

# REPRONEWS

Organo ufficiale della Società Italiana della Riproduzione®

Anno 14 • N. 2 • Dicembre 2012

## Infertilità e Contraccezione

**XX WEEK END SIdR**

*Presidenti*

V. De Leo, L. Fedele

**MILANO**

**23 • 24 maggio 2013**

**SEDE**

**Clinica Mangiagalli**

**Via Commenda, 12**

## CONSIGLIO DIRETTIVO S.I.d.R.

**Presidente: Vincenzo De Leo**

*deleo@unisi.it*

**Vicepresidente: Roberto Palermo**

*roberto.palermo@tin.it*

**Consiglieri: Lamberto Coppola**

*prof.coppola@centrotecnomed.it*

**Antonio Lanzone**

*alanzone@rm.unicatt.it*

**Giuseppe Ricci**

*ricci@burlo.trieste.it*

**Segretario Tesoriere: Antonio La Marca**

*antlamarca@libero.it*

**Revisori dei conti: Antonio Cianci**

*acianci@unict.it*

**Francesco De Seta**

*f.deseta@fmc.unisi.it*

**Past Presidents: Annibale Volpe**

*annibale.volpe@unimore.it*

**Felice Petraglia**

*petraglia@unisi.it*

**Direzione esecutiva: CG MKT**

Via Igino Lega 12 - 00189 Roma

Tel. 0639372581 - Fax 0645438292

*sidr@cgmkt.it*

## REPRONEWS

**Editor in Chief: Piergiorgio Crosignani**

**Managing Editor: Felice Petraglia**

**Comitato di redazione:**

Carlo Alviggi - Paola Anserini

Rosanna Apa - Angelo Cagnacci

Lamberto Coppola - Vincenzo De Leo

Francesco De Seta - Anna Pia Ferraretti

Luca Gianaroli - Secondo Guaschino

Antonio La Marca - Carlo La Vecchia

Antonio Ledda - Claudio Manna

Ivo Noci - Alberto Revelli - Giuseppe Ricci

Laura Rienzi - Edgardo Somigliana

Filippo Ubaldi - Annibale Volpe

## NUMERO 2 ANNO XIV

Stampa BC Graph • Pomezia

Iscr. Trib. Milano N. 655 del 13/10/99

Finito di stampare

Dicembre 2012

*Ai sensi della legge sul diritto d'autore e del codice civile è vietata la riproduzione di questi articoli o di parte di essi con qualsiasi mezzo, elettronico, meccanico, per mezzo di fotocopie, microfilms, registrazioni o altro. La responsabilità del contenuto degli articoli è interamente ascrivibile agli Autori.*

La SidR è una libera Associazione interdisciplinare, apolitica, senza fini di lucro fondata nel 1999 a seguito di sollecitazioni e consensi provenienti da più parti, su iniziativa di un folto gruppo di medici e ricercatori.

La S.I.d.R. ha lo scopo di favorire lo sviluppo della clinica, della ricerca e dell'informazione, nonché di promuovere l'aggiornamento e l'educazione permanente in tema di medicina e biologia della riproduzione.

L'Associazione si rivolge al contesto scientifico Italiano della riproduzione in tutte le sue diverse connotazioni sia applicative che di base, anche attraverso le più ampie aperture verso le Società scientifiche affini, le Associazioni degli utenti ed il mondo della ricerca e della produzione farmaceutica. I suoi associati sono infatti per lo più medici, biologi e ricercatori che operano nei settori della medicina e della biologia della riproduzione compreso quello delle tecnologie e delle biotecnologie riproduttive applicate agli animali domestici e di laboratorio.

Organo ufficiale della Associazione è il periodico REPRONEWS.

## SOMMARIO

**5** *The impact of endometriosis in women's health: the current and the future fields of investigation*

**10** *Indicazioni della IUI*

**20** *Effetto dell'esposizione ambientale a composti perfluorurati sull'integrità degli spermatozoi umani.*

**25** *L'angolo dell'andrologo*

*La vasectomia, alternativa contraccettiva al maschile: quello che il ginecologo oggi dovrebbe sapere*

*Ai soci della SIdR*

*Carissimi,*

*è con vivo piacere che ho accettato la Presidenza di questa prestigiosa società quale è la SIdR.*

*L'intenzione è quella di proseguire il lavoro iniziato dal Prof. Petraglia che ha dovuto interrompere il suo mandato prima della sua naturale scadenza in quanto chiamato a dirigere, in qualità di Editor in Chief, la prestigiosa rivista Human Reproduction Up-date.*

*Continuare il lavoro del Prof. Petraglia è abbastanza consequenziale provenendo entrambi dalla stessa sede e cosa ancor più importante avere la stessa visione scientifica nell'ambito della ricerca e della formazione in medicina della Riproduzione.*

*I temi scientifici su cui punterà la nostra società riguardano principalmente la salute riproduttiva ed il benessere della donna. Su questi argomenti saranno sviluppati i programmi scientifici dei vari convegni e corsi che la SIdR organizzerà nel prossimo biennio in tutta Italia.*

*Le iniziative per il 2013 riguardano l'organizzazione del Week-End Clinico di Milano 23-24 Maggio ed i corsi su "Riproduzione assistita e benessere della Donna".*

*La formazione ha tra i suoi obiettivi quello di rendere più semplici i vari protocolli di induzione dell'ovulazione nelle tecniche di PMA in modo che la personalizzazione delle terapie riduca l'incidenza di gravidanze multiple e i rischi di iperstimolazione ovarica.*

*La SIdR intende, inoltre, favorire con atti concreti la partecipazione alla vita della società dei giovani ricercatori, medici e biologi, sia attraverso la pubblicazione di lavori scientifici sulla rivista della società "Repronews" e sia attraverso la creazione di un forum in cui dibattere i temi più attuali della riproduzione in modo da favorire un aggiornamento continuo.*

*Vorrei infine, ringraziare tutti i componenti del Consiglio Direttivo per la stima e fiducia concessami e mi auguro che con l'aiuto di tutti e con il supporto professionale della CGMKT si possa continuare a far crescere la SIdR per farla diventare sempre più prestigiosa nel campo della medicina della riproduzione in modo da rappresentare un punto di riferimento per tutti gli operatori del settore.*

*Il Presidente*

**Vincenzo De Leo**



**CG MKT** *eventi*

TEL: +39 06 39372581 • FAX: +39 06 45438292  
E-MAIL: congressi@cgmkt.it • www.cgmkt.it

CALENDARIO PRELIMINARE

**DATE IN VIA DI DEFINIZIONE**

**2013**

# Prossimi Appuntamenti

Data da definire

**II CORSO SIFIOG**  
(Società Italiana di Fitoterapia ed Integratori in ostetricia e ginecologia)  
**Direttore del Corso: F. FACCHINETTI**  
MODENA

**FEBBRAIO**

25.26.27

**CORSO DI GINECOLOGIA DELL'INFANZIA E DELL'ADOLESCENZA. DALL'INFANZIA ALL'ADOLESCENZA: "Traiettorie di Crescita e di Cura" • I° Modulo**  
**Presidente: V. BRUNI**  
FIRENZE

**MARZO**

22.23

**IV CORSO: Diagnosi e Terapia della Infertilità Involontaria di Coppia**  
**Presidente: G.B. LA SALA**  
REGGIO EMILIA

25.26.27

**CORSO DI GINECOLOGIA DELL'INFANZIA E DELL'ADOLESCENZA. DALL'INFANZIA ALL'ADOLESCENZA: "Traiettorie di Crescita e di Cura" • II° Modulo**  
**Presidente: V. BRUNI**  
FIRENZE

**MAGGIO**

23.24

**XX WEEK END SIDR**  
(Società Italiana della Riproduzione)  
"Infertilità e Contraccezione"  
**Presidenti: V. DE LEO, L. FEDELE**  
MILANO

**OTTOBRE**

5

**CORSO DI AGGIORNAMENTO F.I.S.S.**  
(Federazione Italiana di Sessuologia Scientifica)  
ROMA

17.18.19

**5° CONGRESSO NAZIONALE S.I.C.**  
**Presidenti: S. VENTUROLI, A. VOLPE**  
BOLOGNA

25.26

**WORKSHOP SU NUTRIZIONE E RIPRODUZIONE ALIMENTAZIONE MODERNA E PROCREAZIONE: UN BINOMIO INCONCILIABILE? LA LEZIONE EVOLUTIVA PER FERTILITÀ, GRAVIDANZA, ALLATTAMENTO**  
**Presidente: E. COLOSI, H. VALENSISE**  
ROMA

**NOVEMBRE**

15.16

**CONGRESSO NAZIONALE CONGIUNTO SIM (Società Italiana Menopausa) SIPO (Società Italiana Policistosi Ovarica)**  
**Presidenti: A. VOLPE, A. CIANCI**  
TAORMINA

22.23

**GIORNATE GINECOLOGICHE**  
**Presidente: A. CAGNACCI**  
MODENA

29

**VI Workshop SIFIOG**  
(Società Italiana di Fitoterapia ed Integratori in Ostetricia e Ginecologia)  
**Presidenti: F. DE SETA • F. VICARIOTTO**  
MILANO

**DICEMBRE**

13.14

**3° EUROPEAN FERTILITY MEETING**  
**Presidenti: E. GRECO**  
ROMA

Data da definire

**CORSO D'ISTEROSCOPIA OPERATIVA**  
**Presidenti: C. NAPPI, A. DI SPIEZIO SARDO**  
NAPOLI

# The impact of endometriosis in women's health: the current and the future fields of investigation

**Serena Pinzauti, Lucia Lazzeri, Claudia Tosti, Gabriele Centini, Stefano Luisi, Errico Zupi, Felice Petraglia**

*Dipartimento di Pediatria, Ostetricia e Medicina della Riproduzione  
Università degli Studi di Siena*

## Introduction

Endometriosis is a benign gynecological disease associated to an extensive impact on women's health, whose diagnosis, classification and management are still debated.

Millions of women worldwide are affected by endometriosis, predominantly in reproductive age (1). Endometriosis is often disabling, leading to a chronic condition that deeply undermines the quality of life of the patient with a negative impact on work and personal life, and therefore has high costs (2).

It is time to pay attention not only to the morbidity associated with endometriosis, but also to the economic burden that endometriosis imposes on society. The high rates of hospital admissions, surgical procedures, medical treatments and incidence of comorbid conditions make endometriosis a high costly public health (3).

On this basis, several researches are focusing on diagnosis and specific management strategies.

## Pathogenesis

Starting from retrograde menstruation, several hypothesis have been done, but nowadays a unifying theory regarding the origin of endometriosis still remains indefinite (4).

The most recent proposals suggest that extrauterine stem-progenitor cells originating from bone marrow may differentiate into endometriotic tissue (5) or that ectopic endometrial implants are the result of lymphatic or hematogenous dissemination of endometrial cells (6).

Overall, the pathogenesis of the disease is multifactorial including: a) an altered hormonal milieu with estrogen dependence and progesterone resistance; b) an inflammatory response with evasion of the immune clearance; c) a modified endometrial cell proliferation, attachment and invasion ability (7) (Figure 1). In particular, the role of ovarian sex steroid hormones remains critical: the most recent researches focused on the effect of endocrine disruptors (plastic, food and water) that may represent alternative sources of sex steroid hormones derivatives, enhancing the pathological estrogen activity (8).

In addition to estrogen dependence, there is increasing evidence to support a profile of progesterone resistance in the pathophysiology of endometriosis. Endometriotic lesions exhibit a reduction in progesterone receptor expression relative to eutopic endometrium and an absence of progesterone receptor-beta. Additionally, endometrial expression profiling has documented dysregulation of progesterone-responsive genes in the luteal phase (9). An incomplete transition of endometrium from the proliferative to secretory phase has significant implications toward enhancing the survival and implantation of refluxed endometrium. The relative progesterone resistance within the endometrium and in endometriotic lesions could lead to further escalation of estradiol actions on these lesions, because progesterone generally downregulate estrogen receptors (10).

When considering the inflammatory response, it is clear that endometriosis is associated with increased pelvic inflammation, including increased macrophage concentration and ac-

tivity (11), increased oxidative stress (12) and increased concentration of inflammatory cytokines (IL-1, IL-6, IL-8, TNF-alpha) (13), indicating an impaired immune activity in women with endometriosis (14).

The endometrial dysregulation in women with endometriosis, likewise a differential ovarian steroid-dependent expression of CRH and urocortin mRNAs in eutopic endometrium from women with endometriosis has been shown (15,16). An impaired sensitivity of endometrial tissue to spontaneous apoptosis also contributes to the abnormal implantation and growth of endometrium at ectopic sites.

Moreover, recently an increased density of nerve fibers was also demonstrated in the myometrium in the lower half of the uterus in women with endometriosis; in this context, new molecules have been studied and nerve fibers shown to stain PGP9.5 in endometrium and myometrium in presence of endometriosis. This finding with the increased nerve fiber density in endometrium of sensory C fibers and adrenergic nerve fibers in women with endometriosis may play an important role in the mechanisms of pain generation (17,18).

At last, new genomic and proteomic approach is undergoing to understand the complex and multifactorial etiology of endometriosis (19).

## Diagnosis

The improvement of diagnostic process is an important tool of investigation. Based on the fact that pathogenesis of endometriosis calls back the putative role of local and systemic, inflammatory and angiogenetic processes, numerous recent studies have focused on recruitment of this markers in the peritoneal fluid and/or serum of women who have the disease, as new biochemical markers for diagnosing endometriosis. Even if, the measurement of VEGF, IL-6, IL-8, TNF-alpha, Fas ligand, still lacks clinical usefulness (20,21), the measurement of molecules involved in the regulation of immune and proliferation function (urocortin, follistatin) shares some clinical utility in the diagnosis of endometriosis.

