

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CATANIA
FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA
Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale
Dottorato di Ricerca in Biomedicina Traslazionale
XXIX Ciclo

Rosita Angela Condorelli

DIABETE MELLITO: UNA "NUOVA" CAUSA DI INFERTILITA'

=====
Tesi di Dottorato
=====

Relatore:
Chiar.mo Prof. Aldo E. Calogero

Anno Accademico 2015-2016

INDICE

Prevalenza ed eziopatogenesi del diabete mellito	Pag. 3
Effetti del diabete mellito sulla funzione riproduttiva	Pag. 4
▪ Le esigenze della società che cambia e l'evoluzione delle patologie	
▪ Il diabete mellito e i parametri convenzionali del liquido seminale	
▪ Il diabete mellito e i parametri non-convenzionali del liquido seminale	
▪ Aspetti biomolecolari	
Diabete mellito: meccanismi di danno tissutale e d'organo	Pag. 10
Diabete mellito: meccanismi di danno sulla funzione riproduttiva	Pag. 12
▪ Meccanismo pre-testicolare	
▪ Meccanismo testicolare	
- ruolo dello stress ossidativo	
- ruolo delle infezioni/inflammazioni	
▪ Meccanismo post-testicolare	
Scopo della tesi	Pag. 18
Pazienti e Metodi	Pag. 21
▪ Selezione della casistica	
▪ Esame standard del liquido seminale e conta leucocitaria mediante microscopia ottica	
▪ Valutazione dei parametri spermatici non convenzionali mediante citometria a flusso	
▪ Conta leucocitaria mediante tecnica citofluorimetrica	
▪ Determinazione diretta dei ROS nel liquido seminale	
▪ Analisi della perossidazione lipidica	
▪ Determinazione dei livelli di superossido mitocondriale	
▪ Determinazione sierica ormonale	
Risultati	Pag. 26
Discussione	Pag. 37
Bibliografia	Pag. 43

Prevalenza ed eziopatogenesi del diabete mellito

Alla luce degli ultimi dati dell'*International Diabetes Federation*, nel Mondo, più di 371 milioni di persone sono affette da diabete mellito (DM), con una prevalenza dell'8.3% (Guariguata, 2012). Le stime suggeriscono che tale numero è in continuo aumento in tutti i Paesi. In Europa, la prevalenza raggiunge i valori del 6.7% e nel 38.6% dei casi il DM non viene diagnosticato. Dunque, dei 55 milioni di diabetici, circa 21,2 milioni di essi non conoscono tale patologia in quanto non sanno di esserne affetti (Guariguata, 2012).

I dati riguardanti la popolazione italiana indicano che per ogni paziente diabetico si spendono mediamente 3507.22 dollari/anno per cure mediche. Se moltiplichiamo tale dato per 3.9 milioni di diabetici italiani, il risultato conferma la gravità di tale patologia sistemica, tanto da giustificare il termine “epidemia del diabete” (Guariguata, 2012). In particolare, circa il 90% di tutti i pazienti diabetici presenta DM tipo 2 (DM2), precedentemente denominato non-insulino dipendente.

Il DM2 ha un'etiopatogenesi ancora non del tutto chiara. Tale patologia interessa individui che presentano resistenza all'insulina e/o solitamente hanno carenza relativa (anziché assoluta) di insulina. Per tale motivo, quindi questi pazienti, almeno nelle fasi iniziali della malattia, possono non avere bisogno di essere sottoposti a trattamento insulinico. La secrezione di insulina è scarsa e insufficiente a compensare l'insulino-resistenza. Alla base di tutto emerge, però, una forte predisposizione genetica, della quale molti aspetti, alquanto complessi, restano ancora poco chiari.

Il DM tipo 1 (DM1) colpisce circa il 5-10% di tutti i pazienti con diabete e la sua eziopatogenesi è di natura autoimmunitaria nella maggior parte dei casi o idiopatica. Il danno autoimmunitario determina una distruzione delle cellule β -pancreatiche, secernenti insulina, che, quando il diabete si appalesa dal punto di vista clinico, sono già state danneggiate per più dell'80%.

Altre forme di DM sono rappresentate dal MODY, LADA e altri tipi, che però, nell'insieme rappresentano una percentuale piuttosto esigua di casi.

Effetti del diabete mellito sulla funzione riproduttiva

Le esigenze della società che cambia e l'evoluzione delle patologie

Osservando più da vicino i tassi di fertilità delle società moderne, è possibile notare come l'aumento della prevalenza del DM sia strettamente associato con il calo dei tassi di natalità e fecondità (Hamilton & Ventura, 2006; Lutz, 2006). Ciò è dovuto ad un aumento preoccupante degli uomini diabetici in età riproduttiva. Alla grande maggioranza dei pazienti con DM1, la malattia viene diagnosticata prima dei 30 anni (Agbaje et al., 2007) e il DM1, come pure il DM2 coinvolge un numero allarmante di bambini e adolescenti (Silink, 2002). Inoltre, le diete occidentali, le abitudini di vita e l'obesità nei giovani contribuiscono in modo rilevante all'insorgenza del DM2 in questa fascia di popolazione (Rosenbloom et al., 1999). In Giappone, gli adolescenti diabetici tipo 2 sono già quattro volte più numerosi del tipo 1 (Kitagawa et al., 1998) e, negli Stati Uniti, più di un terzo delle nuove diagnosi di DM coinvolge giovani adolescenti (Pinhas-Hamiel e Zeitler, 2005).

A ciò si aggiunge, in base ai dati ISTAT, che l'età di concepimento del primo figlio sia in notevole aumento rispetto agli anni passati. Dunque, la patologia sembra arrivare ancor prima del desiderio di gravidanza. L'interesse per la tematica "infertilità maschile e diabete" risulta senz'altro crescente, essendosi delineata e affrancata dalla semplicistica visione di legami generici tra diabete e riproduzione.

Una ricerca su Public Medline aggiornata al 24 maggio 2016, permette di rilevare 27.389 items inserendo come parole chiave di ricerca bibliografica "diabetes and reproduction" con la prima citazione risalente al 1949 (Munro et al., 1949). Sostituendo il termine "reproduction" con "infertility", il numero di items si riduce a 1408, e l'anno della prima citazione il 1959 (Staferi, 1959); infine introducendo come parola chiave di ricerca "diabetes and male infertility" sono accessibili 554 items, di cui la prima citazione risale all'anno 1962 (Rubin, 1962).

Il DM non è quindi una nuova causa di infertilità, sebbene l'interesse per questa associazione stia crescendo sempre più nella società moderna.

Il diabete mellito e i parametri convenzionali del liquido seminale

Diversi studi hanno esaminato gli effetti del DM sul controllo endocrino della spermatogenesi (Daubresse et al., 1978; Handelsman et al., 1985; Dinulovic & Radonjic, 1990; Garcia-Diez et al., 1991; Baccetti et al., 2002; Ballester et al., 2004). I risultati ottenuti, sono però contrastanti tra loro e le anomalie riportate correlano in maniera poco significativa con quadri di compromissione spermatica grave sostenuta dalla sola malattia diabetica (Sexton & Jarow, 1997). Tuttavia anche questo gruppo di

dati conferma il ruolo del DM nel determinismo di quadri di sub-fertilità sostenuti dalla stessa disfunzione sessuale-DM correlata.

Le osservazioni riguardo le alterazioni spermatiche sono limitate alla valutazione dei soli parametri convenzionali (volume dell'eiaculato, conta spermatica, motilità e morfologia), il cui specifico valore prognostico risulta peraltro limitato a prescindere (Jequier, 2005). Tali parametri sembrano essere alterati nei pazienti diabetici rispetto ai soggetti non diabetici (La Vignera et al., 2012; Bhattacharya et al., 2013). Studi condotti su diabetici di tipo 1 (Padron et al., 1984; Garcia-Diez et al., 1991) hanno messo in evidenza la riduzione complessiva dei parametri convenzionali del liquido seminale, e uno studio retrospettivo ha confermato che il numero di nuovi nati da pazienti affetti da DM1, siano essi uomini o donne, appare ridotto rispetto alla popolazione normale, sottolineando che esso dipenda anche dall'epoca di insorgenza del DM e dunque dalla durata di malattia (Sjöberg et al., 2013). Handelsman e colleghi (1985) hanno riscontrato solo una significativa riduzione del volume dell'eiaculato e del numero totale di spermatozoi nei diabetici. Uno studio condotto su una ampia casistica di pazienti diabetici di sesso maschile (Ali et al., 1993) ha mostrato un aumento della concentrazione e del numero totale di spermatozoi nei diabetici, una concomitante riduzione della motilità e nessuna differenza nella morfologia. Vignon e colleghi (1991) hanno invece evidenziato alterazioni morfologiche, in presenza di conta spermatica aumentata. Soltanto uno studio ha posto l'accento sul ruolo di altri fattori legati alla stessa malattia diabetica, quali: controllo glico-metabolico e neuropatia nel determinismo di

un potenziale impatto sui parametri convenzionali spermatici (Sexton & Jarow, 1997).

In generale, la maggior parte degli studi orientati a valutare i parametri convenzionali conducono verso una riflessione unitaria, la malattia diabetica, condiziona mediamente i valori standard rispetto la popolazione di controllo, senza tuttavia registrare dati oggettivamente patologici, almeno, facendo riferimento alle norme fornite dalla WHO.

Numerosi studi sono stati condotti su animali resi sperimentalmente diabetici (Frenkel et al., 1978; Murray et al., 1983; Cameron et al., 1990; Ballester et al., 2004; Scarano et al., 2006). Su modelli animali di ratti trattati con streptozotocina (STZ) è stata riportata una riduzione nella concentrazione e qualità spermatica (Ballester et al., 2004; Amaral et al., 2006; Scarano et al., 2006), probabilmente a causa dell'aumento dell'apoptosi delle cellule germinali (Wankeu-Nya et al., 2013), nel numero di spermatozoi di forma normale (Navarro-Casado et al., 2010). Alterazioni significative si riscontravano anche a carico del testicolo, con riduzione del peso testicolare delle cavie e dei livelli di testosterone totale circolanti (Navarro-Casado et al., 2010). Inoltre, un ridotto tasso di fecondità è stato osservato solo 15 giorni dopo la somministrazione di STZ (Scarano et al., 2006). Altri gruppi hanno riportato effetti simili dopo un periodo più lungo (2-6 mesi) di malattia (Frenkel et al., 1978; Cameron et al., 1990; Ballester et al., 2004). Il ridotto tasso di fertilità osservato è maggiormente pronunciato nei modelli di DM indotto in fase pre-puberale (Frenkel et al., 1978). Ratti Wistar, spontaneamente diabetici, mostrano anch'essi una

significativa riduzione dei parametri di fertilità, dimostrando pertanto che gli agenti diabetogeni non rappresentano un bias metodologico dei lavori descritti (Murray et al., 1983; Cameron et al., 1990).

Il diabete mellito e i parametri non convenzionali del liquido seminale

Un approccio alternativo di valutazione dell'impatto della malattia diabetica sulla funzione riproduttiva maschile è rappresentato dall'analisi delle alterazioni a carico del DNA nucleare e mitocondriale nel liquido seminale (Agarwall & Said, 2003; O'Brien & Zini, 2005; St. John et al., 2005). Nasce la necessità, pertanto di fornire un supporto molecolare alle evidenze cliniche contrastanti.

Il danno del DNA nel liquido seminale non sempre preclude la fertilità maschile (Aitken et al., 1998), tenendo anche conto della capacità riparativa del danno spermatico posseduta dall'ovocita (Genesca et al., 1992). L'eziologia del danno del DNA spermatico è senz'altro multifattoriale (difettoso assemblaggio cromatinico, apoptosi abortiva, stress ossidativo, alterazione dei meccanismi intrinseci di riparazione) (Agarwal & Said, 2003). Uno studio recente ha dimostrato come il DM1 possa influenzare l'espressione di geni coinvolti nella riparazione del DNA spermatico, determinando come effetto finale la frammentazione del DNA stesso (Mallidis et al., 2009).

