

UNIVERSITA' 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

**RUOLO DELLE SUBPOPOLAZIONI
LEUCOCITARIE VALUTATE IN
CITOFLUORIMETRIA IN MODELLI CLINICI
DI PATOLOGIA INFIAMMATORIA CRONICA
GENITALE MASCHILE E FEMMINILE**

Dott.ssa LINDA IACOVIELLO

Tutor:

Prof. E.S. Vicari

Coordinatore:

Prof. E.S. Vicari

Anno Accademico 2014-2015

INDICE

INTRODUZIONE

Premesse generali	3
Modello clinico di patologia infiammatoria cronica genitale maschile: leucociti nel seme.....	5
Modello clinico di patologia infiammatoria cronica genitale femminile: leucociti nel muco cervicale.....	15

SCOPI DELLA RICERCA.....	22
---------------------------------	-----------

MATERIALI E METODI

I parte: Casistica derivata dal modello clinico di patologia infiammatoria cronica genitale maschile.....	23
I parte: Metodologia	25
II parte: Casistica derivata dal modello clinico di patologia infiammatoria cronica genitale femminile.....	33
II parte: Metodologia	34

RISULTATI

I parte – Risultati osservati nel Modello clinico di patologia infiammatoria cronica genitale maschile.....	38
II parte- Risultati osservati nel modello clinico di patologia infiammatoria cronica genitale femminile.....	43

DISCUSSIONE

Commento dei risultati derivati dal modello di studio di patologia infiammatoria cronica genitale maschile.....	46
--	-----------

Commento dei risultati derivati dal modello di studio di patologia infiammatoria cronica genitale femminile.....	50
---	----

TABELLE

Tabella 1.....	53
Tabella 2.....	54
Tabella 3.....	55
Tabella 4.....	56
Tabella 5.....	57

Bibliografia.....	58
--------------------------	-----------

INTRODUZIONE

- **Premesse generali**

I leucociti nell'apparato riproduttivo maschile e femminile, determinati rispettivamente nel liquido seminale e nel muco cervicale, svolgono un'importante ruolo immunologico contro patogeni e di clearance fagocitica di spermatozoi morfologicamente atipici. Le problematiche aperte sul significato di leucocitospermia nell'infertilità da fattore maschile hanno sollevato alcune domande scientificamente provocatorie come sottolineato da alcuni titoli "Seminal leukocytes: passengers, terrorists or good samaritans ?(Aitken *et al.*, 1995) e " Semen leukocytes: friends or foes?" (Kiessling *et al.*,1995) ed in alcuni casi non si possono trarre conclusioni certe.. E' semplicistico e riduttivo pensare che le proprietà difensive o di interferenza sul processo riproduttivo possano riflettere il potenziale armamentario funzionale affidato ai soli leucociti polimorfonucleati neutrofili (unica subpopolazione ad essere analizzata routinariamente secondo gli

standard del manuale WHO. La risposta adattativa dell'ospite in condizioni di infertilità da patologie a decorso cronicizzato, si articola piuttosto in una risposta dinamica dove gli effettori finali (citochine, autoanticorpi antinemasperma, ROS) sono rilasciati da ben altre subpopolazioni leucocitarie (linfociti e monociti) molto spesso sottodimensionate e non prese in giusta analisi.

Nell'apparato riproduttivo femminile, i leucociti presenti svolgono inoltre l'importante funzione di stabilire la tolleranza immunitaria per gli spermatozoi e un embrione / feto. In letteratura, lo studio di determinazioni di biomarkers nelle flogosi cervicali è poco sviluppato con una serie di limiti metodologici ed interpretativi maggiori rispetto al modello maschile.

- **Modello clinico di patologia infiammatoria cronica genitale maschile: leucociti nel seme.**

L'infertilità è un problema diffuso tra le coppie di tutto il mondo. È clinicamente definita come fallimento di una coppia di concepire dopo un anno di rapporti sessuali regolari. E' stato dimostrato che il fattore maschile è implicato nel 20%-50% dei casi di infertilità (Jarow, 2007).

L'analisi dello sperma è il principale strumento di screening per la guida alla diagnosi. Tra i parametri valutati nelle analisi del liquido seminale vi è, oltre alla concentrazione, motilità e morfologia degli spermatozoi, anche la conta dei globuli bianchi. Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO), nel seme una conta leucocitaria $\geq 1 \times 10^6/\text{ml}$ è indicativo di leucocitospermia (WHO, 2010). Un conteggio elevato di leucociti si trova nel liquido seminale di circa il 15%-30% degli uomini infertili, anche in assenza di sintomi infiammatori o di infezione batterica e in circa il 10% degli uomini fertili (Wolff, 1995; Zorn *et al.*, 2000; Krause *et al.*, 2002; Gambera *et al.*, 2007). La condizione di leucocitospermia può essere un indicatore di infezione del tratto

genitale maschile o infiammazione. Tuttavia, in assenza di noxe microbiche, tale condizione può derivare da altri fattori che procurano risposta infiammatoria nel liquido seminale come ad esempio il fumo di sigaretta, uso di alcol, droghe o l'età (Esteves,2002; Saleh *et al.*,2002; Maneesh *et al.*,2006; Cocuzza *et al.*, 2008). Studi sull'influenza negativa della leucocitospermia sulla fertilità maschile danno risultati non univoci. Infatti alcuni studi non hanno trovato nessun effetto negativo (Cottel et al., 2000; Rodin et al.,2003) ma molti altri correlano la presenza di leucociti nel liquido seminale, anche a basse concentrazioni($0.2 \times 10^6/\text{mL}$), a *parametri seminali convenzionali* deteriorati, in particolare morfologia e motilità (Thomas *et al.*, 1997; Esfandiari *et al.*,2002; Aziz *et al.*,2004).

Ad aggiungere confusione alcuni Autori hanno postulato che in condizioni fisiologiche i leucociti nel liquido seminale da essi stimati in concentrazioni tra 1-3 mil/ ml favorirebbero, attraverso un effetto scavenging mediato da citochine prodotte appunto dai leucociti, una migliore spermiazione tubulare e primi effetti sulla maturazione

spermatologica durante il transito epididimo-epididimale, con effetto finale di aumento della concentrazione degli spermatozoi con normale profilo morfologico, con acquisizione di migliore proprietà di reazione acrosomiale (Tomlinson *et al.*, 1992; Kaleli *et al.*, 2000).

D'altra parte, un fronte diametralmente opposto di ricercatori di settore, segnala una serie di potenziali meccanismi attraverso i quali la leucocitospermia potrebbe indurre danni allo sperma, principalmente dovuti ad una iper-produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS).

La discrepanza apparente delle due correnti di pensiero starebbe proprio nei livelli di ROS: "bassi" in condizioni fisiologiche, con ruolo favorevole a una maggiore e progressiva competenza biofunzionale spermatica durante il periodo di permanenza spermatiche nelle prime vie escretici spermatiche (Griveau *et al.*, 1997); in condizioni patologiche livelli di ROS più elevati provocano un disequilibrio nella bilancia ossidativi (fattore pro-ossidanti/ proprietà antiossidanti) realizzando un quadro finale di stress ossidativi a vari livelli anatomico-giandolari. Sotto questo aspetto, alcuni studi hanno dimostrato che lo

stress ossidativo può associarsi a condizioni di infertilità da fattore maschile attraverso alterazioni nella regolazione della spermatogenesi, provocando difetti strutturali a livello degli spermatozoi (Gil-Guzman *et al.*,2001; Ollero *et al.*,2001). A livello subcellulare è stato dimostrato che vi è un aumento delle alterazioni e dei danni nel DNA spermatico (Sharma *et al.*,2001; Alvarez *et al.*, 2002; Henkel *et al.*,2005) e nel DNA mitocondriale e inibendo la produzione di ATP intracellulare (De Lamirande *et al.*,1992 Villegas *et al.*,2005). Senza una corretta produzione di ATP si ha un'alterazione sia della funzionalità che della motilità degli spermatozoi (Pentyala *et al.*,2007).

Il valore-soglia della concentrazione di leucociti nel seme suggerita dalla WHO è stato contestato come troppo alto a causa degli effetti negativi che i leucociti seminali hanno sugli spermatozoi anche a livelli più bassi. E' stato infatti dimostrato che anche concentrazioni di leucociti $<1,0 \times 10^6/\text{ml}$ possono associarsi ad una significativa diminuzione della motilità e integrità del DNA. Inoltre, studi precedenti hanno riportato elevate conte batteriche pur in presenza di basse

concentrazioni di leucociti e anormale morfologia degli spermatozoi già a partire da $0,5 \times 10^6/\text{ml}$ (Thomas *et al.*, 1997; Punab *et al.*, 2003; Mahfouz *et al.*, 2010).

