



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CATANIA  
Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale  
Dottorato di ricerca internazionale in  
“Medicina Sperimentale Clinica e Fisiopatologia Cellulare”- XXVI CICLO  
(Coordinatore: Prof. Enzo S. Vicari)

---

Tesi di Dottorato

EFFETTI NEGATIVI DEL “BODY MASS INDEX”  
SUI PARAMETRI SPERMATICI CONVENZIONALE  
E NON CONVENZIONALI (IN  
CITOFLOREMIA)

Dott. Alvaro Maria Managò

Tutor  
Prof. Sandro La Vignera

Coordinatore  
Prof. Enzo Saretto Vicari

---

Anno Accademico 2013/2014

## SOMMARIO

- Introduzione (da pagina 1)
- Materiali e metodi (da pagina 7)
  - Selezione dei pazienti (da pagina 7)
  - Valutazione seminologica (da pagina 9)
  - Valutazione citoflorimetrica su liquido seminale (da pagina 10)
  - Analisi statistica (da pagina 14)
- Risultati (da pagina 15)
- Discussione (da pagina 21)
- Bibliografia (da pagina 30)

## INTRODUZIONE

L'eccesso ponderale viene sempre più considerato un importante problema sociale. Da un punto di vista statistico la prevalenza del fenomeno ha raggiunto una significativa consistenza numerica e secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità (O.M.S.) entro il 2014 approssimativamente 2,3 milioni di adulti saranno sovrappeso e 700 milioni saranno francamente obesi<sup>(1)</sup>. Nei Paesi a più elevato tenore socio-economico l'obesità essenziale rappresenta il "problema nutrizionale" per definizione. In Italia la prevalenza di sovrappeso (36,1% nel 2009, 33,9 nel 2001) ed obesità (10,3% nel 2009, 8,5 nel 2001) risulta la più elevata d'Europa. Nelle regioni meridionali la prevalenza dell'obesità risulterebbe ancor più elevata nei maschi rispetto alle femmine<sup>(2,3)</sup> e, dato assai allarmante, la Childhood

Obesity Surveillance Initiative (COSI) ha rilevato in Italia una percentuale di bambini obesi pari all'11,9%.

L'obesità è altresì considerata un fattore maschile di infertilità ed i numerosi studi ad oggi condotti sull'argomento indicherebbero una possibile associazione tra l'incremento di peso corporeo ed alcune anomalie riscontrabili nei parametri spermatici, anche se in letteratura non tutti i dati sono univocamente concordanti<sup>(4)</sup>.

Nei pazienti obesi, comunque, diversi parametri spermatici convenzionali (il volume spermatico, la concentrazione nemaspermica, la conta totale degli spermatozoi, la percentuale di spermatozoi mobili e la percentuale di spermatozoi con normale morfologia) presentano di sovente valori alterati rispetto agli intervalli di normalità.<sup>(5-14)</sup>.

Nonostante tale frequente evidenza, è tuttavia da notare che molti soggetti in sovrappeso o addirittura obesi hanno parametri

spermatici convenzionali nella norma con nessun effetto documentato sulla morfologia degli spermatozoi<sup>(5,8)</sup>. È stato anche condotto uno studio teso ad indagare l'eventuale legame intercorrente tra livelli sierici di leptina e parametri spermatici e tuttavia gli autori non hanno trovato alcuna evidente correlazione tra gli elevati livelli sierici di tale ormone, di comune riscontro negli obesi, ed i parametri seminologici medesimi<sup>(15)</sup>. Alcuni studi in meta-analisi non avrebbero inoltre evidenziato alcuna relazione certa intercorrente tra indice di massa corporea (Body Mass Index o BMI) e concentrazione di spermatozoi o quantità totale di spermatozoi. In tali studi l'analisi ha mostrato che gli uomini in sovrappeso e obesi hanno un profilo ormonale, riferito agli ormoni gonadici, chiaramente differente e peculiare ma, considerando i parametri spermatici, le anomalie riscontrate sono solo marginali ed al di sotto del limite di rilevamento statistico di queste numerose

casistiche<sup>(16-18)</sup>. Tuttavia, una più recente revisione, sempre basata sul criterio meta-analitico, ma su dati più omogenei e meglio aggregabili oltre che su un numero di lavori scientifici assai più consistente, ha chiaramente suffragato l'ipotesi di una correlazione inversa tra parametri seminologici e BMI<sup>(19)</sup>. Infine, significative differenze nei valori medi di BMI e parametri spermatici convenzionali sono stati evidenziati nei partner maschili di coppie che si rivolgono a strutture sanitarie che si occupano di problemi legati alla fertilità<sup>(20)</sup>.

A fronte delle numerose indagini scientifiche effettuate sui parametri spermatici convenzionali, solo alcuni autori hanno esplorato l'eventuale relazione intercorrente tra peso corporeo e parametri spermatici non convenzionali. Di fatto l'obesità può a ragione essere considerata un esempio clinico di stress ossidativo sistemico<sup>(21)</sup> ed un cospicuo numero di ricerche sul tema ha dimostrato gli effetti negativi

determinati dall'incremento dello stress ossidativo sulla membrana degli spermatozoi<sup>(22)</sup> in ragione dell'azione svolta dalla perossidazione lipidica sull'integrità della cromatina e del DNA cellulare<sup>(23)</sup>. Nell'ambito di ulteriori studi altri autori hanno riscontrato un indice di frammentazione del DNA significativamente più alto negli obesi rispetto a quanto rilevato in uomini di peso normale<sup>(24,25)</sup> e sono stati inoltre individuati elevati livelli di danno al DNA nemaspermico in uomini obesi rispetto ai controlli sani normopeso<sup>(26)</sup>.

Non sono tuttavia stati pubblicati dati circa eventuali effetti del peso corporeo sulla funzione mitocondriale dello spermatozoo, sui processi di apoptosi precoce, e sulla compattezza della cromatina.