Anche il danno del DNA mitocondriale è associato a infertilità, con correlazione spiccata per quadri di alterata motilità, che si spiega con un'alterazione della catena respiratoria mitocondriale, sostenuta dallo stress ossidativo (Lestienne et

al., 1997). Uno studio recente, condotto da Agbaje e collaboratori (2007), ha riportato che i pazienti diabetici hanno un tasso medio di frammentazione a carico del DNA nucleare e un numero di delezioni del DNA mitocondriale nemaspermico più alto rispetto ai controlli (Agbaje et al., 2007). Studi ancora più recenti confermano il dato dell'aumento della frammentazione del DNA spermatico e del danno mitocondriale attribuendolo allo stress ossidativo (La Vignera et al., 2012; Roessner et al., 2012); infatti altri autori hanno identificato alti livelli di prodotti finali di glicazione avanzata (AGE) e dei loro recettori a livello del tratto riproduttivo maschile (Mallidis et al., 2011).

Aspetti biomolecolari

La spermatogenesi è un processo dipendente dal metabolismo del glucosio (Zysk et al., 1975), anche se le concentrazioni di quest'ultimo sono basse all'interno dei tubuli seminiferi (Robinson & Fritz, 1981). Le cellule del Sertoli svolgono il ruolo cruciale in questo processo in quanto forniscono un supporto nutrizionale alle cellule della spermatogenesi. Esse sono in grado di produrre lattato a concentrazioni elevate che viene consumato, insieme al piruvato dagli spermatociti in fase di pachitene e dagli spermatidi rotondi (Robinson et al., 1981). Il trasporto di glucosio all'interno di tali cellule avviene mediante i trasportatori GLUT1, GLUT3 e GLUT 8 (Galardo et al., 2008).

La comprensione delle basi molecolari del metabolismo del glucosio e l'importanza dei suoi prodotti nel testicolo, va al di là del semplice apporto

nutrizionale. Infatti, il processo di capacitazione viene stimolato dal glucosio (Cappello et al., 2012) e i livelli di ATP, fondamentali per un'adeguata motilità spermatica, sono prevalentemente mantenuti dalla via glicolitica.

A ciò si aggiunge che le fluttuazioni glicemiche e insulinemiche determinano importanti alterazioni molecolari che hanno come effetto finale un'alterazione della salute riproduttiva degli uomini diabetici. In particolare, è stato dimostrato che l'insulina agisce a livello della membrana plasmatica spermatozoaria e dell'acrosoma così da sottomettere tali strutture al controllo ormonale insulinico (Silvestroni et al., 1992). Dunque, nelle condizioni di insulino-resistenza o di deficit insulinico il processo di spermatogenesi è alterato e biopsie derivanti da uomini diabetici rivelano alterazioni testicolari: vacuolizzazione delle cellule del Sertoli e delle cellule germinali, tubuli seminiferi depleti sebbene morfologicamente normali e cellule di Leydig con vacuoli e goccioline lipidiche e in numero piuttosto variabile. (Cameron et al., 1985).

Diabete mellito: meccanismi di danno tissutale e d'organo. Aspetti generali

Sia che si tratti di DM1, DM2 o di altre forme, le conseguenze a livello tissutale sono determinate dall'iperglicemia scatenata dalla condizione diabetica. È infatti quest'ultima la causa del danno vascolare e gli effetti correlano prevalentemente con la durata di malattia diabetica e con il grado di compenso glicometabolico del paziente.

Il DCCT (Diabetes Control and Complications Trial) e l'UKPDS (U.K. Prospective Diabetes Study) hanno identificato nell'iperglicemia la causa iniziale del danno ossidativo a livello dei tessuti. Sebbene questo processo venga modificato, sia da determinanti genetici della suscettibilità individuale, sia da fattori indipendenti acceleranti come l'ipertensione, i meccanismi che mediano gli effetti dell'iperglicemia responsabili del danno a livello tissutale sono stati descritti ormai da diverso tempo. I principali sono:

- aumento del flusso attraverso la via dei polioli;
- sintesi intracellulare di AGE;
- attivazione delle isoforme della proteina chinasi C;
- aumento dell'attività della via dell'esosamina.

Tutte queste vie conducono ad un aumento dello stress ossidativo e dunque, ad un'aumentata produzione di radicali liberi, fra i quali quelli a contenuto d'ossigeno (reactive oxygen species, ROS) come l'anione superossido (O_2^-) ed il perossido d'idrogeno (H_2O_2). La presenza di metalli di transizione liberi (soprattutto Fe^{++} e Cu^{++}) dà origine al radicale ossidrile (OH^-), particolarmente tossico e responsabile della perossidazione lipidica.

Una produzione di ROS è un evento fisiologico, conseguente alle reazioni biochimiche cellulari, soprattutto in quelle che utilizzano ossigeno per produrre energia. Tuttavia diverse condizioni o sostanze sono in grado di aumentare la produzione di ROS nella cellula e negli spazi extracellulari, determinando quadri

clinico-biochimici di patologia radicalica (Agarwal & Prabakaran, 2005). Affinché si instauri una condizione di patologia radicalica deve realizzarsi uno sbilanciamento (stress ossidativo) del rapporto tra fattori pro-ossidanti e fattori antiossidanti, locale e/o generalizzato, a livello di un tessuto o di uno o più organi. Una patologia radicalica può essere sostenuta da una effettiva iperproduzione di ROS, da una diminuzione delle difese antiossidanti, o probabilmente con maggiore frequenza, da entrambi i meccanismi.

Diabete mellito: meccanismi di danno sulla funzione riproduttiva

Il DM può potenzialmente determinare infertilità maschile a tre livelli: a) pre-testicolare; b) testicolare; e c) post-testicolare.

Meccanismo pre-testicolare

Già nel 1984, è stato riportato che la condizione clinica di DM sembra determinare un'alterazione nel rilascio di GnRH (Calvo et al., 1984). Successivamente tre studi epidemiologici hanno suggerito di considerare l'ipotestosteronemia quale fattore di rischio per insorgenza di DM, a causa dell'elevata frequenza di insulino-resistenza negli ipogonadici (MRFIT Cohort, MMAS e Rancho Bernardo Study). Inoltre, è anche dimostrato che il paziente con DM sviluppa ipogonadismo mediante un meccanismo centrale (l'iperleptinemia del soggetto sovrappeso o obeso altera la pulsatilità del rilascio del GnRH) (Chan & Mantzoros, 2001) e periferico (alterazione della funzionalità delle cellule di Leydig)

(Pitteloud et al., 2005) con conseguente riduzione dei livelli di testosterone circolanti.

Da studi animali su ratti resi sperimentalmente diabetici, è stato osservato che l'insulina, assente o poco attiva nel diabetico, regola la funzionalità testicolare con meccanismo indiretto, influenzando l'asse ipotalamo-ipofisi-testicolo e normalizzando i livelli di LH e testosterone, mentre non sembra svolgere alcuna azione a livello delle cellule del Sertoli che controllano la spermatogenesi (Schoeller et al., 2012).

Meccanismo testicolare

A tale livello, il DM determina: a) Aumento dello stress ossidativo (aumentata produzione di ROS nel liquido seminale) (Amaral et al., 2008); b) Frammentazione del DNA nemaspermico (Agbaje et al., 2007); c) Alterazione bioenergetica mitocondriale degli spermatozoi (Agbaje et al., 2007); e d) Prodotti di glicazione enzimatica (Mallidis et al., 2008).

Ruolo dello stress ossidativo

Le azioni svolte dai ROS non risultano sempre dannose: al contrario, basse concentrazioni devono essere presenti per poter contribuire al mantenimento della capacità fertilizzante dello spermatozoo (Gagnon et al., 1991; Aitken, 1997; Aitken, 1999) correlando positivamente con alcuni parametri/funzioni quali: fertilizzazione, reazione acrosomiale, motilità e capacitazione (Griveau & Le Lannou, 1997; Agarwal et al., 2004). Utilizzando modelli sperimentali *in vitro*, nei quali gli

spermatozoi maturi venivano posti in incubazione con bassi livelli di H_2O_2 , sono state osservate maggiori percentuali di capacitazione nemaspermica, reazione acrosomiale e fusione ovocitaria (de Lamirande et al., 1993; Griveau et al., 1994; Aitken, 1995; de Lamirande & Gagnon, 1995; Kodama et al., 1996).

Virtualmente ogni eiaculato umano contiene fonti produttrici di ROS (Aitken, 1995): leucociti e spermatozoi rappresentano le principali matrici cellulari di produzione (Garrido et al., 2004). Gli spermatozoi immaturi, caratterizzati dalla presenza di residui citoplasmatici sono un esempio di iperproduzione iuxta-spermatozoaria di ROS che si associa a prove di bassa biofunzionalità spermatica (Gomez et al., 1996). Diversi studi indicano che la presenza di residui citoplasmatici sia positivamente correlata con alta produzione di ROS mediata dall'enzima glucosio-6-fosfato-deidrogenasi (Aitken, 1999). La produzione spermatozoaria di ROS avviene a 2 livelli: a) membrana spermatozoaria [nicotinammide adenina dinucleotide fosfato (NADPH)]; b) mitocondrio (ossidazione NADPH-dipendente) (Gavella & Lipovac, 1992).

Tutte le componenti cellulari (lipidi, proteine, acidi nucleici, glicidi) sono potenziali target di azione lesiva dei ROS, quando questi superano la soglia minima di produzione. La durata di esposizione ed altri co-fattori extracellulari incidono sulla gravità del danno (temperatura, tensione di ossigeno, sistemi scavenger di difesa antiossidante). I ROS danneggiano gli acidi grassi polinsaturi (PUFA), costituenti essenziali della membrana degli spermatozoi, con una serie di reazioni biochimiche a cascata note come perossidazione lipidica (PL) (Kodama et al., 1996). Uno dei

prodotti di PL è la malonildialdeide, inizialmente utilizzata come marker indiretto di iperproduzione di ROS sulla componente lipidica delle membrane citoplasmatiche (Aitken et al., 1989; Aitken et al., 1994).

Alti tassi di ROS correlano inversamente con la motilità spermatica (Lenzi et al., 1993; Agarwal et al., 1994; Armstrong et al., 1999), ma il meccanismo attraverso cui si verifica l'alterazione di tale parametro non è del tutto noto. Una prima ipotesi indica il danno che si verifica a carico della glucosio 6-fosfato-deidrogenasi (G6PD) ad opera del H₂O₂ dopo diffusione intracellulare. Altra ipotesi è quella della ridotta fosforilazione delle proteine strutturali dell'assonema.

I ROS causano danno del DNA spermatico in termini di modificazioni strutturali a carico delle basi con produzione di basi con siti liberi, delezioni, riarrangiamenti cromosomici, singole o doppie rotture del DNA (Sakkas et al., 1999; Kemal Duru et al., 2000; Aitken & Krausz, 2001). I ROS possono anche causare mutazioni genetiche puntiformi e/o polimorfismi (Spiropoulos et al., 2002; Sharma et al., 2004). In presenza di danno del DNA spermatico di entità minima, lo spermatozoo è in grado di autoripararsi (Agarwal et al., 2007). L'ovocita possiede capacità ancora maggiori di riparare il danno del DNA spermatico (Agarwal et al., 2007). In presenza di un'alterazione genetica di grado maggiore, subentrano sul piano fisiopatologico apoptosi e frammentazione embrionaria (Aitken & Krausz, 2001). L'apoptosi è una risposta di tipo non-infiammatoria al danno tissutale caratterizzata da una serie di modificazioni morfologiche e biochimiche che culmina nell'eliminazione di spermatozoi anormali (Sakkas et al., 1999). Alti tassi di ROS

determinano il rilascio di proteine appartenenti al complesso funzionale del citocromo C e promuovono l'attivazione delle caspasi (sottotipi 9 e 3). E' bene ricordare tuttavia che l'apoptosi dello spermatozoo può avvenire anche attraverso un meccanismo di tipo ROS-indipendente che coinvolge proteine di superficie appartenenti al gruppo FAS (Lee et al., 1997).