Questi risultati contrastanti sul ruolo da assegnare ai leucociti presenti nel seme sono dovuti, essenzialmente, ai diversi metodi di colorazione e di conteggio dei leucociti seminali, oltre ai diversi criteri di selezione utilizzati per i gruppi di studio e i gruppi di controllo, oppure possono riflettere una eterogenea eziologia della leucocitospermia. L'analisi delle popolazioni leucocitarie nel liquido seminale, utile nella diagnosi e nel monitoraggio terapeutico delle infezioni del tratto genitale maschile e di malattie a trasmissione sessuale o di malattie autoimmuni, è spesso difficile da eseguire a causa della bassa percentuale di leucociti o dell'alto numero di spermatozoi. Da una prima analisi delle diverse edizioni di Linee-guida per la standardizzazione dell'esame seminale umano sviluppate dalla WHO emerge che a differenza delle modifiche temporali subite nelle varie edizioni della WHO degli altri parametri spermatici convenzionali (concentrazione, percentuale di motilità totale

e progressiva, percentuale di forme normali), il conteggio dei leucociti è rimasto inchiodato nel tempo sempre allo stesso valore-soglia ($\geq 1 \times 10^6/\text{mL}$) senza subire alcuna variazione nonostante le critiche sollevate in letteratura su tale aspetto specifico.

Per un maggior chiarimento di aspetto intricato ruolo dei leucociti possono tornare utili alcune altre specificazioni intrinseche.

Innanzitutto, in microscopia ottica il metodo di colorazione routinaria dei leucociti nel seme non è nella pratica clinica un metodo affidabile per rilevare e differenziare accuratamente i leucociti nelle diverse subpopolazioni (in analogia con quanto si considera nella pratica clinica ematologica) ed una loro apparente bassa concentrazione non esclude di per sé una condizione di flogosi/infezione delle ghiandole accessorie sessuali maschili (prostata, vescicole seminali, epididimi) specie se cronicizzate. In secondo luogo, esiste un cruciale ed importante aspetto metodologico che sta nella diagnosi differenziale di laboratorio seminologico tra leucociti e cellule germinali immature che

nell'insieme costituiscono la popolazione di “cellule rotonde” (round cells): infatti i globuli bianchi non possono essere distinti facilmente dalle cellule germinali immature a causa della loro simili colorazioni e caratteristiche citomorfologiche. Anche per questo motivo, il manuale della WHO raccomanda l'utilizzo di un colorante citochimico (a base di orto-toluidina) specifico per l'attività perossidasi leucocitaria (Endtz *et al.*, 1974), caratteristica propria dei granulociti. Purtroppo il metodo della colorazione perossidasi ha due svantaggi: non rileva i granulociti attivati che hanno già rilasciato i propri granuli e non rileva altri tipi di leucociti che non esprimono la perossidasi, come i macrofagi, i monociti e i linfociti.

Ecco perché finalmente, per studiare i meccanismi con cui i leucociti possono causare alterazioni dei parametri spermatici convenzionali e non-convenzionali (biofunzionali), è stata essenziale la determinazione della “totalità” della popolazione leucocitaria (che sfrutta anticorpi monoclonali marcati in fluorescenza: metodo immunocitochimico con Ab anti pan-leucocitario CD-45, antigene panleucocitario comune, così

definito in quanto espresso da tutte le classi di leucociti umani) nel liquido seminale (Vicari,1999; La Vignera *et al.*,2013) di categorie di pazienti infertili con infezione cronica delle ghiandole accessorie maschili (male accessori gland infections, MAGI), dimostrando una “elevata”, “intermedia” o “più bassa” risposta infiammatoria (in termini di leucocitospermia ed iperproduzione di ROS) rispettivamente nel seme di pazienti con prostatite-vescicolite-epididimite, prostatite-vescicolite e prostatite (Vicari, 1999).

Pertanto, la colorazione immunoistochimica con l'utilizzo di anticorpi monoclonali anti pan-leucocitari CD45+, cioè contro tutte le sottopopolazioni leucocitarie, è ormai considerata da molti come il gold standard per una lettura al microscopio ottico nell'analisi dei leucociti nel liquido seminale, ma è un metodo costoso, che richiede tempo e non è standardizzato (Wolff *et al.*, 1988; Eggert-Kruse *et al.*, 1992; Kiessling *et al.*, 1995). Inoltre è stata riportata in molti studi (Keel, 2004) la variabilità inter osservatore e intra-osservatore, che porta a letture diverse dello stesso campione di liquido seminale.

Vari metodi sono stati proposti per migliorare l'affidabilità dell'esame del liquido seminale, come ad esempio un contatore Coulter (Brotherton et al., 1974), o l'analisi effettuata tramite dei software C.A.S.A. (computer assisted sperm analyzer) (Boyers et al., 1989) ,ma fin ad ora, nessuno di questi approcci si sono dimostrati realmente utili per le applicazioni di routine.

Negli ultimi anni, la citofluorimetria a flusso è entrata nel laboratorio di Andrologia ed è stata ampiamente utilizzata per valutare caratteristiche bio-funzionali e strutturali degli spermatozoi come: la struttura della cromatina (Pasteur *et al.*, 1994), la funzione mitocondriale (Graham *et al.*, 1990), lo status acrosomiale (Thomas *et al.*, 1997), gli anticorpi antispermatozoi (Ke *et al.*, 1995), difetti spermatogenetici (Levek-Motola *et al.*, 2005) e molto altro. Il vantaggio della citofluorimetria a flusso è che molte migliaia di cellule possono essere analizzate in pochi secondi, dando una valutazione statisticamente più precisa tramite una tecnica riproducibile. Questa tecnica, se usata insieme ad anticorpi monoclonali, permette una rapida

analisi multiparametrica delle particelle ed è adatto per il conteggio leucociti seminali (Ricci *et al.*, 2000).

Altre applicazioni dei metodi in citofluorimetria sono state: il conteggio degli spermatozoi basato sulla colorazione del DNA (Spanò *et al.*, 1984); il rapporto di cellule ad una concentrazione nota di fluorosfere sia in specie di mammiferi (Evenson *et al.*., 1993) che nel liquido seminale umano (Eustache *et al.*, 2001).

- **Modello clinico di patologia infiammatoria cronica genitale femminile: leucociti nel muco cervicale.**

L'apparato riproduttivo femminile ha due funzioni principali: protezione contro i cambiamenti microbici e mantenimento, fino al termine, della gravidanza. L'apparato riproduttivo superiore comprende le tube di Falloppio, l'utero e l'endocervice mentre il tratto inferiore è costituito dalla portio e la vagina. Le cellule immunitarie che risiedono nel tratto riproduttivo svolgono ruoli contraddittori: mantengono l'immunità contro gli agenti patogeni vaginali nel tratto inferiore e nel tratto superiore stabiliscono la tolleranza immunitaria per gli spermatozoi e un embrione / feto. Il sistema immunitario è significativamente influenzato dagli ormoni steroidei sessuali, anche se i leucociti ne mancano dei recettori per estrogeni e progesterone. I leucociti, in entrambe le parti dell'apparato riproduttivo, sono distribuiti come aggregati o dispersi nello strato epiteliale, lamina propria e stroma. (Ki Lee *et al.* ,2015). Capire il sistema immunitario del tratto riproduttivo femminile contribuirà in modo significativo alla salute

delle donne e del successo in gravidanza. La mucosa del tratto riproduttivo femminile è diversa tra le vie superiori e inferiori. Mentre il tratto riproduttivo femminile superiore è coperto da un singolo strato di epitelio colonnare, il tratto inferiore è costituito da un singolo strato di epitelio non cheratinizzato stratificato, che forma una barriera più protettiva (Trifonova et al., 2014). Negli ultimi decenni, molti ricercatori si sono concentrati sui cambiamenti ciclici dei tessuti endometriali uterini e le loro cellule immunitarie. Tuttavia le caratteristiche del sistema immunitario e il ruolo di ciascuna delle cellule immunitarie nel tratto riproduttivo femminile sono ancora dibattute.

Pochi studi hanno indagato il modo con il quale i microrganismi vengono trasportati attraverso le mucose (Edwards *et al.*, 1985; Parr *et al.*, 1990) e le variazioni specifiche dei componenti cellulari associati con la progressione o eliminazione delle infezioni (McKenzie *et al.*, 1991; Gallichan *et al.*, 1998). In particolare, studi sulla distribuzione di cellule immunocompetenti del tratto genitale femminile hanno dato

risultati contrastanti. Alcuni autori hanno trovato più linfociti T CD4 + rispetto ai linfociti T CD8 + (Olaitan *et al.*,1996; Cohen *et al.*,2000), mentre altri Autori hanno trovato che le cellule T CD8 + siano più numerose rispetto ai linfociti T CD4+ (Given *et al.*,1997). I risultati contrastanti e la loro difficile interpretazione finale dipende dalla variabilità nei metodi utilizzati per raccogliere campioni, la selezione dei soggetti e le diverse tecniche di valutazione.

