



FONDATA NEL 1562

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI
FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

SCUOLA DI DOTTORATO IN SCIENZE BIOMEDICHE

Direttore: Prof. Eusebio Tolu

INDIRIZZO DI FISIOPATOLOGIA MEDICA

Responsabile: Prof. Nicola Glorioso

XXIV° CICLO

"Effetto dei farmaci inibitori del Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF α) sui parametri del liquido seminale di pazienti affetti da malattie reumatiche"

Direttore della Scuola:

Chiar.mo Prof. Eusebio Tolu

Relatore:

Chiar.mo Prof. Giuseppe Passiu

DOTTORANDO:

Dott.ssa Maria Giovanna Longu

Anno Accademico 2010-2011

SOMMARIO

1.	FARMACI INIBITORI DEL TNF α e MALATTIE REUMATICHE	2
2.	SPERMATOGENESI	7
3.	TNF-ALPHA (TNF α)	23
4.	OBIETTIVI	28
5.	DISEGNO DELLO STUDIO	29
6.	MATERIALI E METODI	30
7.	ANALISI STATISTICA	34
8.	RISULTATI	35
9.	DISCUSSIONE	38
10.	CONCLUSIONI	45
11.	BIBLIOGRAFIA	55

1. Farmaci inibitori del TNF α e Malattie reumatiche

I farmaci inibitori del Tumor necrosis factor alpha (TNF α)¹, che hanno come target i pazienti non responder alle comuni terapie con DMARDs(disease modifying anti-rheumatic drugs), hanno permesso negli ultimi anni un importante miglioramento sia della qualità di vita dei pazienti reumatici sia dell'outcome di malattia in termini di evoluzione del danno clinico e articolare².

In reumatologia il loro utilizzo è prevalentemente indirizzato al trattamento dell'artrite reumatoide³ (AR) e delle spondiloartriti (SpA), di cui fanno parte la spondilite anchilosante (SA)⁴ e l'artrite psoriasica (PsA)⁵, condizioni in cui il TNF α svolge un ruolo di primo piano nella patogenesi e nell'evoluzione del processo infiammatorio.

Nell'AR, caratterizzata da una sinovite erosiva delle piccole articolazioni ad interessamento poliarticolare e simmetrico, è responsabile della proliferazione delle cellule sinoviali fino a formare il tipico "panno sinoviale" e dell'attivazione di condrociti e osteoclasti che conduce al danno erosivo⁶.

Nelle SpA è coinvolto nell'induzione e nel mantenimento della flogosi articolare periferica, assiale ed entesica e nella patogenesi delle

manifestazioni extra articolari rappresentate principalmente dall'interessamento oculare e intestinale; nella PsA sia le manifestazioni cutanee che quelle articolari riconoscono nel TNF α il mediatore principale, come dimostrato da studi bioptici su cute articolazioni dei pazienti affetti.

Le malattie reumatiche interessano soggetti in età giovanile (20-35 anni) che sempre più frequentemente devono far ricorso all'utilizzo dei farmaci inibitori del TNF α per un completo controllo dell'infiammazione articolare e sistemica.

Accanto ad un miglioramento della qualità di vita quotidiana in termini funzionali, si rende necessario garantire ai pazienti reumatici anche la sicurezza di un utilizzo a lungo termine di questi farmaci.

Di recente alcuni studi hanno evidenziato il duplice ruolo che il TNF α sembra svolgere anche sulla funzione gonadica⁷⁻⁸⁻⁹; da un lato con la sua azione anti-apoptotica sulle cellule germinali favorirebbe la spermatogenesi, dall'altro gli elevati livelli di questa citochina secreta dai macrofagi interstiziali in particolari condizioni cliniche avrebbero un effetto inibitorio sulla steroidogenesi¹⁰; inoltre il TNF α presente nel liquido seminale di soggetti affetti da infezioni urogenitali causerebbe

riduzione della motilità spermatica e apoptosi degli spermatozoi.

Il cambiamento della storia naturale della malattia, indotto dalle più recenti terapie, ha fatto emergere nuove esigenze da parte dei pazienti, come la necessità di salvaguardare la¹¹ performance riproduttiva, in considerazione dell'effetto negativo che una sua eventuale perdita potrebbe determinare sulla qualità di vita di questi pazienti.

Tuttavia alcuni studi clinici inerenti la funzione gonadica in pazienti affetti da malattie reumatiche infiammatorie croniche, in particolare con storia di AR e SA¹², evidenziano un'alterazione dei livelli ormonali di androgeni e gonadotropine nel siero; in questi pazienti accanto ad una riduzione dei livelli di testosterone e suoi derivati si osservano livelli variabili di ormone luteinizzante (LH)¹³ ed ormone follicolostimolante (FSH) frequentemente associati ad alterazioni della spermatogenesi e potenziale infertilità.

Tale alterazione dei livelli androgenici si riscontra più frequentemente in pazienti affetti da AR¹⁴, rispetto ai pazienti affetti da SA e PsA, e sembra essere influenzata dall'attività di malattia divenendo più evidente in corso dei flares di riacutizzazione¹⁵. Spesso inoltre ad un miglioramento delle condizioni cliniche corrisponde un aumento dei

livelli di testosterone.

Non è tuttavia ancora chiaro se la carenza androgenica sia causa¹⁶ o conseguenza dell' infiammazione tipica delle malattie reumatiche; infatti è noto il ruolo protettivo degli androgeni nei confronti dell'infiammazione sinoviale e sistemica di queste condizioni cliniche e delle malattie autoimmuni¹⁷, così come è stato dimostrato il ruolo promovente degli estrogeni¹⁸.

A conferma di ciò la maggior incidenza dell'AR nel sesso femminile rispetto a quello maschile; in quest'ultimo la malattia, non solo sembra essere associata ad una carenza androgenica ma anche ad elevate concentrazioni di aromatasi e di conseguenza ad aumentati livelli di estrogeni, in seguito all'azione stimolatoria sulla sintesi dell'aromatasi svolta dalle citochine circolanti.

In alcuni studi clinici è stato infatti dimostrato miglioramento dei parametri di attività di malattia e della clinica in seguito a terapia androgenica o antiestrogenica¹⁹⁻²⁰.

Anche le terapie con anti-TNF α hanno evidenziato, associata al miglioramento clinico e funzionale e al miglior controllo dell'infiammazione, normalizzazione dei livelli sierici degli ormoni

androgeni, soprattutto testosterone e deidroepiandrosterone.

Inoltre per alcune terapie utilizzate per il trattamento della malattie reumatiche, come la salazopirina, è stato ripetutamente dimostrato un ruolo inibitorio nei confronti della spermatogenesi con alterazione dei parametri spermatici²¹; tali alterazioni erano rappresentate da riduzione della conta degli spermatozoi, riduzione della motilità progressiva e maggior frequenza di anomalie morfologiche, ma si mostravano reversibili alla sospensione del farmaco²².

Il seguente studio nasce dunque per valutare se l'utilizzo della terapia con farmaci biologici inibitori del TNF α possa determinare un miglioramento dell'ipogonadismo frequentemente riscontrato nelle condizioni infiammatorie croniche; allo stesso tempo si propone una stima dell'effetto delle suddette terapie sulla funzione gonadica e la prevalenza di oligospermia e astenospermia nei soggetti esposti.

2. Spermatogenesi

La spermatogenesi ha inizio nel testicolo con la pubertà e comprende l'intero processo che dallo spermatogonio porta alla formazione dei gameti maschili o spermatozoi²³.

Questo processo di differenziazione e maturazione avviene nei tubuli seminiferi nel cui epitelio si trovano due tipi di cellule: le cellule di Sertoli (CS) e le cellule spermatogonie. Nell'intersizio del testicolo si trovano invece le cellule di Leydig (CL) che regolano la spermatogenesi con la secrezione di testosterone.

Le CS sono localizzate in un singolo strato sulla membrana basale strettamente adese tra loro e svolgono funzione di supporto e di nutrimento nei confronti delle cellule germinali, presiedendo alla secrezione di ormoni, citochine e altre molecole biologiche direttamente coinvolte nella spermatogenesi.

Tra una CS e l'altra, poco distante dalla membrana basale, un'insieme di complessi e proteine giunzionali garantisce l'aderenza tra cellule adiacenti e forma la barriera ematotesticolare (BTB)²⁴.