Uno studio recente ha dimostrato la presenza di PL nel liquido seminale di pazienti diabetici soprattutto correlato al compenso glicometabolico. Paragonando, infatti, i livelli di malonildialdeide di pazienti diabetici con scarso compenso glicometabolico (HbA1c >10%) con quelli di pazienti diabetici ben compensati (HbA1c <7%) i primi risultavano essere più elevati in maniera statisticamente significativa (La Vignera et al., 2012). Inoltre, la determinazione del grado di PL negli spermatozoi umani è stata messa a punto grazie ad una sonda che viene incorporata nelle membrane biologiche e risponde all'attacco dei radicali liberi modificando il suo spettro di emissione e permettendo la sua identificazione e quantizzazione grazie alla metodica citofluorimetrica (Aitken et al., 2007).

Recentemente, l'attenzione della letteratura si è rivolta allo studio del superossido mitocondriale, radicale libero che si genera in seguito alla fosforilazione ossidativa nei mitocondri nemaspermici. Tale dato, associato a quello dell'avvenuta PL, nel liquido seminale di particolari gruppi di pazienti fornisce importanti spunti di ricerca, soprattutto alla luce delle sempre nuove terapie antiossidanti e della composizione differente di essi nelle diverse formulazioni.

Ruolo delle flogosi

I processi infettivi/inflammatori rappresentano una complicanza importante del DM e richiedono un aumento del fabbisogno insulinico. La patogenesi della maggiore predisposizione alle infezioni del diabetico non è del tutto nota. Si ritiene che il DM scarsamente controllato e di lunga durata, rappresenti una condizione di immunodeficienza acquisita. Tale dato è confermato da studi condotti *in vitro* e *in vivo*, che hanno dimostrato la presenza di numerose alterazioni della proliferazione, della migrazione e dell'attività antibatterica dei leucociti e dei macrofagi. Altro elemento che favorisce le infezioni è l'ischemia distrettuale, spesso presente, che favorisce lo sviluppo di flora micotica ed anaerobia rendendo meno efficace la terapia antibiotica sistemica.

Le infezioni di più frequente riscontro nei pazienti diabetici sono quelle del tratto urogenitale e delle ghiandole accessorie maschili (MAGI), con una prevalenza di circa il 43% (Condorelli et al., 2013) e si presentano in maniera silente e talvolta con sintomatologia aspecifica come dolore addominale, nausea e vomito. A causa del fatto che esse decorrono asintomatiche, l'evoluzione più frequente è la pielonefrite e l'ascesso perirenale. Recenti studi mostrano come l'associazione DM-MAGI amplifichi la risposta infiammatoria nel seme con notevole produzione di leucociti e ROS, senza talvolta alterare i parametri convenzionali del liquido seminale: ciò sembra favorire la maggiore estensione del processo infiammatorio e la sua cronicizzazione (La Vignera et al., 2009).

Meccanismo post-testicolare

Infine, lo spermatozoo deve percorrere le vie escrettrici e in tali sedi completare la sua maturazione. Sono stati descritti vari meccanismi attraverso i quali il DM possa causare danno spermatico e/o impedire l'emissione di liquido seminale:

- Cronicizzazione flogosi genitourinarie (Patterson & Andriole, 1997);
- Esaltata risposta citochinica (Guest et al., 2008);
- Alterata funzionalità vescicolare (La Vignera et al., 2006; La Vignera et al., 2011);
- Disfunzione erettile e/o eiaculatoria.

Il deficit erettile e l'eiaculazione retrograda sono complicanze abbastanza note della malattia diabetica (Braun et al., 2000). In assoluto, le disfunzioni di tipo eiaculatorio rappresentano la causa più frequente di infertilità nel maschio diabetico (Sexton & Jarow, 1997). Ali e colleghi (1993), valutando 314 uomini con DM2, hanno posto in evidenza un aumento della conta nemespermica contrapposta a bassa motilità, oltre che alterazioni del volume di plasma seminale, verosimilmente indicative di disfunzione vescicolare (Ali et al., 1993).

Scopo della tesi

Sulla base di queste premesse, lo scopo della tesi è stato quello di valutare la frequenza dell'infertilità maschile e i meccanismi di danno spermatico nei pazienti con DM di età compresa fra 18-45 anni. I campi di indagine hanno riguardato i seguenti parametri:

- la funzione spermatica (esame standard del liquido seminale e valutazione citofluorimetrica dei parametri non convenzionali del liquido seminale quali frammentazione del DNA nemaspermico, grado di vitalità, apoptosi precoce e apoptosi tardiva mediante il riscontro dei livelli di esternalizzazione della fosfatidilserina; valutazione del grado di condensazione cromatinica; studio del potenziale di membrana mitocondriale);
- la presenza di flogosi urogenitale utilizzando un iter diagnostico appropriato (La Vignera et al., 2013). Valutazione dei leucociti presenti nel liquido seminale dei pazienti con DM mediante tecnica citochimica che riconosce l'enzima perossidasi, caratteristico dei leucociti polimorfonucleati (WHO, 2010) e l'identificazione della formula leucocitaria nell'eiaculato (mediante analisi citofluorimetrica). È noto infatti che tradizionalmente i leucociti nell'eiaculato vengono contati mediante una procedura istochimica che identifica l'enzima perossidasi, caratteristico dei granulociti. Questa tecnica ha il vantaggio di essere di relativamente facile esecuzione, ma non individua i polimorfonucleati attivati che hanno rilasciato i loro granuli e tutti gli altri tipi di leucociti come linfociti, macrofagi e monociti, che non contengono perossidasi, né la presenza di altre sottoclassi di leucociti.

Recentemente, la valutazione delle sottopopolazioni leucocitarie nell'eiaculato sembra acquisire una rilevanza clinica sempre maggiore (Seshadri et al., 2011). Infatti, finora il solo dato ottenuto dall'analisi mediante microscopia ottica ci ha permesso di stabilire se l'infezione/infiammazione sia

presente o meno ma mai di definire la causa di essa (batterica, virale, acuta o cronica). È dunque, ad oggi impossibile ricreare il modello che comunemente si identifica su sangue periferico mediante esame emocromocitometrico della “formula leucocitaria”. A ciò si aggiunge il fatto che, talvolta gli esami microbiologici possono non riconoscere il germe in quanto presente ancora in moderate quantità, non identificando la sola flogosi, responsabile dell’aumento dello stress ossidativo e dunque delle conseguenze sopra riportate. La valutazione delle sottopopolazioni leucocitarie su liquido seminale rappresenta in campo andrologico un enorme passo avanti sia per la diagnosi che per l’eventuale terapia dei pazienti;

- la presenza di stress ossidativo nel liquido seminale nei pazienti arruolati nello studio, mediante valutazione del grado del superossido mitocondriale e del grado di PL da esso causata;
- la funzione sessuale di tali pazienti al fine di stabilire un legame con la condizione sintomatologica e per meglio valutare il quadro seminologico stesso (valutazione ecografica didimo-epididimaria prima e dopo eiaculazione per la valutazione del grado di svuotamento e contrattilità epididimaria e determinazione sierica in chemiluminescenza di testosterone totale, LH per identificare l’eventuale presenza di ipogonadismo e/o di disfunzione erettile, con tecnica immunoenzimatica.

Pazienti e Metodi

Selezione della casistica

Per raggiungere questi obiettivi, sono stati studiati 34 pazienti con DM1 e 55 pazienti con DM2, (secondo gli Standards of Medical Care in Diabetes, 2012) con storia di infertilità della durata >12 mesi, e un campione di 100 soggetti fertili sani “controllo normale”. I pazienti diabetici sono stati ulteriormente suddivisi in gruppi sulla base delle seguenti variabili:

- compenso glicometabolico (tre gruppi in base ai valori di HbA1c: buono se <7%, scarso se fra 7-10%, pessimo se >10%);
- durata della malattia (tre gruppi in base agli anni di malattia: breve se <5, intermedia se fra 5-10, lunga se >10).

Sono stati esclusi i pazienti con le seguenti condizioni: azoospermia di natura ostruttiva o non ostruttiva, elevati livelli sierici di FSH (>10 mUI/ml), anamnesi o presenza di patologia testicolare primitiva (criptorchidismo, orchite, varicocele) o ridotto volume testicolare (<12 ml secondo Prader), pazienti con accertata presenza di germi rilevabili alla spermicoltura, abitudine al fumo di sigaretta, consumo di alcolici, esposizione occupazionale a tossici di natura chimica, farmaci di comprovata spermiotossicità, insufficienza epatica e insufficienza renale e epatica.

Esame standard del liquido seminale e conta leucocitaria mediante microscopia ottica

L'esame del liquido seminale è stato eseguito secondo i criteri del Manuale della WHO del 2010.

Per la colorazione della perossidasi è stata impiegata la orto-toluidina. La soluzione di lavoro risulta composta da 1 ml di NH_4Cl , 1 ml di Na_2EDTA in tampone fosfato, 9 ml di orto-toluidina e una goccia di H_2O_2 al 30% in acqua distillata. Tale soluzione è stata utilizzata entro le 24 ore dalla preparazione, mescolando 0,1 ml di sperma con 0,9 ml di soluzione di lavoro, agitando per 2 minuti e lasciando riposare per 20-30 minuti a temperatura ambiente e agitando nuovamente. Le cellule perossidasi-positive si colorano di marrone, quelle perossidasi-negative rimangono incolori.

Valutazione dei parametri spermatici non convenzionali mediante citometria a flusso

Mediante citometria a flusso è possibile indagare i parametri biofunzionali dello spermatozoo e dunque fornire dati circa la funzionalità dei mitocondri (sede principale di formazione di ATP necessaria per il movimento flagellare), del DNA nemaspermico e della compattazione della doppia elica (processo importante quando lo spermatozoo deve trasferire il suo materiale genetico all'interno dell'ovocita) e della vitalità spermatica. Sono stati, dunque, esaminati:

- Frammentazione del DNA nemaspermico mediante saggio TUNEL. Il kit comunemente in uso è l'Apoptosis Mebstain kit (Beckman Coulter, IL, Milan, Italy). Il test TUNEL è basato sulla capacità dell'enzima TdT di riconoscere e legare le estremità 3'OH libere che si trovano a livello dei filamenti di DNA liberi e quindi interrotti. Tale enzima viene omesso nel controllo negativo, che ci permette di rilevare la esatta percentuale di cellule con DNA frammentato. Due metodi possono essere adottati sulla base del controllo negativo:
 - ❖ Threshold-setting (fissando una soglia sul controllo negativo)
 - ❖ Subtraction-blank (sottraendo l'istogramma del controllo negativo dal quello del campione in esame), da noi adottato.
- Valutazione della vitalità, apoptosi precoce e apoptosi tardiva nemaspermica mediante marcatura con Annessina V e ioduro di propidio (PI). La fosfatidilserina (PS), (che possiede alta affinità con l'annessina V) si trova nelle cellule vive nel compartimento interno della membrana plasmatica. La traslocazione dal compartimento interno a quello esterno riflette l'avvio di un processo di apoptosi precoce. Lo PI, quando aggiunto invece, non è in grado di oltrepassare la membrana plasmatica della cellula vitale, mentre si accumula all'interno delle cellule che presentano membrana plasmatica danneggiata. Ciò permette inoltre, la suddivisione delle cellule non più vitali (PI positive) con PS esternalizzata e quelle che si stanno avviando alla morte cellulare ma che ancora sono vitali.

- Grado di compattazione della cromatina nemaspermica mediante colorazione con PI. Lo PI entra all'interno delle cellule, dopo adeguata permeabilizzazione della membrana cellulare, e tanto più la cromatina è compatta tanto meno esso potrà legarsi ad essa. La fluorescenza viene dunque rilevata dallo citometro a flusso in proporzione alla quota non legata.
- Valutazione del potenziale di membrana mitocondriale (MMP) mediante colorazione con 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide (JC-1). Il JC-1 è la sonda più affidabile e specifica per la valutazione del potenziale di membrana mitocondriale. Nelle cellule con potenziale di membrana conservato, si trova in forma monomerica nel citosol (verde) e si accumula inoltre come aggregato nei mitocondri (all'interno dei quali penetra grazie alla carica negativa del potenziale di membrana intatto ed essendo lipofila) dove emette in arancio. Nelle cellule con potenziale di membrana alterato resta, invece, in forma monomerica nel citosol (verde) in quanto non può accumularsi all'interno del mitocondrio a causa del potenziale danneggiato.