Plasma urocortin levels measured in women with ovarian endometrioma were higher in women with endometrioma than in the control group and urocortin levels was able to detect 88% of the cases of endometrioma with 90% of specificity (22). Similarly, follistatin showed 92% and 96% of sensitivity and specificity, respectively, in detection of endometrioma (23).

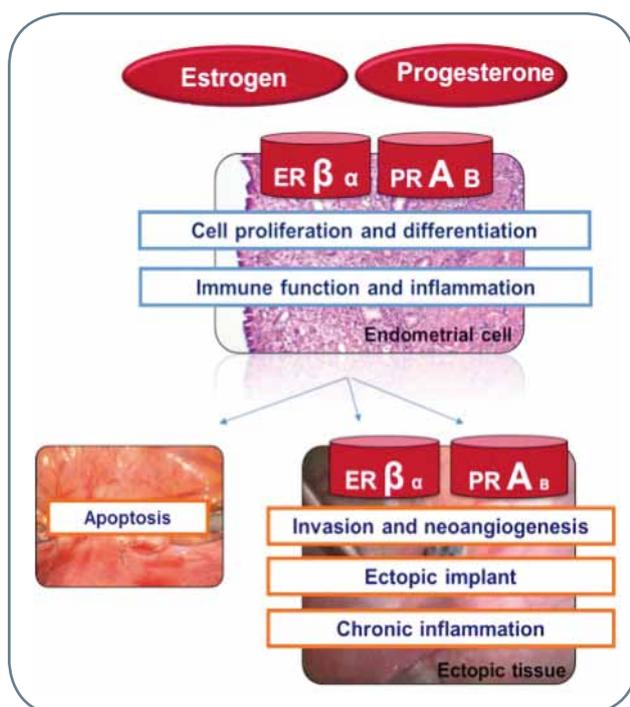
## Treatments

Endometriosis is surgically treated upon diagnosis, but with a high rate of recurrence, suggesting that a combination of surgical and medical management might provide better outcomes (32). The current medical treatment of endometriosis is based on ovarian hormone suppression that induce atrophy of endometrial implants and interrupt the cycle of stimulation for obtaining iatrogenic menopause (Figure 1).

The use of GnRH agonists is well recognized (33), but new GnRH antagonists are equally effective for regression of size and histological components of endometriosis. On this basis, GnRH antagonists may be considered an alternative choice instead of GnRH agonists for the treatment of endometriosis, since they have fewer side effects (i.e. postmenopausal symptoms) and no estradiol add-back is needed (34).

Available GnRH antagonist formulations require subcutaneous administration at least once

**Figure 1.** Pathogenesis of endometriosis.



a week, but data are still limited. Furthermore the development of new orally available GnRH antagonist (NBI-42902) that immediately suppress the reproductive endocrine axis reducing the LH and FSH levels followed by a delayed suppression of E2 may have future clinical utility in endometriosis treatment (35-37).

Similarly, aromatase inhibitors may cause a iatrogenic menopause effect; the use of aromatase inhibitors for endometriosis is still experimental and is based on the observation that endometriotic lesions express the enzyme aromatase and are able to make their own estrogen, even in the absence of gonadotropin stimulation (38). Pain relief after 6 months of daily treatment with an aromatase inhibitor together with high-dose norethindrone acetate or an oral contraceptive and showed significant resolution of pelvic pain in women with endometriosis (39,40).

Further researches are required to determine if aromatase inhibitors will be safe and effective for long-term use in women with endometriosis pain (41).

Recently, the evaluation of selective estrogen receptor modulators (SERMs) efficacy suggested that bazedoxifene (BZA), currently under evaluation for the treatment of osteoporosis, may be superior to other SERM in endometriosis treatment *in vitro*.

The regression of endometriotic lesions appears to have occurred primarily by suppression of estrogen-induced proliferation and further experiments using animal models as well as clinical trials will be helpful in determining the utility of this compound in women with endometriosis (42).

Current hormonal management of endometriosis is based also to the creation of a pseudo-pregnancy state (Figure 1); in this context the efficacy of progestins and oral contraceptives is well-known, but the introduction of new formulations and molecules create new advances. Danazol was once the gold standard of endometriosis treatment, but has been used less because associated with androgenic side effects and not tolerable long-term treatment. The effectiveness of danazol by vaginal route for 12 months on dysmenorrhea, dyspareunia and pelvic pain has been demonstrated, with

few side effects (43).

Recent advances concentrated also on the efficacy of dienogest, a novel progestin, that may represent a safe and effective long-term treatment option for women with endometriosis (44). Dienogest (2 mg/day for 12 weeks) showed a significant efficacy in pain reduction, in comparison with placebo and with gonadotropin-releasing hormone agonists (leuprolide acetate) with less adverse effects (45). Likewise, oral contraceptives assumed a new role in treatment endometriosis since their use is not limited to the preoperative treatment, but the post-operative use is now considered an essential part of long-term therapeutic strategies. Continuous administration, without a 7-day break, to avoid withdrawal bleeding, may be more beneficial in terms of pain relief. Their effect is limited to the period of use, with a significant reduction of endometriosis lesions and pelvic pain recurrences (46,47).

A regression of endometriosis lesions has been observed *in vitro* with administration of selective progesterone receptor modulators (SPRMs) (48,49). SPRMs may offer new insights in hormonal therapies (50).

Increasing knowledge about the pathogenesis of endometriosis is providing the opportunity to use new non-hormonal agents for medical treatment, including anti-inflammatory, antiangiogenic and pro-apoptotic compounds (Figure 1). Since endometriosis is characterized by an altered endometrial production of inflammatory mediators, included omega-3 polyunsaturated fatty acids, their therapeutic effect has been suggested.

Omega-3 fatty acids (DHA and EPA) have been shown to significantly reduce interleukines and prostaglandins release, decrease Cox-2 expression, suggesting a potential benefit in treatment of pelvic pain in patients with endometriosis (51).

The advances in diagnosis and treatment of endometriosis will improve delivery of care for patients with endometriosis and these are a research priority.

## Bibliografia

- Giudice LC, Kao LC. Endometriosis. *Lancet*. 2004;13-19;364:1789-99.
- Nnoaham KE, Hummelshoj L, Webster P, d'Hooghe T, de Cicco Nardone F, de Cicco Nardone C, Jenkinson C, Kennedy SH, Zondervan KT. Impact of endometriosis on quality of life and work productivity: a multicenter study across ten countries. World Endometriosis Research Foundation Global Study of Women's Health consortium. *Fertil Steril*. 2011;96:366-373.e8.
- Simoens S, Dunselman G, Dirksen C, Hummelshoj L, Bokor A, Brandes I, Brodsky V, Canis M, Colombo GL, DeLeire T, Falcone T, Graham B, Halis G, Horne A, Kanj O, Kjer JJ, Kristensen J, Lebovic D, Mueller M, Vigano P, Wullschlegel M, D'Hooghe T. The burden of endometriosis: costs and quality of life of women with endometriosis and treated in referral centres. *Hum Reprod*. 2012;27:1292-9.
- Viganò P, Somigliana E, Gentilini D, Benaglia L, Vercellini P. Back to the original question in endometriosis: Implantation or metaplasia? *JE* 2009;1,1-8
- Sasson IE, Taylor HS. Stem cells and the pathogenesis of endometriosis. *Ann N Y Acad Sci*. 2008;1127:106-15
- Hey-Cunningham AJ, Wei Ng F, Busard M, Berbic M, Mancini F, Yotting L, Barrera-Villa Zevallos H, Russell P, Markham R, Fraser IS. Uterine lymphatic and blood micro-vessels in women with endometriosis through the menstrual. *JE* 2010;4,197-205.
- Bulun SE. Endometriosis. *N Engl J Med*. 2009;15;360:268-79.
- Crain DA, Janssen SJ, Edwards TM, Heindel J, Ho SM, Hunt P, Iguchi T, Juul A, McLachlan JA, Schwartz J, Skakkebaek N, Soto AM, Swan S, Walker C, Woodruff TK, Woodruff TJ, Giudice LC, Guillette LJ Jr. Female reproductive disorders: the roles of endocrine-disrupting compounds and developmental timing. *Fertil Steril* 2008;90:911-40.
- Bulun SE, Cheng YH, Pavone ME, Xue Q, Attar E, Trukhacheva E, Tokunaga H, Utsunomiya H, Yin P, Luo X, Lin Z, Imir G, Thung S, Su EJ, Kim JJ. Estrogen receptor-beta, estrogen receptor-alpha, and progesterone resistance in endometriosis. *Semin Reprod Med*. 2010;28:36-43.
- Bulun SE, Cheng YH, Yin P, Imir G, Utsunomiya H, Attar E, Innes J, Julie Kim J. Progesterone resistance in endometriosis: link to failure to metabolize estradiol. *Mol Cell Endocrinol* 2006;248:94-103.
- Osuga Y, Koga K, Hirota Y, Hirata T, Yoshino O, Taketani Y. Lymphocytes in endometriosis. *Am J Reprod Immunol*. 2011;65:1-10.1
- Ngô C, Chéreau C, Nicco C, Weill B, Chapron C, Batteux F. Reactive oxygen species controls endometriosis progression. *Am J Pathol*. 2009;175:225-34.
- Mihalyi A, Gevaert O, Kyama CM, Simsa P, Pochet N, De Smet F, De Moor B, Meuleman C, Billen J, Blanckaert N, Vodolazkaia A, Fulop V, D'Hooghe TM. Non-invasive diagnosis of endometriosis based on a combined analysis of six plasma biomarkers. *Hum Reprod*. 2010;25:654-64.
- Khoufache K, Michaud N, Harir N, Kibangou Bondza P, Akoum A. Anomalies in the inflammatory response in endometriosis and possible consequences: a review. *Minerva Endocrinol*. 2012;37:75-92.
- Novembri R, Carrarelli P, Toti P, Rocha AL, Borges LE, Reis FM, Piomboni P, Florio P, Petraglia F. Urocortin 2 and urocortin 3 in endometriosis: evidence for a possible role in inflammatory response. *Mol Hum Reprod*. 2011;17:587-93.
- Novembri R, Borges LE, Carrarelli P, Rocha AL, De Pascalis F, Florio P, Petraglia F. Impaired CRH and urocortin expression and function in eutopic endometrium of women with endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96:1145-50.
- Wang G, Tokushige N, Fraser IS. Nerve fibers and menstrual cycle in peritoneal endometriosis. *Fertil Steril*. 2011;30;95:2772-4.
- Tokushige N, Markham R, Russell P, Fraser IS. Different types of small nerve fibers in eutopic endometrium and myometrium in women with endometriosis. *Fertil Steril*. 2007;88:795-803.
- Burney RO, Hamilton AE, Aghajanova L, Vo KC, Nezhat CN, Lessey BA, Giudice LC. MicroRNA expression profiling of eutopic secretory endometrium in women with versus without endometriosis. *Mol Hum Reprod*. 2009;15:625-31.
- Machado DE, Abrao MS, Berardo PT, Takiya CM, Nasciutti LE. Vascular density and distribution of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor VEGFR-2 (Flk-1) are significantly higher in patients with deeply infiltrating endometriosis affecting the rectum. *Fertil Steril*. 2008;90:148-55.
- Ohata Y, Harada T, Miyakoda H, Taniguchi F, Iwabe T, Terakawa N. Serum interleukin-8 levels are elevated in patients with ovarian endometrioma. *Fertil Steril*. 2008;90:994-9.
- Florio P, Reis FM, Torres PB, Calonaci F, Toti P, Bocchi C, Linton EA, Petraglia F. Plasma urocortin levels in the diagnosis of ovarian endometriosis. *Obstet Gynecol*. 2007;110:594-600.
- Reis FM, Luisi S, Abrão MS, Rocha AL, Viganò P, Rezende CP, Florio P, Petraglia F. Diagnostic value of serum activin A and follistatin levels in women with peritoneal, ovarian and deep infiltrating endometriosis. *Hum Reprod*. 2012;27:1445-50.
- Guerriero S, Mais V, Ajossa S, Paoletti AM, Angiolucci M, Labate F, Melis GB. The role of endovaginal ultrasound in differentiating endometriomas from other ovarian cysts. *Clin Exp Obstet Gynecol*. 1995;22:20-2.
- Abrao MS, Goncalves MO, Dias JA, Jr, Podgaec S, Chamie LP, Blasbalg R. Comparison between clinical examination, transvaginal sonography and magnetic resonance imaging for the diagnosis of deep endometriosis. *Hum Reprod* 2007;22:3092-3097.
- Bazot M, Darai E, Hourani R, Thomassin I, Cortez A, Uzan S, Buy JN. Deep pelvic endometriosis: MR imaging for diagnosis and prediction of extension of disease. *Radiology* 2004;232:379-389.
- Bazot M, Bornier C, Dubernard G, Roseau G, Cortez A, Darai E. Accuracy of magnetic resonance imaging and rectal en-