Questa divide l'epitelio seminifero in due compartimenti

funzionalmente distinti: il compartimento basale dove le cellule spermatogonie proliferano e differenziano in spermatociti e il compartimento apicale in cui si svolge il processo di maturazione che porta al rilascio degli spermatozoi nel lume tubulare.

Le cellule spermatogonie si trovano invece nel compartimento basale al di sotto della BTB e si muovono verso il compartimento apicale e verso il lume tubulare nel corso del processo di maturazione.

Nella spermatogenesi possiamo distinguere due fasi: la Spermatocitogenesi, a sua volta suddivisa in Spermatogoniogenesi e Spermioцитogenesi, che ha luogo nel compartimento basale e la Spermioцитogenesi che viene portata a termine nel compartimento apicale.

Nella spermatogoniogenesi si assiste , attraverso un susseguirsi di divisioni mitotiche, alla proliferazione delle cellule spermatogonie o spermatogoni²⁵. Nei tubuli seminiferi sono presenti tre tipi di spermatogoni: Spermatogoni Ad (scuri) che a loro volta danno origine a spermatogoni Ap (chiari) e spermatogoni B.

Gli spermatogoni A restano confinati nel compartimento basale e costituiscono la riserva permanente degli elementi germinali, mentre gli spermatogoni B migrano verso il compartimento apicale ed in

seguito ad ulteriore divisione mitotica diventano spermatociti primari che, a loro volta, vanno incontro alla prima divisione meiotica dando origine agli spermatociti secondari. Questi durante la prima fase della meiosi, la profase, attraversano vari stadi passando dallo stadio di leptotene allo stadio di zigotene, pachitene, diplotene e quindi diacinesi. Lo spermatocita pre-leptotene è quello che compie il passaggio attraverso la BTB dirigendosi verso il compartimento apicale dove da ogni spermatocita secondario, che possiede corredo diploide, con la seconda divisione meiotica, originano due spermatidi con corredo cromosomico aploide.

A questo punto ogni spermatide, nella fase della spermiogenesi, va incontro ad una serie di modifiche conformazionali completando, con la condensazione del nucleo, la riduzione del citoplasma e la formazione dell'acrosoma e del flagello, la sua trasformazione in spermatozoo.

Lo spermatozoo, rilasciato nel lume del tubulo seminifero, acquisirà la capacità fecondante nel passaggio attraverso l'epididimo.

A questo punto la fagocitosi da parte della CS del citoplasma residuo dello spermatozoo, determina attivazione di alcune citochine che

innescano i meccanismi di ristrutturazione della BTB consentendo il passaggio di un altro spermatozoo e così il processo spermatogenetico continua incessantemente.

L'intero processo della spermatogenesi, della durata di circa 74 giorni, è strettamente regolato²⁶ dall'azione endocrina dell'asse ipotalamo-ipofisario, dall'azione paracrina delle cellule residenti del testicolo (CS e CL) e dall'attività di ormoni e citochine secreti dai diversi tipi cellulari presenti nel testicolo.

L'asse ipotalamo-ipofisario presiede alla regolazione della spermatogenesi con la secrezione dell'ormone stimolante il rilascio delle gonadotropine (GnRH) da parte dell'ipotalamo che stimola la secrezione delle gonadotropine, l'ormone luteinizzante (LH) e l'ormone follicolostimolante (FSH), da parte dell'ipofisi.

Le gonadotropine LH ed FSH²⁷ agiscono interagendo con i loro recettori situati rispettivamente sulle CL e sulle CS e svolgono un ruolo cruciale nel controllo delle funzioni riproduttive, regolando sia la gametogenesi che la sintesi di ormoni sessuali.

Le CL si trovano nell'interstizio del testicolo strettamente adese ai macrofagi residenti e, sotto stimolo dell'LH, producono testosterone

(T) che diffonde attraverso la membrana basale nell'epitelio del tubulo seminifero garantendo la sua azione di stimolo sulla spermatogenesi. Lo stesso testosterone agisce poi sul controllo ipotalamico del processo spermatogenetico inibendo con meccanismo di feedback negativo la secrezione dell'LH da parte dell'ipofisi.

Le CS sono invece localizzate in unico strato sulla membrana basale del tubulo seminifero e svolgono funzione di sostegno e nutrimento per le cellule germinali in maturazione con la secrezione e il trasporto di transferrina, lattato, ceruloplasmina (sotto l'azione dell'FSH). Inoltre le CS regolano il numero di cellule germinali che proseguirà verso la spermatocitogenesi grazie ad un meccanismo di apoptosi cellulare indotta dal legame FAS-FASL, appartenenti rispettivamente alla famiglia del TNF (fattore di necrosi tumorale) e dei recettori del TNF ed espressi il primo sulle cellule germinali ed il secondo sulle CS.

Sotto lo stimolo dell'FSH²⁸ le CS producono ABP (proteina legante gli androgeni) che garantisce la giusta concentrazione di testosterone necessaria alla maturazione delle cellule germinali, e un'aromatasi che favorisce la trasformazione del testosterone in estrogeni, utili per il

proseguimento del processo maturativo.

Le CS esercitano anche un controllo sulla regolazione ormonale endocrina svolta dall'asse ipotalamo-ipofisario con la secrezione di inibina e activina che intervengono con un meccanismo di feedback sul rilascio del GnRH ipotalamico e quindi sul rilascio di LH ed FSH.

L'activina²⁹ secreta dalle CS in risposta all'azione di citochine locali, come IL-1 α secreta dalle stesse CS e TNF α secreto dalle cellule germinali, agisce da stimolo sulla liberazione di FSH; mentre l'inibina, prodotta anche essa dalle CS in seguito a stimolazione FSH-mediata, sopprime selettivamente la secrezione di FSH ipofisario mediante inibizione dell'activina.

2.1 La Barriera ematotesticolare (BTB)

A livello del tubulo seminifero la spermatogenesi viene suddivisa in due compartimenti (basale ed apicale o adluminale) dalla BTB che ha il compito di impedire sia il passaggio dal circolo ematico e dall'interstizio di molecole nocive per le cellule germinali, sia il reflusso delle stesse cellule germinali immature verso l'interstizio e il circolo ematico, dove verrebbero riconosciute come non-self dal sistema immune ed eliminate.

La BTB è costituita da diversi complessi proteici che formano giunzioni serrate³⁰ e legami tra CS adiacenti nell'epitelio del tubulo seminifero. I complessi proteici sono rappresentati da complessi di “ancoraggio”, con i loro adattatori e regolatori associati, che garantiscono l'aderenza tra due CS vicine (tight junction – TJ e basal ES dove ES sta per specializzazione ectoplasmica) o tra CS e cellula germinale (desmosomi e apical-ES). Altri complessi di ancoraggio mantengono sulla membrana basale CS e spermatogoni (emidesmosomi); esistono poi altri complessi proteici con funzione di comunicazione che formano dei veri e propri canali di scambio o trasporto per facilitare il rilascio di sostanze da e nell'ambiente

extracellulare (Gap-junction).

La BTB non è una struttura stabile , ma va incontro ad un continuo rimaneggiamento con distruzione e ricostruzione per garantire il passaggio tra i due compartimenti delle cellule germinali in maturazione, in particolare dello spermatocita preleptotene, durante il ciclo epiteliale della spermatogenesi. Si assiste dunque ad uno “spostamento” della BTB che viene distrutta davanti allo spermatocita in transito e ricostruita dietro di esso.

La BTB assolve dunque a diversi compiti importanti, tutti garantiti dalla sua impermeabilità:

- Limita i flussi di biomolecole, sostanze nutritive e tossici nel compartimento apicale dove avviene lo sviluppo post-meiotico delle cellule germinali;
- Isola e preserva l’ambiente cellulare durante la spermatogenesi garantendo l’accesso di ormoni e nutrienti nel compartimento in cui si trovano le cellule in attiva replicazione e proteggendo invece le cellule in differenziazione e maturazione oltre la BTB;
- Agisce come una barriera immunologica in quanto contribuisce allo stato di immunoprivilegio del testicolo evitando l’esposizione di

antigeni transitoriamente espressi dalle cellule germinali in maturazione e la conseguente reazione del sistema immunitario;

- Conferisce la polarità cellulare dell'epitelio del tubulo seminifero grazie a specifiche proteine di polarità; queste consentono il dislocamento di organelli, cellule e complessi proteici all'interno o tra CS in rapporto alle esigenze della spermatogenesi e regolano i flussi delle vescicole endocitosiche nel processo di distruzione e ricostruzione della BTB. Così, grazie alla presenza delle proteine di polarità, i nuclei delle CS si trovano confinati a livello basale, mentre gli spermatozoi vengono orientati in modo da occupare meno spazio possibile con la testa rivolta verso la membrana basale e la coda verso il lume del tubulo seminifero.