Conta leucocitaria mediante tecnica citofluorimetrica

Le sottopopolazioni leucocitarie sono state identificate mediante esame citofluorimetrico grazie alla triplice marcatura mediante anticorpi monoclonali marcati e diretti verso antigeni di membrana specifici. In particolare, dopo liquefazione, 3 aliquote da 100 µl di liquido seminale sono state sottoposte a tre cicli

di lavaggi con PBS (phosphate buffered saline) con eliminazione del surnatante e risospesi in 1 ml di PBS. Successivamente:

- la prima aliquota marcata con Ab Anti CD45 (antigene pan leucocitario), Ab Anti CD14 e Ab Anti CD16 per la determinazione dei neutrofilo (coespressione di CD45 e CD16) e di monociti-macrofagi (coespressione di CD45 e CD14). Questi ultimi a loro volta, all'interno di tale gate, sono stati suddivisi in base alle dimensioni cellulari;
- la seconda aliquota marcata con Ab Anti CD45, Ab Anti CD3 e Ab Anti CD4 per la determinazione dei linfociti T helper;
- l'ultima aliquota marcata con Ab Anti CD45, Ab Anti CD3 e Ab Anti CD8 per la determinazione dei linfociti T suppressor.

Le altre popolazioni leucocitarie (basofili, eosinofili, linfociti B) dai dati in letteratura, non sono descritte in quanto le percentuali sembrano essere estremamente esigue.

Analisi della perossidazione lipidica

L'analisi della PL mediante citometria a flusso è resa possibile grazie alla sonda BODIPY (581/591) C₁₁, che dopo essersi incorporata nelle membrane cellulari, risponde all'attacco dei radicali liberi dell'ossigeno modificando il suo spettro di emissione dal rosso al verde. Tale spostamento di emissione viene visualizzato dal citofluorimetro che fornisce una stima del grado di perossidazione.

Determinazione dei livelli di superossido mitocondriale

I livelli di superossido mitocondriale nel liquido, sono stati rilevati mediante il MitoSOX red mitochondrial superoxide indicator (Barbonetti et al., 2013). Tale sonda, una volta penetrata all'interno dei mitocondri viene rapidamente ossidata dall'anione superossido (non dagli altri radicali liberi) e in seguito a tale processo la sonda diventa altamente fluorescente con rilevazione del segnale.

Determinazione sierica ormonale

I livelli di LH, testosterone totale e SHBG sono stati ottenuti mediante determinazione sierica in chemiluminescenza. Il dosaggio di inibina B mediante tecnica immunoenzimatica.

Risultati

Le caratteristiche dei pazienti arruolati sono elencate in Tabella 1.

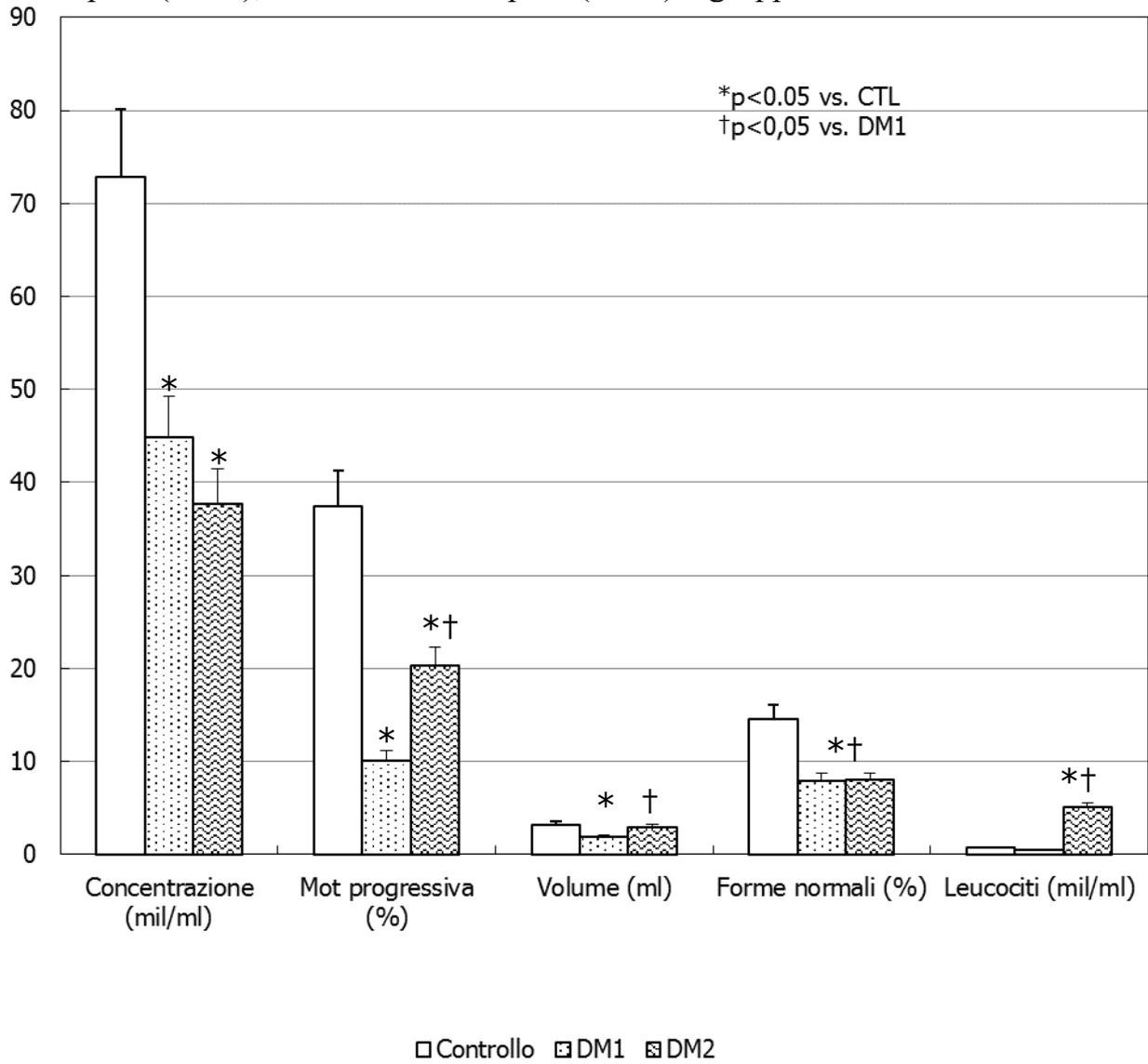
Tabella 1. Parametri antropometrici dei pazienti arruolati

	CTL (n=100)	DM1 (n=34)	DM2 (n=55)
Età	28.0±2.7	27.0±1.9	30.0±0.5
BMI (kg/m ²)	26.2±1.3	26.5±0.9	25.9±1.4
CV (cm)	95.0±2.8	94.0±2.2	95.0±3.4

Parametri convenzionali e non convenzionali del liquido seminale

I parametri spermatici convenzionali sono risultati significativamente diversi nei 3 gruppi esaminati. Infatti, i pazienti con DM1 e DM2 (Fig. 1) hanno mostrato una riduzione statisticamente significativa della concentrazione di spermatozoi rispetto al gruppo di controllo e i pazienti con DM2 hanno mostrato una concentrazione nemaspermica lievemente inferiore anche rispetto ai pazienti con DM1 (Fig. 1). La motilità progressiva è risultata significativamente ridotta nei pazienti con DM1 e DM2 rispetto ai controlli ($p < 0.05$). I pazienti con DM1 hanno fatto registrare una motilità progressiva significativamente più bassa rispetto ai pazienti con DM2 ($p < 0.05$) (Fig. 1). Il volume dell'eiaculato è risultato significativamente inferiore nei pazienti con DM1 ($p < 0.05$), ma sembra non subire variazioni significative nei pazienti con DM2 rispetto al gruppo di controllo ($p < 0.05$) (Fig. 1). I pazienti diabetici mostravano percentuali di spermatozoi di forma normale ridotte rispetto al gruppo di controllo ($p < 0.05$). Le concentrazioni di leucociti, perossidasi positivi alla microscopia ottica, risultavano essere significativamente più elevate nei pazienti con DM2 rispetto ai due gruppi ($p < 0.05$). (Fig. 1).

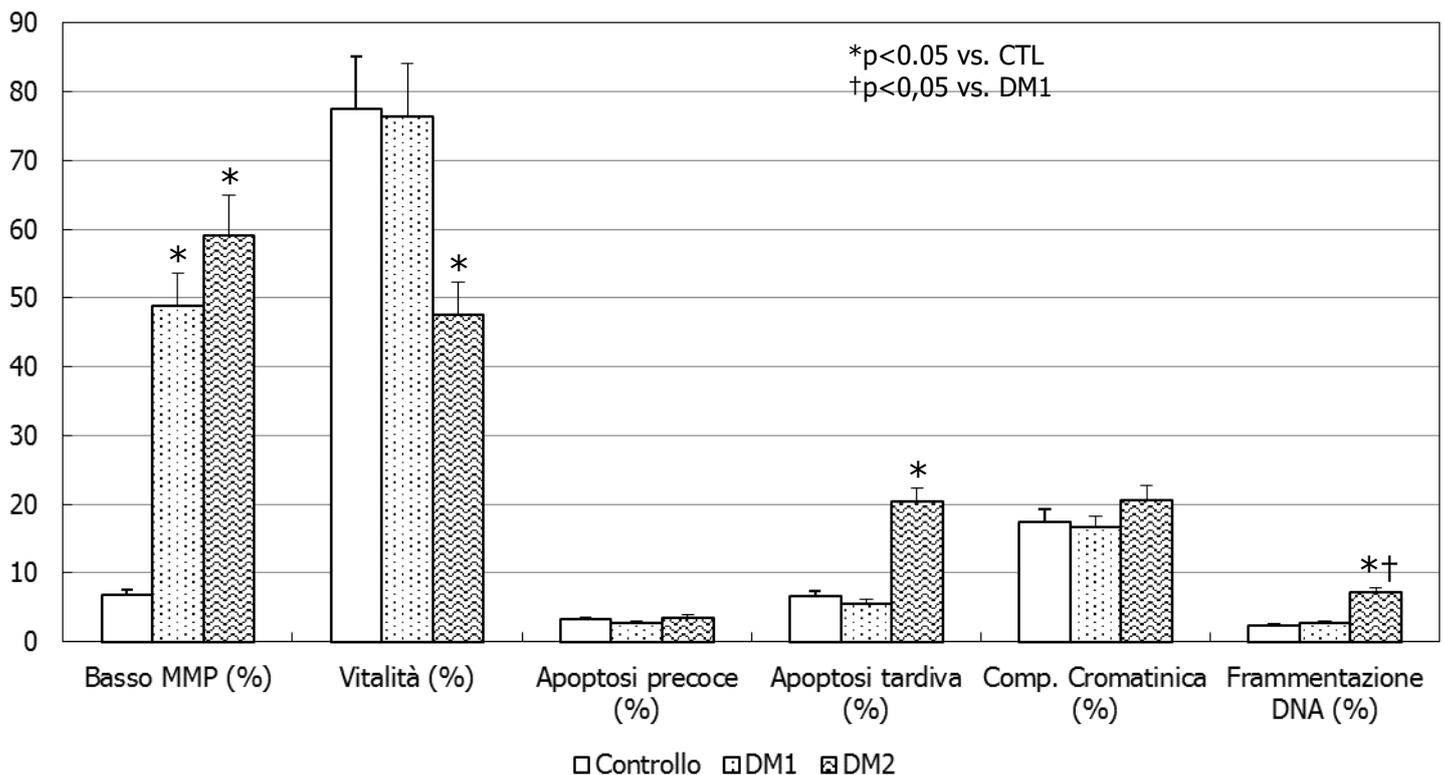
Figura 1. Parametri convenzionali del liquido seminale nei pazienti affetti da diabete mellito tipo 1 (DM1), diabete mellito tipo 2 (DM2) e gruppo di controllo



L'analisi dei parametri spermatici non convenzionali ha mostrato che la percentuale di spermatozoi con basso MMP è aumentata in maniera statisticamente significativa in entrambi i gruppi di pazienti diabetici ($p < 0.05$) (Fig. 2).