- doscopic sonography for the prediction of location of deep pelvic endometriosis. *Hum Reprod* 2007;22:1457-1463.
28. Bazot M, Detchev R, Cortez A, Amouyal P, Uzan S, Darai E. Transvaginal sonography and rectal endoscopic sonography for the assessment of pelvic endometriosis: a preliminary comparison. *Hum Reprod* 2003;18:1686-1692.
  29. Bazot M, Thomassin I, Hourani R, Cortez A, Darai E. Diagnostic accuracy of transvaginal sonography for deep pelvic endometriosis. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2004;24:180-185.
  30. Bazot M, Malzy P, Cortez A, Roseau G, Amouyal P, Darai E. Accuracy of transvaginal sonography and rectal endoscopic sonography in the diagnosis of deep infiltrating endometriosis. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2007;30:994-1001.
  31. Guerriero S, Ajossa S, Gerada M, Virgilio B, Angioni S, Melis GB. Diagnostic value of transvaginal 'tenderness-guided' ultrasonography for the prediction of location of deep endometriosis. *Hum Reprod*. 2008;23:2452-7.
  32. Rocha AL, Reis FM, Petraglia F. New trends for the medical treatment of endometriosis. *Expert Opin Investig Drugs*. 2012;21:905-19.
  33. Vercellini P, Crosignani PG, Somigliana E, Berlanda N, Barbara G, Fedele L. Medical treatment for rectovaginal endometriosis: what is the evidence? *Hum Reprod*. 2009;24:2504-14.
  34. Struthers RS, Nicholls AJ, Grundy J, et al. Suppression of gonadotropins and estradiol in premenopausal women by oral administration of the nonpeptide gonadotropin-releasing hormone antagonist elagolix. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94:545-51
  35. Altintas D, Kokcu A, Tosun M, Cetinkaya MB, Kandemir B. Comparison of the effects of cetrorelix, a GnRH antagonist, and leuprolide, a GnRH agonist, on experimental endometriosis. *J Obstet Gynaecol Res*. 2008;34:1014-9.
  36. Struthers RS, Xie Q, Sullivan SK, Reinhart GJ, Kohout TA, Zhu YF, Chen C, Liu XJ, Ling N, Yang W, Maki RA, Bonneville AK, Chen TK, Bozigian HP. Pharmacological characterization of a novel nonpeptide antagonist of the human gonadotropin-releasing hormone receptor, NBI-42902. *Endocrinology*. 2007;148:857-67.
  37. Kupker W, Felberbaum RE, Krapp M et al. Use of GnRH antagonists in the treatment of endometriosis. *Reprod Biomed Online*. 2002;5:12-6.
  38. Buzdar A, Howell A. Advances in aromatase inhibition: clinical efficacy and tolerability in the treatment of breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2001;7:2620-35.
  39. Amsterdam LL, Gentry W, Jobanputra S, Wolf M, Rubin SD, Bulun SE. Anastrozole and oral contraceptives: a novel treatment for endometriosis. *Fertil Steril*. 2005;84:300-4.
  40. Razzi S, Fava A, Sartini A, De Simone S, Cobellis L, Petraglia F. Treatment of severe recurrent endometriosis with an aromatase inhibitor in a young ovariectomised woman. *BJOG*. 2004;111:182-4.
  41. Ferrero S, Gillott DJ, Venturini PL, Remorgida V. Use of aromatase inhibitors to treat endometriosis-related pain symptoms: a systematic review. *Reprod Biol Endocrinol*. 2011;21:9:89.
  42. Kulak J Jr, Fischer C, Komm B, Taylor HS. Treatment with bazedoxifene, a selective estrogen receptor modulator, causes regression of endometriosis in a mouse model. *Endocrinology*. 2011;152:3226-32.
  43. Razzi S, Luisi S, Calonaci F, Altomare A, Bocchi C, Petraglia F. Efficacy of vaginal danazol treatment in women with recurrent deeply infiltrating endometriosis. *Fertil Steril*. 2007;88:789-94.
  44. Petraglia F, Hornung D, Seitz C, Faustmann T, Gerlinger C, Luisi S, Lazzeri L, Strowitzki T. Reduced pelvic pain in women with endometriosis: efficacy of long-term dienogest treatment. *Arch Gynecol Obstet*. 2012;285:167-73.
  45. Strowitzki T, Marr J, Gerlinger C, Faustmann T, Seitz C. Dienogest is as effective as leuprolide acetate in treating the painful symptoms of endometriosis: a 24-week, randomized, multicentre, open-label trial. *Hum Reprod*. 2010;25:633-41.
  46. Seracchioli R, Mabrouk M, Frascà C, Manuzzi L, Savelli L, Venturoli S. Long-term oral contraceptive pills and postoperative pain management after laparoscopic excision of ovarian endometrioma: a randomized controlled trial. *Fertil Steril*. 2010;94:464-71.
  47. Harada T, Momoeda M, Taketani Y, Hoshiai H, Terakawa N. Low-dose oral contraceptive pill for dysmenorrhea associated with endometriosis: a placebo-controlled, double-blind, randomized trial. *Fertil Steril*. 2008;90:1583-8.
  48. Bouchard P, Chabbert-Buffet N, Fauser BC. Selective progesterone receptor modulators in reproductive medicine: pharmacology, clinical efficacy and safety. *Fertil Steril*. 2011;96:1175-89.
  49. Chwalisz K, Perez MC, Demanno D, Winkel C, Schubert G, Elger W. Selective progesterone receptor modulator development and use in the treatment of leiomyomata and endometriosis. *Endocr Rev*. 2005;26:423-38.
  50. Chabbert-Buffet N, Pintiaux A, Bouchard P. The imminent dawn of SPRMs in obstetrics and gynecology. *Mol Cell Endocrinol*. 2012;25:358:232-43.
  51. Novembri R, Luisi S, Carrarelli P, Ciani V, De Pascalis F, Petraglia F. Omega 3 fatty acids counteract IL-8 and prostaglandin E2 secretion induced by TNF- $\alpha$  in cultured endometrial stromal cells. *JE* 2011;1:34-40.

# Indicazioni della IUI

**Giuseppe Ricci, Leila Lo Bello, Alessandra Faraca, Gina Cervi, Kristina Skerk, Michela De Santis, Gabriella Zito**

*SSD Procreazione Medicalmente Assistita*

*IRCCS Burlo Garofolo e Università di Trieste, Trieste*

L'inseminazione intrauterina (IUI) è una procedura di fecondazione assistita che ha l'obiettivo di superare la barriera mucosa cervicale e di concentrare un elevato numero di spermatozoi mobili, attivati in un piccolo volume, all'interno della cavità uterina, in modo da portarli il più vicino possibile al sito della fecondazione.

La tecnica prevede il trattamento del liquido seminale in laboratorio, che ha il fine di selezionare e attivare gli spermatozoi, e di rimuovere il plasma seminale, ricco di varie sostanze, quali prostaglandine, linfocine, citochine, radicali liberi, fattori decapacitanti, nonché tutte le cellule non utili ai fini della fecondazione, quali spermatozoi non vitali, cellule progenitrici degli spermatozoi, cellule di sfaldamento dell'epitelio genitale, leucociti, detriti cellulari e batteri. Il liquido preparato è poi inserito, in modo traumatico per via vaginale, con un catetere all'interno della cavità uterina.

I vantaggi e gli svantaggi della IUI rispetto alle procedure di fecondazione in vitro sono elencati nella Tabella 1. Le principali indicazioni all'IUI, con o senza stimolazione ovarica, sono l'infertilità da fattore cervicale, l'infertilità inspiegata, l'infertilità maschile e l'endometriosi I-II stadio.

## IUI e fattore cervicale

Il fattore cervicale d'infertilità è diagnosticato generalmente con l'esecuzione del post-coital test (PCT). Tuttavia, vari studi hanno dimostrato la limitata affidabilità del PCT, per cui questo ha assunto negli anni sempre minor valore diagnostico e prognostico.

Teoricamente, l'inseminazione intra-uterina dovrebbe essere il modo più logico ed efficace per superare le problematiche a livello della cervice uterina, ed in effetti in passato, il fattore cervicale è stato considerato come l'indicazione più ovvia per la IUI. In realtà, negli ultimi anni le linee guida delle principali Società Scientifiche, quali l'American Society for Reproductive Medicine, l'European Society of Human Reproduction and Embryology, il Royal College of Obstetricians and Gynaecologists, non contemplano tale indicazione per la IUI.

L'ultima Cochrane Review disponibile sull'argomento ha preso in considerazione gli studi che hanno comparato la IUI con i rapporti mirati (Helmerhorst et al., 2005). Sono sta-

ti identificati 5 studi randomizzati controllati (Tabella II). Purtroppo, tutti e cinque gli studi avevano gravi limitazioni metodologiche, per cui non è stato possibile eseguire la metanalisi e la Cochrane review non arriva ad alcuna conclusione.

Successivamente sono stati pubblicati due studi randomizzati controllati olandesi (Steures et al. 2007a; 2007b) (Tabella III). Il primo ha confrontato la IUI per 6 cicli (i primi 3 senza stimolazione ovarica, i successivi, in caso di mancato concepimento, con stimolazione ovarica) e con l'atteggiamento di attesa per 6 mesi.

Nonostante nel primo gruppo sia stata trovata una pregnancy rate più alta, questa non è risultata statisticamente significativa. Il secondo studio (Steures et al., 2007b) ha comparato la IUI con e senza stimolazione ovarica, sempre in coppie con infertilità da fattore cervicale.

Non è stato dimostrato un beneficio dell'aggiunta della stimolazione ovarica. In conclu-

sione, non vi sono prove in favore dell'utilizzo della IUI per l'infertilità da fattore cervicale, rispetto all'atteggiamento di attesa o ai rapporti mirati (Helmerhorst et al., 2005).

### IUI e infertilità inspiegata

Si parla d'infertilità inspiegata qualora una coppia non concepisca dopo un anno di rapporti intenzionalmente fecondi e non siano state evidenziate alterazioni dell'ovulazione, patologie tubo-pelviche e anomalie del liquido seminale. La percentuale delle coppie che presenta questa forma d'infertilità è molto variabile nelle casistiche raccolte finora, oscillando dall'8 al 28%, in funzione del livello di approfondimento diagnostico. Utilizzando una diagnostica intensiva, che preveda anche la laparoscopia, tale percentuale si riduce significativamente.

Il ruolo della IUI nel trattamento dell'infertilità inspiegata è alquanto dibattuto.

Si discute, soprattutto, se la IUI offra reali vantaggi rispetto ai rapporti mirati, e se conviene associare all'inseminazione una stimolazione ovarica. Una recente Cochrane review (Veltman-Verhulst, 2006) ha preso in considerazione tutte le possibili opzioni terapeutiche, valutando 11 studi randomizzati controllati, comparando:

- a) la IUI versus i rapporti mirati senza stimolazione ormonale;
- b) la IUI con stimolazione ovarica versus i rapporti mirati con stimolazione ormonale;
- c) la IUI in ciclo naturale versus la IUI con stimolazione ovarica;
- d) la IUI con stimolazione ovarica versus rapporti mirati in ciclo naturale;
- e) la IUI in ciclo naturale versus i rapporti mirati con stimolazione ovarica.

Una successiva metanalisi (Steures, 2010) ha incluso altri tre studi, senza peraltro arrivare a conclusioni differenti

- a) riguardo la prima comparazione, è disponibile un solo studio (Bhattacharya, 2008) con caratteristiche adeguate, che non mette in evidenza differenze significative relativamente alla pregnancy rate ottenuta con la IUI e con

rapporti temporizzati (Tabella IV).

- b) Per quanto riguarda il confronto fra la IUI con stimolazione ormonale e i rapporti mirati con stimolazione ormonale, i risultati della Cochrane review, che comprende sei studi randomizzati, non indicano un vantaggio dell'utilizzo della procedura di fecondazione assistita di primo livello (Tabella V).
- c) la Cochrane review considerando 4 studi randomizzati, conclude che l'associazione della stimolazione ovarica alla IUI, rispetto alla IUI in ciclo naturale, aumenta significativamente le probabilità di gravidanza (Tabella VI).

La IUI con stimolazione dell'ovulazione offre una pregnancy rate circa il doppio rispetto alla IUI senza uso di farmaci induttori dell'ovulazione.

Peraltro, come è noto, la stimolazione farmacologica comporta un rischio di sindrome da iperstimolazione ovarica e di gravidanze multiple.

Tali rischi sono stati riportati in misura notevolmente diversa nei vari studi.

Peraltro, a causa dell'eterogenità dei protocolli di trattamento e delle carenze del follow-up di tali studi, la Cochrane review non è in grado di quantificare correttamente il peso di tali rischi.

- d) vi sono solo 2 studi che hanno confrontato la IUI con stimolazione ovarica con i rapporti mirati in ciclo naturale: uno piuttosto datato (Deaton et al., 1990), e uno più recente (Steures et al., 2006).

Entrambi non dimostrano una pregnancy rate significativamente diversa per le due opzioni terapeutiche (Tabella VII).

- e) esiste un solo studio (Bhattacharya, 2008) che ha confrontato la IUI in ciclo naturale versus i rapporti mirati con stimolazione ovarica. Tale studio dimostra un modesto vantaggio della IUI senza stimolazione ovarica in confronto ai rapporti spontanei in ciclo stimolato con clomifene citrato (Tabella VIII).

### IUI e infertilità da fattore maschile

La IUI è generalmente la tecnica di fecondazione assistita più utilizzata per i casi d'infertilità

da fattore maschile lieve-medio. Peraltro, non vi è unanimità nel definire il limite per procedere alla IUI o ricorrere alla fecondazione in vitro. Uno dei parametri più utilizzati è il recupero di almeno un milione di spermatozoi mobili dopo preparazione del liquido seminale. Come per altre situazioni di sub-fertilità, è necessario stabilire se la IUI offra significativi vantaggi in termini di pregnancy rate rispetto ai rapporti mirati, se l'aggiunta della stimolazione dell'ovulazione produca benefici e con quali costi in termini di complicanze quali, soprattutto, gravidanze multiple e sindrome da iperstimolazione ovarica. Gli studi disponibili sono stati valutati da una Cochrane Review (Bensdorp, 2007) che ha identificato 17 studi randomizzati controllati valutabili. Una successiva metanalisi ha incluso un altro studio, senza peraltro arrivare a conclusioni differenti (Steures, 2010).