In letteratura, lo studio di determinazioni di biomarkers nelle flogosi cervicali incontra una serie di limiti (Castle & Giuliano, 2003):

- Sebbene citochine proinfiammatorie (quali TNF-alpha, IL-1beta, ed IL-6) di derivazione monocitica-macrofagica siano prodotte in corso di infezione da *T. vaginalis* (Han et al, 2009) o di *Clamydia trachomatis* (Agrawal et al, 2011), non si conosce del tutto quanto i livelli di biomarkers (leucociti, citochine) di flogosi cervicale possano essere rappresentativi di esposizione, danno o risposta immunitaria.

- Tali determinazioni non sono ancora sufficientemente riproducibili, né si è stabilita una maggiore valenza immunitaria (rispetto a determinazioni plasmatiche o sieriche degli stessi biomarkers).
- Sono altresì necessari studi metodologici standardizzati (insufficiente prelievo per poter determinare più citochine; modalità di prelievo unico o multiplo nel tempo);
- Nuove metodiche possono essere promettenti, quali: recycling immunoaffinity chromatography (RIC), citofluorimetria, protein microarrays (Vignali, 2000).

Nel presente disegno di studio, oggetto della tesi di Dottorato di Ricerca, a nostra conoscenza del tutto originale in letteratura, abbiamo voluto identificare le sub-popolazioni leucocitarie in citofluorimetria utilizzando una matrice biologica (muco cervicale) ed un modello di patologia riproduttiva femminile da infezione virale (donne HPV

positive, HPV+) vs gruppo di controllo (donne sane HPV negative, HPV-).

L'epitelio della cervice uterina umana comprende differenti tipi di cellule secretorie che, nelle sue diverse parti, variano per natura e quantità di granuli secretori. I secreti di queste cellule contribuiscono alla formazione del muco. Sono gli ormoni ovarici che controllano la secrezione di muco: il 17 β -estradiolo stimola la produzione di una grossa quantità di muco acquoso, mentre il progesterone inibisce l'attività delle cellule secretorie.

La quantità della secrezione di muco cervicale mostra variazioni cicliche: in donne normali in età riproduttiva, la produzione giornaliera di muco varia da 500 ml a metà ciclo fino a meno di 100 ml negli altri periodi. Inoltre, anche una piccola quantità di fluido proveniente dall'endometrio, dalle tube ed anche dal follicolo contribuisce a costituire il muco. Sono infine presenti leucociti e residui cellulari dell'epitelio uterino e cervicale. Il muco cervicale è un *idrogel*, formato

da una componente ad alta viscosità e da una componente a bassa viscosità, che comprende elettroliti, composti organici e proteine solubili. La componente ad alta viscosità è costituita da una rete macromolecolare di mucina, che è la prima responsabile delle caratteristiche reologiche del muco. La mucina cervicale è un sistema fibrillare formato da sub unità che sono costituite da un core peptidico e da catene laterali di oligosaccaridi. Le alterazioni cicliche dei costituenti del muco cervicale umano possono influenzare la capacità penetrativa degli spermatozoi e la loro sopravvivenza (WHO, 2010).

Un'infezione persistente da Papillomavirus Umani (HPV) è causa necessaria dell'insorgenza del cervico-carcinoma e delle sue lesioni pre-cancerose. I circa 40 genotipi di HPV che infettano la mucosa genitale vengono suddivisi in alto rischio (HR-HPV) e basso rischio (LR-HPV) oncogeno a seconda della alta e bassa associazione con la neoplasia cervicale (Lorincz *et al*, 1992):

1. a basso rischio (HPV 6/11, 42, 43, 44)
2. rischio intermedio (HPV 31, 33, 35, 51, 52, 58)

3. ad alto rischio / HPV 16

4. ad alto rischio / HPV 18.

L'insorgenza e progressione delle lesioni preneoplastiche cervicali è, però, associata non solo alla presenza di HPV ad alto rischio, ma, soprattutto, a rallentata clearance virale per oltre 18 mesi, alla capacità di integrazione degli HPV ad alto rischio e alla conseguente sovra-espressione delle oncoproteine E6/E7.

Pertanto capire il sistema immunitario del tratto riproduttivo femminile è estremamente importante nella gestione delle infezioni sessualmente trasmissibili, tra cui HPV, e nel miglioramento dei risultati di fertilità e la gravidanza.

SCOPI DELLA RICERCA

Utilizzando 2 modelli clinici di studio di patologia riproduttiva rappresentati da uomini con bassa ed elevata concentrazione di leucociti nel liquido seminale e da donne affette da HPV abbiamo mirato ai seguenti obiettivi:

obiettivo principale (primary outcome), comprendente analisi e differenziazione delle subpopolazioni leucocitarie (con l'utilizzo di anticorpi monoclonali in analisi citofluorimetrica) nel liquido seminale e nel muco cervicale;

obiettivo secondario (solo nel modello clinico maschile), comprendente (in analisi citofluorimetrica) i cosiddetti parametri spermatici non convenzionali: la funzione mitocondriale spermatica (con colorazione JC-1), l'esternalizzazione della fosfatidilserina PS (tramite la doppia colorazione Annessina V/ioduro di propidio PI) indicatore di una apoptosi precoce delle cellule, la compattazione della cromatina (colorazione PI) e la frammentazione del DNA (TUNEL test).

MATERIALI E METODI

- **I parte: casistica derivata dal modello clinico di patologia infiammatoria cronica genitale maschile**

Un totale di 105 pazienti sono stati arruolati presso l'U.O.C. di Andrologia ed Endocrinologia (Policlinico G. Rodolico) dell'Università di Catania, sede dei Laboratori principali di svolgimento della ricerca.

La casistica su suddivisa in tre gruppi sulla base della conta iniziale dei leucociti seminali stimata con il test colorimetrico della perossidasi (Endtz test):

gruppo di Controllo, comprendente 25 soggetti fertili con conta leucocitaria pari a 0 mil/ml;

gruppo I, comprendente 40 pazienti con moderata concentrazione di leucociti nel liquido seminale (conta leucocitaria 0.2 - 0.9 mil/ml);

gruppo II, comprendente 40 pazienti con leucocitospermia. (conta leucocitaria ≥ 1 mil/ml).

Criteri di esclusione

- Varicocele (non trattato o trattato);
- Idrocele;
- Patologie testicolari primitive (desunte da esame ecografico);
- Malattie genetiche (cariotipo alterati e / o la presenza di microdelezioni del cromosoma Y);
- Storia clinica di criptorchidismo;
- Malattie sistemiche (malattie renali, malattie epatiche, e diabete mellito);
- Fumo di sigaretta;
- Consumo di alcol;
- Uso concomitante di altri farmaci durante i precedenti 6 mesi;
- Infezioni microbiche delle ghiandole accessorie maschili (MAGI).

I PARTE: METODOLOGIA

Analisi standardizzata del liquido seminale (secondo WHO,2010)

I campioni di liquido seminale sono stati raccolti tramite ipsoazione in contenitore sterile dopo 2-5 giorni di astinenza sessuale e sono stati portati al laboratorio entro 30 minuti dopo l'eiaculazione. Per tutti i pazienti, l'analisi dello sperma è stata ripetuta 2 volte a circa 4 settimane di distanza. Secondo le linee guida dell'WHO del 2010, un'aliquota di ogni campione è stato valutato per il volume, pH, numero di spermatozoi, motilità progressiva, la morfologia e la concentrazione cellule rotonde.

Misurazione dei leucociti e cellule germinali immature

a) Leucociti seminali (perossidasi Test)

Il protocollo utilizzato è stato adattato da quello di Endtz (1974). La soluzione di lavoro utilizzata per la prova è stata ottenuta aggiungendo 1 µl di H₂O₂ a 20 µl di una soluzione madre allo 0,09% 3,3'-

diaminobenzidina di tetraidrocloride (DAB, ISOPAC, Sigma, Milano, Italia) in 40% di etanolo.

In ogni saggio, 20 μ l di sperma è stato incubato con 20 μ l di soluzione di lavoro in una provetta Eppendorf per 5 minuti a temperatura ambiente. Prima di preparare il vetrino, sono stati aggiunti 40 μ l di PBS.

