<sup>26</sup>. La maggior suscettibilità ad aberrazioni cromosomiche nei figli giustifica però la necessità di una consulenza genetica. Oltre che la messa in atto di una terapia volta a risolvere la problematica dell'infertilità, vi sarà la necessità di introdurre una terapia ormonale sostitutiva a base di testosterone<sup>11</sup>.

Le anomalie cromosomiche possono coinvolgere, oltre ai cromosomi sessuali, anche gli autosomi.

Le microdelezioni del cromosoma Y, sono la seconda più frequente causa di infertilità genetica dopo la sindrome di klinefelter<sup>27</sup>. Il numero di microdelezioni Yq è stimato essere 1/400 nella popolazione generale, ma è stata riscontrata un'incidenza maggiore nella popolazione infertile<sup>28</sup>. Il braccio lungo del cromosoma Y (Yq) contiene infatti alcuni geni indispensabili alla spermatogenesi ed è sede di microdelezioni che vengono definite in base alla loro localizzazione in AZFa, AZFb e AZFc. In queste condizioni la consulenza genetica diventa obbligatoria a causa della trasmissione di tali mutazioni alla progenie maschile<sup>29</sup>.

Un'ulteriore mutazione è quella che coinvolge il gene della fibrosi cistica (CFTR). La presenza di due mutazioni severe determinerà la condizione di fibrosi cistica, al contrario delle mutazioni lievi (“*mild*”) con genotipo  $CF^m/CF^m$  o  $CF/CF^m$  potranno determinare l'agenesia dei dotti deferenti<sup>30</sup>. Durante lo sviluppo fetale si verifica una malformazione congenita dei dotti di Wolff, precursori dei dotti deferenti, epididimi e vescichette seminali. Nel 30-45 % dei casi, di agenesia dei dotti deferenti, è possibile riscontrare due mutazioni; al contrario negli altri pazienti sarà possibile riscontrare un'unica mutazione. In questi casi sarà di fondamentale importanza utilizzare analisi genetiche di secondo livello prima di eseguire una procreazione medicalmente assistita, specialmente nell'eventualità in cui la partner sia portatrice di un gene CFTR mutato. Queste mutazioni predispongono infatti ad un aumentato rischio di fibrosi cistica nel nascituro determinano la necessità di svolgere un'analisi genetica di entrambi i partner, considerata l'eredità di un allele mutato da parte del padre e la modalità autosomica recessiva di trasmissione<sup>31</sup>. Data la localizzazione della problematica, la maggior parte dei pazienti avranno una spermatogenesi normale nel momento in cui venga indagata con TESE o biopsia testicolare e ciò permetterà di intervenire tramite queste modalità per ottenere una gravidanza<sup>32 33</sup>.

Seppur in maniera meno frequente rispetto alle precedenti l'infertilità maschile potrebbe essere legata ad un ipogonadismo ipogonadotropo, determinato da una mancata liberazione dell'ormone ipotalamico GnRH, con conseguente alterato rilascio da parte dell'ipofisi degli ormoni FSH e LH.

In particolare, determinerà un ipogonadismo ipogonadotropo la sindrome di Kallaman in cui l'ipogonadismo si associa ad ipo/anosmia<sup>34</sup>. L'ipogonadismo è dovuto ad una non corretta differenziazione cellulare o ad una errata migrazione cellulare da parte dei neuroni che compongono la mucosa olfattoria e che, in seguito alla loro migrazione, dovrebbero localizzarsi a livello ipotalamico con la funzione di secernere GnRH; gli alterati livelli di GnRH a loro volta determineranno una diminuita produzione di ormoni sessuali e una mancata maturità sessuale con assenza dei caratteri sessuali secondari<sup>35</sup>.

La PCD, Primary Ciliary Dyskinesia, che determina un'infertilità legata all'alterata mobilità degli spermatozoi è una mutazione autosomica recessiva, che oltre a

determinare astenozoospermia per alterazioni del movimento del flagello avrà delle ripercussioni su altri sistemi; in particolare determinerà frequenti infezioni del tratto respiratorio e alterata disposizione degli organi interni<sup>36</sup>.

Causa genetica, in grado di determinare un'alterazione del sistema endocrino, è inoltre la sindrome di Prader Willi, che, a causa di alterazioni nel gene 15q11.2-q13, si manifesta con un ipogonadismo. I soggetti affetti da questa sindrome presenteranno nei primi mesi di vita difficoltà motorie e nell'alimentazione che si trasformerà, al contrario, in età prescolare in un consumo eccessivo di cibo e conseguente obesità; ciò determinerà la necessità di un attento controllo dell'alimentazione. Sarà sempre presente, anche se in maniera variabile, una compromissione cognitiva e disturbi del comportamento che potranno esser associati a tratti facciali particolari, strabismo e scoliosi. Questi pazienti saranno per la maggior parte sterili; vi sarà un ipogonadismo che determinerà un alterato sviluppo puberale e degli organi genitali<sup>37</sup>.

Ulteriore causa di infertilità maschile è la sindrome di Laurence-Moon-Beild; patologia a trasmissione autosomica recessiva, con penetranza ed espressività variabile. Si caratterizza per il riscontro in questi pazienti di: obesità (95%), ritardo mentale (90%), degenerazione retinica (90%), ipogonadismo (75%) e polidattilia (75%)<sup>38</sup>.

#### *Cause idiopatiche*

Una parte dei pazienti infertili presentano una azoospermia o OAT idiopatica. In questi casi non è possibile riscontrare una causa precisa, ma la causa è probabilmente attribuibile a cause genetiche e ambientali. Questa condizione è presente in quasi il 30% dei casi di infertilità maschile e lo stress ossidativo è ritenuto l'elemento attraverso cui i fattori, sia esogeni che endogeni, possono indurre l'infertilità. Per trattare questa condizione vengono principalmente instaurate terapie empiriche a base di antiossidanti<sup>39</sup> o in alternativa un trattamento ormonale. I trattamenti empirici, utilizzati nelle condizioni di infertilità idiopatica, vengono definiti non-specifici, a causa della mancata certezza sulla causa dell'infertilità<sup>40</sup>. Tra i farmaci antiossidanti vengono utilizzati vitamine, zinco e carnitina al fine di ridurre i danni dello stress ossidativo. L'utilizzo di questo tipo di terapia aumenta il possibile numero di gravidanze spontanee<sup>41</sup>. Come trattamenti

ormonali vengono utilizzate gonadotropine, androgeni e bloccanti del recettore degli estrogeni<sup>40</sup>. Trovano inoltre impiego, off-label, gli inibitori delle aromatasi che riducendo l'aromatizzazione del testosterone ad estradiolo provocano una riduzione dei livelli di estrogeni interferendo quindi con il feed-back negativo esercitato dagli estrogeni a livello ipotalamo-ipofisario con conseguente aumento del GnRH e delle gonadotropine<sup>42</sup>.

### *Infertilità da anomalie urogenitali*

Le anomalie urogenitali che possono determinare infertilità possono a loro volta essere suddivise in congenite e acquisite. Tra le anomalie congenite si ritrovano quelle localizzate a livello dell'epididimo (disfunzionale, assente, cisti), a livello del dotto deferente e il criptorchidismo; quest'ultimo consiste in una mancata discesa dei testicoli nella borsa scrotale al momento della nascita. Può essere monolaterale o bilaterale e anche se corretto precocemente può avere un ruolo impattante sulla fertilità<sup>43</sup>. Cisti a livello del dotto eiaculatorio vanno sospettate se confrontati con una azoospermia o oligozoospermia, un ridotto volume di liquido seminale e un setting ormonale e caratteri sessuali secondari nella norma oltre a vescichette seminali dilatate all'esame ecografico<sup>44</sup>.

Le anomalie acquisite sono principalmente: l'ostruzione bilaterale o la legatura dei vasi deferenti, l'orchietomia, l'epididimite, l'eiaculazione retrograda e il varicocele<sup>9</sup>. Il varicocele consiste in un'anormale dilatazione del plesso pampiniforme, il cui ruolo è il drenaggio venoso del sangue da ciascun testicolo. Questa alterazione ha svariate implicazioni nel paziente; vi potrà infatti essere un alterato sviluppo del testicolo, una ridotta fertilità e sintomatologia dolorosa. La condizione di varicocele è riscontrabile nell'11.7% dei pazienti con spermioγραμμα normale e nel 25.4% dei pazienti presentanti un alterato spermioγραμμα<sup>45</sup>.

### *Cause endocrinologiche*

Requisito fondamentale per una normale fertilità maschile è quello della presenza di un corretto regolamento del sistema endocrino riproduttivo. Per questo qualsiasi perturbazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-testicolo può determinare una condizione

di ipogonadismo ed infertilità<sup>46</sup>; e una correzione di tale problematica può determinare una risoluzione dell'infertilità.

Tra queste cause rientra l'iperprolattinemia; essa è determinata da un eccesso di prolattina, riscontrabile mediante il suo dosaggio. L'iperprolattinemia può essere dovuta a cause diverse, in particolare: ipotiroidismo, malattie epatiche, stress, l'uso di farmaci o la presenza di un adenoma ipofisario<sup>47</sup>. Questa condizione può risultare asintomatica o al contrario manifestarsi con una ridotta libido e disfunzione erettile<sup>48</sup>. L'azione inibitrice della prolattina a livello ipotalamico, con conseguente mancato rilascio di gonadotropine, è la causa dell'infertilità tipica di questi pazienti, in cui si risconterà una ridotta capacità secretiva di testosterone e un'alterata spermatogenesi. Nel momento in cui venga riscontrata un'iperprolattinemia è importante l'esclusione della presenza di un adenoma ipofisario mediante una risonanza magnetica<sup>49</sup>.

L'equilibrio dell'asse ipotalamo-ipofisi-testicolo può essere in alternativa alterato da un eccesso di estrogeni o androgeni. La principale fonte di estrogeni nell'uomo è quella proveniente dalla conversione di testosterone da parte delle aromatasi localizzate nel tessuto adiposo; di conseguenza un aumento dell'incidenza di obesità rappresenta un fattore di rischio per l'infertilità maschile<sup>50</sup>. Allo stesso modo l'eccesso di androgeni agisce mediante un meccanismo a feed-back negativo sul rilascio ipotalamico di GnRH. L'eccesso di testosterone può avere causa endogena come esogena<sup>49</sup>.

Caratterizzata da un alterato controllo dell'asse ipotalamo-ipofisi-testicolo è anche la condizione di ipogonadismo ipogonadotropo in cui a causa del mancato feed-back negativo del testosterone, dell'estradiolo e dell'inibina B è possibile riscontrare elevati valori di gonadotropine<sup>49</sup>.

La fertilità maschile risulta compromessa anche nei casi di alterato controllo tiroideo; sia di ipotiroidismo che di ipertiroidismo. L'impatto tiroideo sullo sviluppo testicolare, sulla qualità della spermatogenesi e sulla fertilità con, in particolare, compromissione della motilità degli spermatozoi, del volume testicolare e del volume di eiaculato è dovuta alla presenza di recettori tiroidei a livello testicolare. Nel testicolo sono infatti presenti recettori tiroidei (TR alfa1 e TR alfa2); gli ormoni tiroidei regolano conseguentemente la proliferazione e la

differenziazione delle cellule di Sertoli, della BTB (blood-testis-barrier) e la differenziazione delle cellule di Leydig. I parametri del liquido seminale migliorano con il ripristino dell'eutiroidismo<sup>51</sup>.

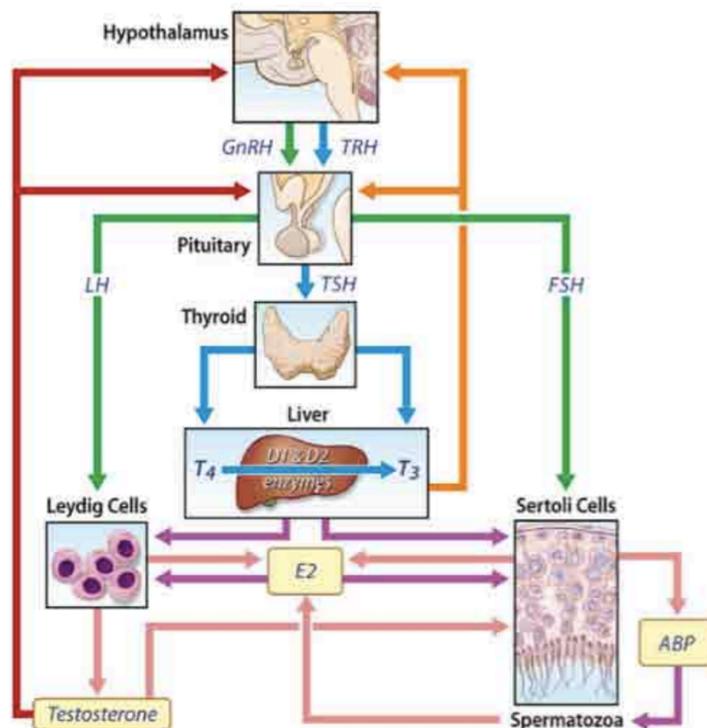


Figura 4: ruolo della tiroide nello sviluppo testicolare e nella spermatogenesi e possibili interazioni fra l'asse ipotalamo-ipofisi gonadi (in verde stimolatorio ed in rosso inibitorio) e l'asse ipotalamo-ipofisi-tiroide<sup>51</sup>

Un'alterazione della regolazione endocrina può inoltre insorgere successivamente ad un trauma cranico determinante una lesione a livello ipotalamico-ipofisario<sup>13</sup>.

#### *Infezioni del tratto urogenitale*

Le infezioni del tratto urogenitale e delle ghiandole sessuali accessorie sono potenzialmente cause di infertilità maschile<sup>52</sup> e pertanto le infezioni vengono considerate degli elementi contributivi all'infertilità maschile a causa del loro impatto negativo sulla qualità del liquido seminale<sup>53</sup>. Le successive risposte infiammatorie al processo infettivo possono determinare un aumento dello stress ossidativo e provocare conseguentemente danno testicolare<sup>54,55</sup>. In particolare è stato dimostrato come le infezioni da HPV siano capaci di ridurre i tassi di gravidanze naturali o medicalmente assistite<sup>56</sup>

### *Cause immunologiche*

Dal punto di vista antigenico lo spermatozoo si comporta come una struttura parzialmente estranea sia per l'uomo che li produce che per la donna che li riceve; per questo motivo gli spermatozoi vengono protetti mediante un meccanismo di tolleranza immunologico. Gli spermatogoni e gli spermatozoi maturi non presenteranno gli stessi antigeni di superficie; durante le diverse fasi della spermatogenesi vi sono infatti numerose modifiche che determinano riarrangiamenti cromatici, epigenetici e molecolari. Il testicolo, definito sede di privilegio immunitario, è quindi composto di strutture anatomico-funzionali in grado di contrastare una risposta immunitaria; che risulterebbe lesiva nei confronti degli spermatozoi. In particolare, questa funzione essenziale è svolta dalle cellule di Sertoli, elemento della barriera emato-testicolare, che sono distribuite tra gli spermatogoni; esse circondano le cellule germinali mediante prolungamenti citoplasmatici estendendosi dalla membrana basale in direzione radiale<sup>11</sup>. Elemento caratteristico dell'unione di due cellule di Sertoli limitrofe è il complesso di giunzioni serrate disposte basalmente e non in posizione apicale diversamente dalle giunzioni serrate delle altre cellule epiteliali. Questa peculiarità permette quindi la creazione di un microambiente all'interno del quale oltre al sistema di mimetismo immunitario le cellule di Sertoli assumono un ruolo per la regolazione della funzione nutritiva e strutturale.