Come per l'infertilità inspiegata, la IUI è stata confrontata con i rapporti mirati, in ciclo naturale e stimolato, con le diverse combinazioni:

- a) IUI versus rapporti mirati senza stimolazione ormonale;
  - b) IUI con stimolazione ovarica versus rapporti mirati con stimolazione ormonale;
  - c) IUI in ciclo naturale versus IUI con stimolazione ovarica;
  - d) IUI con stimolazione ovarica versus rapporti mirati in ciclo naturale;
  - e) IUI in ciclo naturale versus rapporti mirati con stimolazione ovarica.
- a) è disponibile un solo studio (Kerin et al., 1984) con caratteristiche adeguate, che non mette in evidenza differenze significative relativamente alla pregnancy rate ottenuta con la IUI e con rapporti temporizzati in ciclo naturale. Si tratta, peraltro, di uno studio molto vecchio (Tabella IX).
  - b) per quanto riguarda il confronto fra la IUI con stimolazione ormonale e i rapporti mirati con stimolazione ormonale, gli studi disponibili non indicano un beneficio statisticamente significativo della procedura di fecondazione assistita (Tabella X).
  - c) i risultati della Cochrane review indicano che l'associazione della stimolazione ovarica alla IUI non fornisce vantaggi rispetto alla IUI in ciclo naturale. Infatti, non aumenta significativamente le probabilità di gravidanza, a fronte di complicanze non ben quantificabili. Anche sommando agli studi presi in considerazione dalla Cochrane review uno studio pubblicato successivamente (Steures et al., 2006), i risultati non cambiano (Tabella XI).
  - d) vi sono solo 2 studi (Ho et al., 1992; Aribarg et al. 1994) che hanno confrontato la IUI con stimolazione ovarica versus i rapporti mirati in ciclo naturale. Entrambi gli studi indicano un vantaggio della IUI in cicli stimolati, valutando complessivamente i cicli eseguiti dai due gruppi di trattamento, ma non forniscono dati sulla pregnancy rate per coppia. Pertanto, non si possono trarre conclusioni valide.
  - e) non vi sono studi valutabili che abbiano confrontato la IUI in ciclo naturale versus i rapporti mirati con stimolazione ovarica. Di conseguenza, non è possibile fornire alcuna indicazione.

### IUI ed endometriosi

Alcuni studi randomizzati, controllati hanno dimostrato potenziali vantaggi della IUI associata alla stimolazione ovarica (Deaton, 1990; Chaffkin, 1991; Fedele, 1992).

Sebbene non sia disponibile una metanalisi e i risultati non siano conclusivi, l'American Society for Reproductive Medicine raccomanda, in caso di endometriosi I e II stadio, la IUI con stimolazione ovarica o l'attesa per le donne con meno di 35 anni e la IUI con stimolazione ovarica o la fecondazione in vitro per le donne con età più avanzata (The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, 2006).

Allo stesso modo le linee guida del NICE (2004) suggeriscono negli stadi I e II di endometriosi fino a 6 cicli di IUI, associata alla stimolazione farmacologica dell'ovulazione.

### Conclusioni

Nonostante che la IUI venga utilizzata da molti anni come trattamento di prima linea per l'infertilità inspiegata, da fattore cervicale e da fattore maschile, e numerosissimi studi siano stati condotti, l'analisi rigorosa della letteratura offre pochissimi dati certi. L'unica conclusione che è possibile trarre è che l'associazione della stimolazione ovarica alla IUI nei casi d'infertilità inspiegata migliora la pregnancy rate rispetto alla IUI in ciclo naturale. Peraltro, non sono definibili quantitativamente i rischi di complicanze e di eventi avversi. La scarsa disponibilità di prove solide fa sì che siano poche le linee guida disponibili e che emergano differenze non trascurabili confrontando le loro raccomandazioni (Haagen, 2006) (Tabella XII).

La maggiore criticità dell'IUI è rappresentata dall'incremento delle gravidanze multiple legato alla stimolazione ovarica. Come è noto, le gra-

vidanze gemellari sono responsabili di un aumento della morbilità, della mortalità e dei costi complessivi. Per ciò che concerne l'incidenza di gravidanze multiple, Andersen nel 2008, analizzando lo European IVF Monitoring Programme 2004, descrive, su 98.388 IUI condotte in 19 paesi europei, una pregnancy rate (PR) per ciclo del 12,3%, con 12.081 nati vivi, di cui 87% gravidanze singole e 13% gravidanze multiple (Andersen, 2008). Si tratta quindi di una percentuale di gemellarità non trascurabile.

In conclusione, come ha ribadito nel 2009 l'ESHRE Capri Workshop Group (2009), analizzando tutti gli studi presenti in letteratura sull'IUI, ad oggi non è possibile ottenere una stima precisa dell'efficacia della tecnica, e sono quindi necessari ulteriori studi controllati randomizzati che mettano a confronto l'IUI con l'atteggiamento di attesa o con la fecondazione in vitro.

**Tabella 1.** Vantaggi e svantaggi della IUI rispetto alle procedure di fecondazione in vitro

| Vantaggi  | Svantaggi  |
|---|--|
| Minima invasività   | Non da informazioni sulla capacità degli spermatozoi di fertilizzare l'ovocita   |
| Maggior rispetto della fisiologia riproduttiva              | È necessario che almeno una tuba sia integra   |
| Minore impegno di tempo per la coppia                       | È necessario che dopo trattamento del liquido seminale siano recuperati almeno 1-2 milioni di spermatozoi con motilità progressiva |
| Monitoraggio della crescita follicolare meno intensivo      | Non applicabile in caso di sterilità immunologica grave  |
| Minore impatto psicologico                                  | In caso di stimolazione ovarica non è controllabile il numero di ovociti che vengono effettivamente fecondati                      |
| Basso rischio di complicanze                                | Percentuale di successo per ciclo relativamente bassa  |
| Non richiede attrezzature complesse                         | Rischio infettivo  |
| Facile apprendimento per gli operatori                      | Rischio di formazione di anticorpi antispermatozoo   |
| Procedura completamente ambulatoriale                       |  |
| Costi complessivi modesti                                   |  |
| Possibilità di ripetizione per più cicli, anche consecutivi |  |

**Tabella 2.** Fattore cervicale d'infertilità

| <b>Confronto fra IUI e Rapporti mirati. Esito: pregnancy rate</b> |               |                        |                           |
|---|---------------|------------------------|---------------------------|
| <b>Autore</b>   | <b>IUI</b>    | <b>Rapporti mirati</b> | <b>OR (IC 95%)</b>        |
| Check, 1995   | 17/80         | 3/76                   | 6.57 (1.84 - 23.45)       |
| Glazener, 1987  | 2/223         | 3/252                  | 0.75 (0.12 - 4.53)        |
| Kirby, 19991  | 7/58          | 4/52                   | 1.65 (0.45 to 5.99)       |
| Martinez, 1990  | 1/3           | 0/4                    | 5.4 (0.15 - 189.00)       |
| Te Velde, 1989  | n.d.          | n.d.                   |                           |
| <b>Totale</b>   | <b>27/364</b> | <b>10/384</b>          | <b>3.00 (1.43 - 6.28)</b> |

**Tabella 3.** Fattore cervicale d'infertilità

| <b>Confronto fra IUI e Attesa. Esito: pregnancy rate</b> |            |               |                    |
|--|------------|---------------|--------------------|
| <b>Autore</b>  | <b>IUI</b> | <b>Attesa</b> | <b>OR (IC 95%)</b> |
| Steures, 2007  | 22/51      | 13/48         | 1.59 (0.91 - 2.79) |

| <b>Confronto fra IUI con e senza stimolazione ovarica. Esito: pregnancy rate</b> |                                     |                                       |                    |
|--|-------------------------------------|---------------------------------------|--------------------|
| <b>Autore</b>  | <b>IUI con stimolazione ovarica</b> | <b>IUI senza stimolazione ovarica</b> | <b>OR (IC 95%)</b> |
| Steures, 2007  | 21/95                               | 19/87                                 | 1.01 (0.59 - 1.75) |

**Tabella 4.** Infertilità inspiegata

| <b>Confronto fra IUI e Rapporti Mirati. Esito: pregnancy rate</b> |            |           |                    |
|---|------------|-----------|--------------------|
| <b>Autore</b>   | <b>IUI</b> | <b>RM</b> | <b>OR (IC 95%)</b> |
| Bhattacharya, 2008  | 38/177     | 27/167    | 1,53 (0,88-2,64)   |

**Tabella 5.** Infertilità inspiegata

| <b>Confronto fra IUI e Rapporti mirati entrambi in cicli stimolati. Esito: pregnancy rate per coppia (tutti i cicli)</b> |                                     |                                    |                         |
|--|-------------------------------------|------------------------------------|-------------------------|
| <b>Autore</b>  | <b>IUI con stimolazione ovarica</b> | <b>RM con stimolazione ovarica</b> | <b>OR (IC 95%)</b>      |
| <b>Clomifene citrato</b>   |                                     |                                    |                         |
| Karlstrom, 1993  | 1/17                                | 4/23                               | 0,30 (0,03-2,93)        |
| <b>Gonadotropine</b>   |                                     |                                    |                         |
| Janko, 1998  | 10/36                               | 7/36                               | 1,59 (0,53-4,79)        |
| Karlstrom, 1993  | 3/15                                | 3/24                               | 1,75 (0,30-19,07)       |
| Melis, 1995  | 22/52                               | 23/56                              | 1,05 (0,49-2,26)        |
| <b>Sub-Totale</b>  | <b>56/153</b>                       | <b>42/166</b>                      | <b>1,68 (1,03-2,75)</b> |
| <b>Clomifene citrato e gonadotropine</b>   |                                     |                                    |                         |
| Arcaini, 1996  | 22/36                               | 12/32                              | 2,62 (0,98-6,98)        |
| <b>Clomifene citrato o gonadotropine</b>   |                                     |                                    |                         |
| Crosignani, 1991   | 7/42                                | 5/48                               | 1,62 (0,52-5,05)        |
| <b>Totale</b>  | <b>85/248</b>                       | <b>59/269</b>                      | <b>2,68 (1,13-2,50)</b> |

**Tabella 6.** Infertilità inspiegata

| <b>Confronto fra IUI in cicli spontanei e IUI in cicli stimolati. Esito: pregnancy rate per coppia (tutti i cicli)</b> |                                     |                                       |                         |
|--|-------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------|
| <b>Autore</b>  | <b>IUI con stimolazione ovarica</b> | <b>IUI senza stimolazione ovarica</b> | <b>OR (IC 95%)</b>      |
| <b>1 clomifene citrato</b>   |                                     |                                       |                         |
| Arici, 1994  | 3/10                                | 1/16                                  | 6,43 (0,56-73,35)       |
| <b>2 Gonadotropine</b>   |                                     |                                       |                         |
| Goverde, 2000  | 22/61                               | 14/59                                 | 1,81 (0,82-4,02)        |
| Guzick, 1999   | 25/111                              | 10/100                                | 2,62 (1,19-5,77)        |
| Murdoch, 1991  | 1/20                                | 2/19                                  | 0,45 (0,004-5,39)       |
| <b>Sub-Totale</b>  | <b>192</b>                          | <b>178</b>                            | <b>2,02 (1,18-3,45)</b> |
| <b>Totale</b>  | <b>202</b>                          | <b>194</b>                            | <b>2,14 (1,26-3,61)</b> |

**Tabella 7.** Infertilità inspiegata

| <b>Confronto fra IUI in cicli stimolati e RM in cicli spontanei. Esito: pregnancy rate</b> |                                     |                                      |                    |
|--|-------------------------------------|--------------------------------------|--------------------|
| <b>Autore</b>  | <b>IUI con stimolazione ovarica</b> | <b>RM senza stimolazione ovarica</b> | <b>OR (IC 95%)</b> |
| Clomifene Citrato  |                                     |                                      |                    |
| Deaton, 1990   | 8/23                                | 4/28                                 | 3,20 (0,82-12,5)   |
| Clomifene citrato o gonadotropine  |                                     |                                      |                    |
| Steures, 2006  | 29/127                              | 34/126                               | 0,80 (0,45-1,42)   |

**Tabella 8.** Infertilità inspiegata

| <b>Rapporto fra IUI in cicli spontanei e Rapporti mirati in cicli stimolati. Esito: pregnancy rate per coppia (tutti i cicli)</b> |                                       |                                    |                    |
|---|---------------------------------------|------------------------------------|--------------------|
| <b>Autore</b>   | <b>IUI senza stimolazione ovarica</b> | <b>RM con stimolazione ovarica</b> | <b>OR (IC 95%)</b> |
| Bhattacharya, 2008  | 38/167                                | 25/175                             | 1,77 (1,01-3,08)   |

**Tabella 9.** Fattore maschile d'infertilità

| <b>Confronto fra IUI e Rapporti Mirati in cicli naturali. Esito: pregnancy rate per coppia (tutti i cicli)</b> |            |           |                      |
|--|------------|-----------|----------------------|
| <b>Autore</b>  | <b>IUI</b> | <b>RM</b> | <b>OR (IC 95%)</b>   |
| Kerin, 1984  | 3/14       | 0/7       | 5.29 [ 0.42, 66.48 ] |