La BTB è necessaria, come dimostrato da esperimenti sui ratti, per un'adeguata e puntuale spermatogenesi; infatti, l'utilizzo di sostanze tossiche per alcuni componenti della BTB determina allo stesso tempo distruzione della BTB con diffusione di un tracciante nel compartimento apicale e blocco della spermatogenesi, almeno finché la BTB non venga ricostituita.

In questo continuo rimaneggiamento della BTB sembrano svolgere un

ruolo importante meccanismi complessi in cui si alternano le azioni di ormoni sessuali, citochine prodotte localmente e proteine chinasiche non recettoriali (tirosin chinasi) che agiscono su singoli componenti della BTB.

Il testosterone³¹ secreto dalle CL interagendo con il recettore per gli androgeni espresso dalle CS svolge numerose azioni nella regolazione di diversi aspetti della spermatogenesi; ha infatti un ruolo promovente nella proliferazione e differenziazione delle cellule spermatogonie, nella progressione del ciclo epiteliale del tubulo seminifero e nel garantire e mantenere l'adesione tra le CS e tra CS e cellule germinali. Inoltre contribuisce al mantenimento dello stato di immunoprivilegio del testicolo essendo direttamente coinvolto nel mantenimento dell'integrità della BTB, nella maturazione delle CS e nella loro polarizzazione; a dimostrazione di ciò in esperimenti in vitro l'inattivazione del recettore per gli androgeni determina alterazione dell'integrità della BTB con alterazione della polarità e della maturazione delle CS.

Infine la presenza del testosterone garantisce la stabilità delle TJ

stimolando la sintesi delle proteine che le costituiscono e la loro localizzazione all'interfaccia delle CS; in caso di distruzione e ricostruzione della BTB nel passaggio dello spermatocita, promuove i meccanismi di endocitosi, transitosi e riciclo delle proteine integrali di membrana dalla "vecchia BTB" e favorisce il loro ricollocamento nella "nuova BTB".

Anche gli estrogeni sono coinvolti nella regolazione della spermatogenesi e del rimaneggiamento della BTB. Questi, nell'ambiente testicolare vengono prodotti dal complesso dell'aromatasi per conversione del testosterone e agiscono tramite i loro recettori (ER) espressi su CL, CS, spermatociti primari e spermatidi.

Alcuni studi in vitro, confermati poi da studi in vivo, hanno dimostrato il ruolo di supporto degli estrogeni per le cellule somatiche, di regolazione nell'apoptosi e nella spermiogenesi.

L'azione degli estrogeni determina ritardo della spermatogenesi per l'assenza di una funzionale BTB e questo effetto di alterazione dell'integrità della BTB sembra essere mediato da variazioni nella

distribuzione delle proteine di membrana con destabilizzazione delle TJ.

Dal momento che l'aromatasi risulta essere espressa ad alti livelli negli spermatociti, durante il ciclo epiteliale del tubulo seminifero, al passaggio dello spermatocita preleptotene attraverso la BTB, si riscontrano elevati livelli di aromatasi e quindi della concentrazione di estrogeni che inducono un'iniziale destabilizzazione della barriera, stimolando l'endocitosi delle proteine di membrana e consentendo l'entrata dello spermatocita nel compartimento apicale.

Così sotto l'azione degli ormoni sessuali si assiste alla distruzione della vecchia BTB e all'iniziale ricostruzione di una nuova BTB.

In questo continuo rimaneggiamento intervengono anche proteinchinasi, soprattutto p38-MAPK e JNK (p38 mitogen-activated protein kinases e jun n-terminal kinase), che agiscono sullo stato di fosforilazione delle proteine integrali di membrana e dei loro adattatori e regolatori. Le proteinchinasi (soprattutto le tirosinchinasi) garantiscono l'adesione cellulare e regolano i meccanismi di endocitosi, transitosi e riciclo delle proteine durante le fasi di

distruzione e assemblaggio della BTB.

Infine, tra i più importanti regolatori del processo spermatogenetico, le citochine ($TNF\alpha$, $TGF\beta$, $IL-1\alpha$, $IL-12$, $IFN\gamma$)³² prodotte da cellule residenti e cellule germinali (spermatociti e spermatidi in varie fasi di maturazione), concorrono al coordinamento dei meccanismi di adesione cellulare, endocitosi e transitosi dei complessi proteici, loro degradazione o riciclo. A livello testicolare vengono prodotte numerose citochine con funzioni diverse talvolta in antagonismo tra loro, ma le più fini regolatrici negli eventi della spermatogenesi e nei meccanismi strutturali della BTB sono $TNF\alpha$, $TGF\beta$ e $IL-1\alpha$, che operano attraverso meccanismi e vie di regolazione e trasduzione tra loro indipendenti interagendo con i rispettivi recettori espressi sulle CS.

Il TGF, nelle sue isoforme $\beta 2$ e $\beta 3$, agisce in complesso con i suoi recettori $TGF\beta$ -RI, $TGF\beta$ -RII e $TGF\beta$ -RIII e reclutando altre molecole adattatrici come proteine chinasi (p38-MAPK) e complessi di polarità, alterando l'integrità della BTB e l'adesione cellulare³³.

Sia in studi in vitro che in vivo è stato dimostrato come il $TGF\beta$,

prodotto dalle CS, da spermatociti e spermatidi “giovani”, determina attraverso la via della p38- MAPK una destabilizzazione delle TJ con transitoria apertura della BTB e promuove l’endocitosi delle proteine destinandole alla degradazione endosoma-mediata.

L’IL-1 α , anche essa prodotta da spermatociti, spermatidi e CS, altera la permeabilità della BTB causando la distruzione dei filamenti di actina propri di alcuni complessi di ancoraggio come basal-ES ed apical-ES senza però modificare i livelli delle proteine. E’ in grado tuttavia di aumentare le cinetiche di endocitosi di alcune proteine riducendone la degradazione ed indirizzandole verso la via del riciclo³⁴.

Il TNF α viene prodotto a livello testicolare da CS, spermatociti e spermatidi ad ogni stadio di maturazione e dalle cellule interstiziali³⁵.

Le sue azioni sono mediate dai recettori TNF-RI e TNF-RII .

Assolve a diversi compiti nel portare avanti il processo spermatogenetico: svolge un ruolo antiapoptotico nei confronti delle cellule germinali in maturazione; stimola l’espressione del recettore

per gli androgeni nelle CS e la disponibilità e il trasporto di ferro e lattato per il sostentamento delle cellule germinali; regola il processo di spermiiazione, favorendo il distacco e la liberazione nel lume tubulare degli spermatozoi; è in grado di inibire la produzione e la secrezione di testosterone dalle CL.

I suoi recettori risultano espressi da diversi tipi cellulari (CS, macrofagi, linfociti, CL e cellule germinali) e le sue azioni dipendono dal tipo di recettore coinvolto e dall'attivazione di specifici adattatori/regolatori. A livello della BTB ne favorisce la distruzione, come riscontrato da studi morfologici in vitro e funzionali in vivo in cui , utilizzando sostanze traccianti, si ha prova della mancanza di una funzionale BTB, in quanto la sostanza tracciante diffonde senza ostacoli nel compartimento apicale in caso di esposizione a TNF α .

Il TNF α è in grado di indurre da parte delle CS la sintesi e l'attivazione di alcune metalloproteasi (MMP9) che agiscono degradando il collagene della membrana basale con conseguente compromissione dell'integrità di membrana proprio nel momento in cui si verifica il transito dello spermatocita dal compartimento basale a quello apicale.

Al pari di $TGF\beta$ e testosterone incentiva l'endocitosi delle proteine integrali di membrana, indirizzandole però verso la degradazione.

Pertanto il $TNF\alpha$ risulta essere il principale responsabile degli eventi che dirigono e accompagnano il passaggio dello spermatozoo attraverso i due compartimenti. Con un'azione diretta sui complessi proteici di adesione e ancoraggio altera la struttura della vecchia BTB che si trova davanti allo spermatozoo in transito, ma in contemporanea, stimolando l'azione androgenica, agevola la costruzione della nuova BTB che inizia ad assemblarsi dietro lo spermatozoo in transito, garantendo sempre il mantenimento dell'integrità e dell'impermeabilità della BTB.