Le cellule perossidasi-positive sono state caratterizzate da una colorazione giallo-marrone-rosso, mentre le cellule perossidasi-negative sono rimaste incolori. Sono state contate almeno 100 cellule con microscopio ottico a 400x e sono stati valutate le percentuali di cellule perossidasi-positivi e quelle negative. Il conteggio totale dei leucociti è espressa in milioni per millilitro di sperma.

b) Cellule germinali immature nel liquido seminale

Gli spermatidi sono stati differenziati da leucociti da uno striscio di liquido seminale colorato con la tecnica di Papanicolaou (Johanisson et al,2000). Gli spermatidi sono stati individuati sulla base dei seguenti

parametri: colorazione, dimensione, forma e dimensione nucleo (circa 5 μ M) e assenza di perossidasi intracellulare. Morfologicamente, gli spermatidi multinucleati sono stati distinti dai leucociti polimorfonucleati dalla presenza di colore rosa in contrasto con il colore bluastrò di leucociti polimorfonucleati.

Valutazione citofluorimetrica

a. Principi essenziali della tecnica

L'analisi è stata condotta con un citofluorimetro EPICS XL (Coulter Electronics, IL, USA), equipaggiato con un laser ad argon a 488 nm e tre rivelatori di fluorescenza: verde (FL-1 a 525 nm), arancione (FL-2-575 nm) e rosso (FL-3 a 620 nm). Per ogni campione, 100.000 eventi sono stati misurati ad una bassa velocità di flusso e analizzati utilizzando System II, versione 3.0.

b. Analisi citofluorimetrica delle sub popolazioni leucocitarie

Per eseguire la conta leucocitaria assoluta, 100 μ l di ogni campione di sperma liquefatto sono stati lavati con 1 ml di PBS. Dopo la

centrifugazione, a 5600rpm per 5', il surnatante è stato rimosso e il campione è stato incubato con una miscela contenente Syto-16 fluorescente per identificare gli spermatozoi ed escludere detriti (concentrazione finale 200 nM) (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) e gli anticorpi necessari per individuare le sub-popolazioni leucocitarie. Le diverse sub-popolazioni vengono identificate grazie alle differenze antigeniche delle relative membrane cellulari. Gli anticorpi utilizzati, marcati con fluorocromi di diverso colore, sono:

- **anti-CD45- ECD** (antigene pan-leucocitico) marcato in rosso per riconoscere la “totalità dei leucociti” del seme;
- **anti -CD16-FITC** marcato in verde per riconoscere PMN;
- **anti-CD14-PE** marcato in arancio per riconoscere i macrofagi/monociti;
- **anti –CD3- FITC/PE** (antigene pan T specifico);
- **anti -CD8- PE** anticorpo anti linfociti T suppressor;
- **anti- CD4- FITC** anticorpo anti linfociti T helper.

L'aggiunta di 100 µl di Flow-Count Fluorospheres (Beckmann-Coulter, Fullerton, CA, USA) in 1034 perline / mL ci ha permesso di determinare la conta leucocitaria assoluta mediante citometria a flusso. Dopo incubazione al buio per 20 minuti a temperatura ambiente, è stato aggiunto 1 ml di PBS e il campione è stato analizzato mediante citofluorimetria (FACSCalibur, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). Per ogni esame, sono stati acquisiti 100.000 eventi. Il numero totale di leucociti per millilitro è stato calcolato secondo la seguente formula (Ricci *et al.*, 2000):

$$\frac{\% \text{ monoclonal antibody} - \text{positive cells} \times \text{no. of spermatozoa/ml}}{100}$$

c. Analisi citofluorimetrica dei parametri spermatici non convenzionali

Colorazione JC-1

Una sospensione di 1×10^6 cellule/mL di ogni campione è stata incubata al buio con JC-1 (Space Import-Export, Milano, Italia), per 10-

15minuti a 37°C per definire il potenziale di membrana mitocondriale (MMP) .

Test ANNESSINA V/PI

La colorazione con Annessina V/PI è stata eseguita utilizzando un Kit disponibile in commercio (Annexin V-FITC Apoptosis detection kit, BeckmanCoulter,IL). Un'aliquota contenente 1×10^6 cellule/ml, dopo lavaggio in PBS, è stata risospesa in 0.5ml di binding buffer, marcato con 1 µl di Annexin V-FITC e 5 µl di PI e incubato al buio per 10 minuti a 5°C e immediatamente analizzato. Il segnale è stato rilevato attraverso i rilevatori FL-1 (FITC) and FL-3 (PI). I diversi modelli di marcatura nell'analisi bivariate PI / annexinV identifica differenti popolazioni di cellule: annessina-negativo e PI- negativo sono stati designati come cellule vive; annessina-positivi e PI-negativi come spermatozoi con PS esternalizzata (cellule apoptotiche precoci).

Colorazione con PI

Un'aliquota di sperma contenente 1×10^6 cellule/ml è stato centrifugato a 500g per 10 minuti a temperatura ambiente. Una volta rimosso il surnatante gli spermatozoi sono stati incubati a T.A. per 10 minuti al buio con LPR DNA-Prep Reagent contenente 0.1% di cianuro potassio, 0.1%NaN₃, detergente non ionico (BeckmanCoulter,IL). Dopo sono stati incubati a T.A. per 10 minuti al buio con Stein-DNA- Prep reagent contenente 50µg/ml di PI(<0.5%), RNAsi Tipo A (4 Kunits/ml), <0.1% NaN₃.

Test TUNEL

Il TUNEL test è stato effettuato utilizzando il Kit Apoptosis Mebstain Kit (BeckmanCoulter,IL). Come da protocollo, il controllo negativo è stato ottenuto non aggiungendo TdT alla miscela di reazione; il controllo positivo è stato ottenuto dal pretrattamento degli spermatozoi con 1 µg/ml di RNAsi-free deossiribonucleasi I (Sigma Chemical) a 37°C per 60 minuti prima della marcatura.

Analisi Statistica

Tutti i risultati sono stati riportati come media $\pm$ SEM. Le variazioni delle medie dei gruppi di studio tra loro e vs il gruppo di controllo sono state analizzate tramite il *t*-student's test. Una differenza statistica è stata definita significativa con valori di $p < 0.05$.

MATERIALI E METODI

- **II parte - Casistica derivata dal modello clinico di patologia infiammatoria cronica genitale femminile**

Un totale di 22 donne fertili sono state arruolate presso l'ambulatorio di colposcopia dell'U.O.C. di Ginecologia ed Ostetricia dell'Università di Catania (Policlinico G. Rodolico). Sono state suddivise in:

Controllo (n=9 soggetti HPV -)

Gruppo A (n=13 pazienti HPV+)

Al gruppo A appartengono donne HPV + aventi sia genotipi virali a basso rischio che ad alto rischio. Dal gruppo A inoltre è stato estrapolato a parte un subgruppo (gruppo B) costituito solo da donne HPV+ con genotipi (16/18) ad alto rischio.

Criteri di inclusione

- infezione da HPV positivo
- basso grado CIN-1
- segni colposcopici di HPV

- età > 18 anni

Criteri di esclusione

- Menopausa;
- Pap-Test positivo;
- Malattie genetiche;
- Malattie sistemiche;
- Fumo di sigaretta;
- Consumo di alcol;
- Uso concomitante di altri farmaci durante i precedenti 6 mesi.

II PARTE: METODOLOGIA

Preparazione del muco cervicale

Da ogni donna, in fase preovulatoria, sono stati prelevati dall'endocervice con una pipetta circa 300µl di muco cervicale. Prima di procedere all'analisi citofluorimetrica, per promuovere il processo di fluidificazione, è stata effettuata una digestione enzimatica del muco mediante bromelina, un enzima proteolitico ad ampia specificità. Sono

stati preparati 10 UI/ml di bromelina disciolta in PBS mediante miscelazione di 15-20 minuti. Ogni campione è stato diluito 1:2 con 10 UI/ml di bromelina, ben miscelato con una pipetta e incubato a 37°C per 15 minuti. A fluidificazione completa il campione era giudicato idoneo all'analisi delle subpopolazioni leucocitarie tramite la metodica citofluorimetrica.

Analisi citofluorimetrica delle sub popolazioni leucocitarie

Per eseguire la conta leucocitaria assoluta, 100 µl di ogni campione di muco cervicale liquefatto sono stati lavati con 1 ml di PBS. Dopo la centrifugazione, a 5600rpm per 5', il surnatante è stato rimosso e il campione è stato incubato con una miscela gli anticorpi necessari per individuare le sub-popolazioni leucocitarie. Le diverse sub-popolazioni vengono identificate grazie alle differenze antigeniche delle relative membrane cellulari. Gli anticorpi utilizzati, marcati con fluorocromi di diverso colore, sono:

- anti-CD45- ECD (antigene pan-leucociti) marcato in rosso per riconoscere la “totalità” dei leucociti del muco cervicale;
- anti -CD16-FITC marcato in verde per riconoscere PMN;
- anti-CD14-PE marcato in arancio per riconoscere i macrofagi/monociti;
- anti –CD3- FITC/PE (antigene pan T specifico);
- anti -CD8- PE anticorpo anti linfociti T suppressor;
- anti- CD4- FITC anticorpo anti linfociti T helper.