Gli spermatozoi nel loro percorso di sviluppo giungeranno a livello dell'epididimo dove subiranno delle modifiche molecolari a livello superficiale. Anche in questa sede sarà presente una barriera emato-epididimaria nonostante il possibile riscontro di leucociti.

Ci sono svariate patologie in grado di alterare il funzionamento di questa barriera può essere alterato e reso disfunzionale da svariate patologie che determineranno un'autoimmunizzazione antispermatozoo. Gli anticorpi antispermatozoo (ASA) saranno in grado, dopo esser stati formati, di attraversare la barriera emato-testicolare e interagire con la superficie nemaspermica.

Tra i fattori determinanti alterazioni della barriera i più frequenti saranno: traumi, macro e micro-necrosi, ostruzioni e processi infiammatori<sup>11</sup>.

### *Disfunzioni sessuali*

L'infertilità maschile può talora essere dovuta alla presenza di disfunzioni sessuali<sup>9</sup>. Nella popolazione di pazienti infertili la mancanza di desiderio sessuale, la disfunzione erettile e l'eiaculazione precoce rappresentano le cause più frequenti di infertilità. Nei casi di grave disfunzione erettile, la mancata erezione compromette infatti la possibilità di poter concepire una gravidanza naturale. Le cause più frequenti di disfunzione erettile sono: psicologiche (ansia e depressione), relazionali o organiche (cardiovascolari, neurologica, metabolica o endocrine)<sup>57</sup>. Allo stesso modo anche gravi condizioni di eiaculazione precoce rappresentano un ostacolo al concepimento naturale. Nei casi di pazienti refrattari al trattamento è possibile in questi casi ricorrere ad una procreazione medicalmente assistita<sup>58</sup>.

### *Patologie neoplastiche*

Tra le patologie neoplastiche che possono determinare infertilità le più frequenti sono adenomi ipofisari, masse sellari, craniofaringiomi. Anche il trattamento chirurgico o tramite radioterapia e chemioterapia per patologie neoplastiche possono determinare un'infertilità<sup>9</sup>. La gonatotossicità di questi trattamenti è presente sia per la donna che per l'uomo; in quest'ultimo si può infatti instaurare una condizione di azoospermia transitoria o permanente. La crioconservazione deve quindi essere proposta come parte integrante del percorso di cura del paziente<sup>59</sup>.

### *Infertilità da farmaci e droghe*

Farmaci e droghe possono assumere un ruolo preponderante nel determinare un'infertilità maschile.

In particolare, l'assunzione di oppioidi, droghe psicotrope e l'utilizzo di cannabis possono inficiare la fertilità maschile attraverso un'inibizione del GnRH. Tra i farmaci il ketoconazolo e la cimetidina oltre che la supplementazione di testosterone possono a loro volta implicare un'alterata fertilità maschile<sup>60</sup>.

Un'alterazione della spermatogenesi e della fertilità può anche essere dovuta ad una supplementazione con testosterone (a scopo terapeutico e non); ciò è dovuto all'alterazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-testicolo in cui il testosterone ha un ruolo inibitorio<sup>61</sup>.

### *Stile di vita*

La aumenta prevalenza di coppie e uomini infertili riscontrata nelle ultime decenni fa supporre che vi sia un deterioramento progressivo dei parametri di fertilità maschile; in parte legati allo stile di vita e all'esposizione a determinate sostanze<sup>26</sup>. Tra questi vanno segnalati l'uso di alcol, di tabacco e droghe (cannabis, oppiacei e steroidi anabolizzanti), un'alimentazione scorretta, con conseguente obesità e sindrome metabolica, oltre allo stress termico genitale legato all'utilizzo di telefonini e laptop<sup>62</sup>.

### **1.2 Neoplasie**

La seconda indicazione alla crioconservazione è costituita dai pazienti con una diagnosi di neoplasia maligna che devano intraprendere un percorso gonadotossico che possa quindi potenzialmente compromettere la fertilità. L'indicazione alla crioconservazione in questi pazienti è fondamentale<sup>63</sup> e deve essere fatta ad ogni paziente che deva intraprendere un percorso di chemioterapia, radioterapia o un orchietomia<sup>64</sup>.

### *Tumore testicolare*

Il tumore testicolare rappresenta una delle indicazioni più frequenti alla crioconservazione di gameti maschili. Il suo interesse in ambito clinico è legato principalmente all'età dei pazienti colpiti; costituisce infatti uno dei tumori più diffusi nella fascia di età compresa tra 15 e i 44 anni<sup>65</sup>, con un tasso di sopravvivenza a 5 anni, se correttamente trattato, pari al 97% dei casi<sup>66</sup>. La maggior parte dei tumori testicolari ha origine dalla linea germinale e i fattori di rischio associati al tumore testicolare sono in particolare criptorchidismo, anamnesi personale o familiare positiva per tumore testicolare e l'etnia del paziente<sup>66</sup>. All'esame obiettivo è possibile riscontrare una massa solida, di dimensioni variabili di cui bisognerà indagare la localizzazione; dovrà essere in seguito eseguito un esame ecografico color-doppler bilaterale.

Il trattamento consiste nell'orchifunicolectomia radicale inguinale, con conseguente rimozione del testicolo e del cordone spermatico. Successivamente basandosi sull'istotipo del tumore e sulla stadiazione verranno compiute le

successive scelte terapeutiche; tra cui radioterapia, chemioterapia e resezione dei linfonodi retroperitoneali<sup>67</sup>.

I trattamenti eseguiti per la cura del tumore testicolare possono potenzialmente compromettere la fertilità dei pazienti, in alcuni casi in maniera irreversibile.

Conseguentemente risulta di fondamentale importanza proporre al paziente la crioconservazione di gameti maschili prima dell'inizio della terapia; ciò permetterà di intraprendere una PMA se, in seguito alla terapia antineoplastica, si venga ad instaurarsi una condizione di azoospermia<sup>66</sup>.

## **2. Excursus storico sulla preservazione della fertilità**

I primi rudimentali tentativi di crioconservazione degli spermatozoi umani risalgono a oltre due secoli fa quando l'italiano Spallanzani tentò di conservare degli spermatozoi mediante il loro raffreddamento nella neve<sup>68</sup>. Nei decenni successivi si susseguirono diversi tentativi che non permisero però di ottenere risultati significativi fino al 1949 quando si scoprì la funzione crioprotettrice del glicerolo; questo permise un'ampia diffusione delle metodiche di crioconservazione, facendole assumere l'importanza che oggi riveste nel contesto delle tecniche di PMA. Alla base dell'attuale ricerca, nell'ambito della crioconservazione, vi è il tentativo di massimizzare il numero di spermatozoi vitali recuperati dopo i processi di crioconservazione.

### **Utilizzo di crioprotettori e processo di crioconservazione**

L'utilizzo di crioprotettori ha permesso di diminuire la quantità di acqua intracellulare in grado di produrre cristalli di ghiaccio potenzialmente dannosi per gli spermatozoi, permettendo conseguente una maggior sopravvivenza degli stessi. I crioprotettori possono essere suddivisi in permeabili ed impermeabili; entrambi agiscono mediante una diminuzione del punto di congelamento dell'acqua intracellulare ed extracellulare, proteggendo conseguentemente dai danni causati dai cristalli di ghiaccio, e attraverso un controllo della pressione oncologica cellulare<sup>49</sup>.

Tra i crioprotettori permeabili, il primo ad essere utilizzato fu il glicerolo; successivamente, fu introdotto il dimetilsofossido (DMSO), composto in grado di

penetrare più velocemente all'interno delle cellule richiedendo una concentrazione inferiore per la prevenzione dei danni da crioconservazione. L'utilizzo di composti permeabili determina una difficile rimozione e un possibile danno determinato da una loro tossicità nei confronti degli spermatozoi<sup>50</sup>. Ciò ha favorito conseguentemente l'utilizzo dei crioprotettori non permeabili al fine di minimizzare il danno arrecato; tra questi vi sono il citrato di tuorlo d'uovo, albumine e destrani. I meccanismi che generano il danno, nei processi di crioconservazione, sono multifattoriali: stress osmotico, stress ossidativo e shock da freddo con la conseguente possibile formazione di cristalli intracellulari. Ciò ha portato all'introduzione, nel processo di crioconservazione, di alcuni additivi con proprietà antiossidanti in grado di diminuire i danni arrecati dallo shock da freddo e dai ROS; tra questi additivi i più utilizzati sono la vitamina E, la vitamina C, il glutatione (GSH), la melatonina (MLT), la taurina, lo zinco e il selenio oltre che alla L-carnitina. Vi sono inoltre additivi enzimatici tra cui la glutatione perossidasi, la superossido dismutasi e la catalasi<sup>51</sup>. L'uso di più additivi in maniera combinata potrebbe determinare danno agli spermatozoi per cui, nonostante la loro grande utilità nella preservazione degli spermatozoi, vanno utilizzati attentamente<sup>69</sup>. In aggiunta alcuni studi hanno dimostrato come l'utilizzo di lipoproteine a bassa densità<sup>70</sup> e la lecitina di soia<sup>71</sup> fossero in grado di minimizzare l'impatto del danno da ROS (Reactive Oxygen Species).

Durante il processo di crioconservazione le velocità di raffreddamento e riscaldamento devono essere rispettate scrupolosamente, potendo impattare negativamente sulla funzionalità degli spermatozoi. Infatti, il raffreddamento troppo veloce può arrecare danno al pari di uno troppo lento<sup>72</sup>. Una velocità eccessiva porta alla produzione di cristalli intracellulari al contrario una troppo lenta determina un'esposizione prolungata a soluzioni concentrate, formatesi durante la conversione di acqua in ghiaccio.

Attualmente prevale la tecnica di congelamento lento che consiste nel raffreddare gli spermatozoi in due o tre fasi in un intervallo di tempo che va dalle due alle quattro ore<sup>73</sup>; inizialmente il liquido spermatico verrà mantenuto a temperatura ambientale per dieci minuti, dopodiché i campioni vengono gradualmente raffreddati da 20 °C a 5 °C con una velocità di 0.5-1 °C minuto e tra i 5 °C e i -80

°C ad una velocità di 1-10 °C minuto, infine verranno immersi nell'azoto liquido<sup>74</sup>. Questa tecnica non risulta però adeguata nel momento in cui si sia confrontati con un liquido spermatico contenente pochi spermatozoi; in questo caso si prediligerà un raffreddamento rapido. Questa metodica consiste nell'immersione diretta nell'azoto liquido alla temperatura di -196 °C degli spermatozoi dopo che siano entrati a contatto con i vapori di azoto per dieci minuti<sup>2</sup>. La tecnica di raffreddamento rapido determina una miglior motilità e sopravvivenza successivamente allo scongelamento, senza però risolvere le problematiche relative alla formazione dei cristalli intracellulari e della rimozione degli adiuvanti necessari per la crioconservazione<sup>75</sup>. In alternativa ai metodi di congelamento convenzionali è stata individuata la tecnica di vitrificazione, ovvero il processo di solidificazione di un liquido in uno stato amorfo; tuttavia, gli studi volti a valutare l'efficacia del processo di vitrificazione hanno fornito risultati contrastanti. Al pari del congelamento anche lo scongelamento dei gameti maschili andrà svolto a temperature e velocità controllate per permettere la miglior sopravvivenza spermatica possibile. Il tasso di spermatozoi vitali diminuisce nel caso in cui il processo di scongelamento venga svolto ad una temperatura subottimale; ciò potrebbe essere dovuto alla ricristallizzazione che avviene esternamente alle cellule nei processi di riscaldamento lento<sup>77</sup>.

Data la minor funzionalità degli spermatozoi ottenuti dal liquido seminale crioconservato che quelli ottenuti dal liquido seminale fresco vi sarà una diminuzione dei tassi di gravidanza con l'utilizzo di materiale crioconservato<sup>78</sup>; è noto infatti come la crioconservazione possa impattare negativamente sulla cromatina<sup>79</sup> e sulle proprietà degli spermatozoi, in particolare sulla loro motilità che può diminuire dal 50,6% al 30,2%<sup>80</sup>. Questa problematica è stata, in parte, arginata grazie per mezzo del metodo di inseminazione ICSI che necessitando di numeri inferiori ed esigui di spermatozoi funzionali può essere applicato più agevolmente<sup>81</sup>. Una volta completato il processo di crioconservazione non vi sono invece evidenze che la durata temporale della crioconservazione impatti negativamente sugli spermatozoi<sup>82</sup>. I vari procedimenti andranno svolti in maniera sterile ed andrà utilizzata durante i vari passaggi una cappa di classe A.

### 3. Procreazione Medicalmente Assistita (PMA)

Nel caso in cui, al termine di un percorso diagnostico approfondito, non sia stato possibile risolvere la condizione di infertilità è opportuno che venga intrapreso, se desiderato dalla coppia, un percorso di procreazione medicalmente assistita (PMA). Nel corso di questa procedura viene preferito l'utilizzo, se disponibile, del liquido seminale raccolto a fresco il giorno della PMA o, in caso contrario, prevede l'utilizzo di gameti maschili crioconservati precedentemente. Essa consiste nell'insieme di trattamenti medici volti a risolvere una condizione di infertilità favorendo il concepimento. La scelta di intraprendere un percorso di PMA dovrà considerare l'età dei componenti della coppia, la probabile causa di infertilità ed i rischi associati alle diverse tecniche<sup>83</sup>.

È possibile suddividere le tecniche di PMA in livelli, caratterizzati da una crescente invasività. Verranno quindi, sulla base della scelta medica, inizialmente privilegiate le soluzioni terapeutiche più semplici e meno invasive. Le tecniche di PMA possono essere utilizzate sia con gameti maschili ottenuti a fresco sia crioconservati<sup>83</sup>.