Questa stretta interazione tra ormoni, citochine, proteinchinasi non recettoriali, proteine integrali di membrana e complessi di polarità, fornisce un efficace sistema per garantire l'integrità di membrana durante il ciclo epiteliale del tubulo seminifero, segregando i due diversi compartimenti e preservando le cellule germinali da insulti esterni, contribuendo infine al mantenimento dello stato di immunoprivilegio del testicolo.

3. Il TNF α

Il TNF α è una citochina appartenente alla famiglia dei TNF.

Presenta una struttura omotrimerica e ciascuna unità del peso di 17KDA è costituita da 156 aminoacidi.

Il TNF α svolge numerose funzioni biologiche: controlla l'eliminazione delle cellule tumorali e regola i processi di proliferazione cellulare; essendo coinvolto nei processi infiammatori vi svolge il doppio ruolo di potente stimolatore autocrino e induttore paracrino di altre citochine.

L'attività TNF-mediata si compie attraverso l'interazione con i suoi recettori solubili o trans membrana; questi recettori, TNF-RI e TNF-RII, sono organizzati come dimeri sulla superficie di diversi tipi cellulari e legando il TNF α danno inizio al segnale di trasduzione e ad una grande varietà di risposte biologiche.

Alcune di queste risposte stimolano l'infiammazione e la proliferazione cellulare e dipendono dall'attivazione dei fattori NF-KB (fattore nucleare KB) e AP-1, che inducono ex novo la trascrizione di diversi geni, tra cui quelli antiapoptotici.

Altri membri della famiglia dei TNF-R (TNF-RI e FAS) traducono

segnali che portano alla morte cellulare per apoptosi, attivando prevalentemente la via delle caspasi.

La diversa risposta biologica dipende dunque sia dal recettore attivato sia dal tipo cellulare coinvolto.

Diversi autori hanno descritto un possibile ruolo del $TNF\alpha$ anche sulla funzione gonadica; coinvolto nella spermatogenesi sembra svolgere la sua azione soprattutto sulle CS e sulle CL.

Da un lato, a livello dei tubuli seminiferi, il $TNF\alpha$ secreto da spermatociti e spermatidi interferisce con il processo di apoptosi delle cellule germinali alterando il sistema FASL/FAS, causando una down regulation dell'espressione del FASL sulle CS. Inoltre stimola sulle CS la secrezione di transferrina e lattato, che vengono utilizzati come fonte energetica dalle cellule germinali in attiva proliferazione.

In diversi studi morfologici è stata dimostrata la presenza di macrofagi interstiziali strettamente adesi alle CL; questo ha portato ad ipotizzare (e dimostrare poi in studi in vitro) un'azione paracrina del $TNF\alpha$ secreto da questi macrofagi in particolari condizioni infiammatorie croniche e disordini immunitari sul rilascio di testosterone da parte delle CL.

Gli studi clinici riportano dati contrastanti sulla presenza del TNF α nel fluido seminale in determinate situazioni e sui suoi effetti sulla mobilità degli spermatozoi.

Il TNF α in sinergia con altre citochine può essere responsabile dell'infertilità riscontrata in soggetti con lesioni del midollo spinale che presentano una ridotta motilità spermatica.

Una riduzione della motilità spermatica è stata inoltre verificata anche in soggetti con infezioni genitourinarie dove sembra essere correlata alla presenza di leucocituria e di TNF α secreto dai leucociti nel fluido seminale. In questi soggetti con la terapia antibiotica si assiste alla progressiva normalizzazione della mobilità spermatica.

Nelle donne con endometriosi gli elevati livelli di TNF α nel liquido peritoneale sembrano essere la principale causa di infertilità, responsabili della riduzione della mobilità spermatica nelle vie genitali femminili; l'aggiunta in vitro di un anticorpo monoclonale anti-TNF α , a conferma di questa ipotesi, appare in grado di bloccare questo effetto inibitorio del liquido peritoneale sulla mobilità spermatica.

In letteratura si ritrovano pareri discordanti.

In alcuni reports clinici si parla del riscontro di astenospermia in

pazienti con SA dopo trattamento con anti-TNF α .

In diversi esperimenti in vitro invece è stata dimostrata la possibilità di bloccare l'azione antiapoptotica indotta dal TNF α su cellule germinali, con l'aggiunta di infliximab (un anticorpo monoclonale inibitore del TNF α) ad una cultura di tubuli seminiferi.

Altri studi in vitro rilevano un miglioramento della motilità di spermatozoi in contatto con liquido peritoneale di donne con endometriosi dopo l'aggiunta di anticorpi monoclonali anti-TNF α o bloccanti recettoriali del TNF α .

Una riduzione della percentuale di astenospermia si riscontra nel liquido seminale sia di pazienti con lesioni del midollo spinale con l'aggiunta di un inibitore del TNF α , sia nel liquido seminale di donatori sani , esposto a dosi elevate di TNF α e poi trattato con anticorpi monoclonali anti-TNF α .

Dal momento che i farmaci inibitori del TNF α fanno ormai parte della pratica clinica quotidiana in reumatologia, abbiamo condotto uno studio per valutare in vivo l'effetto di questi farmaci su funzione gonadica e motilità spermatica in soggetti affetti da malattie reumatiche infiammatorie croniche esposti a trattamento con farmaci

bloccanti l'azione del TNF³⁶⁻³⁷⁻³⁸⁻³⁹.

4. Obiettivi

Valutare l'effetto della terapia con farmaci inibitori del TNF-alpha sulla conta e motilità degli spermatozoi in pazienti affetti da malattie articolari infiammatorie croniche (MAIC).

Endpoints studio cross-sectional:

a) differenza, tra i pazienti in trattamento con anti-TNFalpha e i pazienti in trattamento con DMARDs/FANS, dei seguenti parametri nel campione di liquido seminale:

- numero di spermatozoi ($10^6/\text{mm}^3$)
- % di spermatozi con motilità progressiva A+B

Endpoints studio prospettico open-label:

a) differenza dei seguenti parametri nelle caratteristiche del campione di liquido seminale fornito dai pazienti al basale prima della terapia e dopo almeno 6 mesi di terapia con anti-TNF:

- numero di spermatozoi ($10^6/\text{mm}^3$)
- % di spermatozi con motilità progressiva A+B

5. Disegno dello studio

Sono stati condotti due studi, di cui uno con disegno osservazionale cross-sectional e l'altro con disegno prospettico open-label

a) studio cross-sectional:

Studio osservazionale cross-sectional con popolazioni di confronto predefinite. Sono stati considerati casi i soggetti affetti da MAIC in terapia con inibitori del TNF- α al momento della valutazione. Sono stati considerati come controlli i soggetti affetti da MAIC che non assumevano e che non avevano mai assunto farmaci inibitori del TNF- α e che al momento della raccolta del campione di liquido seminale erano in terapia con DMARDs/FANS.

b) studio prospettico open-label:

Studio prospettico (open-label, interventional, proof-of-concept).

Il campione di liquido seminale è stato fornito dai pazienti in trattamento con farmaci anti-TNF α al basale prima della terapia e al controllo dopo almeno 6 mesi di terapia

6. Materiali e metodi

Pazienti

Sono stati invitati a partecipare allo studio tutti i pazienti consecutivi affetti da MAIC (AR, PsA e SA) afferenti agli ambulatori del Servizio di Reumatologia dell'Azienda Ospedaliera Universitaria di Sassari (Sassari, Italy) nel periodo compreso tra il 1 Gennaio 2008 e il 10 Novembre 2011.

Sono stati arruolati i pazienti che soddisfacevano i seguenti criteri di inclusione:

1. Diagnosi di AR secondo i criteri ACR del 1987 (12)
2. Diagnosi di PsA secondo i criteri CASPAR del 2006 (13)
3. Diagnosi di SA secondo i criteri di NY modificati del 1984 (14)
4. Terapia in corso con farmaci inibitori del TNF- α
5. Terapia in corso con farmaci DMARDs o FANS
6. Assenza di evidenze anamnestiche o cliniche di infezioni nei tre mesi precedenti all'arruolamento
7. Assenso alla partecipazione allo studio

Raccolta e refertazione delle caratteristiche del campione di liquido seminale

Tutti i pazienti partecipanti allo studio hanno raccolto mediante masturbazione un campione di liquido seminale in un contenitore sterile a bocca larga, in ambiente domestico, dopo un periodo di astinenza di 3-5 giorni.