**Tabella 10.** Fattore maschile d'infertilità

| <b>Confronto fra IUI E Rapporti Mirati entrambi in cicli stimolati. Esito: pregnancy rate per coppia</b> |                                     |                                    |                           |
|--|-------------------------------------|------------------------------------|---------------------------|
| <b>Autore</b>  | <b>IUI con stimolazione ovarica</b> | <b>RM con stimolazione ovarica</b> | <b>OR (IC 95%)</b>        |
| Gregoriou, 1996  | 8/31                                | 4/31                               | 2.35 (0.63 – 8.81)        |
| Melis, 1995  | 11/40                               | 12/41                              | 0.92 (0.35 – 2.41)        |
| Nan, 1994  | 5/25                                | 1/34                               | 8.25 (0.90 – 75.79)       |
| <b>Totale</b>  | <b>24/96</b>                        | <b>17/106</b>                      | <b>1.67 (0.83 – 3.37)</b> |

**Tabella 11.** Fattore maschile d'infertilità

| <b>Confronto fra IUI in cicli stimolati e IUI in cicli naturali. Esito: pregnancy rate</b> |                                     |                                       |                           |
|--|-------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------|
| <b>Autore</b>  | <b>IUI con stimolazione ovarica</b> | <b>IUI senza stimolazione ovarica</b> | <b>OR (IC 95%)</b>        |
| Goverde, 2000  | 9/24                                | 11/27                                 | 0.87 (0.28 – 2.70)        |
| Guzick, 1999   | 37/120                              | 27/134                                | 1.77 (1.00 – 3.13)        |
| Cohlen, 1998   | 3/36                                | 4/38                                  | 0.77 (0.16 – 3.72)        |
| Arici, 1994  | 1/12                                | 0/18                                  | 4.83 (0.18 – 128.79)      |
| <b>Sub-Totale</b>  | <b>50/192</b>                       | <b>42/217</b>                         | <b>1.47 (0.91 – 2.38)</b> |
| Steures, 2007  | 33/132                              | 28/133                                | 1.25 (0.70 – 2.21)        |
| <b>Totale</b>  | <b>83/324</b>                       | <b>70/350</b>                         | <b>1.37 (0.95 - 1.97)</b> |

**Tabella 12.** Confronto fra linee guida disponibili dei diversi paesi

| <b>Indicazioni</b>          | <b>Danimarca</b>     | <b>Inghilterra e Galles</b> | <b>Francia</b>            | <b>Olanda</b>               |
|-----------------------------|----------------------|-----------------------------|---------------------------|-----------------------------|
| Fattore maschile            | IUI + SO (3-6 cicli) | IUI (fino a 6 cicli)        | IUI + SO (fino a 6 cicli) | IUI (+ SO) (fino a 6 cicli) |
| Infertilità inspiegata      | IUI + SO (3-6 cicli) | IUI (fino a 6 cicli)        | IUI + SO (almeno 6 cicli) | IUI + SO (fino a 6 cicli)   |
| Endometriosi lieve-moderata | IUI + SO (3-6 cicli) | IUI (+SO) (fino a 6 cicli)  | IUI + SO                  |                             |

## Bibliografia

1. Andersen A.N. et al. Assisted reproductive technology in Europe, 2004: results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod.* 2008;23:756-71.
2. Arcaini L, Bianchi S, Baglioni A et al. Superovulation and intra-uterine insemination vs superovulation alone in the treatment of unexplained infertility – A randomized study. *J Reprod Med.* 1996;41:614-8.
3. Arici A, Byrd W, Bradshaw K, Kutteh WH et al. Evaluation of Clomiphene Citrate and Human Chorionic-Gonadotropin Treatment – A Prospective, Randomized, Crossover Study During Intrauterine Insemination Cycles. *Fertil Steril.* 1994; 61:314-8.
4. Aribarg A, Sukcharoen N. Intrauterine insemination of washed spermatozoa for treatment of oligozoospermia. *Int J Androl.* 1995 Jun;18 Suppl 1:62-6.
5. Bendsdorp A, Cohlen BJ, Heineman MJ, Vanderkerchove P. Intra-uterine insemination for male subfertility. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2007, Issue 4. Art. No.: CD000360.
6. Bhattacharya S, Harrild K, Mollison J, et al. Clomifene citrate or unstimulated intrauterine insemination compared with expectant management for unexplained infertility: pragmatic randomised controlled trial. *BMJ.* 2008, 337:a716.
7. Chaffkin LM, Nulsen JC, Luciano AA, Metzger DA. A comparative analysis of the cycle fecundity rates associated with combined human menopausal gonadotropin (hMG) and intrauterine insemination (IUI) versus either hMG or IUI alone. *Fertil Steril.* 1991;55:252–257.
8. Check JH, Bollendorf A, Zaccardo M et al. Intrauterine insemination for cervical and male factor without super-ovulation. *Arch Androl.* 1995;35:135-41.
9. Chung CC, Fleming R, Jamieson ME et al. Randomized comparison of ovulation induction with and without intrauterine insemination in the treatment of unexplained infertility. *Hum Reprod.* 1995;10:3139-41.
10. Cohlen BJ, te Velde ER, van Kooij RJ et al. Controlled ovarian hyperstimulation and intrauterine insemination for treating male subfertility: a controlled study. *Hum Reprod.* 1998;13:1553-8.
11. Crosignani PG, Walters DE, Soliani A. The ESHRE multicentre trial on the treatment of unexplained infertility: a preliminary report. *European Society of Human Reproduction and Embryology. Hum Reprod.* 1991;6:953-8.
12. Crosignani PG, Walters DE. Clinical Pregnancy and Male Subfertility– the Eshre Multicenter Trial on the Treatment of Male Subfertility. *Hum Reprod.* 1994;9:1112-8.
13. Deaton JL, Gibson M, Blackmer KM, Nakajima ST, Badger GJ, Brumsted JR. A randomized, controlled trial of clomiphene citrate and intrauterine insemination in couples with unexplained infertility or surgically corrected endometriosis. *Fertil Steril.* 1990;54:1083–1088.
14. Dutch Society of Obstetrics and Gynaecology. Guideline – Intrauterine insemination (IUI). *NVOG-richtlijn nr 29*, 2000.
15. ESHRE Capri Workshop Group. Intrauterine insemination. *Hum Reprod Update* 2009;15:265-77.
16. Fedele L., S. Bianchi, M. Marchini, L. Villa, D. Brioschi, F. Parazzini. Superovulation with human menopausal gonadotropins in the treatment of infertility associated with minimal or mild endometriosis: a controlled randomized study. *Fertil Steril.* 1992;58:28–31.
17. Glazener CM, Coulson C, Lambert PA et al. The value of artificial insemination with husband's semen in infertility due to failure of postcoital sperm-mucus penetration—controlled trial of treatment. *Br J Obstet Gynaecol.* 1987;94:774-8.
18. Goverde AJ, McDonnell J, Vermeiden JP et al. Intrauterine insemination or in-vitro fertilisation in idiopathic subfertility and male subfertility: a randomised trial and cost-effectiveness analysis. *Lancet.* 2000;355:13-8.
19. Gregoriou O, Vitoratos N, Papadias C et al. Pregnancy rates in gonadotrophin stimulated cycles with timed intercourse or intra uterine insemination for the treatment of male subfertility. *Eur J Obst Gynecol Reprod Biol.* 1996;64:213-6.
20. Guzik DS, Carson SA, Coutifaris C, Overstreet JW, Factor-Litvak P, Steinkampf MP et al. Efficacy of superovulation and intrauterine insemination in the treatment of infertility. *N Engl J Med* 1999;340:177-183.
21. Haagen EC, Hermens RP, Nelen WL, Braat DD, Groel RP, Kremer JA. Subfertility guidelines in Europe: the quantity and quality of intrauterine insemination guidelines. *Hum Reprod.* 2006;21:2103-9.
22. Helmerhorst FM, van Vliet HA, Gornas T, et al. Intrauterine insemination versus timed intercourse for cervical hostility in subfertile couples. *Cochrane Database Syst Rev* 2005; CD002809.
23. Ho PC, So WK, Chan YF, Yeung WS. Intrauterine insemination after ovarian stimulation as a treatment for subfertility because of subnormal semen: a prospective randomized controlled trial. *Fertil Steril.* 1992;58:995-9.
24. Janko P, Hruzik P, Saliba H et al. Induction of ovulation with or without intrauterine insemination in cases of unexplained sterility. *Fertil Steril.* 1998;70:S442.
25. Karlstrom PO, Bergh T, Lundkvist O. A prospective randomized trial of artificial insemination versus intercourse in cycles stimulated with human menopausal gonadotropin or clomiphene citrate. *Fertil Steril.* 1993;59:554-9.
26. Kerin JF, Kirby C, Peek J et al. Improved conception rate after intrauterine insemination of washed spermatozoa from men with poor quality semen. *Lancet.* 1984;1:533-5.
27. Kirby CA, Flaherty SP, Godfrey BM et al. A prospective trial of intrauterine insemination of motile spermatozoa versus timed intercourse. *Fertil Steril.* 1991;56:102-7.
28. Martinez AR, Bernardus RE, Voorhorst FJ et al. Intrauterine Insemination Does and Clomiphene Citrate Does Not Improve Fecundity in Couples with Infertility Due to Male Or Idiopathic Factors –A Prospective, Randomized, Controlled-Study. *Fertil Steril.* 1990;53:847-53.

## Bibliografia

29. Melis GB, Paoletti AM, Ajossa S et al. Ovulation Induction with Gonadotropins As Sole Treatment in Infertile Couples with Open Tubes - A Randomized Prospective Comparison Between Intrauterine Insemination and Timed Vaginal Intercourse. *Fertil Steril.* 1995;64:1088-93.
30. Murdoch AP, Harris M, Mahroo M et al. Gamete Intrafallopian Transfer (Gift) Compared with Intrauterine Insemination in the Treatment of Unexplained Infertility. *Br J Obstet Gynaecol.* 1991;98:1107-11.
31. Nan PM, Cohlen BJ, te Velde ER et al. Intra-uterine insemination or timed intercourse after ovarian stimulation for male subfertility? A controlled study. *Hum Reprod.* 1994;9:2022-6.
32. National Collaborating Centre for Women's and Children's Health (NICE). Fertility guideline: assessment and treatment for people with fertility problems. <http://www.nice.org.uk> 2004.
33. Steures P, van der Steeg JW, Hompes PG et al. Intrauterine insemination with controlled ovarian hyperstimulation versus expectant management for couples with unexplained sub-fertility and an intermediate prognosis: a randomised clinical trial. *Lancet.* 2006;368:216-21.
34. Steures P, van der Steeg JW, Hompes PG et al. The additional value of ovarian hyperstimulation in intrauterine insemination for couples with an abnormal postcoital test and a poor prognosis: a randomized clinical trial. *Fertil Steril.* 2007;88:1618-24.
35. Steures P, van der Steeg JW, Hompes PG et al. Effectiveness of intrauterine insemination in subfertile couples with an isolated cervical factor: a randomized clinical trial. *Fertil Steril.* 2007;88:1692-6.
36. Steures P, van der Steeg JW, Hompes PG et al. Intrauterine insemination, what do we really know? A critical appraisal of the literature. *F&V in ObGyn.* 2010; Monograph1: 3-28.
37. te Velde ER, van Kooy RJ, Waterreus JJ. Intrauterine insemination of washed husband's spermatozoa: a controlled study. *Fertil Steril.* 1989;51:182-5.
38. The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Endometriosis and infertility *Fertility and Sterility.* 2006;86:S156-S160.
39. Veltman-Verhulst SM, Cohlen BJ, Hughes E, Heineman MJ. Intra-uterine insemination for unexplained subfertility. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2006, Issue 4. Art. No.: CD001838.

# Effetto dell'esposizione ambientale a composti perfluorurati sull'integrità degli spermatozoi umani.

**Laura Governini PhD<sup>1,2</sup>, Anita Stendardi PhD<sup>1,2</sup>, Francesca Serafini PhD<sup>2</sup>, Laura Gambera PhD<sup>2</sup>, Cristiana Guerranti PhD<sup>3</sup>, Vincenzo De Leo MD<sup>1,2</sup>, Paola Piomboni PhD<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>Dip. Medicina Molecolare e dello Sviluppo, Università di Siena; <sup>2</sup>Centro per la Diagnosi ed il Trattamento della Sterilità di Coppia, Ospedale S. Maria alle Scotte, Siena; <sup>3</sup>Dip. Scienze Ambientali "G.Sarfatti", Università di Siena.

## Riassunto

I composti perfluorurati (PFC) sono idrocarburi fluorurati di sintesi molto persistenti nell'ambiente. Dall'inizio degli anni '80, l'utilizzo dei PFC nelle applicazioni industriali e commerciali è notevolmente aumentato e con esso anche l'interesse a comprendere se ed in che modo tali composti possano causare danni alla salute.

Per quanto concerne la sfera riproduttiva, sembra che i PFC possano interferire negativamente sulla qualità del liquido seminale.

A questo scopo abbiamo valutato la contaminazione da PFC nel sangue, nel plasma seminale e negli spermatozoi e correlato i risultati con le caratteristiche funzionali, ultrastrutturali e con l'integrità del DNA spermatico.

## Introduzione

Una crescente esposizione a contaminanti ambientali e industriali è stata ipotizzata essere una delle cause di un generale peggioramento della qualità del liquido seminale (Sharpe, 2001). Particolare attenzione è stata prestata agli interferenti endocrini, composti di sintesi o naturali che incidono sulla normale attività del sistema endocrino ed in particolare sull'asse endocrino-riproduttivo (Damstra et al., 2002).