In considerazione di quanto suesposto è stato intrapreso il presente progetto di ricerca al fine di valutare sia gli effetti di un aumento di peso corporeo sui parametri seminali convenzionali

(densità, motilità e morfologia) che su alcuni specifici parametri spermatici non convenzionali. Nel novero dei parametri spermatici non convenzionali abbiamo esaminato la funzione mitocondriale degli spermatozoi, i segni d'incipiente apoptosi, il grado di compattezza della cromatina e l'indice di frammentazione del DNA mediante l'utilizzo della metodica di citometria di flusso. In tale studio sono stati arruolati 50 soggetti sovrappeso e 50 soggetti francamente obesi senza evidenze anamnestiche e cliniche di comorbidità. Il campione è stato accuratamente selezionato al fine di evitare la possibile interferenza dovuta al fumo di sigaretta<sup>(27,28)</sup> e/o a qualsiasi patologia andrologica conosciuta in grado di influenzare i parametri spermatici convenzionali e non convenzionali. Come gruppo di controllo sono stati selezionati 50 uomini in buona salute e normozoospermici.



## **MATERIALI E METODI**

### *SELEZIONE DEI PAZIENTI*

Per l'arruolamento in questo studio sono stati attentamente selezionati cinquanta soggetti sani in sovrappeso (BMI compreso tra 25,0 e 29,9 kg/m<sup>2</sup>), 50 soggetti obesi (BMI compreso tra 30,0 e 44,0 kg/m<sup>2</sup>), e 50 con peso normale (BMI compreso tra 19,0 e 24,9 kg/m<sup>2</sup>) tutti non fumatori. Tutti i soggetti sono stati selezionati in modo casuale nel contesto della popolazione generale.

Al fine di escludere i soggetti affetti da concomitante presenza di patologia andrologica nota, possibile causa di alterazione dei parametri spermatici convenzionali e non, si è proceduto alla raccolta di una completa ed accurata storia clinico-anamnestica per ciascuno dei pazienti arruolati nello studio. Tutti i soggetti con anamnesi negativa sono stati sottoposti ad un attento esame obiettivo,

ad esami di laboratorio (esami ematochimici di routine, spermogramma, esame batterioscopico e colturale su liquido seminale) e a valutazione ecotomografica strumentale della regione didimo-epididimaria e prostato-vescicolare mediante scansione transrettale endocavitaria.

Tutti i soggetti (controlli, normopeso ed obesi) con patologia di carattere sistemico ed endocrine, disfunzioni sessuali, attività sessuale irregolare prima delle verifiche, infezione delle ghiandole accessorie maschili (MAGI), criptorchidismo o riscontro di varicocele passato o presente, microrchidismo, anamnesi positiva per fumo di sigaretta, alcol o droga e di recente sottoposti a trattamento ormonale per qualsivoglia ragione sono stati esclusi dalla ricerca in oggetto. Per i soggetti senza alcuna malattia sistemica od andrologica arruolati in questo studio si è proceduto alla determinazione delle concentrazioni

sieriche di ormone luteinizzante (LH), ormone follicolo-stimolante (FSH), testosterone totale, 17- $\beta$ -estradiolo e della globulina legante gli ormoni sessuali (SHBG). Si è proceduto inoltre alla raccolta del liquido seminale per valutare i parametri spermatici convenzionali e non convenzionali.

Il protocollo è stato approvato dal Comitato Interno di Revisione e per ogni paziente arruolato nello studio è stato ottenuto il consenso informato per iscritto.

#### *VALUTAZIONE SEMINOLOGICA*

Si è proceduto alla raccolta per ipsoazione di due campioni di liquido seminale, con un intervallo tra le due determinazioni di 7-10 giorni e dopo 4 giorni di astinenza sessuale. Dopo liquefazione i campioni sono stati analizzati facendo riferimento ai “vecchi” criteri

dell'OMS (edizione 1999). Gli spermatozoi presenti nel campione sono stati poi utilizzati anche per l'analisi citometrica a flusso.

#### *VALUTAZIONE CITOFLORIMETRICA SU LIQUIDO SEMINALE*

La citometria a flusso è stata eseguita utilizzando il citoflorimetro EPICS XL (Coulter Electronics, Milano, Italia)<sup>(34)</sup>, al fine di valutare la funzione mitocondriale degli spermatozoi, dopo colorazione mediante l'impiego di 5,59,6,69-tetracloro-1, 19,3,39-tetraetil-cloruro benzimidazolylcarbocyanine [JC-1], l'esternalizzazione della fosfaditilserina (PS), dopo aver eseguito doppia colorazione con annessina V e ioduro di propidio [PI], la compattezza della cromatina (dopo colorazione con PI), ed il grado di frammentazione del DNA nemaspermico utilizzando il saggio desossinucleotide transferasi-mediato dUTP (TUNEL).

*Colorazione JC-1* - il potenziale di membrana mitocondriale

(MMP) è stato valutato mediante colorazione con JC-1 secondo la tecnica indicata in precedenza<sup>(34)</sup>. La sospensione di spermatozoi è stata regolata ad una densità di 0,5-1 per 10<sup>6</sup> cellule per millilitro ed incubata con JC-1 per 10-15 minuti a 37 C° in assenza di luce.

*Saggio mediante Annessina V/PI* – la colorazione con

annessina V/PI è stata effettuata utilizzando un kit disponibile in commercio (kit per la rilevazione dell'apoptosi annessina V-FITC, Beckman Coulter, Schaumburg, Illinois). Una quota contenente 0,5 x 10<sup>6</sup> spermatozoi per millilitro è stata risospesa in 0,5 millilitri di soluzione tampone, marcata con 1 millilitro di annessina V-FITC più 5 millilitri di PI, successivamente incubata per 10 minuti in assenza di luce e immediatamente sottoposta ad analisi. I segnali sono stati registrati attraverso rilevatori per FL-1 (fluoresceina isotiocianato) e FL-

3 (PI). I diversi modelli di marcatura in sede di analisi mediante annessina V/PI bivariata hanno portato all'identificazione di diverse popolazioni di cellule: le popolazioni cellulari annessina negative e PI negative sono state considerate appartenenti al gruppo di cellule vitali mentre le popolazioni cellulari annessina positive e PI negative come spermatozoi PS-esternalizzanti (cellule apoptotiche precoci).