Il campione così raccolto, veniva consegnato entro 50 minuti dalla raccolta, evitando escursioni termiche di rilievo, presso il laboratorio analisi della Clinica Ostetrica e Ginecologica dell'Università di Sassari dove veniva immediatamente analizzato. I risultati venivano riportati utilizzando come valori di riferimento quelli proposti dall'Organizzazione Mondiale della Sanità del 1999 (vedi appendice 1).

I campioni di liquido seminale sono stati refertati secondo le seguenti classificazioni:

Normospermia: concentrazione spermatica entro il range di riferimento

Oligospermia: concentrazione spermatica inferiore ai valori di riferimento

Astenospermia: motilità inferiore ai valori di riferimento

Teratospermia: conta di spermatozoi con morfologia normale inferiore ai valori di riferimento

Azoospermia: assenza di spermatozoi nell'eiaculato

Dosaggi ormonali

E' stato inoltre ottenuto mediante puntura venosa, eseguita a digiuno dopo almeno 12 ore di riposo notturno, un campione di sangue per la valutazione dell'assetto ormonale il giorno in cui venivano raccolti i campioni di liquido seminale. Il campione di sangue veniva quindi immediatamente centrifugato e il siero così ottenuto veniva aliquotato e conservato a -20°C.

Al termine dello studio veniva eseguito il dosaggio di FSH, LH, PRL, T, e FT nei soggetti con spermiogramma patologico. Il dosaggio del T è stato eseguito con test ELISA competitivo IMMUNOLITE/IMMUNOLITE 1000 (Siemens Healthcare Diagnostic UK).

I dosaggi di PRL, FSH e LH sono stati eseguiti con dosaggio immunometrico in chemiluminescenza in fase solida a doppio sito con IMMUNOLITE/IMMUNOLITE 1000 (Siemens Healthcare

Diagnostic UK).

Il dosaggio del FT è stato eseguito con metodica radioimmunologica, Free Testosterone Bridge (Adaltis Italia spa).

Indici di attività di malattia

E' stata valutata l'attività di malattia impiegando i seguenti indici:

- 1) DAS, Disease Activity Score (vedi appendice 3)
- 2) BASDAI, Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index
- 3) BASFI, Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index
- 4) HAQ, Health Assesment Questionnaire
- 5) HAQs, Health Assesment Questionnaire modificato per le spondiloartriti

7. Analisi statistica

L'analisi della distribuzione dei dati (Skewness e Kurtosis test) con il test di Kolmogorov-Smirnov ha dimostrato una distribuzione normale per tutte le variabili con l'eccezione della durata di malattia e dell'HAQ. Il confronto tra le medie delle variabili continue con distribuzione normale è stato eseguito con il *t-test* e tra le medie delle variabili continue con distribuzione non normale con il *Mann Whitney U test*. Il *t-test per dati appaiati* è stato impiegato per il confronto delle medie delle variabili in esame prima e dopo terapia.

Il confronto delle variabili discrete è stato eseguito con il *test χ^2* . Sono stati considerati significativi valori di *p* per test a due code inferiori a 0.05. L'analisi statistica è stata eseguita con il software SPSS 11.1 (Chicago, IL).

8. Risultati

Risultati studio cross-sectional

Dei 55 pazienti invitati a partecipare allo studio, 28 hanno rifiutato e 27 hanno raccolto il campione di liquido seminale secondo le raccomandazioni indicate nel protocollo.

Il gruppo dei casi era costituito da 15 pazienti, di cui 4(26.6%) affetti da PsA, 3(20%) da AR e 8(53.3%) da SA; Sette pazienti assumevano etanercept e 8(53.3%) adalimumab.

Il gruppo dei controlli era costituito da 12 pazienti, 4(33.3%) affetti da PsA, 5(41.6%) da AR e 3(25%) da SA; Di questi, 7(58.3%) erano in monoterapia con methotrexate(MTX), 2 (16.6%) assumevano MTX in associazione con idrossiclorochina(HCQ) e 1(8.3%) assumeva leflunomide(LFN). Due pazienti(16.6%) erano in terapia con FANS.

Nella tabella 1 sono riportate le caratteristiche demografiche e di attività di malattia dei due gruppi di pazienti. I due gruppi risultavano omogenei per quanto riguarda età, attività di malattia. I pazienti affetti da SpA in terapia con anti-TNF rispetto ai controlli avevano una durata di malattia significativamente maggiore.

Non sono state rilevate differenze statisticamente significative tra casi e controlli per quanto riguarda il numero degli spermatozoi degli spermatozoi ($56.7 \pm 43.9 \times 10^6/\text{ml}$ spermatozoi nel gruppo dei pazienti non trattati vs $55.1 \pm 35.3 \times 10^6/\text{ml}$ spermatozoi nel gruppo dei pazienti trattati con inibitori del TNF- α , $p=0.91$ (vedi grafico 1). L'analisi condotta per proporzione di pazienti con astenospermia nei due gruppi d'analisi ha confermato l'assenza di differenze significative ($p=0.82$) (prevalenza di oligospermia nel gruppo dei pazienti trattati (3/15, 20%) con inibitori del TNF- α rispetto al gruppo dei pazienti non trattati (2/12, 16.7%).

Al contrario la mobilità degli spermatozoi nei pazienti in terapia con inibitori del TNF- α è risultata significativamente migliore rispetto a quella dei pazienti in terapia tradizionale. Infatti sono risultati astenospermici 6/12 (50%) pazienti in terapia con farmaci tradizionali rispetto a 2/15 (13.3%) pazienti in terapia con inibitori del TNF- α ($p=0.038$) (vedi tabella 2).

La presenza di astenospermia nei controlli è risultata significativamente associata con l'assenza di terapia di fondo con methotrexate (3 pazienti su 9 in terapia con MTX sono risultati

astenospermici (33.3%) vs 3/3(100%) dei pazienti che non assumevano MTX).

Valutando la percentuale di spermatozoi con motilità progressiva A+B vie era una differenza significativa ($p = 0.04$) tra i casi (0.472 ± 0.154) e i controlli (0.411 ± 0.152),

L'assetto ormonale (T, FT, FSH, LH, PRL) nei pazienti con oligospermia è risultato nella norma.

Risultati studio prospettico

Sono stati invitati a partecipare allo studio prospettico 50 pazienti, di cui 25 hanno rifiutato di partecipare e 6 sono stati persi al follow-up.

Non abbiamo riscontrato differenze significative per quanto riguarda la motilità degli spermatozoi nei campioni di liquido seminale raccolti prima ($65,68 \pm 57,367 \times 10^6/\text{mm}^3$) e dopo la terapia ($51,89 \pm 37,6 \times 10^6/\text{mm}^3$), $p = 0.143$. Nessuna differenza significativa ($p = 0.580$) inoltre era riscontrabile nella mobilità progressiva prima ($0,46\% \pm 0,178$) e dopo terapia ($0,442 \pm 0,171$) (vedi tabelle 3-4 e 5).

9. Discussione

Non è noto con certezza, allo stato attuale delle evidenze scientifiche, quale sia il ruolo delle terapie biotecnologiche con farmaci inibitori del TNF-alpha sui processi differenziativi che portano dalla cellula indifferenziata fino allo spermatozoo maturo a livello del tubulo seminifero e sulle caratteristiche morfofunzionali dello spermatozoo nel liquido seminale. Mentre infatti, sono noti in larga parte gli effetti locali del TNF alpha a livello del tubulo seminifero, della barriera ematotesticolare e nel liquido seminale (anche se perlopiù si tratta di evidenze mediate da sistemi in vitro e in vivo su animale), non vi sono ancora dati sull'uomo se non di carattere aneddotico-speculativo e retrospettivo.

L'unica possibilità di raccogliere evidenze di carattere prospettico è rappresentata dalla necessità di studiare il rapporto tra inibizione del TNF-alpha e caratteristiche del liquido seminale (e in ultima analisi potenzialità fecondante) in pazienti affetti da condizioni patologiche per la terapia delle quali vi sia una indicazione all'uso dei farmaci inibitori del TNF-alpha, come le malattie reumatiche. Questa che rappresenta una opportunità eccezionale di studiare una via funzionale

di un sistema biologico in vivo nell'uomo, in parte ne rappresenta anche un limite in relazione alla necessità di studiare soggetti affetti da una condizione patologica che di per se può essere causa di alterazioni secondarie del processo differenziativo degli spermatozoi e in definitiva della caratteristiche del liquido seminale.