Tra questi si annoverano i composti perfluorurati (PFC), che vengono prodotti industrialmente attraverso il processo di fluorurazione

elettrochimica (Calafat et al., 2007). Il perfluorottano sulfonato (PFOS) e il perfluorooctanoato (PFOA) sono due dei più noti PFC, con particolari proprietà fisico-chimiche, che danno loro stabilità chimica e termica, rendendoli estremamente resistenti al calore ed anche insolubili in acqua e olio (Park et al., 2000). Queste particolari caratteristiche dei PFC ne hanno permesso un ampio utilizzo sia come emulsionanti nei prodotti per la pulizia, come componenti inerti nei pesticidi, nei contenitori per alimenti, padelle antiaderenti (commercialmente denominato "Teflon", prodotto da PFOA), shampoo, dentifricio, e così via (Renner, 2001; Tittlemier et al., 2004).

Molti studi sugli animali e sull'uomo hanno suggerito che vi sia un'associazione tra l'esposizione a tali composti e l'alterazione delle funzioni riproduttive (Giesy e Kannan, 2001; Midasch et al., 2007), ma solamente pochi studi hanno caratterizzato in vivo la presenza di PFC nel plasma seminale e la sua correlazione con altri fluidi biologici (Guruge et al., 2005).

Queste molecole possono inoltre alterare lo sviluppo fetale e causare malformazioni e disabilità nel caso in cui l'esposizione avvenga durante le fasi critiche della crescita.

Spinti dalle osservazioni di cui sopra, lo scopo del nostro studio è stato quello di valutare la contaminazione da PFC nel sangue intero, nel plasma seminale e nella frazione di spermatozoi di soggetti con parametri seminali normali (N) e soggetti oligo-asteno-teratozoospermici (OAT), e di rilevare un'eventuale correlazione tra la contaminazione da PFC e lo spermogramma, le ca-

ratteristiche ultrastrutturali e la frammentazione del DNA degli spermatozoi. Queste tre diverse matrici organiche sono state scelte nel tentativo di valutare se i PFC si legano alla superficie cellulare, penetrano negli spermatozoi o si accumulano nella frazione proteica.

## Materiali e Metodi

I soggetti inclusi nello studio sono stati reclutati presso il Centro Sterilità di Coppia della AOUS. Tutti i soggetti erano sottoposti ad indagini diagnostiche del liquido seminale e rispondevano alle seguenti caratteristiche: non fumatori, storia medica ed esame obiettivo negativi (no varicocele, criptorchidismo ecc.), profilo ormonale normale (FSH, LH, Testosterone). Tutti i soggetti hanno firmato un consenso informato prima dell'inclusione nello studio.

### • **Analisi dei parametri seminali**

I campioni di liquido seminale sono stati raccolti per masturbazione dopo 3-5 giorni di astinenza dai rapporti sessuali.

Le analisi delle caratteristiche macroscopiche e microscopiche sono state eseguite secondo le linee guida dell'organizzazione mondiale della Sanità (WHO, 2010); l'analisi ultrastrutturale è stata effettuata mediante microscopia elettronica a trasmissione (TEM).

Per l'analisi al TEM, aliquote di ciascun campione di spermatozoi sono state processate secondo la procedura precedentemente descritta (Piomboni et al., 2006).

### • **Metodo analitico per l'analisi della contaminazione da PFC**

Per l'analisi tossicologica di sangue, plasma seminale e campioni di cellule spermatiche, abbiamo utilizzato il metodo descritto da Governini et al. (2011).

### • **Analisi della frammentazione del DNA degli spermatozoi.**

La frammentazione del DNA degli spermatozoi è stata valutata mediante doppia colorazione con TUNEL e ioduro di propidio (PI), e la fluorescenza è stata analizzata mediante citometria di flusso secondo il metodo di Muratori et al. (2008).

La colorazione TUNEL è stata eseguita utilizzando un kit commerciale "TUNEL DeadEndTM fluorimetric".

I campioni sono stati analizzati mediante citometria a flusso (FACScan, Becton Dickinson). L'analisi dei dati è stata effettuata con il software CellQuest (Becton Dickinson).

### • **Analisi statistica.**

I dati sono stati analizzati utilizzando il software GraphPad Prism4 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). I risultati sono stati espressi come media  $\pm$  deviazione standard (SD). Valori standardizzati asimmetria e curtosi sono stati usati per determinare la distribuzione normale dei dati. Di Mann-Whitney U-test è stato utilizzato per il confronto con la significatività statistica fissati a  $p < 0.05$ .

## Risultati

Un gruppo di 59 pazienti con età media di 33 anni (range 27-45 anni) è stato incluso nello studio. L'analisi del liquido seminale ha evidenziato che 13 soggetti erano normozoospermici (N) e 46 oligo-asteno-teratozoospermici (OAT).

In tutti i soggetti in studio, non sono state rilevate contaminazioni da PFC nella frazione di cellule spermatiche, mentre nel 33% dei campioni di sangue intero e nel 15% di quelli di plasma seminale abbiamo riscontrato la presenza di PFC.

Tra i PFC ricercati, nei campioni di sangue intero sono stati rilevati più frequentemente i PFOS (84%) rispetto alle molecole di PFOA (16%), mentre nel plasma seminale il 25% dei campioni è risultato essere contaminato da PFOS ed il 75% da molecole di PFOA (Tabella I).

La presenza di PFOS e/o PFOA è stata rilevata in totale nel 4,3% di soggetti del gruppo N e nel 50% del gruppo OAT (Tabella II, Fig.1, pannello di destra).

L'analisi mediante TEM dei campioni del gruppo N ha confermato la presenza di una elevata percentuale di spermatozoi con normale struttura sia a livello della testa (nuclei e acrosomi con forma tipica e cromatina ben condensata) che della coda (assonemi 9 +2, bracci di dineina regolari; mitocondri e strut-

ture assonemali accessorie ben organizzate). D'altra parte, l'analisi TEM dei campioni OAT ha rivelato diverse anomalie quali una forma nucleare alterata, un acrosoma spesso localizzato lontano dal nucleo, vuoto e di forma irregolare.

L'assonema appariva disorganizzato e l'organizzazione mitocondriale era irregolare. Inoltre, sono stati osservati anche numerosi residui citoplasmatici isolati, delimitati da membrana, contenenti corpuscoli, aggregati di membrane, organelli e cromatina, corrispondenti ai corpi apoptotici M540, tipici di una spermatogenesi anomala.

Per quanto riguarda la valutazione della frammentazione del DNA degli spermatozoi sono state osservate due diverse popolazioni spermatiche caratterizzate da una diversa intensità della colorazione nucleare con PI: le cellule con DNA completamente frammentato risultavano essere debolmente marcate (PI<sub>dim</sub>), mentre quelle con DNA parzialmente frammentato avevano una marcatura più intensa (PI<sub>br</sub>).

La somma di queste due popolazioni di spermatozoi (PI<sub>br</sub> + PI<sub>dim</sub>) era indicativa del livello complessivo di apoptosi nel campione in esame. Utilizzando questo metodo è stato possibile differenziare anche i corpi apoptotici M540 che, essendo privi di nucleo, non erano marcati con PI.

L'indice di frammentazione del DNA non risultava significativamente superiore nel gruppo OAT rispetto al gruppo N (29,94% ± 3,82 vs 20,13 ± 7,44%, rispettivamente).

Tuttavia se tra i soggetti OAT si analizzano i PFC-positivi questi mostrano una percentuale di cellule con DNA completamente frammentato significativamente maggiore rispetto ai PFC-negativi (72,44% vs 56,94%,  $p < 0,05$ ) (Tabella III).

## Discussione

L'esposizione a sostanze chimiche presenti nell'ambiente e nei luoghi di lavoro è aumentata considerevolmente negli ultimi 50 anni, con una concomitante maggiore consapevolezza degli effetti negativi che tali molecole hanno sulla fertilità (Oliva et al, 2001; Sharpe, 2001; Hauser e Sokol, 2008; Mendola et

al, 2008. , Perry, 2008, Philips e Tanphaichitr, 2008).

I PFC sono ormai onnipresenti e si accumulano negli esseri umani e nell'ambiente. Mentre la loro tossicità non è elevata, il vero problema è la loro stabilità, e quindi, la loro resistenza.

Precedenti studi circa gli effetti dei PFC sul liquido seminale umano (Dahl et al, 2004; Guruge et al, 2005; Joensen et al, 2009) non hanno riportato chiare correlazioni.

I nostri risultati mettono in evidenza l'elevata frequenza di contaminazione da PFC sia nel sangue umano che nel liquido seminale, in particolare nei pazienti affetti da OAT.

Un dato significativo del nostro studio è la totale assenza di PFC nella frazione di cellule nemesperiche, che conferma l'incapacità dei PFC di aderire alla superficie dello spermatozoo o di accumularsi nel citoplasma, osservazione in linea con altri studi (Ehresman et al., 2007).

I soggetti positivi per la contaminazione da PFC hanno dimostrato un indice significativamente più elevato di frammentazione della cromatina ed una maggiore frequenza di anomalie spermatiche strutturali come evidenziato dalla microscopia elettronica.

Queste anomalie possono essere correlate alle alterazioni causate dai PFC a livello dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi, con un conseguente aumento dell'apoptosi, della frammentazione del DNA e della scarsa qualità degli spermatozoi.

Le associazioni tra danno al DNA ed esiti clinici avversi, quali l'infertilità, uno scarso livello di fecondazione e un anomalo sviluppo preimpianto dell'embrione, sono ormai ben note (Aitken et al., 2008).

L'esposizione umana dovrebbe essere quindi considerata nella futura valutazione dei rischi, concentrandosi sui possibili danni all'apparato riproduttivo ed in particolare sulla qualità del liquido seminale.

Occorre infine sottolineare che le conseguenze a lungo termine dell'accumulo di PFC nell'organismo non sono prevedibili e, pertanto, dovrebbero essere prese precauzioni per ridurre o eliminare il contatto con questi composti.

**Tabella 1.** Contaminazione da PFC nelle diverse matrici biologiche nei soggetti in studio

| Campioni (n=59) | % Positività ai PFC | % Positività PFOS e PFOA             | Concentrazione (ng/g f.w.)                           |
|-----------------|---------------------|--------------------------------------|--|
| Spermatozoi     | 0                   | -                                    | -  |
| Plasma seminale | 15%                 | PFOS: <b>25%</b><br>PFOA: <b>75%</b> | PFOS: <b>5.37 ± 0.45</b><br>PFOA: <b>7.68 ± 0,78</b> |
| Sangue Intero   | 33%                 | PFOS: <b>84%</b><br>PFOA: <b>16%</b> | PFOS: <b>7.07 ± 0,66</b><br>PFOA: <b>8.03 ± 1,04</b> |

**Tabella 2.** Caratteristiche seminali nei differenti gruppi di pazienti distinti in accordo con i parametri WHO (2010)

|                                  | Concentrazione (x10 <sup>6</sup> /ml) | Motilità progressiva totale (%) | Morfologia (%)    |
|----------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------|-------------------|
| Soggetti Normozoospermici (n=13) | <b>97.8 ± 24.7</b>                    | <b>64.8 ± 1.8</b>               | <b>10.3 ± 2.3</b> |
| Soggetti OAT (n=46)              | <b>12.6 ± 3.6</b>                     | <b>18.9 ± 3.3</b>               | <b>5.9 ± 1.2</b>  |