*Colorazione PI* – la colorazione PI degli spermatozoi è stata eseguita previa breve centrifugazione a 500 G per 10 minuti a temperatura ambiente. Il surnatante è stato rimosso e sono stati raccolti gli spermatozoi. Una quantità pari a circa  $1 \times 10^6$  di spermatozoi è stata incubata nel reagente LPR DNA-Prep contenente cianuro di potassio al 0,1%, 0,1% NaN<sub>3</sub>, detergenti non ionici, e stabilizzato in soluzione salina (Beckman Coulter) in assenza di luce, a temperatura ambiente per 10 minuti, poi incubate in reagente Stein

DNA-Prep contenente 50 mg per millilitro di PI (0,5%), RNAsi di tipo A (4 kunits/ml), <0,1% NaN<sub>3</sub>, posto in soluzione salina e stabilizzato (Beckman Coulter), in assenza di luce, a temperatura ambiente per 30 minuti.

*Test TUNEL* – un saggio secondo la metodica TUNEL è stato effettuato utilizzando il kit per apoptosi Mebstain (Beckman Coulter). Il controllo negativo è stato ottenuto senza l'aggiunta di desossinucleotidil-transferasi terminale alla miscela di reazione; il controllo positivo è stato ottenuto dal pretrattamento degli spermatozoi con 1 mg per millilitro di RNAasi-free deossiribonucleasi I (Sigma Chemical, St. Louis, Missouri) a 37 C° per 60 minuti prima della marcatura. Il surnatante è stato eliminato seguendo la medesima procedura descritta sopra.

## *ANALISI STATISTICA*

I risultati sono riportati come  $\pm$ SEM nell'ambito dell'intero studio. I parametri spermatici convenzionali sono stati sottoposti ad analisi statistica come la media delle due determinazioni ottenute su ognuno dei soggetti arruolati. I dati sono stati analizzati mediante analisi a una via della varianza (ANOVA) seguita dal test a intervallo multiplo di Duncan. Il software SPSS 9.0 per Windows è stato utilizzato per la valutazione statistica (SPSS Inc., Chicago, Illinois). Una differenza statisticamente significativa è stata accettata per  $P < 0.05$ .



## **RISULTATI**

L'età dei soggetti in sovrappeso ( $31,2 \pm 1,2$  anni, intervallo 20-43 anni) e dei soggetti obesi ( $31,6 \pm 1,7$ , intervallo 22-48 anni) non differiva significativamente da quella dei controlli ( $31,5 \pm 1,1$  anni, intervallo 22-46 anni).

Nel gruppo dei pazienti in sovrappeso, il 70% ( $n = 35$ ) ha mostrato un valore di BMI compreso tra i 27,0 e 28,5  $\text{kg}/\text{m}^2$ , mentre tra i pazienti obesi, l'80% ( $n = 40$ ) ha mostrato un valore di BMI tra i 37,5 e 39,5  $\text{kg}/\text{m}^2$  (classe II; OMS, 1995). Infine, tra i controlli il 70% ha mostrato un valore di BMI compreso tra i 21,5 e 23,5  $\text{kg}/\text{m}^2$ .

I dati relativi ai parametri spermatici convenzionali ed alle concentrazioni ormonali sieriche sono riportati in tabella.

Sia gli uomini in sovrappeso come gli obesi hanno mostrato una conta significativamente più bassa di spermatozoi totali e ridotta

motilità progressiva (grado a + b) rispetto ai controlli ( $p < 0,05$ , ANOVA seguito dal test di Duncan), mentre solo negli uomini obesi è stata riscontrata una percentuale significativamente inferiore di spermatozoi di normale morfologia rispetto ad entrambi i gruppi (controlli e uomini in sovrappeso)  $p < 0,05$ , ANOVA seguito dal test di Duncan. Il volume del liquido seminale, la densità spermatica, la conta totale degli spermatozoi, ed i leucociti presenti nel liquido seminale non hanno mostrato alcuna variazione significativa sia in uomini in sovrappeso che in quelli obesi.

Le concentrazioni sieriche di LH, FSH, e di testosterone totale non differivano in modo significativo nei tre gruppi, mentre i livelli di 17- $\beta$ -estradiolo e di SHBG erano sensibilmente più alti negli uomini in sovrappeso ed obesi rispetto ai controlli sani ( $p < 0,05$  vs i controlli, ANOVA seguito dal test di Duncan).

Il gruppo rappresentato da uomini in sovrappeso così come

**Tabella 1. Principali parametri spermatici e livelli ormonali in pazienti normopeso sani (intervallo BMI: 19,0-24,9 kg/m<sup>2</sup>), pazienti sovrappeso (intervallo BMI: 25,0-29,9 kg/m<sup>2</sup>) e pazienti obesi (BMI: > di 30,0 kg/m<sup>2</sup>)<sup>a</sup> - La Vignera S. et al 2012**

	Controlli (n=50)		Sovrappeso (n=50)		Obesi (n=50)	
Volume, in ml	3,2	± 0,6	3,3	± 0,4	3,3	± 0,8
Densità nemaspermica, x 10 <sup>6</sup> /ml	66,0	± 5,3	68,2	± 11,0	57,9	± 9,7
Numero totale di spermatozoi, x 10 <sup>6</sup> /eiaculato	211,1	± 30,2	225,1	± 44,4	191,7	± 26,4
Motilità progressiva, % (a+b)	48,4	± 4,4	20,2	± 4,0 <sup>b</sup>	23,2	± 6,0 <sup>b</sup>
Forme normali, %	26,2	± 4,4	22,3	± 3,4	11,0	± 2,8 <sup>bc</sup>
Leucociti, x 10 <sup>6</sup> /ml	0,84	± 0,08	0,66	± 0,068	0,69	± 0,37
LH, IU/L	2,7	± 0,6	3,1	± 0,8	3,2	± 0,7
FSH, IU/L	4,4	± 1,4	4,1	± 1,2	4,3	± 1,6
Testosterone totale, µg/l	6,6	± 0,7	6,2	± 0,5	5,8	± 0,8
17 β-estradiolo, ng/l	21,2	± 2,3	33,8	± 3,8 <sup>b</sup>	49,8	± 7,3 <sup>b</sup>
SHBG, µmol/l	11,8	± 1,7	21,2	± 1,6 <sup>b</sup>	23,9	± 3,3 <sup>b</sup>