L'aggiunta di 100 µl di Flow-Count Fluorospheres (Beckmann-Coulter, Fullerton, CA, USA) in 1034 sferette / mL ci ha permesso di determinare la conta leucocitaria assoluta mediante citometria a flusso.

Dopo incubazione al buio per 20 minuti a temperatura ambiente, è stato aggiunto 1 ml di PBS e il campione è stato analizzato mediante

citofluorimetria (FACSCalibur, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). Per ogni esame, sono stati acquisiti 100.000 eventi.

Analisi Statistica

Tutti i risultati sono stati riportati come media $\pm$ SEM. Le variazioni delle medie dei gruppi di studio tra loro e vs il gruppo di controllo sono state analizzate tramite il t-student's test. Una differenza statistica è stata definita significativa con valori di $p < 0.05$

RISULTATI

- **I parte – Risultati osservati nel modello clinico di patologia infiammatoria cronica genitale maschile**

L'età dei pazienti dei *gruppi I* (a bassa concentrazione di leucociti seminali) e *gruppo II* (leucocitospermia) (rispettivamente 30 ± 3 e 31 ± 6 anni) non differisce statisticamente dall'età dei pazienti del gruppo di controllo ($32\pm1,5$ anni) (Tabella 1).

Riguardo alla valutazione dei parametri seminali convenzionali, i pazienti del *gruppo II* mostrano concentrazione, numero totale di spermatozoi, motilità progressiva e forme normali significativamente ($p<0,05$) più basse rispetto a quelli del gruppo di controllo (Tabella 1).

I pazienti del *gruppo I* esibiscono valori medi di percentuale di motilità progressiva e di forme normali significativamente più basse ($p<0,05$) rispetto al gruppo di controllo (Tabella 1).

In Tabella 2 sono riportati i dati relativi alla conta delle subpopolazioni leucocitarie (obiettivo primario della tesi). Per quanto riguarda la

concentrazione di cellule CD45+ si osserva che sia i pazienti del *gruppo I* che quelli del *gruppo II* presentano un aumento statisticamente significativo ($p < 0,05$) rispetto al gruppo di controllo (rispettivamente $0,4 \pm 0,1$ vs $1,1 \pm 0,2$ (mil/ml) e $0,4 \pm 0,1$ vs $5,3 \pm 1,4$ (mil/ml)).

La marcatura con le diverse combinazioni di anticorpi ha permesso di discriminare le subpopolazioni di leucociti. In particolare i granulociti sono marcati con gli anticorpi CD45+CD16+; i macrofagi/monociti con CD45+CD14+; i linfociti T helper con CD45+CD3+ CD4+; i linfociti T citotossici CD45+CD3+ CD8+.

Nei due gruppi di *studio (I e II)* e nel gruppo di controllo la sottopopolazione leucocitaria predominante è quella dei granulociti e non vi sono differenze significative tra i gruppi. Anche per quanto riguarda la popolazione dei macrofagi e dei monociti non vi sono differenze significative tra i tre gruppi esaminati. Per quanto riguarda la popolazione dei linfociti T si osservano delle differenze nei vari gruppi. Confrontando il gruppo di controllo vs il *gruppo I*, il *gruppo I* mostra

un aumento nella percentuale dei linfociti T helper, anche se non significativo, ($2,3 \pm 0,5\%$ contro $1,6 \pm 0,8\%$), mentre risulta significativo ($p < 0,05$) l'incremento dei linfociti T citotossici ($5,9 \pm 0,98\%$ contro $1,1 \pm 1,3\%$). L'aumento della percentuale di cellule T si osserva anche confrontando il gruppo di controllo vs il *gruppo II*. In questo caso si ha una significativa più alta percentuale di linfociti T helper ($8,2 \pm 2\%$ vs. $1,6 \pm 0,8\%$; $p < 0,05$) T citotossici ($9,71 \pm 1,71\%$ vs. $1,1 \pm 1,3\%$; $p < 0,05$).

Infine, in Tabella 3, sono riportati i valori dei parametri spermatici non convenzionali valutati mediante analisi citofluorimetrica.

Confrontando i risultati tra il gruppo di controllo con il *gruppo I* (a bassa concentrazione leucocitaria) è emerso che:

i pazienti del gruppo I mostrano percentuali significativamente ($p < 0,05$) più alte di: spermatozoi con basso potenziale di membrana mitocondriale (MMP) ($18 \pm 1,2\%$ vs. $2,5 \pm 1,8\%$), spermatozoi con più alte percentuali di cromatina decondensata ($11 \pm 4,2\%$ vs. $6 \pm 3,2\%$) e di DNA frammentato ($5,5 \pm 2,6\%$ vs. $1,2 \pm 0,8\%$).

Per quanto riguarda le percentuali di cellule in apoptosi precoce, valutata in citofluorimetria conteggiando le cellule presentanti esternalizzazione della fosfatidilserina, e di cellule vive, valutate con il test Annessina V/PI, non vi sono differenze statisticamente significative.

Confrontando i risultati del gruppo di controllo vs *il gruppo II* (leucocitospermia) è emerso che:

i pazienti del gruppo II presentano un quadro peggiore rispetto al controllo. In particolare sia il potenziale di membrana mitocondriale ($26,3 \pm 3,7\%$ vs $2,5 \pm 1,85\%$), la percentuale di spermatozoi con esternalizzazione fosfatidilserina ($8,5 \pm 3,2\%$ vs $3 \pm 2,8\%$), la percentuale di cellule con cromatina decondensata ($17,7 \pm 2,3\%$ vs $6 \pm 3,2\%$) ed infine la percentuale di spermatozoi con DNA frammentato ($8,6 \pm 2,5\%$ vs $1,2 \pm 0,8\%$) sono tutti statisticamente ($p < 0,05$) più bassi rispetto ai controlli.

Infine la percentuale di cellule vitali risulta essere significativamente ($p < 0,05$) più bassa nei pazienti del gruppo II rispetto a quelli del gruppo di controllo ($68,6 \pm 9,4\%$ contro $90 \pm 8\%$).

- **II parte – Risultati osservati nel modello clinico di patologia infiammatoria cronica genitale femminile**

L'età delle pazienti del gruppo A (30 ± 2 anni) non differisce statisticamente dall'età dei pazienti del gruppo di controllo (28 ± 2 anni) (Tabella 4).

Sotto il profilo clinico le donne del gruppo A presentano infezione da HPV ($13/13=100\%$), basso grado di CIN-1 ($10/13= 76.9\%$), segni colposcopici di infezione HPV-associata (condilomi ed altro) ($13/13=100\%$).

In particolare 9/13 donne (69.2%) del gruppo A, con infezione HPV positiva sostenuta da genotipi virali 16/18 (ad alto rischio oncogeno) sono state estrapolate a formare il gruppo B del nostro studio.

In Tabella 4 sono stati, inoltre, riportati i dati relativi alla conta delle subpopolazioni leucocitarie (obiettivo primario della tesi). Per quanto riguarda la concentrazione di cellule CD45+(mil/ml) si osserva che nelle pazienti del gruppo A si ebbe un aumento statisticamente

significativo ($p < 0,05$) rispetto al gruppo di controllo (rispettivamente 4.5 ± 0.4 vs $2,1 \pm 0,2$ (mil/ml)). La marcatura con le diverse combinazioni di anticorpi ha permesso di discriminare le subpopolazioni di leucociti.

Fra il gruppo di controllo e il gruppo A oggetto di studi, esaminando la concentrazione delle popolazioni dei macrofagi / monociti e dei granulociti neutrofili non sono state osservate differenze significative.

Per quanto riguarda la popolazione dei linfociti T si osservano delle differenze statisticamente significative: nel gruppo A si ha un aumento nella percentuale dei linfociti T helper rispetto ai controlli, ($15 \pm 1.8\%$ contro $3.7 \pm 0.7\%$; $p < 0,05$) e un significativo incremento dei linfociti T citotossici (25 ± 1.5 contro $3.9 \pm 0.5\%$; $p < 0,05$).

Inoltre, confrontando le percentuali di subpopolazioni leucocitarie nel muco cervicale di donne HPV+ (gruppo in toto= gruppo A) vs donne HPV+ (per genotipi 16 e 18 = gruppo B) si osserva aumento statisticamente significativo ($p < 0,05$) della percentuale di cellule di cellule T citotossici nelle donne del gruppo B (Tabella 5)

(rispettivamente $25 \pm 1.5\%$ contro $30 \pm 1.6\%$). Nel confronto tra i gruppi A e B non si osservano altre differenze statisticamente significative, anche se si vuole sottolineare un trend di aumento non significativo delle percentuali di linfociti T helper nel gruppo B.