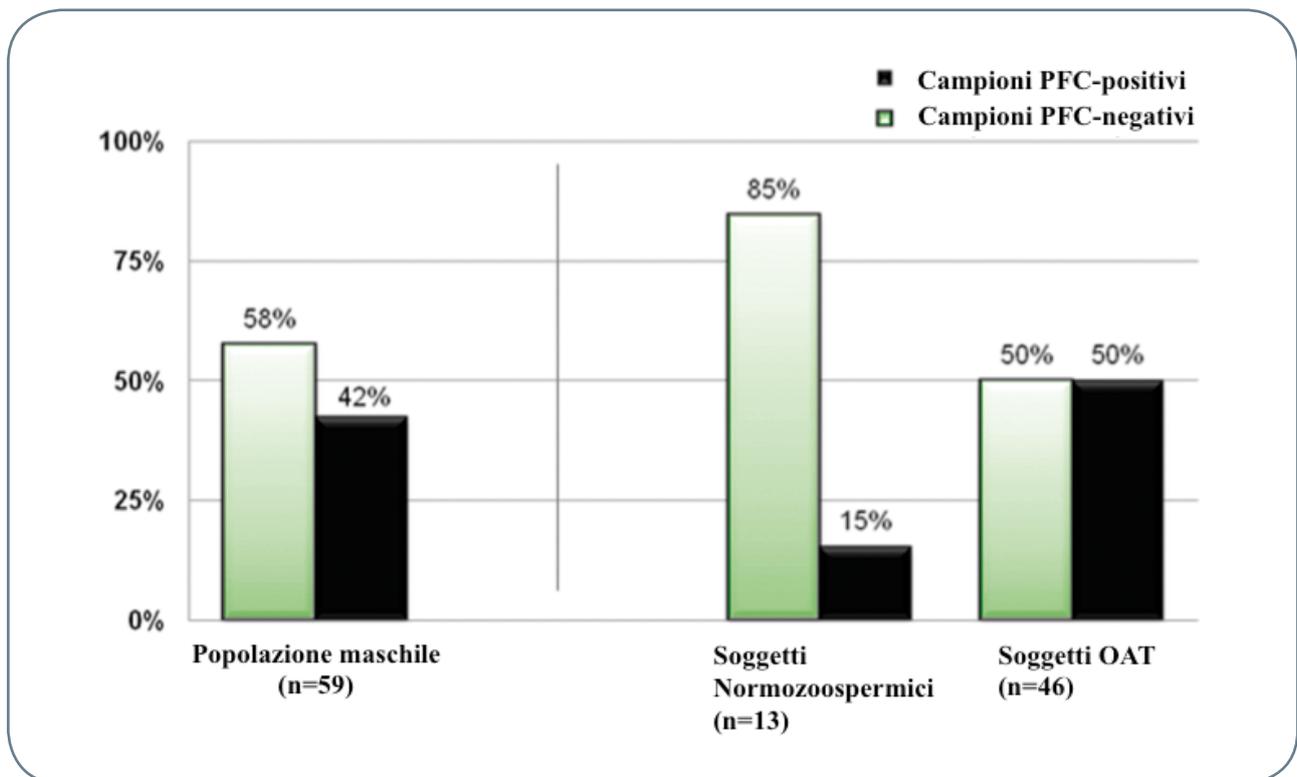
**Tabella 3.**

|   | Popolazione PI <sup>br</sup> | Popolazione PI <sup>dim</sup> | PI <sup>br</sup> + PI <sup>dim</sup> | Corpi M500        |
|---|------------------------------|-------------------------------|--------------------------------------|-------------------|
| <b>Soggetti Normozoospermici</b><br>Media (%) ± SD        | <b>7.5 ± 1.9</b>             | <b>12.7 ± 5.5</b>             | <b>20.1 ± 7.4</b>                    | <b>21.1 ± 6.0</b> |
| % della popolazione PI sul totale di cellule fluorescenti | <b>37.1</b>                  | <b>62.9</b>                   |                                      |                   |
| <b>Soggetti OAT PFC-positivi</b><br>Media (%) ± SD        | <b>7.4 ± 1.6</b>             | <b>19.6 ± 2.6</b>             | <b>27.1 ± 3.9 (ns)</b>               | <b>27.4 ± 4.5</b> |
| % della popolazione PI sul totale di cellule fluorescenti | <b>27.6</b>                  | <b>72.4 *</b>                 |                                      |                   |
| <b>Soggetti OAT PFC-negativi</b><br>Media (%) ± SD        | <b>13.5 ± 3.1</b>            | <b>17.9 ± 4.4</b>             | <b>31.4 ± 7.3 (ns)</b>               | <b>29.6 ± 7.4</b> |
| % di popolazione PI sul totale di cellule fluorescenti    | <b>43.1</b>                  | <b>56.9 *</b>                 |                                      |                   |

**Valutazione della frammentazione del DNA attraverso la tecnica TUNEL/PI:** PI<sup>br</sup> + PI<sup>dim</sup> indica la percentuale totale di cellule apoptotiche presenti nel campione in esame.

\*La percentuale della popolazione PI<sup>dim</sup> era significativamente maggiore nei campioni PFC-positivi rispetto ai PFC-negativi (p<0.05).

Figura 1.



## Bibliografia

- Aitken RJ, De Iuliis GN and McLachlan RI. Biological and clinical significance of DNA damage in the male germ line. *Int J Androl* 2008;32:46-56.
- Calafat AM, Wong LY, Kuklenyik Z, Reidy JA and Needham LL. Polyfluoroalkyl chemicals in the U.S. population: data from the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2003-2004 and comparisons with NHANES 1999-2000. *Environ Health Perspect* 2007;115:1596-1602.
- Corsolini S, Guerranti C, Perra G and Focardi S. Polybrominated diphenyl ethers, perfluorinated compounds and chlorinated pesticides in Swordfish (*Xiphias gladius*) from the Mediterranean Sea. *Environ Sci Technol* 2008;42:4344-4349.
- Dahl SK, Robins JC, Soman RS, Fitzgerald K, Thomas MA and Williams DB. The effect of an environmental toxin, perfluorooctanoic acid, on cryopreserved-thawed, human sperm. *Fertil Steril* 2004;82:S182-183.
- Damstra T, Barlow S, Bergman A, Kavlock R. and Van Der Kraak G. Global Assessment of the State-of-the-Science of Endocrine Disruptors. WHO/PCS/EDC/02.2. Geneva: World Health Organization, International Programme on Chemical Safety (eds. 2002).
- Ehresman DJ, Froehlich JW, Olsen GW. and Butenhoff JL. Comparison of human whole blood, plasma and serum matrices for the determination of perfluorooctane sulfonate (PFOS), perfluorooctanoate (PFOA) and other fluorochemicals. *Environ Res* 2007;103:176-184.
- Giesy JP and Kannan K. Global distribution of perfluorooctane sulfonate in wildlife. *Environ Sci Tec* 2001;35:1339-1342.
- Governini L, Orvieto R, Guerranti C, Gambera L, De Leo V, Piomboni P. The impact of environmental exposure to perfluorinated compounds on oocyte fertilization capacity. *J Assist Reprod Genet.* 2011;28(5):415-8. Epub 2011 Feb 23.
- Guruge KS, Taniyasu S, Yamashita N, Wijeratna S, Mohotti KM and Seneviratne HR. Perfluorinated organic compounds in human blood serum and seminal plasma: a study of urban and rural workers populations in Sri Lanka. *J Environ Monit* 2005;7:371-377.
- Hansen KJ, Clemen LA, Ellefson ME and Johnson HO. Compound-specific, quantitative characterization of organic fluorochemicals in biological matrices. *Environ Sci Technol* 2001;35:766-770.
- Hauser R and Sokol R. Science linking environmental contaminant exposures with fertility and reproductive health impacts in the adult male. *Fertil Steril* 2008;89:e59-65.
- Joensen UN, Bossi R, Leffers H, Jensen AA, Skakkebaek NE and Jørgensen N. Do perfluoroalkyl compounds impair human semen quality? *Environ Health Perspect* 2009;117:923-927.
- Kannan K, Hansen SP, Franson CJ, Bowerman WW, Hansen KJ, Jones PD and Giesy JP. Perfluorooctane sulfonate in fish-eating water birds including Bald Eagles and Albatrosses. *Environ Sci Technol* 2001;35:3065-3070.
- Mendola P, Messer LC and Rappazzo K. Science linking environmental contaminant exposures with fertility and reproductive health impacts in the adult female. *Fertil Steril* 2008;89:e81-94.
- Midasch O, Drexler H, Hart N, Beckmann MW and Angerer J. Transplacental exposure of neonates to perfluorooctane sulfonate and perfluorooctanoate: a pilot study. *Int Arch Occup Environ Health* 2007;80:643-648.
- Muratori M, Marchiani S, Tamburrino L, Tocci V, Failli P, Forti G and Baldi E. Nuclear staining identifies two populations of human sperm with different DNA fragmentation extent and relationship with semen parameters. *Hum Reprod* 2008;23:1035-1043.
- Oliva A, Spira A and Multigner L. Contribution of environmental factors to the risk of male infertility. *Hum Reprod* 2001;16:1768-1776.
- Park BK, Kitteringham NR and O'Neill PM. Metabolism of fluorine-containing drugs. *Pharmacol Toxicol* 2000;41:443-470.
- Perry MJ. Effects of environmental and occupational pesticide exposure on human sperm: a systematic review. *Hum Reprod Update* 2008;14:233-242.
- Philips KP and Tanphaichitr N. Human exposure to endocrine disruptors and semen quality. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 2008;11:188-220.
- Piomboni P, Bruni E, Capitani S, Gambera L, Moretti E, La Marca A, De Leo V, Baccetti B.
- Ultrastructural and DNA fragmentation analyses in swim-up selected human sperm. *Arch. of Androl.* 2006; 52: 51-59.
- Renner R. Growing concern over perfluorinated chemicals. *Environ Sci Technol* 2001;39:A154-160.
- Sharpe RM. Hormones and testis development and the possible adverse effect of environmental chemicals. *Toxicol Lett* 2001;120:221-232.
- Tittlemier S, Ryan JJ and Oostdam JV. Presence of anionic perfluorinated organic compounds in serum collected from Northern Canadian populations. *Organ Comp* 2004;66:4009-4014.
- WHO - World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 5th edn, 2010. Cambridge University Press, Cambridge, UK

# La vasectomia, alternativa contraccettiva al maschile: quello che il ginecologo oggi dovrebbe sapere

Lamberto Coppola <sup>1,2,3</sup>, G. Andrea Coppola <sup>1,3</sup>, Valerio D'Orazi <sup>1,3</sup>

Centri Integrati di Andrologia e Fisiopatologia della Riproduzione Umana Tecnomed (Nardò - Lecce) <sup>1</sup>, Casa di Cura "Prof. Petrucciani" (Lecce) <sup>2</sup> e Casa di Cura "Fabia Mater" (Roma) <sup>3</sup>.

## Introduzione

La sterilizzazione chirurgica è uno dei metodi contraccettivi più diffusi nel mondo sia per l'uomo sia per la donna, ed in particolare la vasectomia si è dimostrata una tecnica molto efficace e sicura nell'ottica di una pianificazione familiare.

Tra le ragioni che inducono la coppia ad optare per la chiusura delle tube può esservi la comodità di abbinare la procedura ad un taglio cesareo ed il rifiuto da parte dell'uomo di sottoporsi a vasectomia per il timore di possibili, quanto infondati, effetti collaterali.

Le coppie che decidono di ricorrere alla vasectomia, invece, sono spinte da altri fattori, quali la maggiore semplicità ed economicità dell'intervento rispetto alla chirurgia tubarica, le limitazioni mediche o psicologiche alla contraccezione femminile, la scarsa incidenza di complicazioni e l'ottima compliance riferita dai pazienti che si sono già sottoposti alla procedura.

Tuttavia in Italia il ricorso alla vasectomia è di gran lunga più limitato rispetto ad altri Paesi ed è soprattutto svantaggiato dall'assenza di una legislazione chiara in merito alla sterilizzazione.

Inoltre l'accostamento della medicina ai meccanismi riproduttivi dell'uomo viene spesso letto come interferenza con la natura ed è quindi sfavorito dalle implicazioni etiche che potrebbero derivarne.

## La sterilizzazione nel mondo

La sterilizzazione contraccettiva, o anticoncezionale, è una pratica piuttosto recente che ha cominciato a diffondersi intorno al 1950. Nel mondo il rapporto fra vasectomia e chiusure delle tube è estremamente variabile.

Secondo un rapporto dell'ONU del 2001, la sterilizzazione riguardava, nel 1994, il 20% delle donne ed il 4% degli uomini.

Negli Stati Uniti, invece, le due modalità di sterilizzazione sono ben distribuite nel tessuto sociale sebbene la chiusura delle tube risulta praticata più frequentemente rispetto alla vasectomia. Le stime mondiali parlano di 42-60 milioni di uomini sterilizzati e del 5% delle coppie in età riproduttiva che lo hanno scelto come metodo di pianificazione familiare.

Negli USA si sottopongono alla procedura circa 500.000 uomini l'anno e tra essi il 2-6% ricorre ad un reversal di vasectomia.

In Cina oltre il 50% delle coppie ha un partner sterilizzato con un rapporto uomo/donna di 5:1. In Gran Bretagna ed in Francia è una pratica molto diffusa nel maschio; in Italia, invece, è difficile stabilire l'incidenza di vasectomie.

Da una ricerca sulla banca dati on-line del Ministero della Salute che raggruppa i DRG

prodotti in Italia negli ultimi anni sono emersi dati molto interessanti ma, a nostro avviso, incompleti e non perfettamente chiarificatori della situazione italiana.

Tali dati dimostrerebbero che dal 1999 al 2003 sono stati effettuati 1145 interventi di vasectomia ma solo 400 di questi classificati come interventi di sterilizzazione maschile.

### Indicazioni

La vasectomia trova rare indicazioni oltre l'ambito contraccettivo in cui rappresenta in assoluto il metodo più efficace.

Può essere effettuata per prevenire le prostatiti acute o per evitare l'insorgenza di epididimiti nei pazienti sottoposti a chirurgia prostatica.

In Italia le indicazioni non-contraccettive alla vasectomia hanno rappresentato per anni un espediente a cui ricorrere per aggirare la legge che vietava espressamente la sterilizzazione chirurgica.

Ancora oggi, nonostante l'abrogazione della norma che proibiva la sterilizzazione e numerose sentenze che hanno sancito la liceità della sterilizzazione chirurgica volontaria, molti medici ricorrono all'espediente del ricovero del paziente con diagnosi di Orchiepididimite Cronica per effettuare una vasectomia.

### Controindicazioni

Non esistono particolari controindicazioni alla vasectomia ma si deve in ogni caso tener conto di eventuali situazioni cliniche che dovrebbero indurre l'andrologo ad escluderlo, quali infezioni locali o sistemiche, segni o sintomi di malattie sessualmente trasmesse e presenza di masse sospette testicolari.

Prima di sottoporre un soggetto a vasectomia è opportuno quindi eseguire una serie di indagini uro-andrologiche di routine per valutare lo stato di salute riproduttiva del paziente. Riteniamo utili un'ecografia con ecocolor Doppler testicolare ed un'indagine del liquido seminale per confermare la presenza

di spermatozoi nell'eiaculato.

È importante, inoltre, che il paziente sia supportato anche da figure specialistiche (psicologo, sessuologo, psichiatra, biologo) in modo da porre l'intervento di vasectomia al termine di un percorso di accompagnamento e approfondimento del problema.

### Tecniche

Sono numerose le tecniche chirurgiche proposte dai vari Autori nel corso degli anni.