Abbreviazioni: BMI, body mass index; LH, ormone luteinizzante; FSH, ormone follicolo stimolante; SHBG, globulina legante gli ormoni sessuali

<sup>a</sup> Valori ormonali normali: LH = 1,7-8,6 IU/L; FSH = 1,5-12,4 IU/L; Testosterone totale = 2,7-9,6 µg/l; 17 β-estradiolo = 10-70 ng/l; SHBG = 11-52 µmol/l

<sup>b</sup> P < .05 vs controlli

<sup>c</sup> P < .05 vs pazienti sovrappeso

il campione costituito da uomini francamente obesi ha evidenziato una percentuale significativamente più alta di spermatozoi con basso MMP rispetto ai controlli (p<0,05, ANOVA seguito dal test di Duncan) e la percentuale di spermatozoi con basso MMP negli uomini obesi è risultata significativamente più alta rispetto a quanto rilevato negli

uomini con condizione di sovrappeso ( $p < 0,05$ , ANOVA seguita dal test di Duncan; Figura 1).

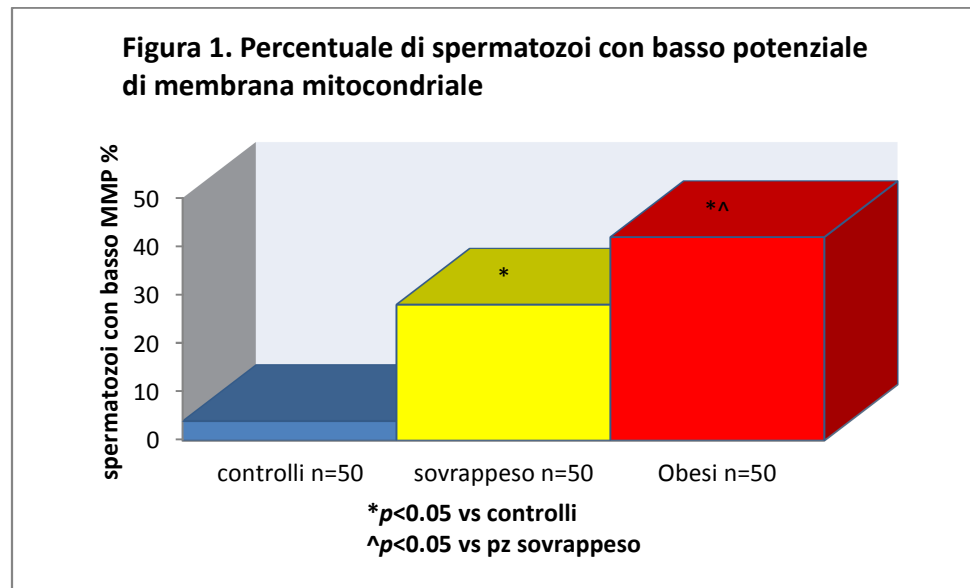


Figura 1. Percentuale di spermatozoi con basso potenziale di membrana mitocondriale (MMP) in normopeso sani (controlli, intervallo BMI: 19,0-24,9 kg/m<sup>2</sup>) uomini in sovrappeso (intervallo BMI: 25,0-29,9 kg/m<sup>2</sup>), ed obesi (BMI: > di 30,0 kg/m<sup>2</sup>).

La percentuale di spermatozoi con esternalizzazione della PS è risultata anche in questo caso significativamente più alta negli uomini in sovrappeso e obesi, ma solo in quest'ultimo gruppo la differenza ha raggiunto una significatività statistica ( $p < 0,05$ , ANOVA seguito dal test di Duncan, figura 2, istogramma in blu).

Allo stesso modo, la percentuale di spermatozoi vivi, valutati con il sistema annessina V/PI test e citometria a flusso, è risultata significativamente ridotta solo negli uomini obesi rispetto a entrambi gli altri gruppi, ovvero al gruppo di controllo ed al gruppo di soggetti in sovrappeso sani ( $p < 0,05$ , ANOVA seguito dal test di Duncan, figura 2, istogramma in rosso).

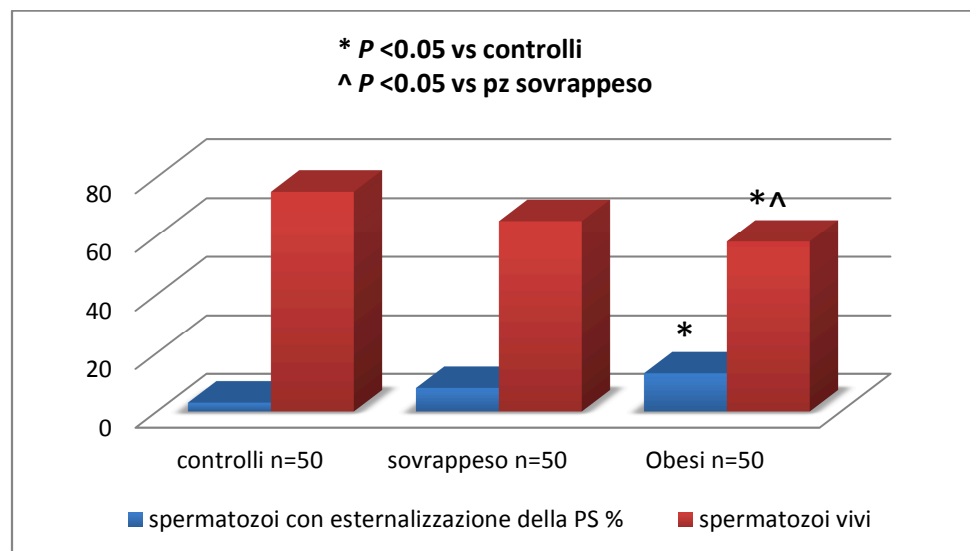


Figura 2. Percentuale di spermatozoi con esternalizzazione della fosfatidilserina (PS; istogrammi in blu) o vitali (cellule annexina e ioduro di propidio negative, istogrammi in rosso) in pazienti sani di peso normale (controlli, intervallo BMI: 19,0-24,9 kg/m<sup>2</sup>), in uomini in sovrappeso (intervallo BMI: 25,0-29,9 kg/m<sup>2</sup>), ed in uomini francamente obesi (BMI: > 30,0 kg/m<sup>2</sup>).