DISCUSSIONE

a) Commento dei risultati derivati dal modello di studio di patologia infiammatoria cronica genitale maschile

In questo modello di studio condotto su casistica di pazienti ed un gruppo di controllo screenata inizialmente per una più rapida lettura al microscopio ottico, solo sulla base di una differente concentrazione di leucociti seminali (mediante valutazione colorimetrica convenzionale dei leucociti in microscopia ottica), furono rubricati (per gruppo di studio e controllo) i parametri convenzionali spermatici applicando metodiche standardizzate (WHO, 2010). In seconda analisi, l'applicazione della metodica citofluorimetrica, ha permesso di analizzare sia le subpopolazioni leucocitarie in presenza di leucociti a bassa concentrazione ($0,1 - 1 \times 10^6/\text{mL}$) e ad elevata concentrazione ($\geq 1 \times 10^6/\text{mL}$) sia i parametri spermatici biofunzionali non-convenzionali (vitalità, potenziale membrana mitocondriale, apoptosi precoce, condensazione della cromatina e DNA frammentato).

Dai risultati sono emerse differenze significative nei parametri seminali e nei parametri non convenzionali tra i 2 gruppi di studio e il gruppo di controllo (senza leucociti). Inoltre, in particolare già a bassi livelli di leucociti (< 1 mil/ml) si osservarono danni al DNA e alterazione del MMP. Inoltre in questo studio si osservarono differenze statisticamente significative riguardo alla conta dei CD45+ tra i tre gruppi esaminati. Già a bassi livelli di leucociti si osservarono delle variazioni nelle concentrazioni di linfociti T helper e T citotossici. Questo potrebbe suggerire un incremento dell'attività delle cellule T responsabile degli alterati parametri convenzionali e non convenzionali osservati nello studio. L'attivazione dei linfociti T helper causa il rilascio di citochine, in particolare interferone, del quale è ben conosciuto l'effetto negativo sulla motilità degli spermatozoi.

Questo studio suggerisce che i difetti bio-morfo-funzionali (in termini di parametri convenzionali e non-convenzionali) degli spermatozoi presenti sia nei pazienti leucocitospermici che in quelli aventi una conta leucocitaria più bassa, possa essere dovuto alle citochine rilasciate dalle

cellule T attive durante le differenti fasi della spermiogenesi. Tutto ciò potrebbe essere mediato dalle citochine o dai ROS prodotti.

Gli effetti di leucocitospermia sulla fertilità sono ancora controversi.

Studi *in vitro* hanno dimostrato in maggior numero di evidenze e modelli di studio che un elevato livello di leucociti può indurre stress ossidativo con modificazioni quantitative (dei *parametri spermatici convenzionali*) e/o qualitative (*in termini di parametri spermatici non convenzionali biofunzionali*) (Fedder J,1996; Arata *et al.*,2000; Saleh *et al.*,2002; Moskovtsev *et al.*,2007). Nel bilancio complessivo devono a rigore essere tenuti anche in considerazione anche le minoritarie evidenze di effetti positivi dei leucociti sulla morfologia (Tomlinson *et al.*,1992; Kiessling *et al.*,1995).

È stato osservato che neutrofili e macrofagi costituiscono circa il 90% dei leucociti seminali, che possono promuovere infertilità maschile danneggiando spermatozoi tramite la generazione di ROS e l'induzione di apoptosi (Tremellen *et al.*,2010).

I risultati di maggiore interesse nella nostra ricerca si possono così compendiare:

- 1) Il gruppo II con leucocitospermia e il gruppo I (con leucociti nel liquido seminale $<1\text{mil/ml}$) presentano una minore percentuale di spermatozoi vitali e una maggior percentuale di spermatozoi presentanti segni di apoptosi precoce rispetto al gruppo di controllo.
- 2) Anche il gruppo di pazienti con bassa concentrazione di leucociti (gruppo I) rispetto al gruppo di controllo esibisce riduzione statisticamente significativa di MMP, cromatina decondensata e DNA frammentato. Questo secondo aspetto richiama quanto evidenziato da altri autori (Sharma *et al.*, 2001; Saleh *et al.*, 2002) sospettando come meccanismo patogenetico lo stress ossidativo.

Il cut-off della WHO è stata contestato in precedenza in molti altri studi (Punab *et al.*, 2003; Mahfouz *et al.*, 2010; Sharma *et al.*, 2001). Con questo studio ci si vuole unire ai precedenti sostenendo che anche gli uomini

con livelli più bassi di leucociti nel liquido seminale possono avere fattori di rischio per l'infertilità, e possono richiedere un trattamento.

Questa area di studio è relativamente nuova e questo è il primo studio a nostra conoscenza ad esaminare le sub popolazioni leucocitarie e gli effetti di bassi livelli di leucociti nello sperma sui parametri convenzionali e non convenzionali.

b) Commento dei risultati derivati dal modello di studio di patologia infiammatoria cronica genitale femminile

A nostra conoscenza questo è il primo studio che mostra l'analisi delle sottopopolazioni leucocitarie, con l'utilizzo della metodica citofluorimetrica, nel muco cervicale di donne HPV- e HPV+. Finora gli studi riguardanti le cellule del sistema immunitario sono state effettuati su campioni di tessuto cervicale o con prelievi effettuati con citobrush.

Il muco cervicale è stato prelevato a livello dell'endocervice in donne non in menopausa in quanto le fluttuazioni ormonali possono influenzare la composizione delle cellule immunitarie nell'apparato genitale e

possono cambiare durante il ciclo mestruale e la gravidanza (Wira et al., 2005). Nello studio, in accordo con altri studi precedenti condotti su diverse matrici biocellulari (biopsie di tessuto cervicale), è stata ritrovata una percentuale di cellule CD14+ (macrofagi) nelle donne HPV- e HPV+ pari a circa il 12%. (Wira et al., 2005; Saba et al., 2010).

Nel presente studio persino nel muco cervicale di entrambi i gruppi esaminati con infezione in toto HPV+ (gruppo A) o con infezione HPV+(genotipo 16 e 18) (gruppo B), in accordo con quanto riportato precedentemente in altri lavori sull'espressione dei linfociti T CD8+ nel "tessuto cervicale", si ha una sovra-espressione di tali linfociti rispetto ai linfociti T CD4+. Ciò è interessante in quanto linfociti T CD8 + sono una componente fondamentale di resistenza agli agenti patogeni intracellulari, in particolare, alle infezioni virali (Pudney et al., 2005). Questo studio sembra confermare nel muco cervicale le concentrazioni delle sottopopolazioni leucocitarie trovate nel "tessuto cervicale" di donne HPV- e per la prima volta nel muco cervicale di donne HPV+.

I risultati ottenuti dalla nostra ricerca, per quanto conseguiti su una casistica limitata, sono d'interesse scientifico e clinico e meritano un approfondimento su una casistica più copiosa, magari con diversa espressione dell'infezione HPV+ o diversa origine fenotipica virale.

TABELLE

Tabella 1: Età e parametri spermatici convenzionali in funzione della differente concentrazione di leucociti dei gruppi di studio (I e II) e del gruppo di controllo

	Controlli (n=25)	Gruppo I (n=40)	Gruppo II (n=40)
Leucociti seminali (mil/ml)	0±0,01	0,6±0,3	4,1±0,8
Eta'	32±1,5	30±3	31±6
Volume(ml)	3±1,4	3,54±0,9	2,8±0,58
Concentrazione (mil/ml)	59±8	43±4,7	11±6,5*
Numero totale (ml)	296±64	146±15,7	34±9,8
Motilità progressiva(%)	35,06±7	20±2,1**	12±0,8*
Forme normali(%)	28±10	18±2,5**	8,4±1,9*

I valori furono espressi come media ± SEM

* p<0.05 vs controlli

** p<0.05 vs controlli

Tabella 2: Concentrazione totale pan-leucocitaria e delle subpopolazioni leucocitarie nel seme dei gruppi di studio (I e II) e del gruppo di controllo

		Controlli (n=25)	Gruppo I (n=40)	Gruppo II (n=40)
CD45+ (mil/ml)		0,4±0,1	1,1±0,2*	5,3±1,4*
CD45+CD16+ (%)	Neutrofili	50±3,6	50±2,8	55±8
CD45+CD14+ (%)	Macrofagi/monociti	18±1,6	20±3	23±5
CD45+CD3+ CD4+(%)	Linfociti T helper	1,6±0,8	2,3±0,5	8,2±2*
CD45+CD3+ CD8+(%)	Linfociti T citotossici	1,1±1,3	5,9±0,98**	9,71±1,71*