#### *I livello*

Tra le tecniche di I livello, ossia le meno invasive, l'inseminazione intrauterina (IUI) è la principale<sup>83</sup>. Il razionale di questa tecnica è quello di aumentare il numero di spermatozoi presenti in prossimità dell'ovulo da fecondare; ciò avviene mediante l'inseminazione di spermatozoi, sottoposti ad un lavaggio, direttamente all'interno della cavità uterina in concomitanza con l'ovulazione<sup>84</sup>. Una stimolazione ovarica può essere affiancata a questa procedura per massimizzare la probabilità di concepimento<sup>84</sup>.

Secondo le linee guida NICE (citato giusto?), trova indicazione nelle coppie che abbiano difficoltà ad avere rapporti sessuali, nel caso in cui uno dei due partner abbia una positività per un'infezione sessualmente trasmissibile, nei cicli eterologa con donazione del seme e nelle coppie dello stesso sesso<sup>85,86</sup>. L'istituto superiore della sanità prevede inoltre l'utilizzo di tale metodica nei pazienti con un'infertilità maschile di grado lieve-moderato che non siano riusciti a concepire dopo l'applicazione di un corretto percorso clinico-diagnostico<sup>83</sup>. Al contrario vi è scarsa indicazione nei casi di infertilità associata ad endometriosi, a grave infertilità

maschile, a forme di infertilità legate a fattori tubarici e in donne di età superiore ai 35 anni<sup>87</sup>.

Gli spermatozoi, nel corso di IUI, prima di poter essere utilizzati devono essere sottoposti ad una preparazione. Sono attualmente disponibili varie tecniche di preparazione: il lavaggio semplice, lo *swim up* e la separazione per gradiente di densità<sup>83</sup>. Non sono attualmente presenti evidenze che raccomandino di privilegiare una tecnica di preparazione in particolare<sup>88</sup>.

La riuscita di tale procedura è strettamente legata alla qualità del liquido seminale fresco e successivo alla preparazione<sup>89</sup>. Sarà quindi fondamentale il riscontro di determinati parametri qualitativi e quantitativi nel liquido seminale prima di poter eseguire una procedura di IUI. Tra i principali parametri vi sono<sup>89</sup>:

- La morfologia, con un cut-off di 5% di forme tipiche
- Il numero totale di spermatozoi mobili, con cut-off di 5-10 milioni
- Il numero di spermatozoi mobili per millilitro dopo lavaggio, con cut-off di 0,8-5 milioni/mL
- Motilità totale nel campione di sperma nativo, con cut-off del 30%.
- Numero di spermatozoi mobili inseminati, in particolare nelle donne di età inferiore ai 35 anni.

Sulla base di questi valori è possibile predire a priori la probabilità di fecondazione. Nel caso in cui vengano riscontrate condizioni che suggeriscano una scarsa probabilità di riuscita di tale metodica sarà importante indirizzare il paziente verso altre tecniche di procreazione medicalmente assistita di II o III livello<sup>84</sup>.

### *II livello*

Le tecniche di II livello si distinguono per una maggior complessità ed invasività. All'interno di questa categoria va fatta la distinzione fra due diverse tecniche, FIVET (Fecondazione In Vitro con Trasferimento dell'Embrione) e ICSI (Iniezione Intracitoplasmatica di Spermatozoi). Queste due tecniche; definite IVF, pur presentando numerose similitudini, si distinguono per le modalità con cui avviene la fecondazione dell'ovocita<sup>90</sup>. Nella procreazione tramite FIVET gli spermatozoi vengono messi, in vitro, a contatto con le cellule uovo permettendo la successiva fecondazione. Nella procedura ICSI invece un singolo spermatozoo viene iniettato all'interno del citoplasma dell'ovocita<sup>91</sup>.

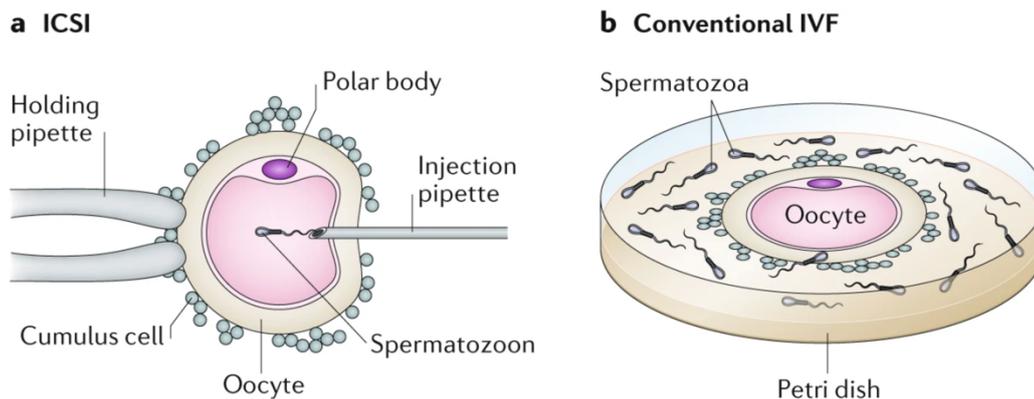


Figura 5: a. Iniezione intracitoplasmatica di spermatozoi (ICSI) che coinvolge un singolo spermatozoo nel citoplasma dell'ovocita; b. fecondazione in vitro tradizionale che prevede che gli spermatozoi vengano incubati con gli ovociti in una piastra di Petri con successiva fecondazione dell'ovocita<sup>90</sup>.

Le fasi di questo processo sono:

1. Stimolazione ovarica
2. Prelievo degli ovociti
3. Inseminazione e fecondazione
4. Trasferimento dell'embrione

L'utilizzo della metodica ICSI, introdotta inizialmente unicamente per il trattamento di forme severe di infertilità maschile, ha trovato negli anni un utilizzo crescente, anche in altre condizioni di infertilità<sup>92</sup>.

L'ICSI si basa sulla capacità del singolo spermatozoo, dotato di un centrosoma funzionante e un materiale genomico intatto, di fecondare un ovocita. Ciò determina l'indicazione all'utilizzo di tale tecnica nei pazienti con diagnosi di azoospermia ostruttiva (OA) e azoospermia non ostruttiva (NOA), acinesia, globozoospermia, anticorpi anti-spermatozoo, necrozoospermia, oligozoospermia severa, criptoospermia e in presenza di un elevato tasso di frammentazione del DNA nemaspermico<sup>90</sup>. Viene inoltre indicata come trattamento nelle condizioni di infertilità che non siano riuscite ad ottenere un concepimento tramite IUI e in alcune patologie femminili quali l'endometriosi di grado III o IV oltre ai casi di fattore tubo peritoneale<sup>83</sup>.

#### 4. Gameti maschili utilizzati per la crioconservazione e successive PMA

I gameti maschili utilizzati per le tecniche di PMA vengono ottenuti di preferenza dal liquido seminale. Nell'eventualità in cui sia presente una grave oligospermia o azospermia si possono mettere in atto dei prelievi chirurgici di spermatozoi: tramite

aspirazione percutanea di spermatozoi per via testicolare (TESA *Testicular Sperm Aspiration*) o dall'epididimo (PESA *Percutaneous Epididymal Sperm Aspiration*), attraverso un'estrazione di spermatozoi per via testicolare (TESE *Testicular Sperm Extraction*) o mediante aspirazione microchirurgica dall'epididimo (MESA *Microsurgical Epididymal Sperm Aspiration*)<sup>83</sup>. Per poter eseguire tali procedure è necessario che vengano rispettate le seguenti condizioni: il cut-off di numero di spermatozoi totali mobili è di 0,2-1 milione e il cut-off di forme tipiche è del 5%<sup>83</sup>. Ulteriore metodica, che viene utilizzata nei pazienti affetti da eiaculazione retrograda, è il recupero dei gameti dalle urine<sup>93</sup>.

### III. OBIETTIVI

Il presente studio è condotto su una coorte di 7044 pazienti assistiti presso l'Ambulatorio di Andrologia e Medicina della Riproduzione dell'Azienda Ospedaliera di Padova, nel quale hanno compiuto un percorso di crioconservazione. Tale ricerca è stata disegnata e svolta con l'obiettivo di individuare i fattori che possono determinare l'utilizzo di gameti maschili crioconservati; in base alle indicazioni demografiche e all'indicazione alla crioconservazione.

A tale scopo si è indagata l'eventuale sussistenza di una correlazione fra la diagnosi che poneva indicazione alla crioconservazione, l'età del paziente, la metodica con cui è avvenuto il prelievo e l'eventuale utilizzo futuro del liquido seminale. La valutazione in oggetto è risultata pratica ed agevole poiché i pazienti, prima di effettuare la crioconservazione, vengono indagati e suddivisi in base alla loro patologia sottostante. Pertanto, è stato possibile indagare retrospettivamente l'utilizzo dei gameti crioconservati sulla base dei dati riportati nelle cartelle cliniche dei pazienti stessi, aggiornate annualmente in occasione del rinnovo del consenso al mantenimento della crioconservazione.

## IV. MATERIALI E METODI

### 1. Popolazione oggetto dello studio

Lo studio svolto è di tipo retrospettivo, basato su una popolazione di 7044 pazienti, di età compresa tra i 12 e i 69 anni, presi in carico presso l'Ambulatorio di Andrologia e Medicina della Riproduzione dell'Azienda Ospedaliera di Padova, nell'ambito di un percorso di crioconservazione. I criteri di inclusione dello studio sono:

- Aver eseguito una crioconservazione tra il novembre 1991 e il novembre 2023.
- Avere una diagnosi della patologia necessitante la crioconservazione

Il numero di prime crioconservazioni è notevolmente cambiato nel corso degli anni; tra il 2004 e il 2010 il numero di crioconservazioni è andato gradualmente aumentando, rimanendo sostanzialmente stabile tra il 2012 e il 2019, per poi registrare un calo progressivo a partire dal 2020 ad oggi. Il numero di prime crioconservazioni maggiori è avvenuto nel 2012, in cui sono stati registrati 442 nuovi pazienti; al contrario il numero minore di crioconservazioni è stato registrato nel 2004 in cui sono state eseguite 144 prime crioconservazioni.

Il numero di nuove crioconservazioni da parte di pazienti oncologici è rimasto sostanzialmente stabile negli anni, al contrario vi è stata una diminuzione delle crioconservazioni da parte dei pazienti infertili.

Tenuto conto che il numero di pazienti esclusi dallo studio, a causa della mancata informazione certa relativa alla diagnosi, non è stato uniforme negli anni abbiamo deciso, al fine di ottenere una maggior rappresentatività, di considerare nel grafico che segue anche i pazienti che non verranno successivamente inseriti nello studio.

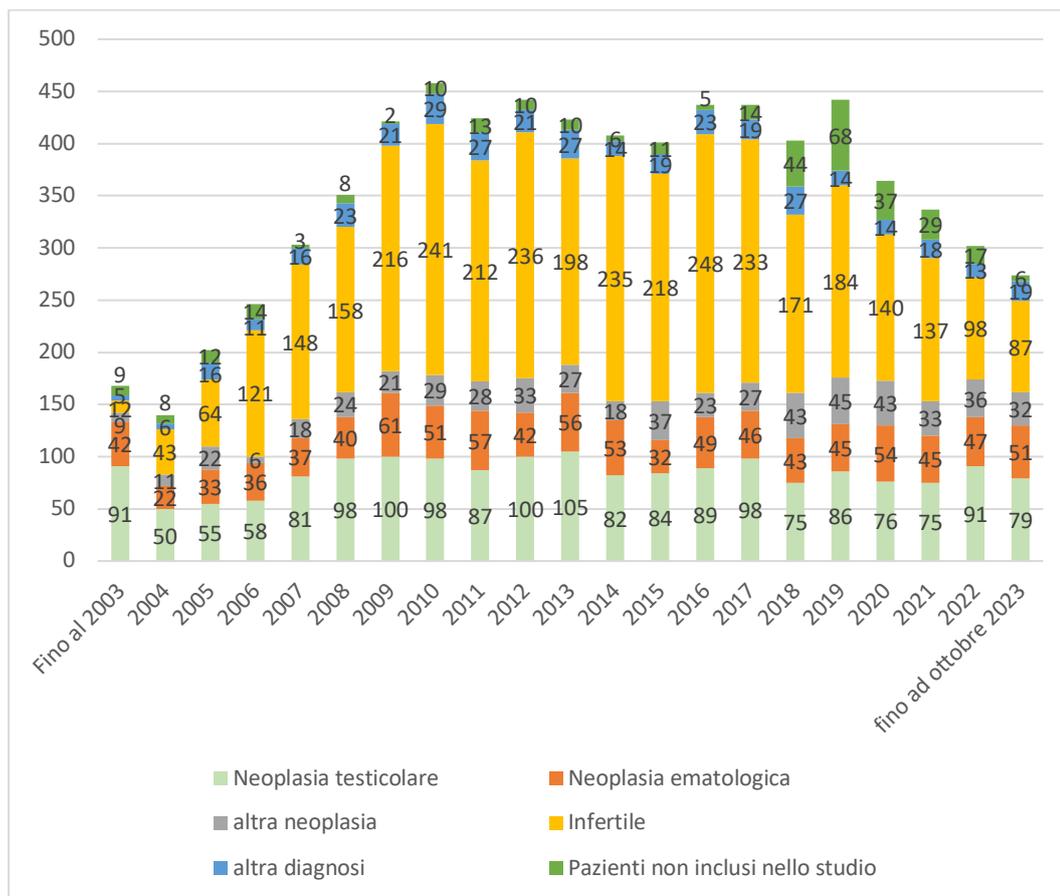


Figura 6: numero di crioconservazioni, suddivise per diagnosi, eseguite presso l'Ambulatorio di Andrologia e Medicina della Riproduzione dell'Azienda Ospedaliera di Padova.

I pazienti, appartenenti a questo studio, si sono recati presso l'ambulatorio o per indicazione del proprio medico curante o per scelta personale. I dati sono stati raccolti dalle cartelle cliniche dei pazienti, aggiornate annualmente al momento del rinnovo del consenso alla crioconservazione. L'analisi si è basata sulla raccolta dei dati relativi all'utilizzo dello sperma in base alle caratteristiche dei pazienti e all'intervallo tra il primo campione crioconservato e la prima richiesta di utilizzo del liquido seminale.

Al momento della presa in carico, i pazienti, oggetto del presente studio, sono stati sottoposti ad una visita medica completa, la quale comprende un'ampia e dettagliata anamnesi personale, patologica prossima e remota, l'anamnesi familiare e farmacologica; nonché lo svolgimento di esami biochimici e l'esame obiettivo.

Nell'anamnesi patologica è posta particolare attenzione all'eventuale patologia sottostante determinante la necessità di intraprendere un percorso di

crioconservazione; in base a questo parametro sono quindi state individuate le tre popolazioni di pazienti dello studio.