La percentuale di spermatozoi con cromatina caratterizzata da un basso grado di compattazione ha mostrato valori sensibilmente

più elevati negli uomini in sovrappeso ed obesi rispetto ai controlli ( $p < 0,05$ , ANOVA seguito dal test di Duncan, Figura 3, istogramma in verde), mentre la percentuale di spermatozoi con DNA frammentato è stata riscontrata in percentuale tangibilmente superiore solo negli uomini obesi rispetto ai controlli ed agli uomini in sovrappeso ( $p < 0,05$ , ANOVA seguito dal test di Duncan, Figura 3, istogramma in arancio).

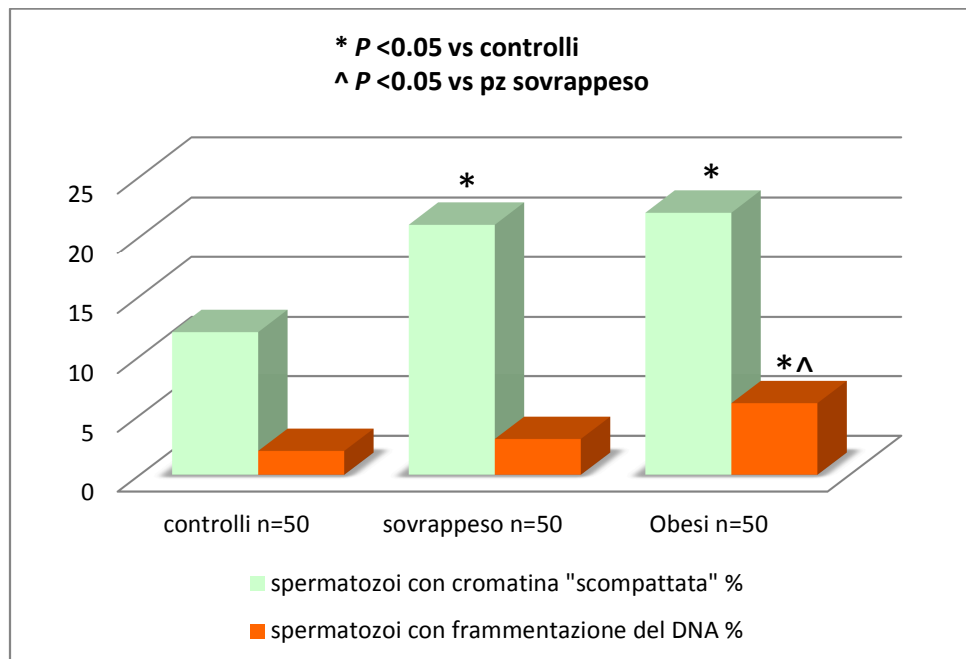


Figura 3. Percentuale di spermatozoi con cromatina "scompattata" (istogramma in verde) e di frammentazione del DNA (istogramma in arancio) in pazienti sani e con peso normale (controlli, intervallo BMI: 19,0-24,9 kg/m<sup>2</sup>), in uomini in sovrappeso (intervallo BMI: 25,0-29,9 kg/m<sup>2</sup>), ed in uomini francamente obesi (BMI: >30,0 kg/m<sup>2</sup>).

## **DISCUSSIONE**

In questo studio, abbiamo esaminato le caratteristiche e la qualità del liquido seminale di uomini con condizione metabolica di sovrappeso e obesi nei quali non è stata preliminarmente identificata una concomitante causa sistemica o endocrina potenziale causa di alterazione dei parametri seminali. I soggetti arruolati sono stati sottoposti ad un approfondito studio clinico in aggiunta ad uno specifico iter di valutazione laboratoristica e strumentale. I risultati hanno confermato che i soggetti in sovrappeso e, in misura maggiore, gli uomini obesi presentano riduzione della motilità progressiva degli spermatozoi e minore percentuale di spermatozoi con regolare morfologia rispetto a uomini sani di peso normale. Inoltre, abbiamo dimostrato per la prima volta che gli uomini sovrappeso ed obesi presentano una maggiore percentuale di spermatozoi con basso MMP ed esternalizzazione di PS, quest'ultimo specifico marcatore di

apoptosi cellulare precoce. Il grado di compattazione cromatinica è anch'esso palesemente diminuito in entrambi i gruppi rappresentati da pazienti in sovrappeso ed obesi. Infine, la percentuale di spermatozoi con DNA frammentato è risultata significativamente più alta solo negli uomini francamente obesi.

Diversi parametri spermatici convenzionali (volume del liquido seminale, concentrazione di spermatozoi, numero totale di spermatozoi, percentuale di spermatozoi mobili, e percentuale di spermatozoi con morfologia normale) hanno mostrato una correlazione numerica inversa rispetto al BMI in un ampio campione di reclute militari danesi, con minori valori positivi osservati negli uomini con un BMI o inferiore a  $20 \text{ kg/m}^2$  o superiore a  $25 \text{ kg/m}^2$ <sup>(5)</sup>.