I valori furono espressi come media $\pm$ SEM

* p<0.05 vs controlli

** p<0.05 vs controlli

Tabella 3: Età e parametri spermatici non-convenzionali in funzione della differente concentrazione di leucociti dei gruppi di studio (I e II) e del gruppo di controllo

	Controlli (n=25)	Gruppo I (n=40)	Gruppo II (n=40)
Basso MMP(%)	2,5±1,8	18±1,2**	26,3±3,7*
Esternalizzazione Fosfatidilserina(%)	3±2,8	5±2,8	8,5±3,2*
Cellule vitali(%)	90±8	85±6,5	68,6±9,4*
Cromatina decondensata (%)	6±3,2	11±4,2**	17,7±2,3*
DNA Frammentato(%)	1,2±0,8	5,5±2,6**	8,6±2,5*

I valori furono espressi come media $\pm$ SEM

* p<0.05 vs controlli

** p<0.05 vs controlli

Tabella 4: Età e concentrazione totale pan-leucocitaria e delle subpopolazioni leucocitarie nel muco cervicale di donne di controllo (HPV-) e con infezione HPV+ (gruppo A)

		Controllo (n=9)	Gruppo A (n=13)
Età		28±2	30±2
CD45+ (mil/ml)		2,1±0,2	4,5±0,4*
CD45+CD16+ (%)	Neutrofili	30±0,8	24±2,1
CD45+CD14+ (%)	Macrofagi/monociti	12±1,8	11±1,4
CD45+CD3+ CD4+(%)	Linfociti T helper	3,7±0,7	15±1,8*
CD45+CD3+ CD8+(%)	Linfociti T citotossici	3,9±0,5	25±1,5*

I valori furono espressi come media $\pm$ SEM

* p<0.05 vs gruppo di controllo

Tabella 5: Età e concentrazione totale pan-leucocitaria e delle subpopolazioni leucocitarie nel muco cervicale di donne con infezione HPV+ in toto o con solo genotipo virale HPV 16-18 (gruppo B)

		Gruppo A (n=13)	GruppoB(n=9)
Età		30±2	29±2
CD45+ (mil/ml)		4,5±0,4	5±0,3
CD45+CD16+ (%)	Neutrofili	24±2,1	20±1,7
CD45+CD14+ (%)	Macrofagi/monociti	11±1,4	10±1,3
CD45+CD3+ CD4+(%)	Linfociti T helper	15±1,8	18±1,5
CD45+CD3+ CD8+(%)	Linfociti T citotossici	25±1,5	30±1,6*

I valori furono espressi come media ± SEM

* p<0.05 vs gruppo B

BIBLIOGRAFIA

- Agrawal T, Bhengraj AR, Vats V, Salhan S, Mittal A. Expression of TLR 2, TLR 4 and iNOS in cervical monocytes of Chlamydia trachomatis-infected women and their role in host immune response. *Am J Reprod Immunol*. 2011; 66(6):534-543.
- Alvarez G.J. Increased DNA damage in sperm from leukocytospermic semen samples as determined by the sperm chromatin structure assay. 2002 *Fertil. Steril*. 78(2): 319-329
- Arata de Bellabarba G, Tortolero I, Villarroel V, Molina CZ, Bellabarba C, Velazquez E: Nonsperm cells in human semen and their relationship with semen parameters. *Fertil Steril* 2000, 45:131–136.
- Aziz, N., et al., Novel associations between specific sperm morphological defects and leukocytospermia. *Fertil Steril*, 2004. 82(3): p. 621-627.
- Boyers SP, Davis RO and Katz DF Automated semen analysis. 1989 *Curr Prob Obstet Gynecol Fertil* 12,165–200
- Barraud-Lange V, Pont JC, Ziyyat A, Pocate K, Sifer C, Cedrin-Durnerin I, Fechtali B, Ducot B, Wolf JP: Seminal leukocytes are Good Samaritans for spermatozoa. *Fertil Steril* 2011, 96:1315–1319.
- Brotherton J and Barnard G Estimation of number, mean size and size distribution of human spermatozoa in oligospermia using a Coulter counter. *J Reprod Fertil* 1974; 40,341–357.
- Castle PE, Giuliano AR Chapter 4: Genital Tract Infections, Cervical Inflammation, and Antioxidant Nutrients—Assessing Their Roles as Human Papillomavirus Cofactors. *J Nat Cancer Institute Monographs* 2003; 31, 29-34,
- Cocuzza M, Athayde KS, Agarwal A, Sharma R, Pagani R, Lucon AM, Srougi M, Hallak J: Age-Related Increase of Reactive Oxygen Species in Neat Semen in Healthy Fertile Men. *Urology* 2008, 71:490-494.
- Cohen RC, Plummer FA, Mugo N, et al. Increased IL-10 in the endocervical secretions of women with non-ulcerative sexually transmitted diseases: a mechanism for enhanced HIV-1 transmission? *AIDS* 1999;13:327–32.
- Cottell E., et al., Are seminal fluid microorganisms of significance or merely contaminants? *Fertil Steril*, 2000. 74(3): p. 465-470.
- Cooper TG, Hellenkemper B: Improving precision in the assessment of round cell numbers in human semen. *Asian J Androl* 2010, 12:111–114.
- De Lamirande E, Gagnon C: Reactive oxygen species and human spermatozoa. *J Androl* 1992, 13:379–386.

Edwards TNJ, Morris BH. Langerhans cells and lymphocyte subsets in the female genital tract. *Br J Obstet Gynaecol* 1985;92:974–82.

Eggert-Kruse, W., Bellmann, A., Rohr, G. Differentiation of round cells in semen by means of monoclonal antibodies and relationship with male fertility. *Fertil. Steril.*, 1992 58, 1046–1055.

Endtz AW. A rapid staining method for differentiating granulocytes from “germinal cells” in Papanicolaou stained semen. *Acta Cytologica* 1974;18(1):2–7.

Esfandiari, N., et al., Positive bacterial culture of semen from infertile men with asymptomatic leukocytospermia. *Int J Fertil Womens Med*, 2002. 47(6): p. 265-270.

Esteves SC: Effect of cigarette smoking on levels of seminal oxidative stress in infertile men: a prospective study. *Int Braz J Urol* 2002, 28:484-485.

Eustache F, Jouannet P and Auger J Evaluation of flow cytometric methods to measure human sperm concentration. *J Androl* 2001; 22:558–567.

Evenson DP, Parks JE, Kaproth MT and Jost LK. Rapid determination of sperm cell concentration in bovine semen by flow cytometry. *J Dairy Sci* 1993; 76:86–94.

Fedder J: Nonsperm cells in human semen: with special reference to seminal leukocytes and their possible influence on fertility. *Fertil Steril* 1996, 36:41–65.

Gallichan WS, Rosenthal KL. Long term immunity and protection against herpes simplex virus type 2 in the murine female genital tract after mucosal but not systemic immunization. *J Infect Dis* 1998;177:1155–61

Gambera L, Serafini F, Morgante G, Focarelli R, De Leo V, Piomboni P: Sperm quality and pregnancy rate after COX-2 inhibitor therapy of infertile males with abacterial leukocytospermia. *Hum Reprod* 2007, 22:1047-1051

Gil-Guzman E, Ollero M, Lopez MC, Sharma R, Alvarez J, Thomas A, Agarwal A Differential production of reactive oxygen species by subset of human spermatozoa at different stages of maturation. *Hum. Reprod* 2001; 16:1922-1930.

Given AL, White HD, Stern JE, et al. Flow cytometric analysis of leukocytes in the human female genital tract: comparison of fallopian tube, uterus, cervix and vagina. *Am J Reprod Immunol* 1997;38:350–9.

Graham JK, Kunze E and Hammerstedt RH Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. *Biol Reprod* 1990; 43:55–64.

Griveau JF, Lannou DL: Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. *Int J Androl* 1997, 20:61–69.