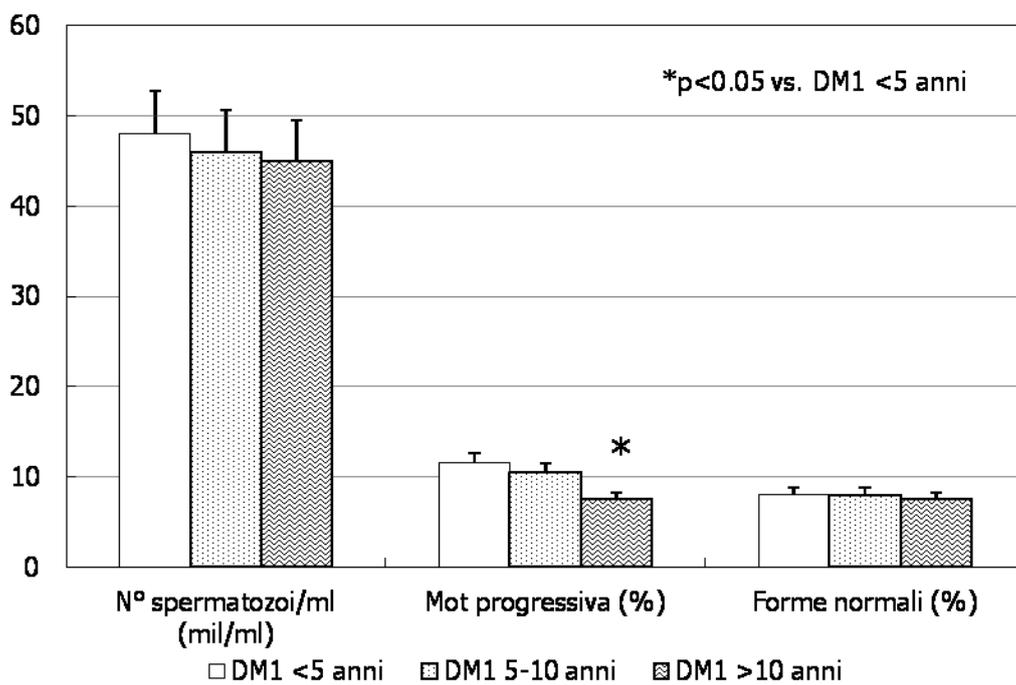
Solo i pazienti con DM2 hanno mostrato una riduzione significativa del grado di vitalità nemaspermica e un aumento dell'apoptosi tardiva rispetto al gruppo di controllo ($p < 0.05$), mentre nessuna variazione significativa si è avuta per parametri quali apoptosi precoce e grado di compattazione cromatinica. Infine, i pazienti con DM2 hanno registrato una percentuale maggiore di spermatozoi con frammentazione del DNA rispetto al gruppo di controllo e al gruppo di pazienti con DM1 ($p < 0.05$) (Fig. 2).

Figura 2. Parametri non convenzionali del liquido seminale nei pazienti affetti da diabete mellito tipo 1 (DM1), diabete mellito tipo 2 (DM2) e gruppo di controllo.



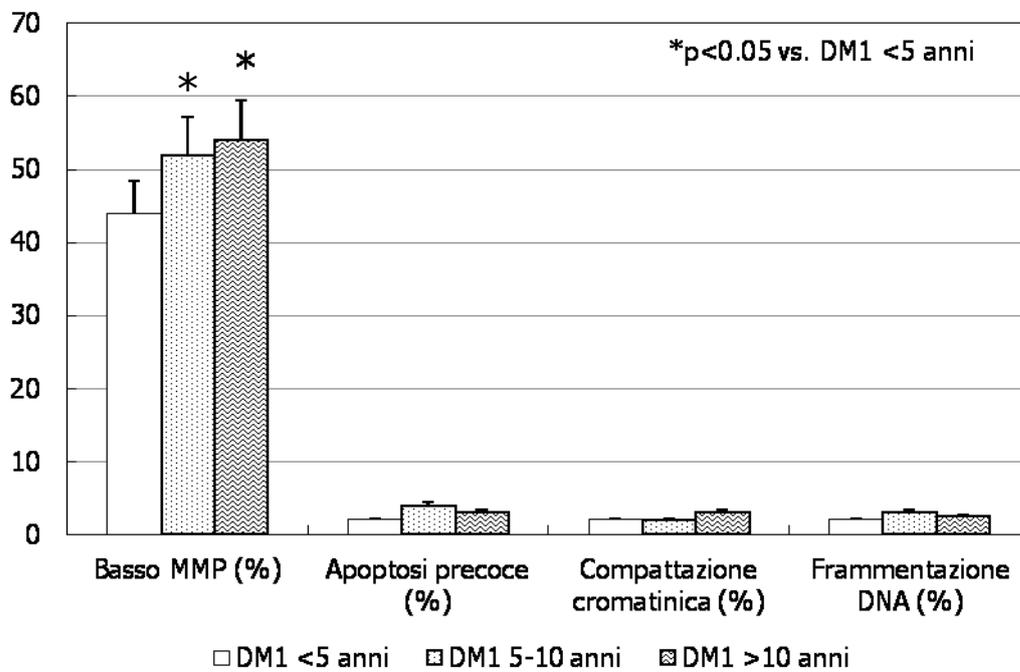
Quando suddivisi per durata di malattia, i pazienti con DM1 presentavano una motilità progressiva minore nei casi di lunga (>10 anni) durata di malattia rispetto agli altri due gruppi ($p < 0.05$). Gli altri parametri non risultavano statisticamente significativi (Fig. 3).

Figura 3. Parametri convenzionali del liquido seminale nei pazienti diabetici di tipo 1 suddivisi in base alla durata di malattia



Inoltre, di tutti i parametri non convenzionali nemaspermici esaminati, solo la percentuale di spermatozoi con basso MMP è risultata più alta nei pazienti con DM1 di più lunga durata raggiungendo la significatività statistica dopo 5 anni di malattia ($p < 0.05$). Gli altri parametri non variavano significativamente con la durata di malattia (Fig. 4)

Figura 4. Parametri non convenzionali del liquido seminale nei pazienti diabetici di tipo 1 suddivisi in base alla durata di malattia



I livelli di HbA1c dei pazienti con DM1 non sono risultati essere correlati con nessuno dei parametri esaminati (dati non mostrati).

Parametri citofluorimetrici di flogosi uro-genitale

Nel gruppo di pazienti con DM2 è stata eseguita la conta leucocitaria per la valutazione delle sottopopolazioni leucocitarie. La percentuale di neutrofili e monociti-macrofagi è risultata simile nel gruppo di pazienti con DM2 rispetto al gruppo di controllo, mentre si registrava una riduzione statisticamente significativa della percentuale di linfociti T helper nel liquido seminale e un aumento di quella dei linfociti T suppressor nei DM2 rispetto ai soggetti di controllo ($p<0.05$) (Fig. 5).

Indici di stress ossidativo

Il grado di PL risultava essere maggiore nel gruppo di DM2 rispetto al gruppo di controllo e al gruppo di pazienti con DM1 ($p<0.05$), mentre le concentrazioni di superossido mitocondriale risultavano essere maggiori nei diabetici rispetto al gruppo di controllo, e nel gruppo di pazienti con DM2 maggiori rispetto a quelle del DM1 ($p<0.05$) (Fig. 6).

Figura 5. Sottopopolazioni leucocitarie nel liquido seminale di pazienti con diabete mellito tipo 2

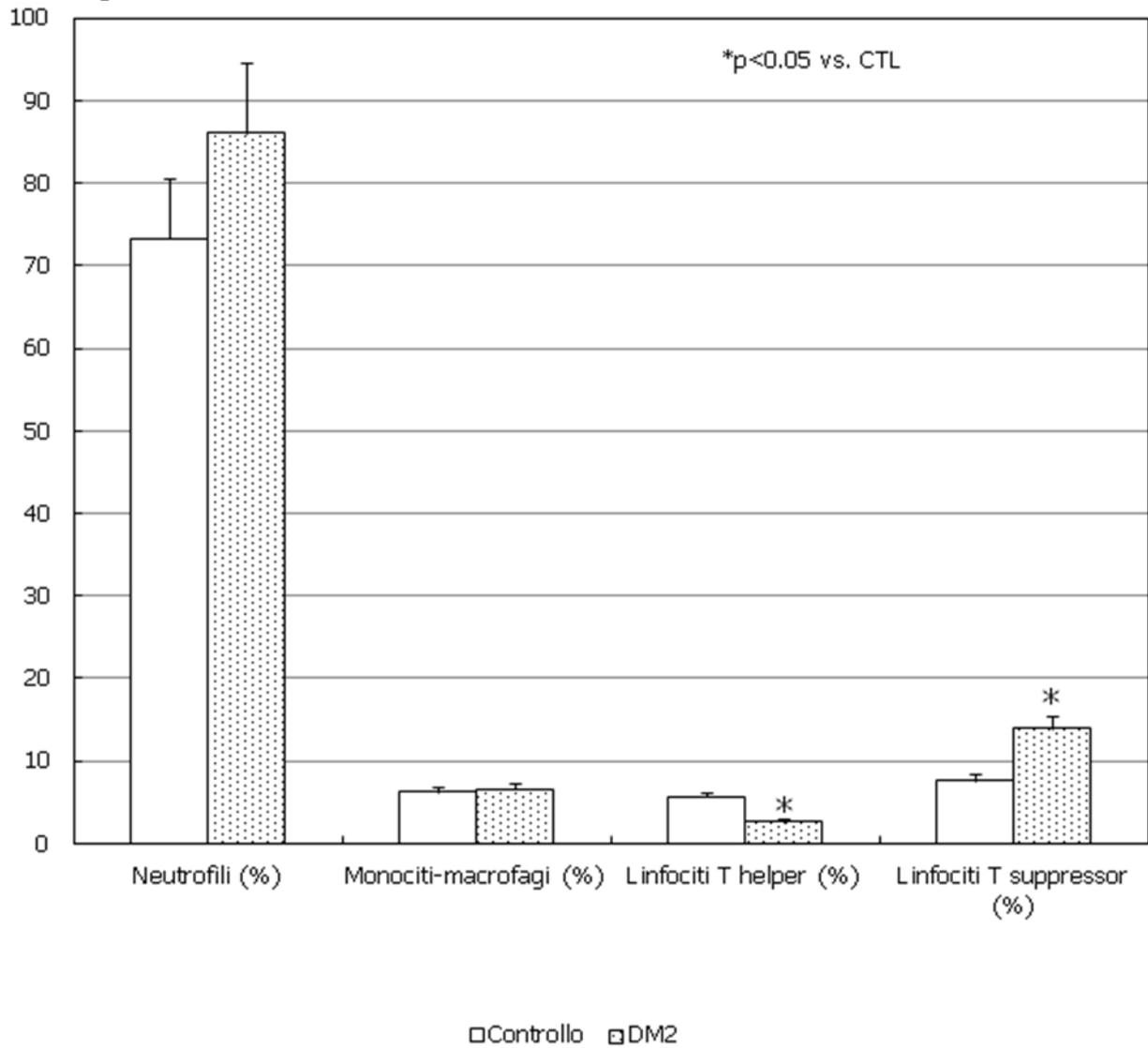
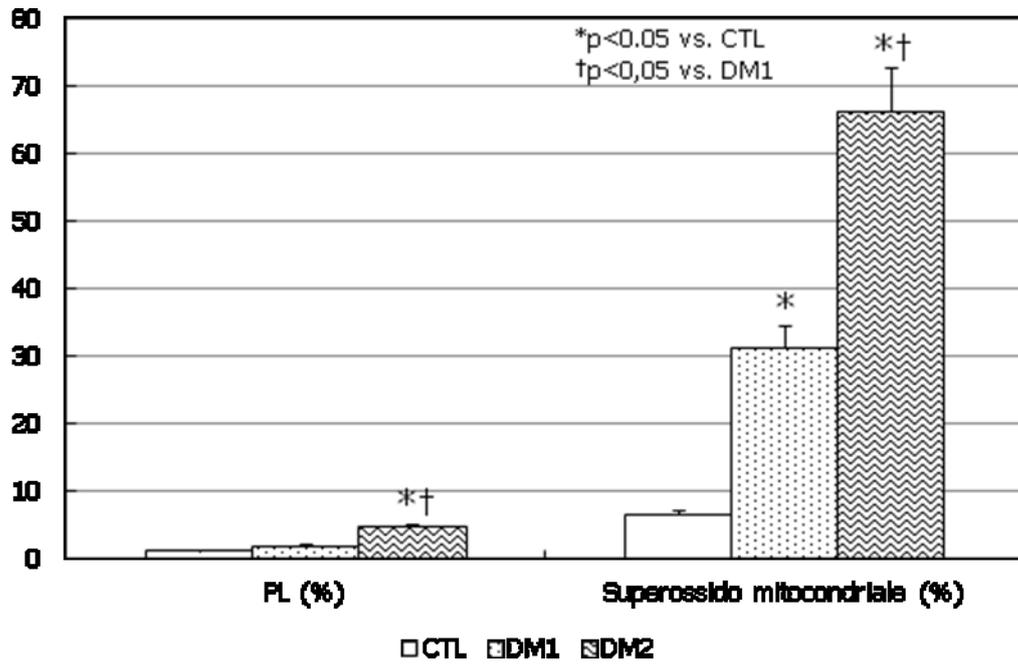