Da uno studio finalizzato a valutare i fattori associati alla alterazione dei parametri spermatici tra le coppie che si sono rivolte ad



un centro specializzato per riproduzione medicalmente assistita (PMA) è emerso che la prevalenza dell'obesità tra i partners maschili era 3 volte superiore a quella degli uomini di coppie caratterizzate un fattore infertilità idiopatica o femminile<sup>(8)</sup>. In un altro studio è stato stimato che la concentrazione spermatica e il numero totale di spermatozoi tra gli uomini con BMI > di 25 kg/m<sup>2</sup> sono stati rispettivamente pari al 26,1% ed al 23,9% in meno, rispetto ai controlli con un BMI compreso tra i 20 ed i 25 kg/m<sup>2(7)</sup>. E ancora, in un altro studio in precedenza citato, la frequenza di oligozoospermia è stata del 29% tra gli uomini in sovrappeso rispetto al 21,7% riscontrato nel gruppo di riferimento normopeso<sup>(6)</sup>. Una ricerca retrospettiva condotta su 26000 gravidanze, ha registrato un rischio relativo per infertilità pari a 1,20 per uomini in sovrappeso e di 1,36 per gli uomini obesi rispetto agli uomini con un più basso indice di massa corporea tendente alla normalità<sup>(9)</sup> in

accordo alle risultanze di un altro lavoro scientifico, anch'esso indicato in precedenza<sup>(10)</sup>, che ha evidenziato come l'incidenza di oligozoospermia e astenozoospermia aumenterebbe con l'aumento del BMI. Una ulteriore conferma su questo specifico tema scaturisce da uno studio condotto su 35 soggetti obesi nei quali la quantità totale di spermatozoi era significativamente più bassa rispetto ai 188 uomini (controlli) con un BMI < a 30 kg/m<sup>2</sup><sup>(11)</sup>. Inoltre, il BMI correla positivamente con la morfologia degli spermatozoi anormali e negativamente con la concentrazione e la motilità degli spermatozoi in uomini obesi sia fertili che non<sup>(12)</sup>.

Tuttavia, anche se molti studi hanno indagato l'effetto del peso corporeo sui parametri spermatici convenzionali<sup>(5-8,10,11 e 16)</sup>, pochi tra questi hanno preso in considerazione gli effetti possibili sui parametri spermatici non convenzionali<sup>(24,26)</sup>. L'indice di

frammentazione del DNA (DNA Fragmentation Index o DFI), valutato mediante lo studio della cromatina spermatica, ha espresso valori significativamente più alti negli uomini in sovrappeso e obesi rispetto a quanto riscontrato negli uomini di peso normale. Nessuna differenza significativa è stata trovata tra i gruppi in sovrappeso e obesi mentre l'analisi di regressione lineare ha rivelato una relazione significativa e positiva tra BMI e DFI<sup>(24)</sup>. Nel corso dello sviluppo di un ulteriore studio, anch'esso oggetto di precedente citazione<sup>(26)</sup>, è stato determinato che negli uomini obesi è riscontrabile un maggior numero di spermatozoi con evidenti danni al DNA, valutato mediante test COMET, rispetto ai controlli (uomini normopeso). I risultati di queste ricerche sono in larga parte sovrapponibili ai risultati del presente studio che, pur comprendendo un numero minore di pazienti, ha esteso la valutazione degli effetti dell'eccesso ponderale sulla funzione mitocondriale degli

spermatozoi, sul grado di esternalizzazione della PS, segno precoce di apoptosi, e sul grado di integrità della cromatina. Un'altra caratteristica importante di questa casistica è la rigorosa selezione dei pazienti valutati. Tutto questo grazie ad un iter clinico-diagnostico meticoloso, che ha consentito di arruolare esclusivamente uomini in sovrappeso e obesi senza alcuna altra condizione nota e/o identificabile possibile causa di anomalie a carico del liquido seminale. Questa selezione accurata, escludendo a priori altre potenziali cause, suggerisce ed avvalorata l'ipotesi di una possibile relazione di causa ed effetto tra BMI e parametri spermatici convenzionali e non convenzionali.

I parametri biofunzionali degli spermatozoi valutati in questo studio sono importanti indicatori della qualità spermatica<sup>(35)</sup> con particolare riferimento all'integrità del DNA spermatico<sup>(36)</sup>. I dati registrati indicano chiaramente che solo una piccola percentuale di

spermatozoi negli uomini normali mostra un DNA frammentato<sup>(37)</sup>. Tre principali teorie cercano di spiegare i meccanismi che generano queste anomalie: una maturazione incompleta nel corso della spermiogenesi, un aumento dello stress ossidativo, e l'innescamento di una apoptosi incontrollata<sup>(38)</sup>. La frammentazione del DNA spermatico che noi (in accordo alla produzione scientifica prodotta da altri autori sullo specifico argomento)<sup>(24,26)</sup> abbiamo riscontrato in pazienti francamente obesi, indica che l'eccesso ponderale potrebbe essere una condizione che determina l'innescamento di processi di apoptosi. Tale ipotesi potrebbe essere sostenuta dall'osservazione che gli uomini in sovrappeso presentano una percentuale simile di spermatozoi con frammentazione del DNA rispetto agli uomini di peso normale, mentre mostrano un aumento del numero di spermatozoi con basso MMP e/o caratterizzati da fenomeni di esternalizzazione della PS. L'alterazione della MMP

anticipa l'esposizione della PS sul foglietto esterno della membrana plasmatica, un segnale potenzialmente reversibile, che da l'avvio alla cascata di eventi che portano in successione e come effetto finale ai processi di frammentazione del DNA<sup>(38)</sup>. Ulteriori possibili meccanismi scatenanti riconoscono un importante ruolo alle noxae determinate dallo stress ossidativo ed un controllo ormonale alterato<sup>(4,39-42)</sup>.

L'accumulo di radicali liberi dell'ossigeno<sup>(43)</sup>, l'elevato tasso di estrogeni circolanti<sup>(44)</sup>, ed i bassi livelli di gonadotropine sieriche<sup>(41)</sup> potrebbero essere potenziali obiettivi di nuove strategie terapeutiche.