A questo riguardo, infatti, va osservato che sorprendentemente il rapporto tra le malattie reumatiche “per se” e la spermatogenesi e le caratteristiche funzionali degli spermatozoi non è stato oggetto, ad oggi, di osservazione mirata e controllata. Dal punto di vista ipotetico e speculativo, la presenza di una condizione patologica, quale la malattia articolare infiammatoria cronica, caratterizzata da una permanente attivazione della risposta infiammatoria potrebbe giustificare, visto il ruolo in parte lesivo del TNF-alpha, una predisposizione del soggetto all'alterazione dei processi di spermatogenesi e di funzionalità degli spermatozoi maturi.

Quello che conosciamo sul rapporto tra malattie infiammatorie articolari croniche e caratteristiche del liquido seminale è finora limitato all'effetto delle terapie con DMARDs. È noto infatti che la salazopirina possiede un effetto negativo, ma reversibile con la

sospensione, sul numero degli spermatozoi. Del methotrexate è invece noto un effetto teratogeno, ma non “sinsu strictu” un effetto extragenomico, sulla maturazione e sulla mobilità dello spermatozoo.

La prima segnalazione, sull'effetto degli anti-TNF alpha e spermatogenesi si deve a La Montagna⁴⁰. Gli Autori riportano la presenza di asteno-azoospermia in tre pazienti con SA in terapia con Infliximab, che prima della terapia avevano avuto figli. Il dato, scarsamente supportato e di natura aneddotica, poggia le sue basi teoriche sulla possibilità che il blocco del TNF-alpha determini un'apoptosi delle cellule germinali, progenitrici degli spermatozoi maturi. Evidenze dallo studio su animale, suggeriscono che il TNF- α sia una molecola chiave nel loop regolatorio del numero delle cellule germinali: sarebbe infatti secreto dagli spermatociti e dagli spermatidi e agirebbe sul recettore TNFR-1 localizzato sulle CS inibendo l'espressione su queste ultime di FAS-L e modulando quindi il sistema FAS/FAS-L responsabile dell'apoptosi delle cellule germinali. A livello della barriera ematotesticolare inoltre il TNF-alpha agirebbe inoltre stimolando la secrezione di transferrina e lattato utilizzato dalle suddette cellule come fonte di energia, determinando il suo blocco una

riduzione della disponibilità energetica per le cellule germinali e una conseguente riduzione della loro capacità relativa di entrare nei successivi stadi differenziativi.

Una prova indiretta a sostegno di questo meccanismo viene dalle evidenze in vitro con l'infliximab che dimostrerebbero una inibizione del segnale anti-apoptotico del TNF- α ⁴¹.

Dallo studio condotto, sia nella componente trasversale che in quella prospettica, non abbiamo avuto modo di documentare significative differenze/modificazioni nella conta degli spermatozoi. Inoltre la prevalenza dell'oligospermia nei pazienti esposti all'anti-TNF- α nello studio cross-sectional e dopo terapia nello studio prospettico è infatti risultata sovrapponibile a quella riscontrata nella popolazione maschile fertile. Dati di letteratura riportano una percentuale di maschi fertili oligospermici variabile dal 2 al 20%⁴²⁻⁴³. La discrepanza rispetto al dato sperimentale potrebbe essere legata al fatto che a livello del tubulo seminifero la presenza della barriera emato-testicolare potrebbe limitare l'accesso all'anti-TNF alpha impedendo il blocco del TNF- α prodotto localmente.

Mentre il tubulo seminifero, grazie alla barriera anatomofunzione

ematotesticolare, potrebbe essere considerato un santuario immunologico e un mieleu citochinico funzionalmente indipendente, è invece plausibile che il blocco dell'anti-TNF- α si possa realizzare a livello interstiziale, ove la produzione di questa citochina da parte dei macrofagi attivati inibisce la steroidogenesi delle CL.

Peraltro, i macrofagi interstiziali producano TNF-alpha in risposta a condizioni di flogosi sistemica, come si riscontra caratteristicamente nei soggetti affetti da malattie reumatiche: pertanto la somministrazione di farmaci anti-TNF-alpha in questi pazienti potrebbe riequilibrare l'assetto ormonale e di conseguenza l'intero processo spermatogenetico.

L'altro aspetto di notevole rilevanza speculativa e clinica è rappresentato dal possibile effetto che elevate concentrazioni seminali del TNF-apha possano avere sulla motilità spermatozoica.

Elevate concentrazioni di TNF- α nel liquido seminale di soggetti infertili con leucocitospermia e/o batteriospermia⁴⁴⁻⁴⁵ sarebbero ascrivibili ai leucociti migrati nell'epitelio epididimale o in altri tratti delle vie spermatiche⁴⁶ in corso di infezioni/inflammazioni cliniche o subcliniche. In maniera simile il riscontro frequente di astenospermia

nei soggetti con lesioni del midollo spinale parrebbe essere legato a elevati livelli nel liquido seminale di TNF- α ⁴⁷.

Nello studio cross-sectional abbiamo riscontrato una significativa prevalenza di astenospermia in pazienti in terapia con DMARDs/FANS (50% dei soggetti) rispetto ai soggetti in terapia con inibitori del TNF- α (13.3% dei soggetti) e alla prevalenza riportata (Passo Sobreiro, 2005) per l'astenospermia nella popolazione generale fertile (2-29.6%).

I dati di una maggiore mobilità degli spermatozoi nei pazienti in terapia con anti-TNF alpha rispetto ai controlli, alla luce dello studio prospettico che non mostra differenze in funzione della terapia con anti-TNF alpha, sarebbe piuttosto da ascrivere a un potenziale effetto tossico della terapia con DMARDs e in maniera particolare al methotrexate. L'altra ipotesi è, come già anticipato, che nei pazienti con malattie infiammatorie articolari croniche, un minore controllo della flogosi, sia responsabile dell'elevata prevalenza di astenospermia. Lo studio condotto presenta dei limiti, sia nella sua componente cross-sectional che in quella prospettica, che è imperativo sottolineare.

Il primo limite è legato alla mancanza del calcolo della dimensione

campionaria e alla scarsa numerosità dei campioni, sia nello studio cross-over come nello studio prospettico.

Peraltro va sottolineato che, come quantitativamente riportato nella sezione dei metodi, la prevalenza di adesione allo studio nella popolazione di pazienti screenati è risultata essere estremamente bassa.

L'altro limite dello studio è legato al fatto che la possibilità di un'infezione delle vie urinarie e genitali è stata esclusa sulla base del solo giudizio clinico e che non è stata condotta nei pazienti una valutazione di carattere endocrinologico.

10. Conclusioni

L'analisi dei dati derivanti dallo studio osservazionale e dallo studio prospettico non consentono di esprimere giudizi sulla possibilità che la terapia con farmaci inibitori del TNF- α possano avere un effetto negativo sulla spermatogenesi e sulle caratteristiche funzionali degli spermatozoi maturi.

Sono peraltro necessari studi a carattere prospettico adeguatamente dimensionati dal punto di vista numerico per valutare il reale effetto delle terapie di fondo e della terapia con inibitori del TNF- α sulla spermatogenesi e sulla motilità spermatica.

Non sono state riscontrate differenze significative ($p=0.82$) nella prevalenza della oligospermia nel gruppo dei pazienti trattati (3/15, 20%) con inibitori del TNF- α rispetto al gruppo dei pazienti non trattati (2/12, 16.7%). Inoltre non sono state rilevate differenze statisticamente significative tra casi e controlli per quanto riguarda la media del numero degli spermatozoi ($56.7 \pm 43.9 \times 10^6/\text{ml}$ spermatozoi nel gruppo dei pazienti non trattati vs $55.1 \pm 35.3 \times 10^6/\text{ml}$ spermatozoi nel gruppo dei pazienti trattati con inibitori del TNF- α , $p=0.91$ (vedi grafico 1).