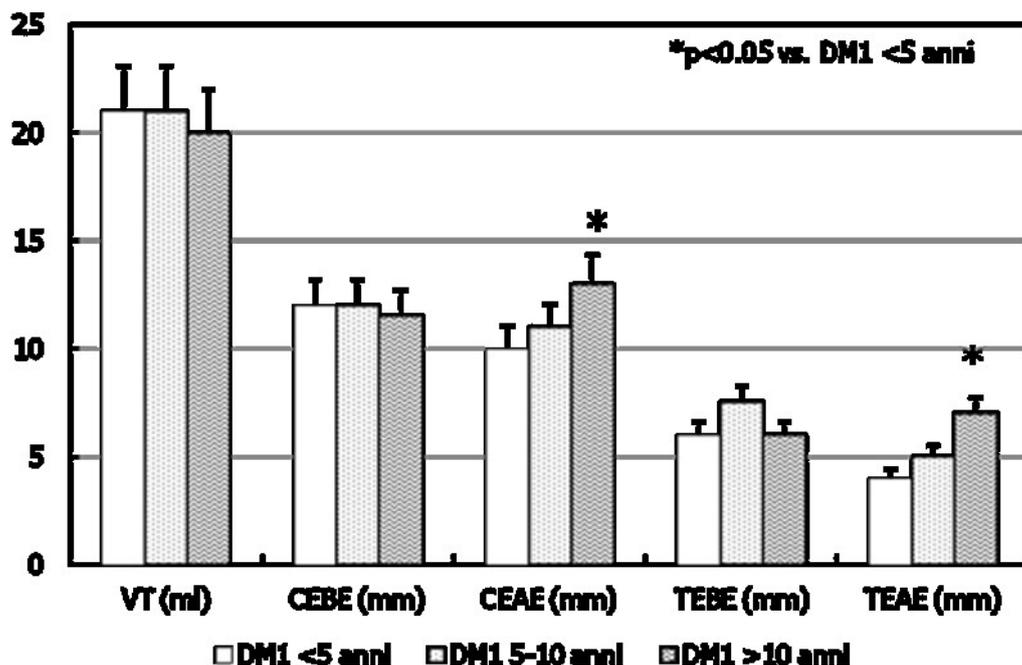
Figura 6. Indici di stress ossidativo seminali nei pazienti con diabete mellito tipo 1 e tipo 2



Parametri ecografici

I dati ecografici hanno mostrato che il diametro del caput (CEAE) e della coda (TEAE) dopo eiaculazione risultavano essere maggiori rispetto al controllo nei pazienti con DM1 di lunga durata rispetto a quelli di breve durata ($p < 0.05$), mentre nessuna differenza veniva riscontrata per quanto riguarda il volume testicolare (VT), il diametro rispettivamente craniale (CEBE) e caudale prima dell'eiaculazione (TEBE) (Fig. 7).

Figura 7. Parametri ecografici didimo-epididimari nei pazienti con diabete mellito tipo 1 suddivisi in base alla durata di malattia



Dosaggi ormonali

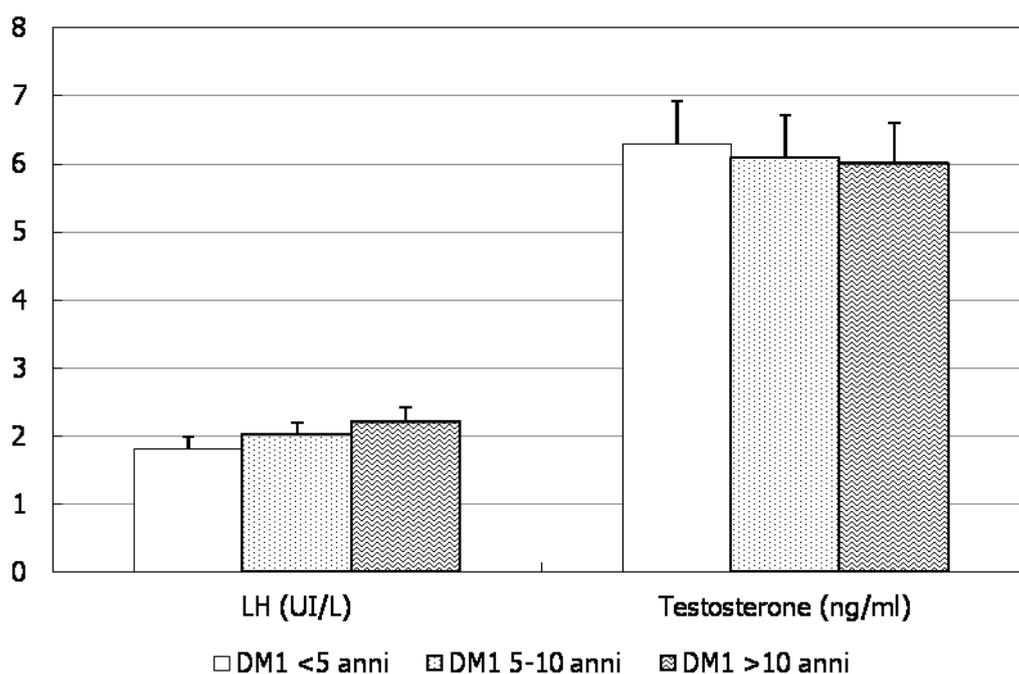
L'analisi statistica, relativamente al dosaggio di TT e LH non ha evidenziato differenze significative fra i pazienti con DM1 e il gruppo di controllo, mentre tale significatività statistica si è registrata nei livelli di TT, più bassi nei DM2 rispetto al gruppo di controllo ($p < 0.05$) (Tab. 2). Anche quando i pazienti con DM1 venivano suddivisi per durata di malattia non si evidenziavano differenze statisticamente significative nei 3 gruppi di pazienti (Fig. 8).

Tabella 2. Livelli ormonali nei pazienti con diabete mellito tipo 2

	CTL (n=100)	DM2 (n=55)
Testosterone totale (ng/ml)	5.1±0.1	2.8±0.5*
LH (UI/L)	2.4±0.1	4.6±2.1

p < 0.05 vs. CTL

Figura 8. Valori ormonali dei pazienti con diabete mellito tipo 1 suddivisi in base alla durata di malattia



Discussione

I risultati di questo studio dimostrano che i pazienti diabetici in età fertile presentano alterazioni dei parametri convenzionali del liquido seminale rispetto alla popolazione non diabetica. In particolare, le principali alterazioni riguardano il numero di spermatozoi, la percentuale di nemaspermi con motilità progressiva e con forma normale. Quando suddivisi in base alla durata di malattia, i pazienti con DM1 hanno mostrato una motilità progressiva che peggiorava significativamente con il trascorrere degli anni di malattia. Alcuni studi precedenti non hanno dimostrato variazioni significative di tale parametro e nessuna correlazione con età, durata di malattia o livelli di HbA1c (Niven et al, 1995; Agbaje et al, 2007), a differenza di altri studi che invece confermano il nostro dato riportando un decremento della motilità progressiva sia nei pazienti con DM1 che con DM2 (Ali et al, 1993) incluso in 32 adolescenti affetti da DM1 (Padrón et al, 1984).

È stata inoltre riscontrata un'associazione fra la riduzione della motilità progressiva, e un aumento del numero di spermatozoi con basso MMP in entrambi i gruppi di pazienti diabetici rispetto al gruppo di controllo. Altri studi su casistiche diverse, hanno riportato che le alterazioni ultrastrutturali mitocondriali e le variazioni di MMP sono associate ad un decremento della motilità nemaspermica (Pelliccione et al., 2011; Amaral et al., 2013). Nel gruppo di pazienti con DM1, le alterazioni della funzione mitocondriale cominciano ad evidenziarsi nei pazienti con durata di malattia compresa fra 5 e 10 anni, mentre le alterazioni della motilità progressiva si rendono manifeste nei pazienti con durata di malattia superiore a 10 anni, testimoniando il

fatto che l'alterazione mitocondriale anticipa la successiva alterazione della motilità nemaspermica.

Il volume dell'eiaculato si riduce nei pazienti con DM2 anche se non in maniera statisticamente significativa, a differenza dei dati presenti in letteratura (Ali et al, 1993). Questa discrepanza può essere giustificata dal fatto che, i pazienti con DM2 arruolati da Ali e collaboratori presentano valori di TT ridotti rispetto al gruppo di controllo. Infatti, il volume dell'eiaculato è il parametro che maggiormente risente dell'influsso androgenico sulle vescicole seminali, ghiandole testosterone-dipendenti, deputate alla produzione di circa il 60% del volume dell'eiaculato. Inoltre, i pazienti con DM2 arruolati nel presente studio sono più giovani di quelli descritti in letteratura, essendo ancora in età fertile, e pertanto non risentono ancora del tutto del declino androgenico età-correlato. Ciò giustificherebbe la lieve riduzione del volume dell'eiaculato, intercettando quindi precocemente un processo che potrebbe peggiorare in una fase successiva. Di contro, i pazienti con DM1 mostrano volumi dell'eiaculato ridotti, in presenza concentrazioni ematiche di androgeni circolanti normali. Tali pazienti, all'esame ecografico didimo-epididimario, presentano diametri della testa e della coda dell'epididimo maggiori dopo eiaculazione rispetto al controllo suggerendo un'alterazione nella funzione contrattile dell'epididimo. Tale fenomeno, indicativo di mancato svuotamento epididimario, potrebbe essere la causa della riduzione del volume dell'eiaculato, da noi riscontrata.

Per quanto riguarda la componente leucocitaria nel liquido seminale, i linfociti presenti nella rete testis, nei vasi deferenti e nell'eiaculato umano sono

prevalentemente linfociti T suppressor (Witkin, 1988). Il ruolo dei leucociti nel liquido seminale non è solo di tipo antimicrobico, ma anche di immunosorveglianza, volto all'eliminazione di corpi o cellule apoptotiche, fagocitate o cellule germinali immature. La presenza di questi linfociti infatti potrebbe migliorare la qualità seminale in quanto l'azione di rimozione cellulare da parte dei linfociti T suppressor eviterebbe l'attivazione dei linfociti T helper verso cellule presentanti l'antigene con conseguente danno verso la componente nemaspermica stessa attraverso la produzione di anticorpi antispermatozoo (Seshadri et al, 2012). Dunque, nei pazienti affetti da DM2, ove dimostrata la presenza di un maggior numero di cellule apoptotiche, la percentuale di linfociti T suppressor aumenta, mentre quella dei T helper si riduce anche in considerazione del fatto che non essendo presente agente microbico, e quindi cellula presentante l'antigene, la funzione di questi ultimi è resa vana.

Per quanto riguarda gli indici di stress ossidativo, la concentrazione di anione superossido è risultata essere superiore nei pazienti con DM2 rispetto a quelli con DM1, dunque, questo dato potrebbe spiegare perché la PL aumenta solo nei pazienti con DM2, soprattutto in relazione alla maggiore concentrazione leucocitaria seminale di questo gruppo di pazienti. Nel DM2, l'aumento della PL e del superossido di origine mitocondriale determinerebbero una riduzione dell'MMP e un conseguente declino della motilità nemaspermica che appare essere maggiore rispetto al DM1.