Uomini sani in sovrappeso e obesi hanno una peggiore motilità progressiva, peggiori caratteristiche morfologiche degli spermatozoi unitamente ad uno scadimento dei parametri spermatici non convenzionali, compresi l'integrità del DNA e della cromatina e,

per la prima volta oggetto di valutazione, della funzione mitocondriale, nel confronto con i parametri seminologici di uomini in normopeso.

Considerato pertanto il ruolo assai rilevante svolto da tali parametri nel determinismo di eventuali problemi di fertilità di coppia, si suggerisce di includere un programma di riduzione del peso corporeo tra i percorsi terapeutici volti a contrastare l'infertilità maschile.

## BIBLIOGRAFIA

1. World Health Organization. *Obesity and Overweight. Fact Sheet*. N8311. Geneva, Switzerland: World Health Organization (2006).
2. Ministero della Salute *Raccomandazioni per la diagnosi e il trattamento ambulatoriale dell'obesità essenziale in età evolutiva*. 2004-2014.
3. Boyd A Swinburn, Gary Sacks, Kevin D Hall, Klim McPherson, Diane T Finegood, Marjory L Moodie, Steven L Gortmaker. *The global obesity pandemic: shaped by global drivers and local environments*. Lancet 2011; 378: 804–14.
4. Du Plessis SS, Cabler S, McAlister DA, Sabanegh E, Agarwal A. *The effect of obesity on sperm disorders and male infertility*. Nat Rev Urol. 2010;7:153–161.
5. Jensen TK, Andersson AM, Jørgensen N, Andersen AG, Carlsen E, Petersen JH, Skakkebaek NE. *Body mass index in relation to semen quality and reproductive hormones among 1558 Danish men*. Fertil Steril. 2004;82:863–870.
6. Fejes I, Koloszar S, Szollosi J, Zavaczki Z, Pal A. *Is semen quality affected by male body fat distribution?* Andrologia. 2005;37:155–159.
7. Koloszar S, Fejes I, Zavacki Z, Daru J, Szollosi J. *Effect of body weight on sperm concentration in normozoospermic males*. Arch Androl. 2005;51:299–304.
8. Magnúsdóttir EV, Thorsteinsson T, Thorsteinsdóttir S, Heimisdóttir M, Ólafsdóttir K. *Persistent organochlorines, sedentary occupation, obesity and human male subfertility*. Hum Reprod. 2005; 20:208–215.
9. Nguyen RH, Wilcox AJ, Skjaerven R, Baird D. *Men's body mass index and infertility*. Hum Reprod. 2007;22:2488–2493.
10. Hammoud AO, Wilde N, Gibson M, Parks A, Carrell DT, Meikle AW. *Male obesity and alteration in sperm parameters*. Fertil Steril. 2008;90:2222–2225.
11. Stewart TM, Liu DY, Garret C, Jørgensen N, Brown EH, Baker HW. *Associations between andrological measures, hormones and semen quality in fertile Australian men: inverse relationship between obesity and sperm output*. Hum Reprod. 2009;24:1561–1568.
12. Hofny ER, Ali ME, Abdel-Hafez HZ, Kamal Eel-D, Mohamed EE, Abd El-Azeem HG, Mostafa T. *Semen parameters and hormonal profile in obese fertile and infertile males*. Fertil Steril. 2010;94: 581–584.
13. Fatima Hammiche, Joop S.E. Laven, John M. Twigt, Willem P.A. Boellaard, Eric A.P. Steegers, and Regine P. Steegers-Theunissen. *Body mass index and central adiposity are associated with sperm quality in men of subfertile couples*. Human Reproduction, Vol.27, No.8 pp. 2365–2372, 2012.
14. Belloc S, Cohen-Bacrie M, Amar E, Izard V, Benkhalifa M, Dalléac A, de Mouzon J. *High body mass index has a deleterious effect on semen*



- parameters except morphology: results from a large cohort study.* Fertil Steril. 2014 Nov;102(5):1268-73. doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.07.1212. Epub 2014 Sep 12.
15. Zorn B, Osredkar J, Meden-Vrtovec H, Majdic G. *Leptin levels in infertile male patients are correlated with inhibin B, testosterone and SHBG, but not with sperm characteristics.* Int J Androl. 2007;30:439–444.
  16. Aggerholm AS, Thulstrup AM, Toft G, Ramlau-Hansen CH, Bonde JP. *Is overweight a risk factor for reduced semen quality and altered serum sex hormone profile?* Fertil Steril. 2008;90:619–626.
  17. Duits FH, van Wely M, van der Veen F, Gianotten J. *Healthy overweight male partners of subfertile couples should not worry about their semen quality.* Fertil Steril. 2010;94:1356–1359.
  18. MacDonald AA, Herbison GP, Showell M, Farquhar CM. *The impact of body mass index on semen parameters and reproductive hormones in human males: a systematic review with meta-analysis.* Hum Reprod Update. 2010; 16:293 – 311.
  19. N. Sermondade, C. Faure, L. Fezeu, A.G. Shayeb, J.P. Bonde, T.K. Jensen, M. Van Wely, J. Cao, A.C. Martini, M. Eskandar, J.E. Chavarro, S. Koloszar, J.M. Twigt, C.H. Ramlau-Hansen, E. Borges Jr, F. Lotti, R.P.M. Steegers-Theunissen, B. Zorn, A.J. Polotsky, S. La Vignera, B. Eskenazi, K. Tremellen, E.V. Magnusdottir, I. Fejes, S. Herberg, R. Levy, and S. Czernichow. *BMI in relation to sperm count: an updated systematic review and collaborative meta-analysis.* Human Reproduction Update, Vol.19, No.3 pp. 221–231, 2013.
  20. Rybar R, Kopecka V, Prinosilova P, Markova P, Rubes J. *Male obesity and age in relationship to semen parameters and sperm chromatin integrity.* Andrologia. 2011;43:286–291.
  21. Dandona P, Aljada A, Chaudhuri A, Mohanty P, Garg R. *Metabolic syndrome: a comprehensive perspective based on interactions between obesity, diabetes, and inflammation.* Circulation. 2005;111:1448–1454.
  22. Tremellen K. *Oxidative stress and male infertility - a clinical perspective.* Hum Reprod Update. 2008;14:243-58.
  23. Lanzafame FM, La Vignera S, Vicari E, Calogero AE. *Oxidative stress and medical antioxidant treatment in male infertility.* Reprod Biomed Online. 2009;19:638–659.
  24. Kort HI, Massey JB, Elsner CW, Mitchell-Leef D, Shapiro DB, Witt MA, Roudebush WE. *Impact of body mass index on sperm quantity and quality.* J Androl. 2006;27:450–452
  25. Dupont C, Faure C, Sermondade N, Boubaya M, Eustache F, Clement P, Briot P, Berthaut I, Levy V, Cedrin-Durnerin I, Benzacken B, Chavatte-Palmer P and Levy R. *Obesity leads to higher risk of sperm DNA damage in infertile patients.* Asian Journal of Andrology (2013) 15, 622–625; doi:10.1038/aja.2013.65; published online 24 June 2013