La valutazione degli esami biochimici dei pazienti si è basata sull'analisi del liquido seminale, compiuta precedentemente all'eventuale crioconservazione, e sullo svolgimento di determinate sierologie virali.

Le sierologie attualmente indagate, prima di poter svolgere una crioconservazione di gameti maschili, sono:

- Citomegalovirus (CMV)
- Treponema Pallidum Haemoagglutination Assay (TPHA)
- HIV
- HCV
- HBV

Questo studio retrospettivo ha raccolto i seguenti dati: età al momento della prima crioconservazione, indicazione alla crioconservazione, data del primo ritiro di liquido seminale, numero di pazienti deceduti, numero di raccolte eliminate e tipologia di raccolta dei gameti.

Sono stati quindi analizzati i tassi di utilizzo e il periodo intercorso tra crioconservazione e ritiro dei gameti utilizzati per una procedura di procreazione medicalmente assistita.

## **2. Indicazioni alla preservazione**

Le indicazioni alla criopreservazione sono state suddivise in tre categorie: pazienti con diagnosi di infertilità, pazienti con diagnosi di neoplasia e pazienti con diagnosi diversa dalle precedenti. L'indicazione principale alla crioconservazione è quella legata all'infertilità nel 48,27% (3400/7044) dei casi, seguita dai pazienti doventi intraprendere una terapia potenzialmente gonadotossica per una neoplasia nel 46,31% (3262/7044) ed infine i pazienti con altra diagnosi corrispondente al 5,42% (382/7044).

<b>Diagnosi</b>	<b>N° Totale</b>
<i>Infertilità</i>	3400
<i>Neoplasia</i>	3262
<i>Altra diagnosi</i>	382

Tabella 3: suddivisione della popolazione in base all'indicazione alla crioconservazione

Il gruppo di pazienti con diagnosi di neoplasia è stato analizzato basandosi sulla tipologia di neoplasia diagnosticata individuando così altre tre sottocategorie: neoplasia testicolare, ematologica o altra tipologia di neoplasia.

Il sottogruppo più rappresentato è quello costituito dai pazienti con diagnosi di neoplasia testicolare composto da 1758 pazienti; quello costituito da pazienti con neoplasia ematologica è pari a 942 pazienti; e i pazienti con altra diagnosi di neoplasia sono 562.

<b>Neoplasia</b>	<b>N° Totale</b>
<i>Testicolare</i>	1758
<i>Ematologica</i>	942
<i>Altra</i>	562

Tabella 4: numero di pazienti oncologici suddivisi sulla base di neoplasia

### 3. Età della popolazione

L'età media a cui i pazienti hanno crioconservato il primo campione è di 33,12± 8,41 anni.

La popolazione è, quindi, stata suddivisa, oltre che sulla base della diagnosi determinante la necessità alla crioconservazione, anche in base all'età al momento della stessa. I pazienti con diagnosi di infertilità hanno crioconservato per la prima volta mediamente ad un'età superiore alle altre due categorie; i pazienti con diagnosi di neoplasia costituiscono al contrario la categoria di pazienti che crioconservano mediamente ad un'età inferiore.

<b>Diagnosi</b>	<b>Età media</b>	<b>Deviazione standard</b>
<i>Neoplasia</i>	31,24	± 8,52
<i>Infertilità</i>	34,85	± 7,89
<i>Altra diagnosi</i>	33,82	± 8,67
<i>Totale</i>	33,13	± 8,41

Tabella 5: età media il giorno della crioconservazione e deviazione standard, calcolata per ogni diagnosi

Successivamente sono stati suddivisi i pazienti in sottogruppi utilizzando il criterio anagrafico dell'età; in particolare è stata eseguita la seguente suddivisione: età inferiore ai 20 anni, compresa tra 20 e 24anni, tra i 25 e i 29 anni, tra i 30 e i 34 anni, tra i 35 e i 39 anni, tra i 40 e i 44 anni, tra i 45 e i 49 anni e oltre i 50 anni.

<i>Età</i>	<i>tot</i>	<i>Neoplasia</i>	<i>Infertilità</i>	<i>Altra diagnosi</i>
<i>fino ai 20</i>	504	305	171	28
<i>20-24</i>	793	498	256	39
<i>25-29</i>	1070	660	355	55
<i>30-34</i>	1730	776	870	84
<i>35-39</i>	1549	546	927	76
<i>40-44</i>	879	281	527	71
<i>45-49</i>	343	121	204	18
<i>oltre i 50</i>	176	78	87	11

*Tabella 6: suddivisione della popolazione in base all'età il giorno della crioconservazione.*

Da questo dato è quindi stato possibile calcolare la rappresentatività di ciascun sottogruppo. La fascia di età compresa tra 30 e i 34 anni, comprendendo il 24,55% della popolazione dello studio, è la più numerosa.

<i>Età</i>	<i>% Della Popolazione</i>
<i>fino ai 20</i>	7,15
<i>20-24</i>	11,26
<i>25-29</i>	15,19
<i>30-34</i>	24,56
<i>35-39</i>	21,98
<i>40-44</i>	12,49
<i>45-49</i>	4,87
<i>oltre i 50</i>	2,5

*Tabella 7: percentuale della popolazione per gruppo di età*

#### 4. Origine del materiale crioconservato

Il materiale crioconservato è stato suddiviso anche sulla base della sua origine. Sono in particolare possibili quattro metodiche diverse per il recupero dei gameti maschili successivamente crioconservati:

- Dal liquido seminale del paziente
- Tramite biopsia testicolare
- Tramite agoaspirato
- Tramite il recupero dalle urine del paziente

Tra i pazienti oncologici il 98,5% (3213/3262) delle crioconservazioni era costituita da gameti ottenuti dal liquido seminale, nel 1,1% (36/3262) tramite biopsia, nello 0,31% (10/3262) tramite agoaspirato e nello 0,09% (3/3262) dalle urine del paziente.

I gameti crioconservati dai pazienti infertili sono stati prelevati nel 61,15% (2079/3400) dal liquido seminale, nel 29,94% (1018/3400) mediante una biopsia, nell'8,47% (288/3400) tramite un agoaspirato e nello 0,44% (15/3400) tramite le urine.

All'interno della popolazione di pazienti crioconservanti gameti maschili per un'indicazione diversa, che non fosse né oncologica né di infertilità: il 94,24 % (360/382) delle crioconservazioni sono state ottenute da liquido seminale, il 2,09% (8/382) da biopsia, il 3,4% (13/382) tramite agoaspirato e lo 0,26% (1/382) dalle urine.

<i>Origine materiale crioconservato</i>	<i>Totale Pazienti</i>	<i>Pazienti Oncologici</i>	<i>Pazienti Infertili</i>	<i>Altra Diagnosi</i>
<i>Liquido Seminale</i>	<b>80,24%</b> (5652/7044)	<b>98,5%</b> (3213/3262)	<b>61,15%</b> (2079/3400)	<b>94,24%</b> (360/382)
<i>Biopsia</i>	<b>15,08%</b> (1062/7044)	<b>1,1%</b> (36/3262)	<b>29,94%</b> (1018/3400)	<b>2,09%</b> (8/382)
<i>Agoaspirato</i>	<b>4,42%</b> (311/7044)	<b>0,31%</b> (10/3262)	<b>8,47%</b> (288/3400)	<b>3,4%</b> (13/382)
<i>Urine</i>	<b>0,27%</b> (19/7044)	<b>0,09%</b> (3/3262)	<b>0,44%</b> (15/3400)	<b>0,26%</b> (1/382)

Tabella 8: suddivisione dei pazienti in base all'origine dei gameti crioconservati.

## 5. Analisi statistica

Tutte le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando il software SPSS (Versione 14, SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Valori di  $p < 0.05$  sono stati considerati statisticamente significativi. I risultati sono stati espressi come frequenze (percentuali) e come media  $\pm$  deviazione standard. Nell'ambito dell'analisi statistica condotta sulle variabili categoriche di questo studio, ci siamo avvalsi del test del chi-quadro per valutare le disparità tra le distribuzioni di frequenza osservate e attese. La differenza tra variabili continue è stata fatta mediante l'utilizzo di test di t di student e ANOVA.

Il nostro criterio di significatività è stato fissato a un livello inferiore allo 0,05, al fine di identificare differenze che non potessero verosimilmente derivare da casualità con una probabilità superiore al 5%.

## V. RISULTATI

### *Numero di ritiri*

Il numero di ritiri per anno, nel periodo temporale analizzato dal presente studio è stato variabile. Il numero maggiore di ritiri è avvenuto nel 2011 in cui 138 pazienti hanno ritirato per la prima volta.

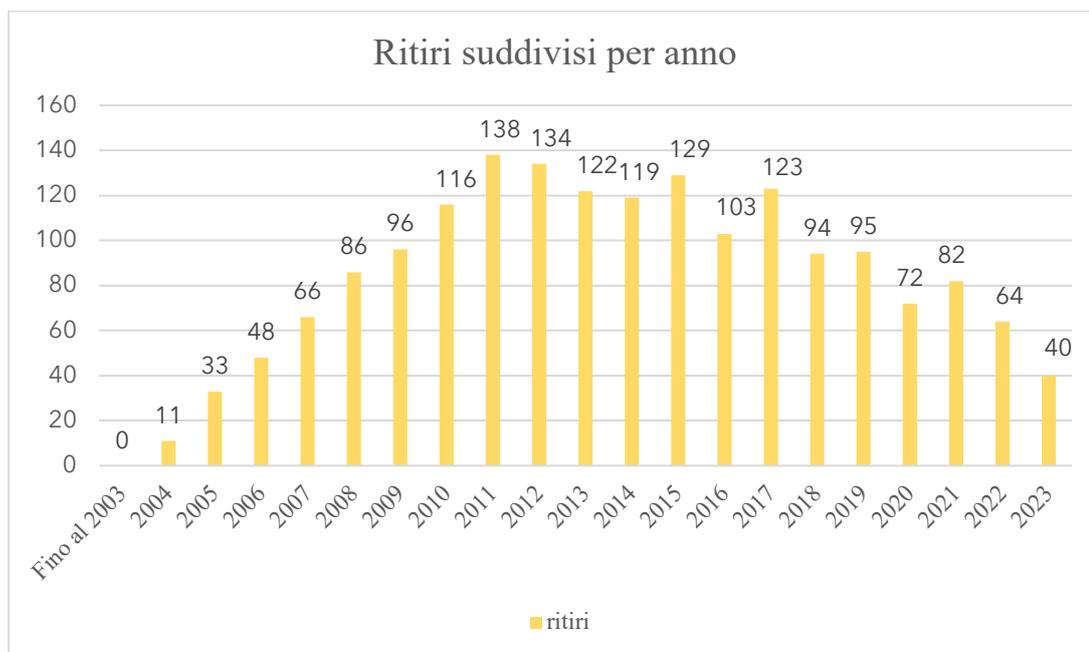


Figura 7: numero ritiri suddivisi per anno.

Il numero di ritiri è stato analizzando osservando la popolazione sulla base dell'indicazione alla crioconservazione e sulla base del criterio anagrafico dell'età.

### *Numero di ritiri per diagnosi*

I pazienti con diagnosi diversa hanno tassi di ritiro percentuali non omogenei tra loro. I pazienti infertili si caratterizzano per un maggior numero di ritiri (42,15%), percentualmente al numero di crioconservazioni, rispetto i pazienti con diagnosi di neoplasia (8,55%); i pazienti con altra diagnosi si caratterizzano invece per un tasso di ritiro intermedio (15,45%).

La percentuale di ritiro per ogni gruppo di pazienti è:

- Pazienti con neoplasia: 8,55% (279/3262)
- Pazienti infertili: 42,15% (1433/3400)
- Pazienti con altra diagnosi: 15,45% (59/382)

È stata quindi valutata la significatività delle diverse frequenze di ritiri presenti nelle categorie dello studio. Nello specifico abbiamo utilizzato test del chi-quadrato. La differenza tra i tassi di ritiro tra le diverse diagnosi dello studio è risultata significativa ( $p < 0.05$ ).

Test del chi-quadrato: numero di ritiri					
					Totale
			NON RITIRA	RITIRA	
Patologia	Altra Diagnosi	Conteggio	323	59	382
		Conteggio previsto	286,0	96,0	382,0
	Infertilità	Conteggio	1967	1433	3400
		Conteggio previsto	2545,2	854,8	3400,0
	Neoplasia	Conteggio	2983	279	3262
		Conteggio previsto	2441,9	820,1	3262,0
Totale		Conteggio	5273	1771	7044
		Conteggio previsto	5273,0	1771,0	7044,0

	Valore	gl	Significatività asintotica (bilaterale)
Chi-quadrato di Pearson	1018,442 <sup>a</sup>	2	,001
Rapporto di verosimiglianza	1080,619	2	,001
N di casi validi	7044		
a. 0 celle (0,0%) hanno un conteggio previsto inferiore a 5. Il conteggio previsto minimo è 96,04.			

Tabella 9: Test del chi-quadrato: numero di ritiri.

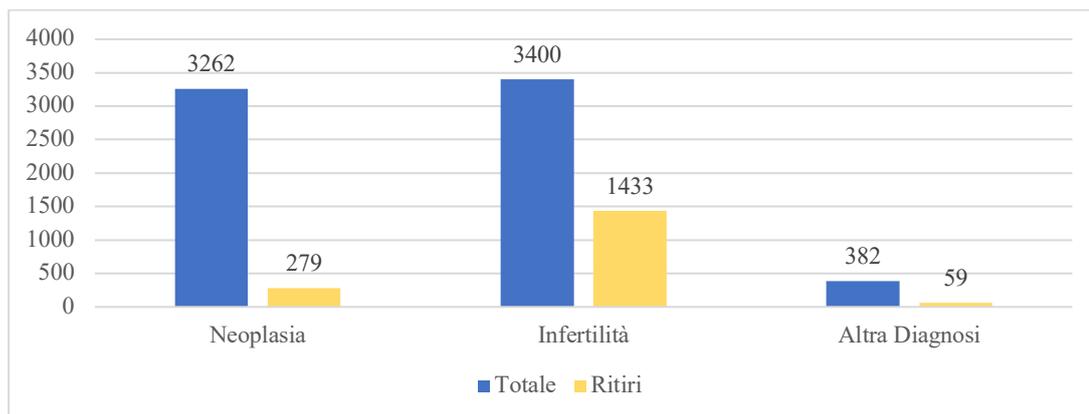


Figura 8: numero di ritiri suddivisi in base alla diagnosi.

È stato, inoltre, possibile calcolare i tassi di ritiro di ciascuna sottocategoria appartenente al gruppo di pazienti con diagnosi di neoplasia. I tassi di ritiro all'interno della popolazione dello studio: per neoplasia testicolare è pari al 7,91%, nel caso della neoplasia ematologica al 7,96% e in caso di altra tipologia di neoplasia al 11,57%.