Recentemente è stato dimostrato infatti che l'epididimo è un potenziale target dello stress ossidativo nei pazienti diabetici. Infatti, l'analisi immunostochimica ha

evidenziato la presenza di recettori degli AGE nella regione epididimaria (Mallidis et al., 2008). A ciò si aggiunge che, i livelli di malonildialdeide, prodotto finale della PL, sono più elevati nei pazienti con DM2 rispetto al gruppo di controllo (La Vignera et al., 2011). Il dato acquisito risulta rilevante ai fini della comprensione di aspetti fisiopatologici e clinici che possono indirizzare verso un approccio terapeutico più mirato e specifico. Inoltre, gli spermatozoi di pazienti con DM2 risultavano essere meno vitali, con una tendenza all'apoptosi tardiva e alla frammentazione del DNA. Tali dati, associati ad un aumentato numero di leucociti nel liquido seminale, responsabili dell'aumento della PL e delle concentrazioni di superossido mitocondriale trovano nello stress ossidativo la principale causa determinante alterata qualità nemaspermica nei pazienti con DM2.

La valutazione ecografica didimo-epididimaria ha evidenziato un aspetto peculiare dei pazienti con DM1, ossia una mancanza di contrazione fisiologica sia della porzione craniale che caudale dell'epididimo dopo eiaculazione. Tale alterazione era significativamente più elevata nei pazienti con lunga (>10 anni) durata di malattia diabetica. Tale aspetto risulta essere interessante in quanto suggerisce uno stato di atonia/ipotonia di tale struttura anatomica, finora mai studiata nei pazienti con DM1. Fisiologicamente, infatti, dopo l'eiaculazione, lo spessore epididimario, valutato ecograficamente, si riduce approssimativamente di 3 mm come riscontrato anche nel gruppo di controllo. In condizioni di normalità, durante l'eiaculazione, l'epididimo accoglie circa 200 milioni di spermatozoi, metà di questi nella sua porzione cefalica e nel corpo e i rimanenti nella porzione caudale (Amann & Howard,

1980). I tratti craniale e caudale sono caratterizzati da una peristalsi spontanea in grado di trasportare anche gli spermatozoi immobili (El-Badawi & Schenk, 1967). La porzione caudale dell'epididimo presenta una ricca innervazione adrenergica che si attiva nella fase di emissione del processo eiaculatorio. La denervazione adrenergica non elimina la contrattilità epididimaria (Kempinas et al., 1998). Ciò suggerisce che tale contrattilità non è mediata solo da un meccanismo neuronale, ma anche da altri fattori ormonali (ossitocina ed endotelina 1) e non ormonali, in grado di alterare la funzione contrattile dell'epididimo.

Infine, come anticipato, i pazienti con DM2 presentano un'iniziale ipotestosteronemia come già descritto in letteratura (La Vignera et al., 2009). Bassi livelli di TT sono in grado di prevedere un aumento del rischio a 5 anni di sviluppare DM2 (Atlantis et al., 2016)

Per concludere possiamo dire che, i pazienti con DM1 presentano bassi volumi dell'eiaculato per mancato svuotamento epididimario, associato ad un danno mitocondriale che anticipa il successivo declino della motilità nemaspermica. A questi dati si associa comunque, un aumento dello stress ossidativo in grado di alterare anche gli altri parametri convenzionali del liquido seminale, anche se in misura minore rispetto al DM2.

La condizione clinica di DM2 si caratterizza, invece, per una condizione infiammatoria con incremento della componente cellulare leucocitaria, pur in assenza di infezione causata da specifico agente microbico, in grado di innalzare gli indici di stress ossidativo in maniera importante tanto da determinare un danno non solo dei

parametri convenzionali del liquido seminale ma anche a carico del DNA spermatico riducendone inoltre anche la vitalità.

Bibliografia

1. Agarwal A, Ikemoto I, Loughlin KR. Relationship of sperm parameters with levels of reactive oxygen species in semen specimens. *J Urol* 152:107-110, 1994.
2. Agarwal A, Nallella KP, Allamaneni SS, Said TM. Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. *Reprod Biomed Online* 8:616-627, 2004.
3. Agarwal A, Prabakaran SA. Mechanism, measurement, and prevention of oxidative stress in male reproductive physiology. *Indian J Exp Biol* 43:963-974, 2005.
4. Agarwal A, Prabhakaran SA, Sikka SC. Clinical relevance of oxidative stress in patients with male factor infertility: evidence-based analysis. *AUA Update Series* 26:1-12, 2007.
5. Agarwal A, Said TM. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Hum Reprod Update* 9:331-345, 2003.
6. Agbaje IM, Rogers DA, McVicar CM, McClure N, Atkinson AB, Mallidis C, Lewis SE. Insulin dependant diabetes mellitus: implications for male reproductive function. *Hum Reprod.* 22:1871-1877, 2007.
7. Aitken J, Krausz C, Buckingham D. Relationships between biochemical markers for residual sperm cytoplasm, reactive oxygen species generation, and the presence of leukocytes and precursor germ cells in human sperm suspensions. *Mol Reprod Dev* 39:268-279, 1994.

8. Aitken RJ, Clarkson JS, Fishel S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. *Biol Reprod* 41:183-197, 1989.
9. Aitken RJ, Gordon E, Harkiss D, Twigg JP, Milne P, Jennings Z, Irvine DS. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol Reprod* 59:1037-1046, 1998.
10. Aitken RJ, Krausz C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction* 122:497-506, 2001.
11. Aitken RJ, Smith TB, Lord T, Kuczera L, Koppers AJ, Naumovski N, Connaughton H, Baker MA, De Iuliis GN. On methods for the detection of reactive oxygen species generation by human spermatozoa: analysis of the cellular responses to catechol oestrogen, lipid aldehyde, menadione and arachidonic acid. *Andrology* 1:192-205, 2013.
12. Aitken RJ, Wingate JK, De Iuliis GN, McLaughlin EA. Analysis of lipid peroxidation in human spermatozoa using BODIPY C11. *Mol Hum Reprod* 13:203-211, 2007.
13. Aitken RJ. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reprod Fertil Dev* 7:659-668, 1995.
14. Aitken RJ. Molecular mechanisms regulating human sperm function. *Mol Hum Reprod* 3:169-173, 1997.
15. Aitken RJ. The Amoroso Lecture. The human spermatozoon-a cell in crisis? *J Reprod Fertil* 115:1-7, 1999.

16. Ali ST, Shaikh RN, Siddiqi NA, Siddiqi PQ. Semen analysis in insulin-dependent/non-insulin-dependent diabetic men with/without neuropathy. *Arch Androl* 30:47-54, 1993.
17. Amaral A, Lourenço B, Marques M, Ramalho-Santos J. Mitochondria functionality and sperm quality. *Reproduction* 146: 163-174, 2013.
18. Amaral S, Oliveira P.J, Ramalho-Santos J. Diabetes and the impairment of reproductive function: possible role of mitochondria and reactive oxygen species. *Current Diabetes Reviews* 4:46-54, 2008.
19. Amaral S., Moreno AJ, Santos MS, Seica R, Ramalho-Santos J. Effects of hyperglycemia on sperm and testicular cells of Goto-Kakizaki and streptozotocin-treated rat models for diabetes. *Theriogenology* 66:2056-2067, 2006.
20. Armstrong JS, Rajasekaran M, Chamulitrat W, Gatti P, Hellstrom WJ, Sikka SC. Characterization of reactive oxygen species induced effects on human spermatozoa movement and energy metabolism. *Free Radic Biol Med* 26:869-880, 1999.
21. Atlantis E, Fahey P, Martin S, O'Loughlin P, Taylor AW, Adams RJ, Shi Z, Wittert G. Predictive value of serum testosterone for type 2 diabetes risk assessment in men. *BMC Endocr Disord* 16:26, 2016.
22. Baccetti B, La Marca A, Piomboni P, Capitani S, Bruni E, Petraglia F, De Leo V. Insulin-dependent diabetes in men is associated with hypothalamo-pituitary

- derangement and with impairment in semen quality. *Hum Reprod* 17:2673-2677, 2002.
23. Ballester J, Munoz MC, Dominguez J, Rigau T, Guinovart JJ, Rodríguez- Gil JE. Insulin-dependent diabetes affects testicular function by FSH- and LH-linked mechanisms. *J Androl* 25:706-719, 2004.
24. Barbonetti A, Vassallo MR, Di Rosa A, Leombruni Y, Felzani G, Gandini L, Lenzi A, Necozone S, Francavilla S, Francavilla F. Involvement of mitochondrial dysfunction in the adverse effect exerted by seminal plasma from men with spinal cord injury on sperm motility. *Andrology* 1:456-463, 2013.
25. Bhattacharya SM, Ghosh M, Nandi N. Diabetes mellitus and abnormalities in semen analysis. *J Obstet Gynaecol Res* 40:167-171, 2014.
26. Braun M, Wassmer G, Klotz T, Reifenrath B, Mathers M, Engelmann U. Epidemiology of erectile dysfunction: results of the 'Cologne Male Survey'. *Int J Impot Res* 12:305-311, 2000.
27. Calvo JC, Barañao JL, Tesone M, Charreau EH. Hypothalamic-hypophyseal-gonadal axis in the streptozotocin-induced diabetic male rat. *J Steroid Biochem* 20:769-772, 1984.
28. Cameron DF, Murray FT, Drylie DD. Interstitial compartment pathology and spermatogenic disruption in testes from impotent diabetic men. *Anat Rec*. 213:53-62, 1985.

29. Cameron DF, Rountree J, Schultz RE., Repetta D., Murray FT. Sustained hyperglycemia results in testicular dysfunction and reduced fertility potential in BBWOR diabetic rats. *Am J Physiol* 259: E881-E889, 1990.
30. Cappello AR, Guido C, Santoro A, Santoro M, Capobianco L, Montanaro D, Madeo M, Ando S, Dolce V, Aquila S. The mitochondrial citrate carrier (CIC) is present and regulates insulin secretion by human male gamete. *Endocrinology* 153:1743-1754, 2012.
31. Chan JL, Mantzoros CS Leptin and the hypothalamic-pituitary regulation of the gonadotropin-gonadal axis. *Pituitary*. 4:87-92, 2001.
32. Condorelli RA, Calogero AE, Vicari E, Duca Y, Favilla V, Morgia G, Cimino S, Di Mauro M, La Vignera S. Prevalence of MAGI in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Endocrinol Invest* 36:770-774, 2013.
33. Daubresse JC, Meunier JC, Wilmotte J, Luyckx AS, Lefebvre PJ. Pituitary–testicular axis in diabetic men with and without sexual impotence. *Diabete Metab* 4:233-237, 1978.
34. de Lamirande E, Eiley D, Gagnon C. Inverse relationship between the induction of human sperm capacitation and spontaneous acrosome reaction by various biological fluids and the superoxide scavenging capacity of these fluids. *Int J Androl* 16:258-266, 1993.
35. de Lamirande E, Gagnon C. Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. *Hum Reprod* 10:15-21, 1995.

36. Dinulovic D, Radonjic G. Diabetes mellitus/male infertility. *Arch Androl* 25:277-293, 1990.
37. Frenkel GP, Homonnai ZT, Drasnin N, Sofer A, Kaplan R, Kraicer PF. Fertility of the streptozotocin-diabetic male rat. *Andrologia* 10:127-136, 1978.
38. Gagnon C, Iwasaki A, De Lamirande E, Kovalski N. Reactive oxygen species and human spermatozoa. *Ann N Y Acad Sci* 637:436-444, 1991.
39. Galardo MN, Riera MF, Pellizzari EH, Chemes HE, Venara MC, Cigorraga SB, Meroni SB. Regulation of expression of Sertoli cell glucose transporters 1 and 3 by FSH, IL1 beta and bFGF at two different time-points in pubertal development. *Cell Tissue Res.* 334:295-304, 2008.
40. García-Diez LC, Corrales Hernandez JJ, Hernandez-Diaz J, Pedraz MJ, Miralles JM. Semen characteristics and diabetes mellitus: significance of insulin in male infertility. *Arch Androl* 26:119-128, 1991.
41. Garrido N, Meseguer M, Simon C, Pellicer A, Remohi J. Pro-oxidative and anti-oxidative imbalance in human semen and its relation with male fertility. *Asian J Androl* 6:59-65, 2004.
42. Gavella M, Lipovac V. NADH-dependent oxidoreductase (diaphorase) activity and isozyme pattern of sperm in infertile men. *Arch Androl* 28:135-141, 1992
43. Genesca A, Caballin MR, Mirò R, Benet J, Germà JR, Egozcue J. Repair of human sperm chromosome aberrations in the hamster egg. *Hum Genet* 89: 181-186, 1992.