26. Chavarro JE, Toth TL, Wright DL, Meeker JD, Hauser R. *Body mass index in relation to semen quality, sperm DNA integrity and serum reproductive hormone levels among men attending an infertility clinic.* Fertil Steril. 2009;93:2222–2231.
27. Calogero AE, Polosa R, Perdichizzi A, Guarino F, La Vignera S, Scarfia A, Fratantonio E, Condorelli R, Bonanno O, Barone N, Burrello N, D'Agata R, Vicari E. *Cigarette smoke extract immobilizes human spermatozoa and induces sperm apoptosis.* Reprod Biomed Online. 2009;19:564–571.
28. Hui Dai Lee, Hyo Serk Lee, Joong Shik Lee, Yong-Seog Park, Ju Tae Seo. *Do Cigarette Smoking and Obesity Affect Semen Abnormality in Idiopathic Infertile Males?* World J Mens Health. 2014 Aug;32(2):105-9. doi: 10.5534/wjmh.2014.32.2.105. Epub 2014 Aug 26.
29. Antonio Scotto di Frega, Brian Dale, Loredana Di Matteo and Martin Wilding. *Secondary male factor infertility after Roux-en-Y gastric bypass for morbid obesity: Case report.* Human Reproduction Vol.20, No.4 pp. 997–998, 2005.
30. Hammoud A, Gibson M, Hunt SC, Adams TD, Carrell DT, Kolotkin RL, and Meikle AW. *Effect of Roux-en-Y Gastric Bypass Surgery on the Sex Steroids and Quality of Life in Obese Men.* J Clin Endocrinol Metab, April 2009, 94(4):1329–1332.
31. Sermondade N, Massin N, Boitrelle F, Pfeffer J, Eustache F, Sifer C, Czernichow S, Lévy R. *Sperm parameters and male fertility after bariatric surgery: three case series.* Reprod Biomed Online. 2012 Feb;24(2):206-10. Epub 2011 Nov 3.
32. Reis LO, Zani EL, Saad RD, Chaim EA, De Oliveira LC, and Fregonesi A. *Bariatric Surgery Does not Interfere With Sperm Quality—A Preliminary Long-Term Study.* Reproductive Sciences 19(10) 1057-1062, 2012.
33. Lazaros L, Hatzi E, Markoula S, Takenaka A, Sofikitis N, Zikopoulos K and Georgiou I. *Dramatic reduction in sperm parameters following bariatric surgery: report of two cases.* Andrologia 2012, 44, 428–432.
34. Perdichizzi A, Nicoletti F, La Vignera S, Barone N, D'Agata R, Vicari R, Calogero AE. *Effects of tumour necrosis factor- $\alpha$  on human sperm motility and apoptosis.* J Clin Immunol. 2007;27:152–162.
35. Zini A, Libman J. *Sperm DNA damage: importance in the era of assisted reproduction.* Curr Opin Urol. 2006;16:428–434.
36. Agarwal A, Said TM. *Oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male infertility: a clinical approach.* BJU Int. 2005;95:503–507.
37. Cohen-Bacrie P, Belloc S, Menezo YJ, Clement P, Hamidi J, Benkhalifa M. *Correlation between DNA damage and sperm parameters: a prospective study of 1.633 patients.* Fertil Steril. 2009;91:1801–1805.
38. Zhang HB, Lu SM, Ma CY, Wang L, Li X, Chen ZJ. *Early apoptotic changes in human spermatozoa and their*

- relationships with conventional semen parameters and sperm DNA fragmentation.* Asian J Androl. 2008;10:227–235.
39. Coviello AD, Matsumoto AM, Bremner WJ, Hebst KL, Amory JK, Anawalt BD, Sutton PR, Wright WW, Brown TR, Yan X, Zirkin BR, Jarow JP. *Low-dose human chorionic gonadotropin maintains intratesticular testosterone in normal men with testosterone-induced gonadotropin suppression.* J Clin Endocrinol Metab. 2005;90:2595–2602.
40. Dandona P, Aljada A, Chaudhuri A, Mohanty P, Garg R. *Metabolic syndrome: a comprehensive perspective based on interactions between obesity, diabetes, and inflammation.* Circulation. 2005;111:1448–1454.
41. Pauli EM, Legro RS, Demers LM, Kunselman AR, Dodson WC, Lee PA. *Diminished paternity and gonadal function with increasing obesity in men.* Fertil Steril. 2008;90:346–351.
42. Sakkas D, Alvarez JG. *Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis.* Fertil Steril. 2010;93:1027–1036.
43. Bakos HW, Mitchell M, Setchell BP, Lane M. *The effect of paternal diet-induced obesity on sperm function and fertilization in a mouse model.* Int J Androl. 2010 Jul 23.
44. Kley HK, Deslaers T, Peerenboom H, Kruskemper HL. *Enhanced conversion of androstenedione to estrogens in obese males.* J Clin Endocrinol Metab. 1980;51:1128–1132.