Al contrario la mobilità degli spermatozoi nei pazienti in terapia con inibitori del TNF- α è risultata significativamente migliore rispetto a quella dei pazienti in terapia tradizionale. Infatti sono risultati astenospermici 6/12 (50%) pazienti in terapia con farmaci tradizionali rispetto a 2/15 (13.3%) pazienti in terapia con inibitori del TNF- α ($p=0.038$) (vedi tabella 2). La presenza di astenospermia nei controlli è risultata significativamente associata con l'assenza di terapia di fondo con methotrexate (3 pazienti su 9 in terapia con MTX sono risultati astenospermici (33.3%) vs 3/3(100%) dei pazienti che non assumevano MTX). L'assetto ormonale (T, FT, FSH, LH, PRL) nei pazienti con oligospermia è risultato nella norma.

Appendice 1

Volume eiaculato	Maggiore o uguale a 2,0 ml
pH	Maggiore o uguale a 7,2
Concentrazione spermatozoi	Maggiore o uguale a 20×10^6 spermatozoi/ml
Numero totale di spermatozoi	Maggiore o uguale a 40×10^6 spermatozoi per eiaculato
Motilità entro 60 minuti dall'eiaculazione	Maggiore o uguale al 50% di spermatozoi con motilità grado a + b oppure maggiore o uguale al 25% di spermatozoi con motilità di grado a
Morfologia	30% o più spermatozoi normali

Valori di riferimento WHO 1999

Appendice 2

Volume eiaculato	Maggiore o uguale a 1,5 ml
pH	Maggiore o uguale a 7,2
Concentrazione spermatozoi	Maggiore o uguale a 15×10^6 spermatozoi/ml
Numero totale di spermatozoi	Maggiore o uguale a 39×10^6 spermatozoi per eiaculato
Motilità entro 60 minuti dall'eiaculazione	Maggiore o uguale al 40% di spermatozoi con motilità grado a + b oppure maggiore o uguale al 32% di spermatozoi con motilità di grado a
Morfologia	14% o più spermatozoi normali

Valori di riferimento WHO 2010

Appendice 3

Calcolo del Disease Activity Score (DAS 0-10) per la valutazione dell'attività di malattia

- Indice di Ritchie (RAI 0-78)
- Numero di articolazioni tumefatte (SW 44 0-44)
- VES alla prima ora (0-100)
- Stato globale di salute (GH 0-100)

$$\text{DAS} = 0,53938 \times \sqrt{\text{RAI}} + 0,06465 \times \text{SW44} + 0,330 \times \ln \text{VES} + 0,00722 \times \text{GH}$$

Tabella 1: Caratteristiche demografiche e indici di attività di malattia di casi e controlli

	Pazienti non in terapia con anti-TNF n(%)	Pazienti in terapia con anti-TNF n(%)	<i>p</i>
Gruppo totale			
Età, anni	47.5 ± 13.3	41.5 ± 10.6	0.2
Durata di malattia, mesi	103.6 ± 142.8	128.8 ± 118.6	0.6
SA			
	3/11 (27.2%)	8/11(72.8%)	
Età, anni	37.6 ± 15	40 ± 9	0.7
Durata malattia, mesi	7 ± 1.7	162.1 ± 144.5	0.014
BASFI	28.3 ± 27	36.5 ± 30.2	0.6
BASDAI	4.7 ± 3.5	4.6 ± 2.3	0.9
HAQ	1.3 ± 0.7	0.7 ± 0.5	0.1
PsA			
	4/8(50%)	4/8(50%)	
Età, anni	50.5 ± 16.2	39.7 ± 15.7	0.3
Durata malattia, mesi	120.7 ± 124.2	109.5 ± 89.3	0.7
BASDAI	0.7 ± 1.5	4.2 ± 3.1	0.09
HAQ	0.5 ± 0.4	0.6 ± 0.6	0.6
DAS	2.2 ± 0.3	2.1 ± 0.9	0.7
AR			
	5/8(62.5%)	3/8(37.5%)	
Età, anni	51.2 ± 8.8	48 ± 6.5	0.6
Durata malattia, mesi	148 ± 186.5	65.6 ± 47.1	0.4
HAQ	0.8 ± 0.3	0.4 ± 0.4	0.1

Tabella 2: Parametri seminali nei casi e nei controlli. Studio cross-sectional

	Pazienti in terapia con anti-TNF-alpha (n=15)	Pazienti non in terapia con anti-TNF-alpha (n=12)	<i>p</i>
Oligospermia (%)	3/15 (20%)	2/12 (16.7%)	0.82
Media spermatozoi (milione/m ³)	55.1 ± 35.3	56.7 ± 43.9	0.91
Astenospermia (%)	2/15 (13.3%)	6/12 (50%)	0.038
Motilità progressiva (% A+B)	47.2 ± 15.4	41.1 ± 15.2	0,04

Grafico 1: Boxplot media spermatozoi nel gruppo di casi e controlli

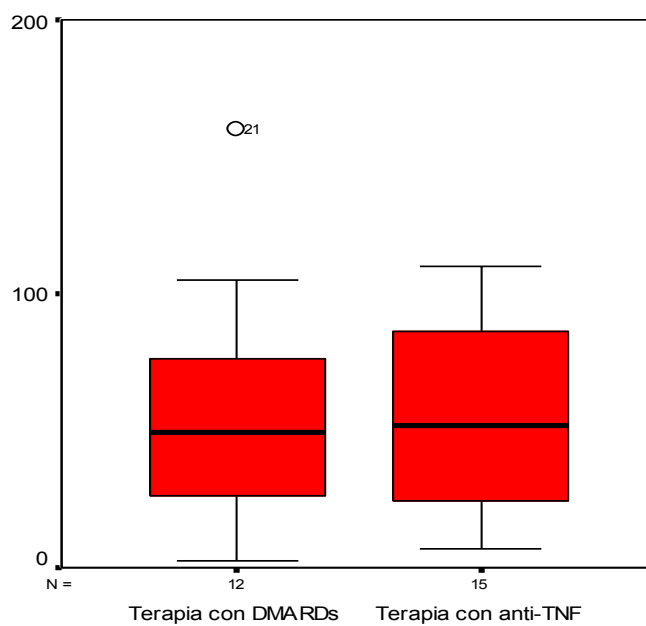


Tabella 3: Caratteristiche demografiche e di attività di malattia dello studio prospettico

Gruppo totale : 19 pazienti

Età media (anni) : 40 ± 10 (27 – 64)

Durata media malattia : 81 ± 86

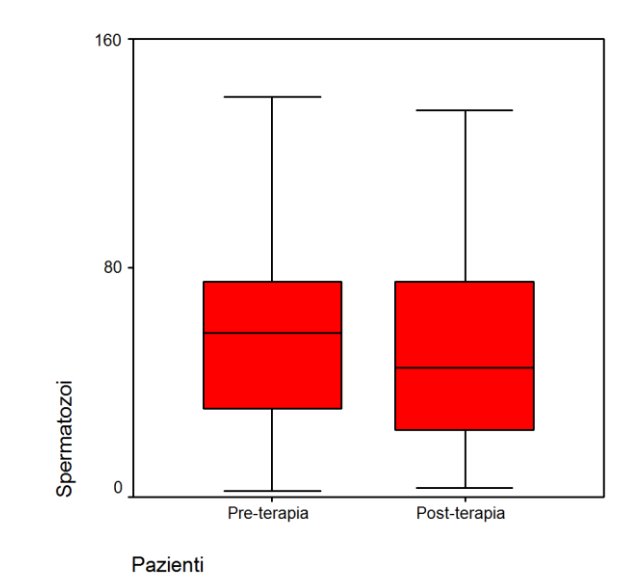
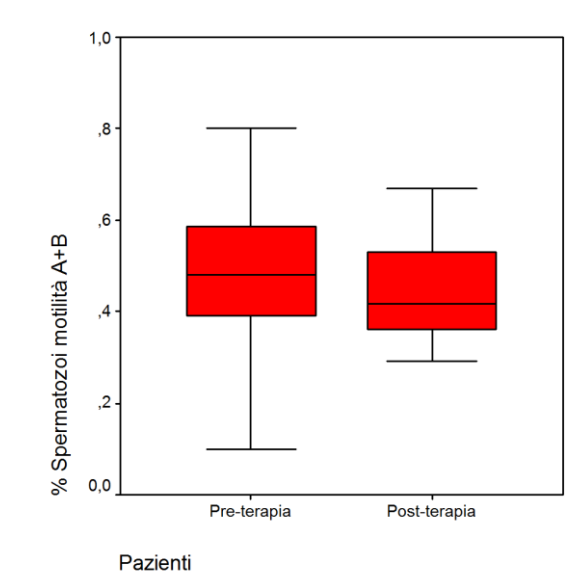
	Pazienti Pre-terapia anti-TNF n(%)	Pazienti Post-terapia anti-TNF n(%)	<i>p</i>
SA 13/19 pazienti (68,42%)			
BASFI	3.79 ± 2.52	3.55 ± 3.24	0.7
BASDAI	$6.5 \pm 1,69$	3.25 ± 2.5	0.0002
HAQs	0.93 ± 0.52	0.7 ± 0.68	0.099
PsA 3/19 pazienti (15,78%)			
BASDAI	3.88 ± 0.43	0.19 ± 0.18	0.002
HAQs	0.41 ± 0.38	0.06 ± 0.11	0.24
DAS	2.74 ± 1.26	1.01 ± 0.86	0.04
AR 3/19 pazienti (15,78%)			
HAQ	0.7 ± 0.57	0.12 ± 0.12	0.19
DAS	4.28 ± 0.90	1.85 ± 0.35	0.3