44. Gomez E, Buckingham DW, Brindle J, Lanzafame F, Irvine DS, Aitken RJ. Development of an image analysis system to monitor the retention of residual cytoplasm by human spermatozoa: correlation with biochemical markers of the cytoplasmic space, oxidative stress and sperm function. *J Androl* 17:276-287, 1996.
45. Griveau JF, Le Lannou D. Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. *Int J Androl* 20:61-69, 1997.
46. Griveau JF, Renard P, Le Lannou D. An in vitro promoting role for hydrogen peroxide in human sperm capacitation. *Int J Androl* 17:300-307, 1994.
47. Guariguata L. By the numbers: new estimates from the IDF Diabetes Atlas Update for 2012. *Diabetes Res Clin Pract* 98:524-525, 2012.
48. Guest CB, Park MJ, Johnson DR, Freund GG. The implication of proinflammatory cytokines in type 2 diabetes. *Front Biosci* 13:5187-5194, 2008.
49. Hamilton BE, Ventura SJ. Fertility and abortion rates in the United States, 1960-2002. *Int J Androl*. 29:34-45, 2006.
50. Handelsman DJ, Conway AJ, Boylan LM et al. Testicular function and glycemic control in diabetic men. A controlled study. *Andrologia* 17:488-496, 1985.
51. Jequier AM. Is quality assurance in semen analysis still really necessary? A clinician's viewpoint. *Hum Reprod* 20:2039-2042, 2005.

52. Kemal Duru N, Morshedi M, Oehninger S. Effects of hydrogen peroxide on DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa. *Fertil Steril* 74:1200-1207, 2000.
53. Kitagawa T, Owada M, Urakami T, Yamauchi K. Increased incidence of non-insulin dependent diabetes mellitus among Japanese schoolchildren correlates with an increased intake of animal protein and fat. *Clin Pediatr (Phila)*. 37:111-115, 1998.
54. Kodama H, Kuribayashi Y, Gagnon C. Effect of sperm lipid peroxidation on fertilization. *J Androl* 17:151-157, 1996.
55. La Vignera S, Calogero AE, Condorelli R, Garrone F, Vicari E. Spermogram: techniques, interpretation, and prognostic value of results. *Minerva Endocrinol* 32:115-126, 2007.
56. La Vignera S, Calogero AE, Condorelli R, Lanzafame F, Giammusso B, Vicari E. Andrological characterization of the patient with diabetes mellitus. *Minerva Endocrinol*. 34:1-9, 2009.
57. La Vignera S, Calogero AE, Condorelli R, Vicari E. Ultrasonographic aspects of altered ampullo-vesicular voiding as a sign of autonomic neuropathy. VII Congresso Nazionale della Società Italiana di Andrologia Medica. Firenze 9-11 Novembre 2006. *J Endocrinol Invest* 29: 21, 2006
58. La Vignera S, Condorelli R, Vicari E, D'Agata R, Calogero AE. Diabetes mellitus and sperm parameters. *J Androl* 33:145-153, 2012.

59. La Vignera S, Condorelli RA, Vicari E, D'Agata R, Salemi M, Calogero AE. High levels of lipid peroxidation in semen of diabetic patients. *Andrologia*. Suppl 1:565-570, 2012.
60. La Vignera S, Condorelli RA, Vicari E, Salmeri M, Morgia G, Favilla V, Cimino S, Calogero AE. Microbiological investigation in male infertility: a practical overview. *J Med Microbiol* 63:1-14, 2014.
61. La Vignera S, Di Mauro M, Condorelli R, La Rosa S, Vicari E. Diabetes worsens spermatoc oxidative "stress" associated with the inflammation of male accessory sex glands. *Clin Ter* 160:363-366, 2009.
62. La Vignera S, Vicari E, Condorelli R, D'Agata R, Calogero AE. Ultrasound characterization of the seminal vesicles in infertile patients with type 2 diabetes mellitus. *Eur J Radiol*. 80:64-67, 2011.
63. Lee J, Richburg JH, Younkin SC, Boekelheide K. The Fas system is a key regulator of germ cell apoptosis in the testis. *Endocrinology* 138:2081-2088, 1997.
64. Lenzi A, Lombardo F, Gandini L, Alfano P, Dondero F. Computer assisted sperm motility analysis at the moment of induced pregnancy during gonadotropin treatment for hypogonadotropic hypogonadism. *J Endocrinol Invest* 16:683-686, 1993.
65. Lestienne P, Reynier P, Chretien MF, Penisson- Besnier I, Malthiery Y, Rohmer V. Oligoasthenospermia associated with multiple mitochondrial DNA rearrangements. *Mol Hum Reprod* 3:811-814, 1997.

66. Lutz W. Fertility rates and future population trends: will Europe's birth rate recover or continue to decline? *Int J Androl* 29:25-33, 2006.
67. Mallidis C, Agbaje I, McClure N, Kliesch S. The influence of diabetes mellitus on male reproductive function: a poorly investigated aspect of male infertility. *Urologe A*. 50:33-37, 2011.
68. Mallidis C, Agbaje I, O'Neill J, McClure N. The influence of type 1 diabetes mellitus on spermatogenic gene expression. *Fertil Steril* 92:2085-2087, 2009.
69. Mallidis C, Agbaje IM, Rogers DA, Glenn JV, Pringle R, Atkinson AB, Steger K, Stitt AW, McClure N. Advanced glycation end products accumulate in the reproductive tract of men with diabetes. *Int J Androl* 32:295-305, 2008
70. Munro HN, Eaton JC, Glen A. Survey of a Scottish diabetic clinic: a study of the etiology of diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol* 9:48-78, 1949.
71. Murray FT, Cameron DF, Orth JM. Gonadal dysfunction in the spontaneously diabetic BB rat. *Metabolism* 32:141-147, 1983.
72. Navarro-Casado L, Juncos-Tobarra MA, Cháfer-Rudilla M, de Onzoño LÍ, Blázquez-Cabrera JA, Miralles-García JM. Effect of experimental diabetes and STZ on male fertility capacity. Study in rats. *J Androl* 31:584-592, 2010.
73. Niven MJ, Hitman GA, Badenoch DF. A study of spermatozoal motility in Type 1 diabetes mellitus. *Diabet Med* 12:921-924, 1995.
74. O'Brien J, Zini A. Sperm DNA integrity and male infertility. *Urology* 65:6-22, 2005.

75. Padrón RS, Dambay A, Suarez R, Màs J. Semen analyses in adolescent diabetic patients. *Acta Diabetol Lat* 21:115-121, 1984.
76. Patterson JE, Andriole VT. Bacterial urinary tract infections in diabetes. *Infect Dis Clin North Am* 11:735-750, 1997.
77. Pelliccione F, Micillo A, Cordeschi G, D'Angeli A, Necozone S, Gandini L, Lenzi A, Francavilla F, Francavilla S. Altered ultrastructure of mitochondrial membranes is strongly associated with unexplained asthenozoospermia. *Fertil Steril* 95:641-646, 2011.
78. Pinhas-Hamiel O, Zeitler P. The global spread of type 2 diabetes mellitus in children and adolescents. *J Pediatr* 146:693-700, 2005.
79. Pitteloud N, Hardin M, Dwyer AA, Valassi E, Yialamas M, Elahi D, Hayes FJ. Increasing insulin resistance is associated with a decrease in Leydig cell testosterone secretion in men. *J Clin Endocrinol Metab* 90:2636-2641, 2005.
80. Robinson R, Fritz IB. Metabolism of glucose by Sertoli cells in culture. *Biol Reprod* 24:1032-1041, 1981.
81. Roessner C, Paasch U, Kratzsch J, Glander HJ, Grunewald S. Sperm apoptosis signalling in diabetic men. *Reprod Biomed Online* 25:292-299, 2012.
82. Rosenbloom AL, Joe JR, Young RS, Winter WE. Emerging epidemic of type 2 diabetes in youth. *Diabetes Care* 22:345-354, 1999.
83. Rubin A. Studies in human reproduction. IV. Diabetes mellitus and seminal deficiency. *Am J Obstet Gynecol* 83:200-202, 1962.

84. Sakkas D, Mariethoz E, Manicardi G, Bizzaro D, Bianchi PG, Bianchi U. Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Rev Reprod* 4:31-37, 1999.
85. Scarano WR, Messias AG, Oliva SU, Klinefelter GR, Kempinas WG. Sexual behaviour, sperm quantity and quality after short-term streptozocin induced hyperglycaemia in rats. *Int J Androl* 29:482-488, 2006.
86. Schoeller EL, Albanna G, Frolova AI, Moley KH. Insulin rescues impaired spermatogenesis via the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in Akita diabetic mice and restores male fertility. *Diabetes* 61:1869-1878, 2012.
87. Seshadri S, Flanagan B, Vince G, Lewis-Jones DJ. Detection of subpopulations of leucocytes in different subgroups of semen sample qualities. *Andrologia*. 44:354-361, 2012.
88. Sexton WJ, Jarow JP. Effect of diabetes mellitus upon male reproductive function. *Urology* 49:508-513, 1997.
89. Sharma RK, Said T, Agarwal A. Sperm DNA damage and its clinical relevance in assessing reproductive outcome. *Asian J Androl* 6:139-148, 2004.
90. Silink M. Childhood diabetes: a global perspective. *Horm Res* 57:1-5, 2002.
91. Silvestroni L, Modesti A, Sartori C. Insulin-sperm interaction: effects on plasma membrane and binding to acrosome. *Arch Androl* 28:201-211, 1992.
92. Sjöberg L, Pitkäniemi J, Haapala L, Kaaja R, Tuomilehto J. Fertility in people with childhood-onset type 1 diabetes. *Diabetologia*. 56:78-81, 2013.

93. Spiropoulos J, Turnbull DM, Chinnery PF. Can mitochondrial DNA mutations cause sperm dysfunction? *Mol Hum Reprod* 8:719-721, 2002.
94. St John JC, Jokhi RP, Barratt CL. The impact of mitochondrial genetics on male infertility. *Int J Androl* 28:65-73, 2005.
95. Stafieri JJ: Pituitary gland, islands of Langerhans and sterility. *Obstet Gynecol Lat Am* 17:537-555, 1959.
96. Standards of Medical Care, American Diabetes Association. *Diabetes Care* 35:S11-63, 2012.
97. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet* 352:837-853, 1998.
98. Vicari E, La Vignera S, Castiglione R, Calogero AE. Sperm parameter abnormalities, low seminal fructose and reactive oxygen species overproduction do not discriminate patients with unilateral or bilateral post-infectious inflammatory prostatic-vesiculo-epididymitis. *J Endocrinol Invest* 29:18-25, 2006.
99. Vicari E. Effectiveness and limits of antimicrobial treatment on seminal leukocyte concentration and related reactive oxygen species production in patients with male accessory gland infection. *Hum Reprod* 15:2536-2544, 2000.

100. Vignon F, Le Faou A, Montagnon D, Pradignac A, Cranz C, Winiszewsky P, Pinget M. Comparative study of semen in diabetic and healthy men. *Diabete Metab* 17:350-354, 1991.
101. Wankeu-Nya M, Florea A, Bâlici S, Watcho P, Matei H, Kamanyi A. *Dracaena arborea* alleviates ultra-structural spermatogenic alterations in streptozotocin-induced diabetic rats. *BMC Complement Altern Med* 13:71, 2013.
102. Witkin SS. Mechanisms of active suppression of the immune response to spermatozoa. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 17:61-64, 1988
103. World Health Organization, WHO Laboratory Manual For the Examination and Processing of Human Semen, Cambridge University Press, Cambridge, UK, 5th edition, 2010
104. Zysk JR, Bushway AA, Whistler RL, Carlton WW. Temporary sterility produced in male mice by 5-thio-D-glucose. *J Reprod Fertil* 45:69-72, 1975.