<i>Neoplasia</i>	<i>Percentuale di ritiro</i>
<i>Testicolare</i>	7,91% (139/1758)
<i>Ematologica</i>	7,96% (75/942)
<i>Altro</i>	11,57% (65/562)

Tabella 10: percentuale di ritiri all'interno di ciascuna categoria di pazienti con diagnosi di neoplasia

Avvalendosi del test del chi-quadrato è stata quindi verificata la significatività dei risultati. Il risultato è risultato significativo con  $p < 0,05$

Tavola di contingenza ritiri dei pazienti con neoplasia				
		RITIRI		Totale
			R	
Altra neoplasia	Conteggio	497	65	562
	Conteggio previsto	513,6	48,4	562
	% del totale	15,20%	2,00%	17,20%
Neoplasia ematologica	Conteggio	868	77	945
	Conteggio previsto	863,7	81,3	945
	% del totale	26,60%	2,40%	28,90%
Neoplasia testicolare	Conteggio	1620	139	1759
	Conteggio previsto	1607,7	151,3	1759
	% del totale	49,60%	4,30%	53,90%
<b>Totale</b>	Conteggio	2985	281	3266
	Conteggio previsto	2985	281	3266
	% del totale	91,40%	8,60%	100,00%

### Test del chi-quadrato

	Valore	gl	Significatività asintotica (bilaterale)
Chi-quadrato di Pearson	7,621 <sup>a</sup>	2	,022
Rapporto di verosimiglianza	7,096	2	,029
N di casi validi	3266		

a. 0 celle (0,0%) hanno un conteggio previsto inferiore a 5. Il conteggio previsto minimo è 48,35.

Tabella 11: Test del chi-quadrato: numero di ritiri

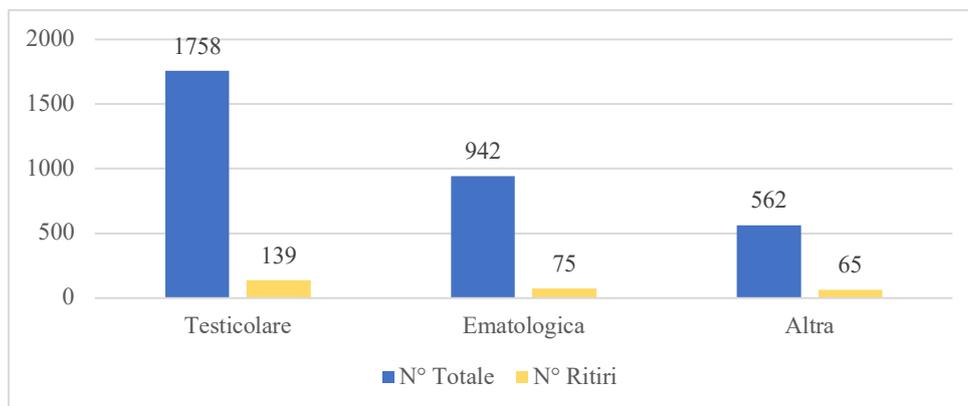


Figura 9: numero di crioconservazioni e ritiri per ciascuna tipologia di neoplasia.

### ***Numero di ritiri per età***

Abbiamo, successivamente, calcolato il numero di ritiri per ciascuna fascia di età e calcolato la percentuale di ritiri ( $n^{\circ}$  ritiri/  $n^{\circ}$  tot pazienti di quella determinata fascia di età).

Suddividendo la popolazione nei diversi sottogruppi di età si è osservato come i pazienti appartenenti ai gruppi con età inferiore, al momento della crioconservazione, dimostrassero, percentualmente, una minor utilizzo del materiale crioconservato rispetto ai pazienti di età intermedie e ai pazienti di età più elevata. In particolare, il sottogruppo di pazienti di età compresa tra i 35 e i 40 anni (36,05%) presenta il tasso di ritiro più elevato; al contrario il gruppo di pazienti con età inferiore ai 20 anni presenta il tasso di ritiro più basso (1,98%). I tassi di ritiro suddivisi per età sono i seguenti:

<b><i>Anni al momento della crioconservazione</i></b>	<b><i>Percentuale di ritiri</i></b>
<i>Inferiore ai 20 anni</i>	1,98% (10/504)
<i>20-24</i>	4,92% (39/753)
<i>25-29</i>	16,08% (172/1070)
<i>30-34</i>	30,17% (522/1730)
<i>35-39</i>	36,05% (558/1548)
<i>40-44</i>	33,30% (293/880)
<i>45-49</i>	35,28% (121/343)
<i>Maggiore di 50</i>	31,25% (55/176)

*Tabella 12: percentuale di ritiri in base all'età dei pazienti*

Attraverso il test del chi-quadro è stata verificata la significatività statistica relativamente ai diversi tassi di ritiro nei sottogruppi di età ( $p < 0,05$ ).

<b>Età media al momento della crioconservazione</b>	minore di 20	Conteggio	494	10	504
		Conteggio previsto	377,3	126,7	504
		% del totale	7,00%	0,10%	7,20%
	20-24	Conteggio	754	39	793
		Conteggio previsto	593,6	199,4	793
		% del totale	10,70%	0,60%	11,30%
	25-29	Conteggio	898	172	1070
		Conteggio previsto	801	269	1070
		% del totale	12,70%	2,40%	15,20%
	30-34	Conteggio	1208	522	1730
		Conteggio previsto	1295	435	1730
		% del totale	17,10%	7,40%	24,60%
	35-39	Conteggio	990	558	1548
		Conteggio previsto	1158,8	389,2	1548
		% del totale	14,10%	7,90%	22,00%
	40-44	Conteggio	586	294	880
		Conteggio previsto	658,8	221,2	880
		% del totale	8,30%	4,20%	12,50%
	45-49	Conteggio	222	121	343
		Conteggio previsto	256,8	86,2	343
		% del totale	3,20%	1,70%	4,90%
	maggiore di 50	Conteggio	121	55	176
		Conteggio previsto	131,8	44,2	176
		% del totale	1,70%	0,80%	2,50%
	<b>Totale</b>	Conteggio	5273	1771	7044
		Conteggio previsto	5273	1771	7044
		% del totale	74,90%	25,10%	100,00%
<b>Test del chi-quadrato</b>					
	Valore	gl	Significatività asintotica (bilaterale)		
Chi-quadrato di Pearson	537,921 <sup>a</sup>	7	,001		
Rapporto di verosimiglianza	663,744	7	,001		
N di casi validi	7044				
a. 0 celle (0,0%) hanno un conteggio previsto inferiore a 5. Il conteggio previsto minimo è 44,25.					

Tabella 13: Test del chi-quadrato: numero di ritiri nei pazienti suddivisi in base all'età

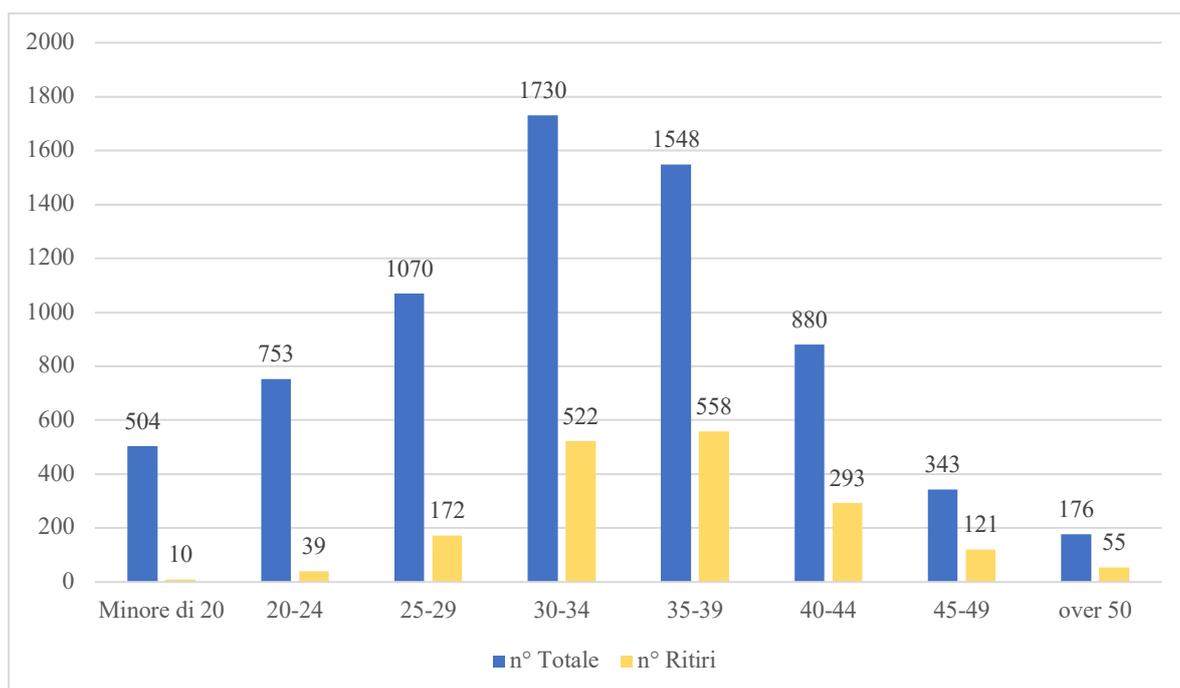


Figura 10: numero totale di crioconservazioni e ritiri per ciascuna fascia di età

### ***Numero di ritiri suddivisi per età e diagnosi***

Si può osservare come anche all'interno di ciascun gruppo di età non sia presente un'omogeneità relativa alle percentuali di ritiro, ma vi siano ampie differenze a seconda della diagnosi. Il sottogruppo con la percentuale di ritiri maggiore è quella dei pazienti infertili di età compresa tra i 30 e i 34 anni. All'interno del sottogruppo di pazienti di età inferiore ai vent'anni si riscontrano i tassi di ritiri più bassi, in particolare tra i 28 pazienti con altra diagnosi nessuno ha ritirato il materiale crioconservato fino ad ora.

<i>Età</i>	<i>Neoplasia</i>	<i>Infertilità</i>	<i>Altra diagnosi</i>
<i>minore 20</i>	<b>1,97%</b> (6/305)	<b>2,34%</b> (4/171)	<b>0%</b> (0/28)
<i>20-24</i>	<b>3,82%</b> (19/498)	<b>7,42%</b> (19/256)	<b>2,56</b> (1/39)
<i>25-29</i>	<b>6,36%</b> (42/660)	<b>35,21%</b> (125/355)	<b>9,09%</b> (5/55)
<i>30-34</i>	<b>9,28%</b> (72/776)	<b>49,77%</b> (433/870)	<b>20,24%</b> (17/84)
<i>35-39</i>	<b>14,73%</b> (80/543)	<b>49,62%</b> (461/929)	<b>22,37</b> (17/76)
<i>40-44</i>	<b>10,32%</b> (29/281)	<b>47,72%</b> (252/528)	<b>18,31%</b> (13/71)
<i>45-49</i>	<b>19,83%</b> (24/121)	<b>45,59%</b> (93/204)	<b>22,22%</b> (4/18)
<i>sopra i 50</i>	<b>8,97%</b> (7/78)	<b>52,87%</b> (46/87)	<b>18,18%</b> (2/11)

Tabella 14: numero di ritiri percentuali suddivisi per diagnosi

#### ***Durata media della crioconservazione per diagnosi***

È possibile osservare anche una differenza tra i diversi gruppi di pazienti per quanto concerne l'intervallo temporale medio intercorso tra la prima crioconservazione e il primo ritiro di materiale crioconservato. I pazienti con diagnosi di infertilità attendono in media un minor intervallo di tempo prima di ritirare i campioni crioconservati ( $1,126 \pm 1,88$  anni), rispetto ai pazienti con altra diagnosi ( $2,086 \pm 3,74$  anni). Nel caso dei pazienti con neoplasia ( $3,64 \pm 3,01$  anni) intercorre mediamente un tempo superiore tra la crioconservazione ed il ritiro.

<b><i>Diagnosi</i></b>	<b><i>Intervallo Temporale Medio</i></b>
<i>Neoplasia</i>	$3,64 \pm 3,01$ a
<i>Infertilità</i>	$1,126 \pm 1,88$ a
<i>Altra Diagnosi</i>	$2,086 \pm 3,74$ a

Tabella 15: intervallo temporale medio espresso in anni tra la crioconservazione ed il ritiro di gameti.

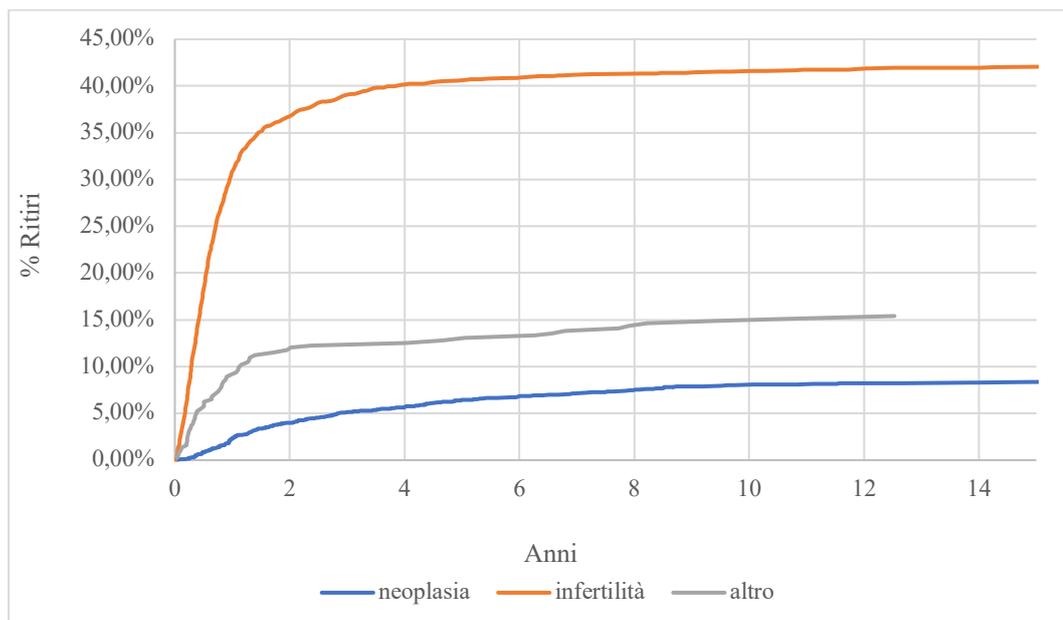


Figura 11: percentuale di ritiri all'interno dei tre diversi gruppi di diagnosi.