L'accesso al vaso deferente può essere eseguito con un'incisione scrotale singola o doppia.

Attualmente, nel mondo, va affermandosi sempre più la tecnica definita come No Scalpel Vasectomy.

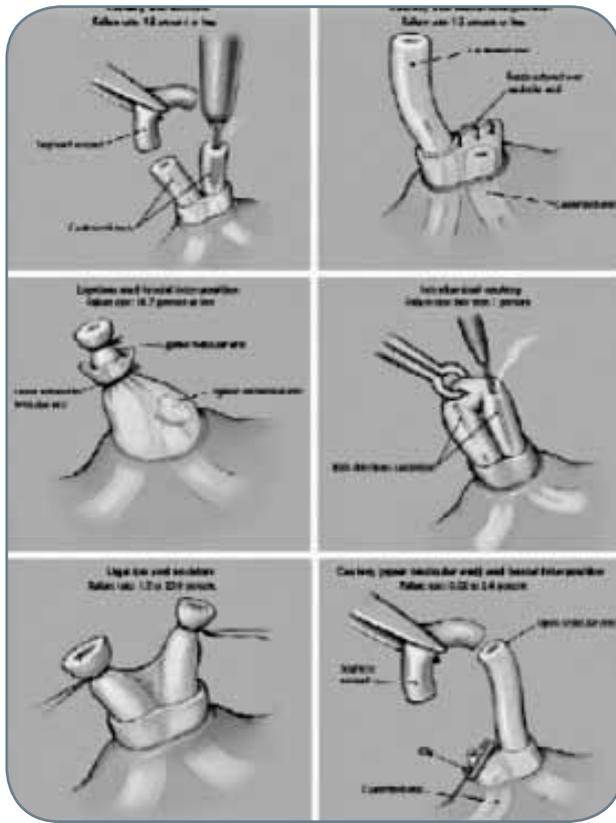
Ideata e messa a punto in Cina, nel 1974, da Shunqiang Li ed introdotta negli Stati Uniti, nel 1985, da Marc Goldstein, è una tecnica che pur richiedendo un adeguato training chirurgico, risulta di semplice esecuzione e presenta numerosi vantaggi tra cui la minore invasività rispetto alle altre (alcune già minimamente invasive), l'assenza di un'incisione scrotale cruenta, la velocità di esecuzione e la rarissima incidenza di complicanze (Tab. I).

Con la NSV, il chirurgo individua il deferente attraverso la cute scrotale e, previa infiltrazione di anestetico locale, effettua una minincisione incruenta con una forbice da dissezione; utilizzando poi un pinza ad anelli esteriorizza il deferente e procede alla sezione del vaso salvaguardando la sua componente vascolare.

Le modalità di interruzione del dotto deferente sono molteplici (Fig. 1).

Tra queste, la Legatura Semplice dei Monconi è il metodo più diffuso, specialmente nei paesi in via di sviluppo. L'Elettrocatterizzazione del deferente, invece, è la tecnica di occlusione più comune negli USA.

**Figura 1.** Tecniche di Vasectomia



(Dassow P, Bennett JM. Vasectomy: an update. *Am Family Phys* 2006;74).

della ricanalizzazione spontanea. Un aspetto importante di natura immunologica è rappresentato dalla possibile formazione di anticorpi anti-spermatozoi (ASA) i quali possono danneggiare la capacità fecondante degli spermatozoi influenzandone negativamente la motilità, la penetrazione nel muco cervicale e l'interazione con l'ovocita.

È importante tener conto di questa evenienza qualora il paziente vasectomizzato "pentito" decidesse di ricorrere al reversal microchirurgico. Infatti secondo la nostra esperienza e dai dati riportati da altri Autori, il reversal della vasectomia è una pratica che offre una discreta percentuale di successo della performance chirurgica, ma un pregnancy rate non particolarmente elevato con un range compreso tra il 30 ed il 60%.

Per quel che riguarda le paventate ripercussioni sulla virilità, si tratta di un fenomeno legato a retaggi culturali, più presenti nei paesi latini e molto meno in quelli anglosassoni; dalla letteratura emerge che nel paziente vasectomizzato potrebbero instaurarsi squilibri psico-sessuologici di varia entità, quali senso di rammarico, dimostrazione della virilità in forma aggressiva, difficoltà a raggiungere l'orgasmo e impotenza.

## Risultati

Il quadro di Azoospermia, quindi il raggiungimento dell'obiettivo contraccettivo, si ottiene dopo circa 90 giorni dall'intervento e deve essere confermato da almeno 3 spermioogrammi che rilevino l'assenza totale di spermatozoi. In caso di persistenza di spermatozoi immobili si consiglia di informare il paziente circa la remota possibilità di gravidanza, mentre la presenza di spermatozoi vitali e di buon grado morfologico dopo 6 mesi dall'intervento ne indica il fallimento.

## Complicanze

Le complicanze post-chirurgiche più frequenti sono l'orchialgia post-vasectomia, determinata dall'aumento della pressione idrostatica intraepididimaria, l'epididimite, la formazione di un granuloma spermatico e la rara evenienza

## Aspetti medico legali

Nel corso dei secoli, la morale e la deontologia medica hanno interpretato l'atto sterilizzante come una mutilazione dell'integrità fisica e psicologica.

Nel nostro Paese tale concezione ha esercitato una notevole influenza anche sugli aspetti giuridici della questione, tanto che nel passato si operò una marcata distinzione tra la sterilizzazione praticata per ragioni strettamente terapeutiche e la sterilizzazione attuata per altri motivi non terapeutici.

Attualmente nessuna distinzione di tal genere merita di essere fatta, atteso che la finalità dell'intervento deve essere comunque tesa sempre al miglioramento della salute, anche psichica, del soggetto richiedente e, in senso più ampio, della coppia. Pur mancando una specifica normativa, numerose sentenze han-

no sancito che la pratica della sterilizzazione chirurgica volontaria non configura il reato di lesioni personali (articoli 582 e 583 c.p.), allorché finalizzata al miglioramento della salute nell'accezione più ampia del termine, ma è considerata atto medico lecito, sempre che sia preceduto da un esplicito, libero, informato e valido consenso del soggetto.

La decisione del paziente deve essere preceduta da una dettagliata e documentata informazione da parte del medico sul quale grava anche l'obbligo medico legale di effettuare ripetuti controlli post-operatori, tenuto conto che potrebbe presentarsi un'eventuale gravidanza non voluta. Durante i colloqui con il paziente è necessario risaltare il concetto che la vasectomia è una tecnica definitiva e che dopo l'intervento gli sarà preclusa la possibilità di fecondare.

Il paziente deve essere pienamente consapevole dell'irreversibilità del trattamento, ma è chiaro che grazie alle tecniche di ricanalizzazione microchirurgica dei deferenti e di PMA, la possibilità di un futuro concepimento non può essere esclusa in modo completamente definitivo.

La donna sterilizzata, ad esempio, continua a disporre di ovaie funzionali e, oltre a poter ricorrere al tentativo di ricostruzione tubarica, può essere sottoposta ad intervento di pick-up ovocitario e successiva FIVET. Allo stesso modo il maschio vasectomizzato può essere sottoposto ad intervento di recupero chirurgico di gameti testicolari o epididimari (mediante MESA, PESA, TESE, MicroTESE) da utilizzare per tecniche di PMA. Contestualmente a tale intervento si dovrebbe tentare anche la ricostruzione microchirurgica dei deferenti per ristabilirne la pervietà e per dare la possibilità alla coppia di ottenere un concepimento per vie naturali.

Tutto ciò nel rispetto della Legge 40/2004 che impone la gradualità degli interventi terapeutici nella coppia che intende iniziare un programma riproduttivo. Nel rispetto quindi dello *ius poenitendi* del paziente, riteniamo che sia utile informarlo sulle attuali possibilità offerte dalla medicina e sulle percentuali di successo delle varie tecniche oggi disponibili.

I dati riportati in letteratura segnalano, inoltre, che tra le precauzioni da adottare prima di una vasectomia c'è quella di proporre al paziente la crioconservazione del liquido seminale.

Questa procedura, se da un lato contrasta con le forti motivazioni che dovrebbero spingere il paziente all'intervento, dall'altro tiene conto delle numerose evidenze che fanno notare come vi sia un significativo aumento delle richieste di ripristino della fertilità.

### Considerazioni conclusive

Tra medici confusi e pazienti disorientati, la vasectomia continua a non trovare spazio in Italia sebbene sia una procedura di minima invasività, di semplice esecuzione e con una ridotta incidenza di complicanze post-operatorie. Nell'ottica di una scelta contraccettiva di coppia la vasectomia offre risultati anti-concezionali in fondo più sicuri rispetto ad altri metodi e la chirurgia dei deferenti è da considerarsi meno invasiva rispetto a quella tubarica.

La scelta di sterilizzazione chirurgica può ricadere sul partner maschile anche in seguito al riscontro di limitazioni mediche alla gravidanza o alla contraccezione della donna, come può essere una controindicazione alla chirurgia tubarica e/o all'applicazione di IUD e/o all'uso di composti estrogeno-progestinici. Sebbene vi siano pareri discordanti sulla liceità della procedura di sterilizzazione volontaria del maschio, in Italia l'orientamento giurisprudenziale appare volto a ritenere pienamente lecita la sterilizzazione consensuale ai fini contraccettivi e a non sanzionare il sanitario che la pratica.

È inevitabile sottolineare infine come, ancora oggi, manchi nel sistema normativo italiano un'organica regolamentazione di tale attività medico-chirurgica, lacuna che solleva numerose perplessità nei medici che si trovano a far fronte alla richiesta di vasectomia da parte di un paziente fortemente motivato il quale viene spesso liquidato con atteggiamento di disinteresse o indisponibilità verso la domanda.

**Tabella 1.** Complicazioni dopo *No-Scalpel Vasectomy*. La tabella mostra i risultati delle *No-Scalpel Vasectomy* eseguite in Cina, New York, Spagna ed India. *Complications after No-Scalpel Vasectomy. The table shows the results of the No-Scalpel Vasectomies performed in China, New York, Spain and India* (da Li et al., 1991, mod.)

## Confronto fra IUI e Rapporti Mirati. Esito: pregnancy rate

| Paese               | Numero di NSV | Ematoma (%) | Infezione (%) |
|---------------------|---------------|-------------|---------------|
| Cina                | 179.741       | 160 (0,09)  | 1.630 (0,91)  |
| New York (USA)      | 238           | 0           | 0             |
| Barcellona (spagna) | 400           | 0           | 0             |
| India               | 4.253         | 2 (0,047)   | 3 (0,07)      |

## Bibliografia

1. A. Ortensi, G. A. Coppola, V. D'orazi, Et Al: la sterilizzazione maschile volontaria: aspetti medici, sociali e legali della vasectomia. *Giornale italiano di medicina sessuale e riproduttiva*. 14:162-185, 2007.
2. G. Piediferro, G.M. Colpi, Et Al: contraccezione maschile. *Minerva Ginecol*. 2004 Oct; 56(5): 469-78
3. United Nations. Population Division. Departement of economic and social affairs. *World Contraceptive Use 2001*
4. S. Li, M. Goldstein, J. Zhu, Et Al: the no-scalpel vasectomy. *J. Urol* 1991; 145: 341-4
5. K.W. Aradhya, K. Best, D.C. Sokal: Recent developments in vasectomy. *Bmj* 2005; 330: 296-299
6. International planned parenthood federation. London: international medical advisory panel (imap) statement on voluntary surgical sterilisation. 1999
7. I.D. Sharlip: what is the best pregnancy rate that may be expected from vasectomy reversal? *J. Urol* 1993;149:1469 -71
8. A.M. Belker, A.J. J.R. Thomas, E.F. Fuchs, J.W. Konnak, I.D. Sharlip: results of 1,469 microsurgical vasectomy reversals by the vasovasostomy study group. *J Urol*. 1991 Mar;145(3):505-11
9. M. Leoni: Sulla sterilizzazione consensuale. *Giust. Pen*. 1987, I, 348-352
10. F. Mantovani: problemi giuridici della sterilizzazione. *Riv. It. Med. Leg.* 1983, V: 840-847

## Le spirali con la tecnologia a più alto livello al costo più basso

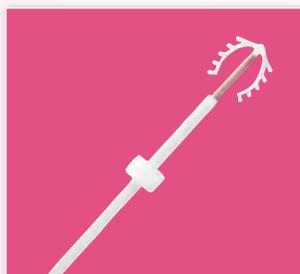
Multi-Safe® CU 375



Neo-Safe® T CU 380



Multi-Safe® CU 375 - short



Per informazioni  
e/o acquisto diretto:

info@mktpharma.it  
www.mktpharma.it

# CONGRESSO NAZIONALE CONGIUNTO



PRESIDENTI:

**A. Volpe, A. Cianci**

## TAORMINA

**15/16 NOVEMBRE 2013**

*Hotel Villa Diodoro*

Via Bagnoli Croci, 75



SEGRETERIA ORGANIZZATIVA

◆ CG MKT  
Via Cassia, 1110 - 00189 Roma  
Tel. 0639372581 - Fax. 0645438292  
info@cgmkt.it  
www.cgmkt.it

PROVIDER

ECM Service S.r.l.  
I.D. n° 275 dell'Albo  
Nazionale Provider

Richiesti i crediti ECM

... i prodotti  
del nostro  
benessere.



Acido Folico  
Lattoferrina  
Magnesio  
Iodio

**FLAM,**

Integratore  
alimentare



**Florigen**  
Lavanda Vaginale



**Florigen**  
Intimo detergente  
*al tè verde*