- Han IH, Goo SY, Park SJ, Hwang SJ, Kim YS, Yang MS, Ahn MH, Ryu JS. Proinflammatory cytokine and nitric oxide production by human macrophages stimulated with *Trichomonas vaginalis*. *Korean J Parasitol*. 2009;47(3):205-212.
- Henkel, R., et al., Effect of reactive oxygen species produced by spermatozoa and leukocytes on sperm functions in non-leukocytospermic patients. *Fertil Steril*, 2005. 83(3): p. 635-642.
- Jarow JP: Diagnostic approach to the infertile male patient. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2007; 36: 297-311.
- Johanisson E, Campana A, Luthi R, de Agostini A. Evaluation of 'round cells' in semen analysis: a comparative study. *Human Reproduction Update*. 2000; 6(4):404-412.
- Kaleli, S., et al., Does leukocytospermia associate with poor semen parameters and sperm functions in male infertility? The role of different seminal leukocyte concentrations. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2000. 89(2): p. 185-191.
- Ke RW, Dockter ME, Majumdar G, Buster JE and Carson SA Flowcytometry provides rapid and highly accurate detection of antisperm antibodies. (1995) *Fertil Steril* 63,902-906
- Keel BA How reliable are results from the semen analysis? 2004 *Fertil Steril* 82,41-44.
- Kiessling, A.A., Lamparelli, N., Yin, H-Z Semen leukocytes: friends or foes? 1995 *Fertil. Steril.*, 64, 196-198.
- Krause W, Herbstreit F, Slenzka W. Are viral infections the cause of leukocytospermia? *Andrologia* 2002;34:87-90.
- Lackner JE, Lakovic E, Waldhor T, Schatzl G, Marberger M: Spontaneous variation of leukocytospermia in asymptomatic infertile males. *Fertil Steril* 2008, 90:1757-1760.
- La Vignera S, Condorelli R, Vicari E, Tumino S, Morgia G, Favilla V, Cimino S, Calogero AE. Markers of semen inflammation: supplementary analysis? 2013 *J. of Repr. Imm.*
- Levek-Motola N, Soffer Y, Shochat L, Raziel A, Lewin LM and Golan R Flow cytometry of human semen: a preliminary study of a noninvasive method for the detection of spermatogenetic defects. (2005) *Hum Reprod* 20,3469-3475
- Lorincz A, Reid R, Jenson AB, et al. Human papillomavirus infection of the cervix: relative risk associations of 15 common anogenital types. *Obstet Gynecol* 1992;79: 328-337.

Mahfouz R, Sharma R, Thiyagarajan A, Kale V, Gupta S, Sabanegh E, Agarwal A: Semen characteristics and sperm DNA fragmentation in infertile men with low and high levels of seminal reactive oxygen species. *Fertil Steril* 2010;94:2141–2146

McKenzie J, King A, Hare J, et al. Immunocytological characterization of large granular lymphocytes in normal cervix and HPV associated disease. *J Pathol* 1991;165:75–80.

Maneesh M, Dutta S, Chakrabarti A, Vasudevan DM: Alcohol abuse-duration dependent decrease in plasma testosterone and antioxidants in males. *Indian J Physiol Pharmacol* 2006, 50:291-296.

Moskovtsev SI, Willis J, White J, Mullen JB: Leukocytospermia: relationship to sperm deoxyribonucleic acid integrity in patients evaluated for male factor infertility. *Fertil Steril* 2007, 88:737–740.

Nuovo GJ, Maritz J, Walsh LL, Mac Connell P, Koulos J. Predictive value of human papillomavirus DNA detection by filter hybridization and polymerase chain reaction in women with negative results of colposcopic examination. *Am J Clin Pathol* 1992;98:489-492

Ollero M, Gil-Guzman E, Lopez MC, Sharma RK, Agarwal A, Learson K, Evenson D, Thomas AJ, Alvarez JG Characterization of subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: implications in the diagnosis and treatment of male infertility.. 2001 16:1912-1921

Olaitan A, Johnson MA, MacLean A, et al. The distribution of immunocompetent cells in the genital tract of HIV positive women. *AIDS* 1996;10:759–64.

Parr MB, Parr EL. Antigen recognition in the female reproductive tract: I. Uptake of intraluminal protein tracers in the mouse vagina. *J Reprod Immunol* 1990;17:101

Pasteur X, Metézéau P, Maubon I, Sabido O and Kiefer H Identification of two human sperm populations using flow and image cytometry. *Mol Reprod Dev* 1994; 38,303–309.

Pentyala S, Lee J, Annam S, Alvarez J, Veerajulu A, Yadlapalli N, Khan SA: Current perspectives on pyospermia: a review. *Asian J Androl* 2007, 9:593–600.

Perticarari S, G.Ricci, M.Granzotto, R.Boscolo, C.Pozzobon, S.Guarnieri, A.Sartore, Presani A new multiparameter flow cytometric method for human semen analysis *Hum. Reprod* 2007; 22: 485–494

Punab M, Loivukene K, Kermes K, Mandar R: The limit of leucocytospermia from the microbiological viewpoint. *Andrologia* 2003; 35:271–278.

Ricci G, Presani G, Guaschino S, Simeone R, Perticarari S, Leukocyte detection in human semen using flow cytometry. *Hum. Reprod* 2000; 15,6 1329-1337

Ricci G, Perticarari S, Boscolo R, Simeone R, Martinelli M, Fischer-Tamaro L, Guaschino S, Presani G. Leukocytospermia and sperm preparation - a flow cytometric study. *Reprod Biol and Endo* 2009; 7:128

Punab M, Loivukene K, Kermes K, Mandar R: The limit of leucocytospermia from the microbiological viewpoint. *Andrologia* 2003, 35:271–278.

Pudney J, Quayle AJ, Anderson DJ: Immunological microenvironments in the human vagina and cervix: mediators of cellular immunity are concentrated in the cervical transformation zone. *Biol Reprod* 2005; 73:1253–1263.

Rodin DM, Larone D, and Goldstein M, Relationship between semen cultures, leukospermia, and semen analysis in men undergoing fertility evaluation. *Fertil Steril*, 2003. 79 Suppl 3: p. 1555-1558

Saba E, Grivel JC, Vanpouille C, Brichacek B, Fitzgerald W, Margolis L, Lisco A: HIV-1 sexual transmission: early events of HIV- 1 infection of human cervico-vaginal tissue in an optimized ex vivo model. *Mucosal Immunol* 2010; 3:280–290.

Saleh RA, Agarwal A, Kandirali E, Sharma RK, Thomas AJ, Nada EA, Evenson DP, Alvarez JG: Leukocytospermia is associated with increased reactive oxygen species production by human spermatozoa. *Fertil Steril* 2002; 78:1215–1224

Sharma, R.K., et al., Relationship between seminal white blood cell counts and oxidative stress in men treated at an infertility clinic. *J Androl* 2001;22(4):575-583

Spanò M, Calugi A, Capuano V, de Vita R, Gohde W, Hacker-Klom U, Maistro A, Mauro F, Otto F, Pacchierotti F. Flow cytometry and sizing for routine andrological analysis. *Andrologia* 1984; 16:367–375.

Thomas J. et al., Increased polymorphonuclear granulocytes in seminal plasma in relation to sperm morphology. *Hum Reprod* 1997; 12(11): p. 2418-2421.

Tomlinson MJ et al The removal of morphologically abnormal sperm forms by phagocytes: a positive role for seminal leukocytes? *Hum. Reprod* 1992 7: 517-522

Tremellen. K, Tunc O: Macrophage activity in semen is significantly correlated with sperm quality in infertile men. *Int J Androl* 2010, 33:823–831

Trifonova RT, Lieberman J, van Baarle D. Distribution of immune cells in the human cervix and implications for HIV transmission. *Am J Reprod Immunol*. 2014;71:252–264.

Vicari E. Seminal leukocyte concentration and related specific reactive oxygen species production in patients with male accessory gland infections. 1999 *Hum Reprod* Aug;14(8):2025-30. 9

Vignali DA. Multiplexed particle-based flow cytometric assays. *J Immunol Methods* 2000;243:243–255

Villegas J, Schulz M, Soto L, Iglesias T, Miska W, Sánchez R: Influence of reactive oxygen species produced by activated leukocytes at the level of apoptosis in mature human spermatozoa. *Fertil Steril* 2005, 83:808–810.

Wira CR, Fahey JV, Sentman CL, Pioli PA, Shen L: Innate and adaptive immunity in female genital tract: cellular responses and interactions. *Immunol Rev* 2005; 206:306–335.

Wolff H: The biologic significance of white blood cells in semen. *Fertil Steril* 1995, 63:1143–1157.

Wolff H; Anderson DJ: Immunohistologic characterization and quantification of leukocytesubpopulations in human semen. *Fertil Steril* 1988, 49:497

World Health Organization: WHO laboratory manual for the examination of human semen and 5th ed. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2010.

Ziyyat A, Barraud-Lange V, Sifer C, Ducot B, Wolf JP, Soufir JC: Paradoxical increase of sperm motility and seminal carnitine associated with moderate leukocytospermia in infertile patients. *Fertil Steril* 2008, 90:2257–2263.

Zorn B, Virant-Klun I; Menden-VrtovecH Semen granulocyte elastase:its relevance for the diagnosis and prognosis of silent genital tract inflammation. *Hum Reprod* 2000; 15:1978