Abbiamo successivamente calcolato la significatività statistica della media temporale intercorsa tra prima crioconservazione e primo ritiro dividendo la popolazione in base alla diagnosi al momento della crioconservazione. Differenze statisticamente significative ( $p < 0,05$ ) sono riscontrate, per la durata temporale media trascorsa tra la crioconservazione ed il ritiro, tra tutti i diversi sottogruppi di diagnosi: infertilità, neoplasia ed altra diagnosi.

Le differenze variabili continue sono state valutate tramite il test t di student accettando un livello di significatività inferiore allo 0,05.

(I) patologia	(J) patologia	Differenza della media (I-J)	Errore std.	Sign.
Altra Diagnosi	Infertilità	0,96	0,31	,005
	Neoplasia	-1,56	0,33	,001
Infertilità	Altra Diagnosi	-0,96	0,31	,005
	Neoplasia	-2,52	0,15	,001
Neoplasia	Altra Diagnosi	1,56	0,33	,001
	Infertilità	2,52	0,15	,001

Tabella 16: Significatività statistica media temporale intercorsa tra crioconservazione e ritiro suddivisa per diagnosi.

### ***Durata media della crioconservazione per età***

Analizzando la media degli intervalli trascorsi tra la prima crioconservazione e il primo ritiro, suddividendo la popolazione sulla base dell'età al momento della crioconservazione, si osserva invece come la categoria dei pazienti con età compresa tra i 45 e i 49 anni si caratterizzi per l'intervallo medio più breve; la fascia di età minore ai 20 anni è quella che presenta al contrario l'intervallo più lungo. I pazienti, dello studio, di età più elevata tendono a ritirare maggiormente e dopo un intervallo inferiore rispetto ai pazienti dei sottogruppi più giovani.

<b><i>Età</i></b>	<b><i>Intervallo medio</i></b>
<i>inferiore ai 20</i>	11,89 ± 7,05 a
<i>20-24</i>	6,87 ± 4,56 a
<i>25-29</i>	3,31 ± 3,73 a
<i>30-34</i>	1,40 ± 1,95 a
<i>35-39</i>	1,15 ± 1,75 a
<i>40-44</i>	0,90 ± 1,14 a
<i>45-49</i>	0,85 ± 0,97 a
<i>maggiore di 50</i>	1,08 ± 1,83 a

*Tabella 17: intervallo medio intercorso tra crioconservazione e ritiro.*

La significatività statistica di queste variabili è stata valutata mediante l'utilizzo di test ANOVA. Il risultato è risultato statisticamente significativo tra i gruppi di età inferiori (inferiore ai 20, 20-24 e 25-30); è risultata inoltre significativa tra i gruppi di età inferiori e quelli di età superiore; al contrario, confrontando tra loro, i gruppi di età più elevata (30-34, 35-39, 40-44, 45-50 e oltre i 50) il risultato non è risultato nella totalità dei casi statisticamente significativo, come illustrato nella tabella 17.

<b>Confronti multipli</b>				
Variabile dipendente: media anni intercorsi tra crioconservazione e ritiro				
(I) Età media al momento della crioconservazione	(J) Età media al momento della crioconservazione	Differenza della media (I-J)	Errore std.	Sign.
Minore di 20	20-24	4,96	0,75	<b>0,001</b>
	20-24	8,52	0,69	<b>0,001</b>
	30-34	10,43	0,68	<b>0,001</b>
	35-39	10,68	0,68	<b>0,001</b>
	40-44	10,94	0,68	<b>0,001</b>
	45-49	10,99	0,7	<b>0,001</b>
	over 50	10,75	0,73	<b>0,001</b>
20-24	25-29	3,56	0,38	<b>0,001</b>
	30-34	5,47	0,35	<b>0,001</b>
	35-39	5,72	0,35	<b>0,001</b>
	40-44	5,98	0,36	<b>0,001</b>
	45-49	6,02	0,39	<b>0,001</b>
	over 50	5,79	0,45	<b>0,001</b>
25-29	30-34	1,9	0,187	<b>0,001</b>
	35-39	2,16	0,19	<b>0,001</b>
	40-44	2,41	0,2	<b>0,001</b>
	45-49	2,46	0,25	<b>0,001</b>
	over 50	2,23	0,33	<b>0,001</b>
30-34	20-24	-5,47	0,35	<b>0,001</b>
	25-29	-1,9	0,19	<b>0,001</b>
	35-39	0,25	0,13	1
	40-44	0,51	0,16	<b>0,029</b>
	45-49	0,56	0,22	<b>0,271</b>
	over 50	0,33	0,3	1
35-39	40-44	0,26	0,15	1
	45-49	0,3	0,21	1
	over 50	0,07	0,3	1
40-44	45-49	0,05	0,23	1
	over 50	-0,19	0,31	1
45-49	over 50	-0,23	0,35	1

Tabella 18: analisi significatività statistica della durata media della crioconservazione nei pazienti suddivisi sulla base del criterio anagrafico dell'età.

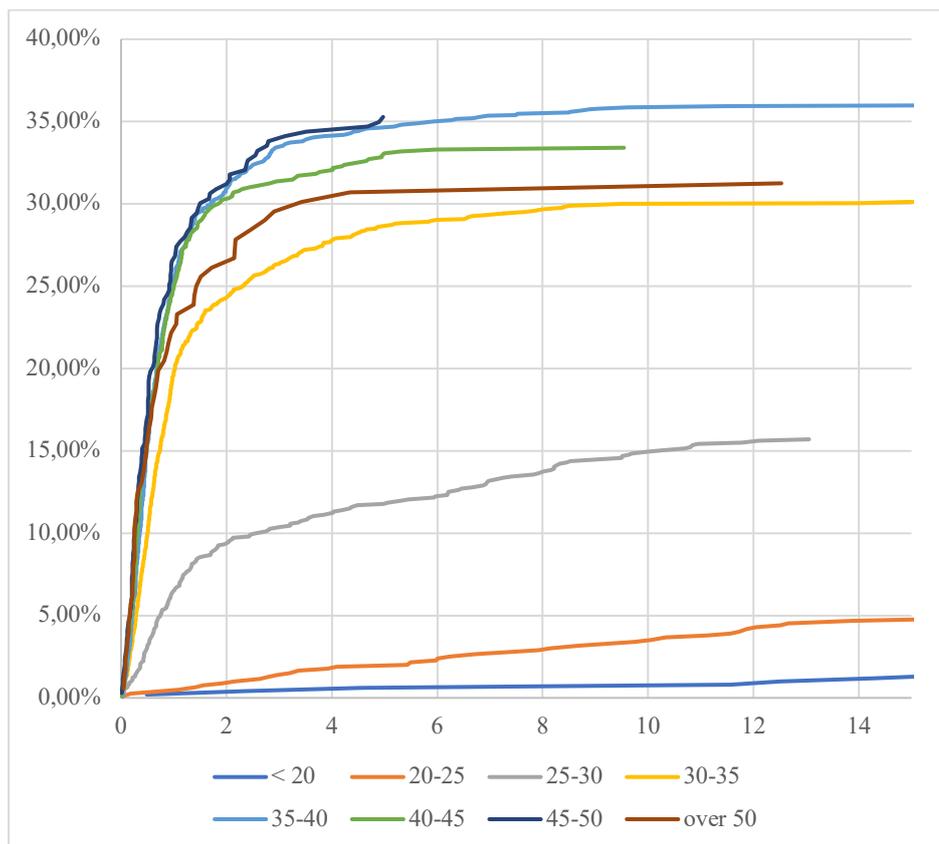


Figura 12: ritiri di materiale crioconservato suddividendo la popolazione nei gruppi di età.

### ***Durata media della crioconservazione per età e diagnosi***

Unendo i dati che dividono la popolazione dello studio per età e diagnosi si può calcolare la media di anni intercorsa tra prima crioconservazione e ritiro per ogni sottogruppo di pazienti. Si osserva come la categoria con la media temporale più bassa è rappresentata dai pazienti con “altra diagnosi” nella fascia di età compresa tra i 45 e i 49 anni ( $0,26 \pm 0,17$  anni); la media più elevata è invece quella dei pazienti con età inferiore ai 20 e diagnosi di neoplasia ( $12,92 \pm 8,29$  anni)

<i>Fascia di età</i>	<i>Neoplasia</i>	<i>Infertilità</i>	<i>Altro</i>
<i>meno di 20</i>	<b>12,92±8,29 A</b> 4,57-20,27 (n°=6)	<b>10,19±5,32 A</b> 2,38- 14,29 (n°=4)	/ (n°=0)
<i>20-24</i>	<b>7,29±4,08 A</b> 2,15-13,88 (n°=19)	<b>6,39±5,18 A</b> 0,06-15,70 (n°=19)	<b>7,92 A</b> (n°=1)
<i>25-29</i>	<b>5,62±3,64 A</b> 0,5- 15,47 (n°=42)	<b>2,49±3,40 A</b> 0,04-15,89 (n°=125)	<b>4,14±4,95 A</b> 0,33-10,7 (n°=5)
<i>30-34</i>	<b>3,49±3,26 A</b> 0,2-16,78 (n°=72)	<b>1,04±1,32 A</b> 0,02-14,00 (n°=433)	<b>1,71±2,38 A</b> 0,06-7,73 (n°=17)
<i>35-39</i>	<b>2,65±2,75 A</b> 0,2-14,96 (n°=80)	<b>0,86±1,34 A</b> Min.0,02 Max. 17,33 (n°=461)	<b>1,48±1,98 A</b> Min.0,04 Max. 6,80 (n°=17)
<i>40-44</i>	<b>1,67 ± 1,49 A</b> 0,23-5,31 (n°=29)	<b>0,75±0,89 A</b> 0,01-5,98 (n°=252)	<b>2,03±2,64 A</b> 0,1-9,54 (n°=13)
<i>45-49</i>	<b>1,66 ± 1,15 A</b> 0,34-4,97 (n°=24)	<b>0,66±0,83 A</b> 0,01-4,89 (n°=93)	<b>0,26±0,17 A</b> 0,1-0,5 (n°=4)
<i>over 50</i>	<b>1,749±1,33 A</b> 0,25-4,34 (n°=7)	<b>0,75±0,82 A</b> 0,05-3,43 (n°=46)	<b>6,37±8,70 A</b> 0,21-12,53 (n°=2)

Tabella 19: media di tempo ( $\pm$ deviazione standard) intercorsa tra la crioconservazione ed il ritiro, suddivisa sulla base dell'età e della patologia, il tempo è espresso in anni; durata minima-massima della crioconservazione; n°= numero di pazienti per ogni sottogruppo

### ***Ritiri in base all'origine dei gameti crioconservati***

Si è potuto osservare come non vi sia una sovrapponibile percentuale di ritiri tra le diverse tipologie di prelievo. L'utilizzo di agoaspirato ed il recupero dei gameti maschili dalle urine trovano infatti un successivo maggior utilizzo, rispettivamente 73,68% e 68,17%, rispetto ai gameti ottenuti mediante biopsia o dal liquido seminale, che vengono utilizzati rispettivamente nel 38,42% e nel 20,12% dei casi.

**Tipologia di prelievo    Percentuale ritiro per tipologia**

<i>Liquido seminale</i>	20,12% (1137/5652)
<i>Biopsia</i>	38,42% (408/1062)
<i>Agoaspirato</i>	68,17% (212/311)
<i>Urine</i>	73,68% (14/19)

Tabella 20: percentuali di ritiro in base alla tipologia di prelievo

Mediante il test del chi-quadrato abbiamo verificato la significatività statistica dei valori; con una  $p < 0,05$  i valori sono stati confermati statisticamente significativi.

<b>Tavola di contingenza sulla base dell'origine del prelievo</b>					
			RITIRI		Totale
				R	
<b>ORIGINE PRELIEVO</b>	B	Conteggio	654	408	1062
		Conteggio previsto	795	267	1062
		% del totale	9,30%	5,80%	15,10%
	LS	Conteggio	4515	1137	5652
		Conteggio previsto	4231	1421	5652
		% del totale	64,10%	16,10%	80,20%
	S	Conteggio	99	212	311
		Conteggio previsto	232,8	78,2	311
		% del totale	1,40%	3,00%	4,40%
	U	Conteggio	5	14	19
		Conteggio previsto	14,2	4,8	19
		% del totale	0,10%	0,20%	0,30%
<b>Totale</b>		Conteggio	5273	1771	7044
		Conteggio previsto	5273	1771	7044
		% del totale	74,90%	25,10%	100,00%
<b>Test del chi-quadrato</b>					
	Valore	gl	Significatività asintotica (bilaterale)		
<b>Chi-quadrato di Pearson</b>	504,971 <sup>a</sup>	3	0,01		
<b>Rapporto di verosimiglianza</b>	443,508	3	0,01		
<b>N di casi validi</b>	7044				
<b>a. 1 celle (12,5%) hanno un conteggio previsto inferiore a 5. Il conteggio previsto minimo è 4,78.</b>					

Tabella 21: significatività statistica calcolate mediante il test del chi-quadrato.

Abbiamo successivamente calcolato il tempo medio intercorso tra la crioconservazione ed il ritiro per ciascuna delle metodiche di prelievo. Si sono osservati tempi di ritiro diversi nei diversi gruppi: in particolare i gameti maschili ottenuti mediante liquido seminale vengono ritirati dopo  $1,89 \pm 2,83$  anni; i gameti prelevati mediante biopsia vengono ritirati dopo un intervallo temporale di  $0,98 \pm 1,60$  anni; tramite agoaspirato l'intervallo è di  $0,91 \pm 1,35$  anni; e negli spermatozoi crioconservati dopo essere stati ottenuti dalle urine l'intervallo temporale è di  $1,35 \pm 2,45$  anni.

<i>origine materiale crioconservazione</i>	<i>media tempo intercorso prima del ritiro</i>
<i>liquido seminale</i>	$1,89 \pm 2,83$ a
<i>biopsia</i>	$0,98 \pm 1,60$ a
<i>agoaspirato</i>	$0,91 \pm 1,35$ a
<i>urine</i>	$1,35 \pm 2,45$ a

Tabella 22: media temporale intercorsa "crioconservazione-ritiro" espressa in anni con relativa deviazione standard suddividendo la popolazione sulla base dell'origine dei gameti maschili crioconservati.

Differenze statisticamente significative ( $p < 0,05$ ) sono riscontrate tra la modalità di prelievo da liquido seminale e biopsia e tra prelievo mediante liquido seminale e agoaspirato. Tra le altre modalità di prelievo non sono invece emerse differenze statisticamente significative.

(I) ORIGINE PRELIEVO	(J) ORIGINE PRELIEVO	Differenza della media (I-J)	Errore std.	Sign.
B	LS	-0,91	0,14	,001
	S	0,066	0,21	1,000
	U	-0,38	0,66	1,000
LS	B	,91	0,14	,001
	S	0,97	0,18	,001
	U	0,53	0,65	1,000
S	B	-0,07	0,21	1,000
	LS	-0,98	0,18	,001
	U	-0,45	0,68	1,000
U	B	0,38	0,66	1,000
	LS	-0,53	0,66	1,000
	S	0,44	0,68	1,000

*Tabella 23: significatività statistica della media temporale intercorsa tra crioconservazione e ritiro suddivisa sulla base della diagnosi.*

## VI. DISCUSSIONE

L'analisi dei dati emersi da questo studio ha permesso di individuare importanti informazioni descrittive riguardanti l'utilizzo del materiale crioconservato. È infatti possibile osservare come il numero di ritiri e conseguente utilizzo dei gameti maschili crioconservati sia disomogeneo all'interno di alcune sottopopolazioni di pazienti. L'età dei pazienti all'interno dello studio variava ampiamente con dei tassi di ritiro più elevati e periodi di crioconservazione più brevi in alcuni sottogruppi. I pazienti nelle fasce di età superiori ai 30 anni, al momento della crioconservazione, hanno dimostrato una maggior predisposizione al ritiro e successivamente ad un periodo temporale più breve dalla crioconservazione. Questo può trovare spiegazione nella diversa rappresentatività, per diagnosi, all'interno dei sottogruppi individuati sulla base del criterio anagrafico dell'età e a causa del minor imminente desiderio di intraprendere una procedura di PMA nei pazienti più giovani. Ciò conferma quanto riscontrato dalla letteratura; in particolare da Bitan et al.<sup>4</sup>, che, analizzando il numero di ritiri di crioconservazioni avvenute presso il Shamir Medical Center, mediante un'analisi retrospettiva su un periodo temporale di trent'anni, osservava un maggior tasso di ritiro tra i pazienti di età più elevata.

All'interno di ciascun sottogruppo individuato, dividendo la popolazione per età o per diagnosi è stato ritirato almeno un campione di materiale crioconservato; ad eccezione del sottogruppo di pazienti con età inferiore ai 20 anni con altra diagnosi (diagnosi né di neoplasia né di infertilità), comprendente 28 pazienti. Questo conferma come l'indicazione alla crioconservazione sia adeguata nei pazienti analizzati dallo studio.

All'interno del sottogruppo di pazienti infertili è stato possibile riscontrare delle percentuali di ritiro di molto superiori alla media della popolazione dello studio. Il sottogruppo di pazienti con il tasso di ritiro più elevato è stato quello dei pazienti di età superiore ai 50 anni e diagnosi di infertilità. Questo dato è giustificabile dalle caratteristiche dei pazienti stessi, dalla loro età e dal loro desiderio di gravidanza al momento della crioconservazione. Spesso i pazienti di età superiore ai 30 anni e rientranti nel gruppo degli infertili giungevano all'ambulatorio di crioconservazione come ultima tappa di percorso clinico-terapeutico volto a ottenere una gravidanza. Il già presente desiderio di una gravidanza, oltre che

giustificare il maggior numero di ritiri, dà spiegazione del minor periodo di tempo medio intercorso tra la crioconservazione e il ritiro.

Al contrario i tassi di ritiro all'interno della popolazione con diagnosi di neoplasia sono inferiori. In questi pazienti la crioconservazione è un trattamento preventivo e, per questo, un minor numero di pazienti necessiterà di una PMA, potendo parte di essi riacquisire una normale funzione spermatogenetica a distanza dalla terapia. Il tasso di ritiri inferiore, ad eccezione del sottogruppo privo di ritiri, è stato riscontrato infatti nella fascia di pazienti con età inferiore ai 20 anni (1,98%). Ciò può essere giustificabile, in parte, dal numero elevato di pazienti con neoplasia all'interno di questo sottogruppo (60,52%) e, in parte, dalla giovane età dei pazienti che possono non aver ancora avuto il desiderio di intraprendere una gravidanza. Osservando infatti la media temporale intercorsa tra la crioconservazione ed il ritiro si nota come la fascia di età di pazienti con età inferiore ai 20 anni è quella che ritira maggiormente a distanza dalla crioconservazione (11,89 anni in media).

I pazienti che tendono a ritirare il materiale crioconservato ad un intervallo temporale inferiore dalla crioconservazione è quello di età compresa tra i 45 e i 49 anni e con diagnosi di infertilità.

Differenze notevoli nei tassi di ritiri sono presenti anche in base al tipo di campione da cui derivi il materiale crioconservato. I gameti maschili ottenuti dal liquido seminale risultano utilizzati per il 20,12%, mediante biopsia al 38,42%, tramite agoaspirato al 68,17% e infine quelli ottenuti dalle urine al 73,68%. Giustificazione di questo è la diversa invasività di queste procedure. Agoaspirato e biopsia verranno tendenzialmente proposti a quei pazienti in cui sia già presente un desiderio di gravidanza e sono necessarie quasi totalmente nella popolazione degli infertili, che, come abbiamo visto precedentemente, tendono a ritirare maggiormente il materiale crioconservato. Inoltre, rappresentano metodiche di recupero più invasive, pertanto il paziente che vi si sottopone sarà maggiormente motivato al loro successivo utilizzo nelle tecniche di PMA.

Il punto di forza di questo studio è rappresentato dalla numerosità del campione e dall'ampio orizzonte temporale considerato.

Il presente studio presenta però alcune limitazioni. Non è stato possibile indagare in maniera retrospettiva a partire dalla cartella clinica del paziente, la tipologia di

PMA intrapresa con il liquido seminale crioconservato e l'esito della stessa procedura. Sarebbe quindi utile poter raccogliere queste informazioni ed integrare tenendo inoltre in considerazione la fertilità della partner e il numero di gravidanze precedenti alla crioconservazione. Le informazioni raccolte dal presente studio andrebbero esaminate osservando in aggiunta le caratteristiche qualitative del liquido seminale crioconservato.

## VII. CONCLUSIONI

L'utilizzo dello sperma nelle due principali categorie di pazienti analizzate dallo studio, oncologici ed infertili, presenta sostanziali differenze. Nei pazienti oncologici il tasso di utilizzo è basso anche osservando i pazienti con un follow-up prolungato; viene, infatti, raggiunta una percentuale di ritiri pari al 8,55% e conseguentemente un tasso di gravidanze inferiori. Al contrario l'utilizzo nei pazienti infertili si discosta con un valore medio decisamente più alto pari al 42,15%, con dei valori ancora maggiori nelle fasce di età più elevate.

Pensiamo che questi dati possano essere di particolare utilità per poter fornire un'analisi dei costi-benefici, della metodica di crioconservazione dei gameti maschili, potendo individuare l'efficacia dei programmi di crioconservazione.

Un'analisi più specifica dei pazienti infertili dovrebbe analizzare l'eziologia dell'infertilità e il numero di nuovi nati a seguito della metodica di procreazione medicalmente assistita, prendendo in considerazione anche la fertilità del partner.

Allo stesso modo la categoria di pazienti oncologici andrebbe suddivisa oltre che sulla base alla diagnosi anche analizzando il trattamento scelto per la sua guarigione, in modo da individuare le popolazioni più suscettibili a non ripristinare la spermatogenesi a distanza dal trattamento.

Sarebbe inoltre auspicabile, per i pazienti trattati con metodiche caratterizzate da gonatotossicità, l'esecuzione di uno spermiogramma, a distanza del termine della terapia, per valutare il ripristino della fertilità, interrompendo eventualmente la crioconservazione degli spermatozoi in caso di ripresa della spermatogenesi potendo in caso di una PMA, utilizzare materiale raccolto a fresco.

Dallo studio è emerso come, nei diversi gruppi di pazienti, oltre ai differenti tassi di ritiro siano presenti medie temporali differenti tra prima crioconservazione e il primo ritiro. Le differenze emerse pongono le basi per degli studi più approfonditi in grado di individuare i punti di forza e le indicazioni alla preservazione di una crioconservazione per un lungo periodo, permettendo di valutare lo smaltimento della crioconservazione nell'eventualità in cui non sia presente alcun ritiro successivamente ad un determinato periodo di tempo prestabilito.

Queste analisi andrebbero integrate anche con il valore psicologico che questa metodica può assumere nel paziente infertile e nei pazienti con diagnosi di

neoplasia, che devano intraprendere un percorso di cura potenzialmente gonadotossico; non dimenticando, inoltre, l'importanza di una valutazione personalizzata a prescindere della diagnosi del paziente.

## VIII. BIBLIOGRAFIA

1. Rajan R, Matsumura K. Development and Application of Cryoprotectants. In: Iwaya-Inoue M, Sakurai M, Uemura M, eds. *Survival Strategies in Extreme Cold and Desiccation*. Vol 1081. Advances in Experimental Medicine and Biology. Springer Singapore; 2018:339-354. doi:10.1007/978-981-13-1244-1\_18
2. Di Santo M, Tarozzi N, Nadalini M, Borini A. Human Sperm Cryopreservation: Update on Techniques, Effect on DNA Integrity, and Implications for ART. *Adv Urol*. 2012;2012:1-12. doi:10.1155/2012/854837
3. World Health Organisation, WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen, 6th ed.; WHO: Geneve, Switzeland, 2021, ISBN 978-92-4-003-078-7.
4. Bitan R, Magnezi R, Kedem A, et al. Autologous sperm usage after cryopreservation—the crucial impact of patients’ characteristics. *Andrology*. Published online August 2, 2023:andr.13502. doi:10.1111/andr.13502
5. Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss: a committee opinion. *Fertil Steril*. 2013;99(1):63. doi:10.1016/j.fertnstert.2012.09.023
6. Vander Borgh M, Wyns C. Fertility and infertility: Definition and epidemiology. *Clin Biochem*. 2018;62:2-10. doi:10.1016/j.clinbiochem.2018.03.012
7. Dati Registro Nazionale Procreazione Medicalmente Assistita, Istituto Superiore di Sanità, 2020.
8. Shih KW, Shen PY, Wu CC, Kang YN. Testicular versus percutaneous epididymal sperm aspiration for patients with obstructive azoospermia: a systematic review and meta-analysis. *Transl Androl Urol*. 2019;8(6):631-640. doi:10.21037/tau.2019.11.20
9. Leslie SW, Soon-Sutton TL, Khan MA. Male Infertility. In: *StatPearls*. StatPearls Publishing; 2023. Accessed November 22, 2023. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562258/>
10. Eisenberg ML, Esteves SC, Lamb DJ, et al. Male infertility. *Nat Rev Dis Primer*. 2023;9(1):49. doi:10.1038/s41572-023-00459-w
11. Lenzi A. *Guida Allo Studio Dell’andrologia*. Società Editrice Universo; 2012. ISBN: 978-88-6510-68-9.
12. Petyim S, Neungton C, Thanaboonyawat I, Laokirkkiat P, Choavaratana R. Sperm preparation before freezing improves sperm motility and reduces apoptosis in post-freezing-thawing sperm compared with post-thawing sperm preparation. *J Assist Reprod Genet*. 2014;31(12):1673-1680. doi:10.1007/s10815-014-0332-y

13. Agarwal A, Baskaran S, Parekh N, et al. Male infertility. *The Lancet*. 2021;397(10271):319-333. doi:10.1016/S0140-6736(20)32667-2
14. Sunder M, Leslie SW. Semen Analysis. In: *StatPearls*. StatPearls Publishing; 2023. Accessed November 24, 2023. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK564369/>
15. Haugen TB, Grotmol T. pH of human semen. *Int J Androl*. 1998;21(2):105-108. doi:10.1046/j.1365-2605.1998.00108.x
16. Dhumal SS, Naik P, Dakshinamurthy S, Sullia K. Semen pH and its correlation with motility and count - A study in subfertile men. *JBRA Assist Reprod*. 2021;25(2):172-175. doi:10.5935/1518-0557.20200080
17. Zorzi P de MD, Kussler AP de S, Pimentel AM, Capp E, Corleta H von E. Semen Analysis of Total Motile Sperm Count Based on the 1999 and 2010 WHO Criteria. *JBRA Assist Reprod*. 2022;26(2):261-266. doi:10.5935/1518-0557.20210066
18. Gatimel N, Moreau J, Parinaud J, Léandri RD. Sperm morphology: assessment, pathophysiology, clinical relevance, and state of the art in 2017. *Andrology*. 2017;5(5):845-862. doi:10.1111/andr.12389
19. Lotti F, Maggi M. Ultrasound of the male genital tract in relation to male reproductive health. *Hum Reprod Update*. 2015;21(1):56-83. doi:10.1093/humupd/dmu042
20. Teixeira T, Oliveira Y, Bernardes F, et al. Viral infections and implications for male reproductive health. *Asian J Androl*. 2021;23(4):335. doi:10.4103/aja.aja\_82\_20
21. Li MK, Tan HH. Transrectal ultrasound in male infertility. *Ann Acad Med Singapore*. 1995;24(4):566-568.
22. Krausz C, Riera-Escamilla A. Genetics of male infertility. *Nat Rev Urol*. 2018;15(6):369-384. doi:10.1038/s41585-018-0003-3
23. Vincent M, Daudin M, De Mas P, et al. Cytogenetic Investigations of Infertile Men With Low Sperm Counts: A 25-Year Experience. *J Androl*. 2002;23(1):18-22. doi:10.1002/j.1939-4640.2002.tb02597.x
24. National Center for Biotechnology Information. Genome decoration page. NCBI <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/tools/gdp> (2018).
25. Hawksworth DJ, Szafran AA, Jordan PW, Dobs AS, Herati AS. Infertility in Patients With Klinefelter Syndrome: Optimal Timing for Sperm and Testicular Tissue Cryopreservation. *Rev Urol*. 2018;20(2):56-62. doi:10.3909/riu0790
26. Plotton I, Renault L, Lapoirie M, et al. Fertility in men with Klinefelter's syndrome. *Ann Endocrinol*. 2022;83(3):172-176. doi:10.1016/j.ando.2022.05.002

27. Pryor JL, Kent-First M, Muallem A, et al. Microdeletions in the Y Chromosome of Infertile Men. *N Engl J Med.* 1997;336(8):534-540. doi:10.1056/NEJM199702203360802
28. Witherspoon L, Dergham A, Flannigan R. Y-microdeletions: a review of the genetic basis for this common cause of male infertility. *Transl Androl Urol.* 2021;10(3):1383-1390. doi:10.21037/tau-19-599
29. Punjani N, Kang C, Schlegel PN. Clinical implications of Y chromosome microdeletions among infertile men. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2020;34(6):101471. doi:10.1016/j.beem.2020.101471
30. Bieniek JM, Lapin CD, Jarvi KA. Genetics of CFTR and male infertility. *Transl Androl Urol.* 2021;10(3):1391-1400. doi:10.21037/tau.2020.04.05
31. Stuhmann M, Dörk T. CFTR gene mutations and male infertility. *Andrologia.* 2000;32(2):71-83. doi:10.1046/j.1439-0272.2000.00327.x
32. Giuliani R, Antonucci I, Torrente I, Grammatico P, Palka G, Stuppia L. Identification of the second CFTR mutation in patients with congenital bilateral absence of vas deferens undergoing ART protocols. *Asian J Androl.* 2010;12(6):819-826. doi:10.1038/aja.2010.58
33. Yu J, Chen Z, Ni Y, Li Z. CFTR mutations in men with congenital bilateral absence of the vas deferens (CBAVD): a systemic review and meta-analysis. *Hum Reprod.* 2012;27(1):25-35. doi:10.1093/humrep/der377
34. Swee DS, Quinton R, Maggi R. Recent advances in understanding and managing Kallmann syndrome. *Fac Rev.* 2021;10. doi:10.12703/r/10-37
35. Sonne J, Lopez-Ojeda W. Kallmann Syndrome. In: *StatPearls*. StatPearls Publishing; 2023. Accessed November 22, 2023. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538210/>
36. Sironen A, Shoemark A, Patel M, Loebinger MR, Mitchison HM. Sperm defects in primary ciliary dyskinesia and related causes of male infertility. *Cell Mol Life Sci.* 2020;77(11):2029-2048. doi:10.1007/s00018-019-03389-7
37. Driscoll DJ, Miller JL, Cassidy SB. Prader-Willi Syndrome. In: Adam MP, Feldman J, Mirzaa GM, et al., eds. *GeneReviews*®. University of Washington, Seattle; 1993. Accessed November 22, 2023. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1330/>
38. Garg MK, Madhu SV, Dwarakanath CS, Ammini AC. LAURENCE-MOON-BARDET-BIEDL SYNDROME - PRESENTING WITH ACUTE ONSET OF DIABETES MELLITUS. *Med J Armed Forces India.* 1998;54(2):155-156. doi:10.1016/S0377-1237(17)30511-7
39. Sengupta P, Roychoudhury S, Nath M, Dutta S. Oxidative Stress and Idiopathic Male Infertility. In: Kesari KK, Roychoudhury S, eds. *Oxidative Stress*

and Toxicity in Reproductive Biology and Medicine. Vol 1358. Advances in Experimental Medicine and Biology. Springer International Publishing; 2022:181-204. doi:10.1007/978-3-030-89340-8\_9

40. Jung JH, Seo JT. Empirical medical therapy in idiopathic male infertility: Promise or panacea? *Clin Exp Reprod Med.* 2014;41(3):108-114. doi:10.5653/cerm.2014.41.3.108

41. Showell MG, Brown J, Yazdani A, Stankiewicz MT, Hart RJ. Antioxidants for male subfertility. *Cochrane Database Syst Rev.* 2011;(1):CD007411. doi:10.1002/14651858.CD007411.pub2

42. Del Giudice F, Busetto G, De Berardinis E, et al. A systematic review and meta-analysis of clinical trials implementing aromatase inhibitors to treat male infertility. *Asian J Androl.* 2020;22(4):360. doi:10.4103/aja.aja\_101\_19

43. Lee PA, Houk CP. Cryptorchidism. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2013;20(3):210-216. doi:10.1097/MED.0b013e32835ffc7d

44. Avellino GJ, Lipshultz LI, Sigman M, Hwang K. Transurethral resection of the ejaculatory ducts: etiology of obstruction and surgical treatment options. *Fertil Steril.* 2019;111(3):427-443. doi:10.1016/j.fertnstert.2019.01.001

45. The influence of varicocele on parameters of fertility in a large group of men presenting to infertility clinics. World Health Organization. *Fertil Steril.* 1992;57(6):1289-1293.

46. Sokol R. Endocrinology of Male Infertility: Evaluation and Treatment. *Semin Reprod Med.* 2009;27(02):149-158. doi:10.1055/s-0029-1202303

47. Dabbous Z, Atkin SL. Hyperprolactinaemia in male infertility: Clinical case scenarios. *Arab J Urol.* 2018;16(1):44-52. doi:10.1016/j.aju.2017.10.002

48. Singh P, Singh M, Cugati G, Singh A. Hyperprolactinemia: An often missed cause of male infertility. *J Hum Reprod Sci.* 2011;4(2):102. doi:10.4103/0974-1208.86094

49. Sengupta P, Dutta S, Karkada IR, Chinni SV. Endocrinopathies and Male Infertility. *Life.* 2021;12(1):10. doi:10.3390/life12010010

50. Pavlovich CP, King P, Goldstein M, Schlegel PN. EVIDENCE OF A TREATABLE ENDOCRINOPATHY IN INFERTILE MEN. *J Urol.* 2001;165(3):837-841. doi:10.1016/S0022-5347(05)66540-8

51. Agarwal A. Thyroid spermatogenesis and male infertility. *Front Biosci.* 2011;E3(3):843-855. doi:10.2741/e292

52. Purvis K, Christiansen E. Infection in the male reproductive tract. Impact, diagnosis and treatment in relation to male infertility. *Int J Androl.* 1993;16(1):1-13. doi:10.1111/j.1365-2605.1993.tb01146.x

53. Pellati D, Mylonakis I, Bertoloni G, et al. Genital tract infections and infertility. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2008;140(1):3-11. doi:10.1016/j.ejogrb.2008.03.009
54. Sengupta P, Nwagha U, Dutta S, Krajewska-Kulak E, Izuka E. Evidence for decreasing sperm count in African population from 1965 to 2015. *Afr Health Sci.* 2017;17(2):418-427. doi:10.4314/ahs.v17i2.16
55. Akhigbe RE, Dutta S, Hamed MA, Ajayi AF, Sengupta P, Ahmad G. Viral Infections and Male Infertility: A Comprehensive Review of the Role of Oxidative Stress. *Front Reprod Health.* 2022;4:782915. doi:10.3389/frph.2022.782915
56. 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(1):65-72.e1. doi:10.1016/j.fertnstert.2015.09.018
57. Lotti F, Maggi M. Sexual dysfunction and male infertility. *Nat Rev Urol.* 2018;15(5):287-307. doi:10.1038/nrurol.2018.20
58. Berger MH, Messore M, Pastuszak AW, Ramasamy R. Association Between Infertility and Sexual Dysfunction in Men and Women. *Sex Med Rev.* 2016;4(4):353-365. doi:10.1016/j.sxmr.2016.05.002
59. Del-Pozo-Lerida S, Salvador C, Martinez-Soler F, Tortosa A, Perucho M, Gimenez-Bonafe P. Preservation of fertility in patients with cancer (Review). *Oncol Rep.* Published online March 14, 2019. doi:10.3892/or.2019.7063
60. Ajayi AF, Akhigbe RE. The physiology of male reproduction: Impact of drugs and their abuse on male fertility. *Andrologia.* 2020;52(9):e13672. doi:10.1111/and.13672
61. Crosnoe LE, Grober E, Ohl D, Kim ED. Exogenous testosterone: a preventable cause of male infertility. *Transl Androl Urol.* 2013;2(2):106-113. doi:10.3978/j.issn.2223-4683.2013.06.01
62. Durairajanayagam D. Lifestyle causes of male infertility. *Arab J Urol.* 2018;16(1):10-20. doi:10.1016/j.aju.2017.12.004
63. Harlev A, Abofoul-Azab M, Har-Vardi I, Levitas E, Lunenfeld E, Huleihel M. [Fertility reservation by cryopreservation of testicular tissue from pre-pubertal boys undergoing gonadotoxic treatment- preliminary results]. *Harefuah.* 2016;155(2):102-104, 131-132.
64. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Electronic address: [asrm@asrm.org](mailto:asrm@asrm.org). Fertility preservation in patients undergoing gonadotoxic therapy or gonadectomy: a committee opinion. *Fertil Steril.* 2019;112(6):1022-1033. doi:10.1016/j.fertnstert.2019.09.013
65. Rosen A, Jayram G, Drazer M, Eggener SE. Global Trends in Testicular Cancer Incidence and Mortality. *Eur Urol.* 2011;60(2):374-379.

doi:10.1016/j.eururo.2011.05.004

66. Baird DC, Meyers GJ, Hu JS. Testicular Cancer: Diagnosis and Treatment. *Am Fam Physician*. 2018;97(4):261-268.
67. Shaw J. Diagnosis and treatment of testicular cancer. *Am Fam Physician*. 2008;77(4):469-474.
68. Huang C, Tang YL, Hu JL, et al. Update on techniques for cryopreservation of human spermatozoa. *Asian J Androl*. 2022;24(6):563. doi:10.4103/aja20229
69. Zhandi M, Sharafi M. Negative effect of combined cysteine and glutathione in soy lecithin-based extender on post-thawed ram spermatozoa. *Cell Tissue Bank*. 2015;16(3):443-448. doi:10.1007/s10561-014-9488-z
70. Snoeck PPN, Moura LCO, Silva MC, et al. Effect of storage conditions on the LDL effectiveness in ovine sperm cryopreservation. *Cryobiology*. 2017;75:88-90. doi:10.1016/j.cryobiol.2017.01.007
71. Sun L, He M, Wu C, Zhang S, Dai J, Zhang D. Beneficial Influence of Soybean Lecithin Nanoparticles on Rooster Frozen–Thawed Semen Quality and Fertility. *Animals*. 2021;11(6):1769. doi:10.3390/ani11061769
72. Morris GJ. The cryopreservation of *Chlorella* 1. Interactions of rate of cooling, protective additive and warming rate. *Arch Microbiol*. 1976;107(1):57-62. doi:10.1007/BF00427867
73. Tao Y, Sanger E, Saewu A, Leveille MC. Human sperm vitrification: the state of the art. *Reprod Biol Endocrinol*. 2020;18(1):17. doi:10.1186/s12958-020-00580-5
74. Thachil JV, Jewett MA. Preservation techniques for human semen. *Fertil Steril*. 1981;35(5):546-548.
75. Vutyavanich T, Piromlertamorn W, Nunta S. Rapid freezing versus slow programmable freezing of human spermatozoa. *Fertil Steril*. 2010;93(6):1921-1928. doi:10.1016/j.fertnstert.2008.04.076
76. Li Y xin, Zhou L, Lv M qi, Ge P, Liu Y chen, Zhou D xia. Vitrification and conventional freezing methods in sperm cryopreservation: A systematic review and meta-analysis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2019;233:84-92. doi:10.1016/j.ejogrb.2018.11.028
77. Koshimoto C, Mazur P. Effects of warming rate, temperature, and antifreeze proteins on the survival of mouse spermatozoa frozen at an optimal rate. *Cryobiology*. 2002;45(1):49-59. doi:10.1016/S0011-2240(02)00105-0
78. Sherman JK. Synopsis of the Use of Frozen Human Semen Since 1964: State of the Art of Human Semen Banking. *Fertil Steril*. 1973;24(5):397-412. doi:10.1016/S0015-0282(16)39678-9

79. Royere D, Hamamah S, Nicolle JC, Lansac J. Chromatin alterations induced by freeze-thawing influence the fertilizing ability of human sperm. *Int J Androl*. 1991;14(5):328-332. doi:10.1111/j.1365-2605.1991.tb01100.x
80. Nijs M, Creemers E, Cox A, et al. Influence of freeze-thawing on hyaluronic acid binding of human spermatozoa. *Reprod Biomed Online*. 2009;19(2):202-206. doi:10.1016/S1472-6483(10)60073-9
81. Kuczyński W, Dhont M, Grygoruk C, Grochowski D, Wołczyński S, Szamatowicz M. The outcome of intracytoplasmic injection of fresh and cryopreserved ejaculated spermatozoa—a prospective randomized study. *Hum Reprod*. 2001;16(10):2109-2113. doi:10.1093/humrep/16.10.2109
82. Clarke GN, Liu DY, Baker HWG. Recovery of human sperm motility and ability to interact with the human zona pellucida after more than 28 years of storage in liquid nitrogen. *Fertil Steril*. 2006;86(3):721-722. doi:10.1016/j.fertnstert.2006.01.050
83. Mazzilli R, Ubaldi FM, Foresta C, Ferlin A. Ruolo del fattore maschile nella Procreazione Medicalmente Assistita (PMA). *L'Endocrinologo*. 2022;23(3):247-251. doi:10.1007/s40619-022-01065-w
84. Gubert PG, Pudwell J, Van Vugt D, Reid RL, Velez MP. Number of motile spermatozoa inseminated and pregnancy outcomes in intrauterine insemination. *Fertil Res Pract*. 2019;5(1):10. doi:10.1186/s40738-019-0062-z
85. O'Flynn N. Assessment and treatment for people with fertility problems: NICE guideline. *Br J Gen Pract*. 2014;64(618):50-51. doi:10.3399/bjgp14X676609
86. National Institute for Health and Care Excellence. *Fertility: assessment and treatment for people with fertility problems*. London: NICE; 2013. CG156. <http://www.nice.org.uk/CG156> (accessed 18 Nov 2013).
87. Allahbadia GN. Intrauterine Insemination: Fundamentals Revisited. *J Obstet Gynecol India*. 2017;67(6):385-392. doi:10.1007/s13224-017-1060-x
88. Boomsma CM, Cohlen BJ, Farquhar C. Semen preparation techniques for intrauterine insemination. Cochrane Gynaecology and Fertility Group, ed. *Cochrane Database Syst Rev*. 2019;2019(11). doi:10.1002/14651858.CD004507.pub4
89. Ombelet W, Dhont N, Thijssen A, Bosmans E, Kruger T. Semen quality and prediction of IUI success in male subfertility: a systematic review. *Reprod Biomed Online*. 2014;28(3):300-309. doi:10.1016/j.rbmo.2013.10.023
90. Esteves SC, Roque M, Bedoschi G, Haahr T, Humaidan P. Intracytoplasmic sperm injection for male infertility and consequences for offspring. *Nat Rev Urol*. 2018;15(9):535-562. doi:10.1038/s41585-018-0051-8

91. Palermo G, Neri Q, Rosenwaks Z. To ICSI or Not to ICSI. *Semin Reprod Med.* 2015;33(02):092-102. doi:10.1055/s-0035-1546825
92. Jain T, Gupta RS. Trends in the Use of Intracytoplasmic Sperm Injection in the United States. *N Engl J Med.* 2007;357(3):251-257. doi:10.1056/NEJMsa070707
93. Crich JP, Jequier AM. Infertility in Men with Retrograde Ejaculation: The Action of Urine on Sperm Motility, and a Simple Method for Achieving Antegrade Ejaculation. *Fertil Steril.* 1978;30(5):572-576. doi:10.1016/S0015-0282(16)43640-X