	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Mobilità progressiva pre	,46258	,178194	,040880
Mobilità progressiva post	,44242	,171097	,039252
N spermatozoi pre	65,68	57,367	13,161
N spermatozoi post	51,89	37,600	8,626

Paired Samples t-test

	Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval of the Difference				
				Lower	Upper			
Mobilità progressiva pre Mobilità progressiva post	,02016	,156029	,035796	,05505	,09536	,563	18	,580
N spermatozoi pre N spermatozoi post	13,79	39,203	8,994	-5,11	32,68	1,533	18	,143

Tabelle 4-5: Motilità progressiva e numero spermatozoi pre e post-terapia.



Bibliografia

1. Schett G. et al “ Structural damage in rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis, and ankylosing spondylitis: traditional view, novel insights gained from TNF blockade, and concepts for the future.” *Arthritis Research & therapy* 2011; 13 (Suppl): S4
2. Weaver A.I. “The impact of new biologicals in th treatment of rheumatoid arthritis.” *Rheumatology* 2004; 43 (Suppl. 3): 17-23
3. Maini R.N. et al.”Beneficial effects of tumor necrosis factor-alpha (TNF α) blockade in rheumatoid arthritis (RA).”*Clin Exp Immunol* 1995;101:207-212
4. Braun J. and Sieper J. “Biological therapies in th spondyloarthritis-the current state.”*Rheumatology* 2004; 43:1072-1084
5. Braun J. and Sieper J. “Therapy of ankylosing spondylitis and other spondyloarthritis: established medical treatment, anti-TNF α therapy and other novel approaches” *Arthritis Res* 2002; 4:307-321
6. Krueger G. “Potential of Tumor Necrosis Factor Inibitors in Psoriasis and Psoriatic Arthritis.” *Arch Dermatol.*2004;140:218-225
7. Peter C. and Elliott MJ “Regulation of Cytokines, Cytokine Inibitors, and Acute-Phase Proteins Following anti-TNF α Therapy in Rheumatoid Arthritis.” *J Immunol* 1999;163;1521-1528
8. Bornstein SR et al “ Cytokines and steroidogenesis” *Mol Cell Endocrinol* 2004; 215:135-141
9. Hong CY et al “Molecular mechanism of suppression of testicular steroidogenesis by proinflammatory cytokine tumor necrosis factor α .” *Molecular and cellular biology* 2004; 24: 2593-2604

10. Guazzone V. et al "Cytokines and chemokines in testicular inflammation: a brief review." *Microscopy Research & Technique* 2009, 72: 620-628
11. Hedger MP & Meinhard DT "Cytokines and immune-testicular axis." *Journal of Reproductive immunology* 2003;58:1-26
12. Ozgocmen s. et al "Antioxidant status and lipid peroxidation in seminal plasma and spermatozoa of patients with ankylosing spondylitis." *Rheumatology* 2003;42:805-807
13. Gordon D et al " Status and sexual function in males with rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis" *Q J Med* 1986; 60: 671-679
14. Tengstrand B et al "Bioavailable testosterone in men with rheumatoid arthritis- High frequency of hypogonadism." *Rheumatology* 2002; 41:285-289
15. Cutolo M et al. " Sex Hormone status of male patients with rheumatoid arthritis : evidence of low serum concentrations of testosterone at baseline an after human chorionic gonadotropin stimulation." *Arthritis Rheum* 1988; 31: 1314-1317
16. Gordon D "Prolonged ipogonadism in male patients with rheumatoid arthritis during flares in disease activity." *Br J Rheumatol* 1988, 27.440-444
17. Cutolo M et al "Do androgens influence the patophysiology of rheumatoid arthritis? Facts & hipotesis." Editorial. *J Rheumatol* 1998; 25: 1041-1047
18. Tengstran B. et al " Gonadal hormones in men with rheumatoid arthritis-from onset through 2 years." *J Rheumatol* 2009 May; 36(5): 887-892
19. Cutolo M et al "Different roles for androgens and estrogens in the susceptibility to autoimmune rheumatic diseases." *Rheum Dis Clin North Am* 2000; 26: 825-839
20. Cutolo M et al " Sex hormone adjuvant therapy in rheumatoid arthritis." *Rheum Dis Clin North Am* 2000 Nov; 26 (4): 881-895
21. Cutolo M "Androgen replacement therapy in male patients with rheumatoid arthritis"

Arthr Rheum 1991Jan;34(1): 1-5

22. Riley SA “ Sulfasalazine induced seminal abnormalities in ulcerative colitis: results of mesalazine substitution.” Gut 1987, 28. 1008-1012

23. Ragni G et al “Abnormal semen quality and low serum testosterone in men with inflammatory bowel disease treated for a long time with sulfasalazine.” Andrologia 1984; 16. 162-167

24. Holstein et al “ Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment .” Reproductive Biology & endocrinology 2003; 1:107

25. Cheng CY et al “The blood testis barrier and its implication for male contraception.” Pharmacol Rev 64. A-AW 2012

26. Foresta C et al. “Evidence for a stimulatory role of follicle-stimulating hormone on the spermatogonial population in adult males.” Fertil Steril 1998; 69: 636-642

27. Sharpe RM “Regulation of spermatogenesis” The physiology of reproduction 1994; 1363-1434

28. Selice R. et al “Effects of endogenous FSH on normal human spermatogenesis in adults.” International Journal of Andrology 2011: 1-7

29. Sharpe RM “Follicle-stimulating hormone and spermatogenesis in the adult male.” J Endocrinol 1989;121:405-407

30. Kazutaka S et al “Regulation of Sertoli cell activin A and inhibin B by tumor necrosis factor α and interleukin 1α : interaction with follicle-stimulating hormone/adenosine 3,5-cyclic phosphate signaling” Molecular and cellular endocrinology 2011;335: 195-203

31. Li MWM et al “Cytokines and the junction restructuring events during spermatogenesis in the testis: an emerging new concept of regulation” Cytokine Growth Factor Rev 2009 Aug; 20(4): 329-338

32. Yan HHN et al. "Blood-testis barrier dynamics are regulated by testosterone and cytokines via their differential effect on the kinetics of protein endocytosis and recycling in Sertoli cells" *FASEB J* 2008; 22:1945-1959
33. Bialas M et al. "The role of IL-6, IL-10, TNF α and its Receptors TNFR1 and TNFR2 in the local regulatory system of normal and impaired human spermatogenesis." *American J of Reproductive Immunology* 2009; 62: 51-59
34. Luy WY et al. "TGF- β s: their role in testicular function and Sertoli cell tight junction dynamics." *Int J Androl* 2003; 26: 147-160
35. Sarkar O. et al. "Interleukin-1 α (IL1 α) is a novel regulator of the blood-testis barrier in the rat." *Biol Reprod* 2008, 78: 445-454
36. Swapan K. DE et al "Expression of TNF α in mouse spermatogenic cells" *Endocrinology*, 1993; 133 (1): 389-396
37. Xiong Y. et al "Expression, regulation and production of TNF α in mouse testicular interstitial macrophages in vitro" *Endocrinology*, 1993; 133 (6): 2568-2573
38. Moore C. et al, "Physiological relevance of TNF in mediating macrophage-Leydig cell interactions" *Endocrinology*, 1994; 134 (1): 63-69
39. Pentikainen V. et al, "TNF α down-regulates the Fas ligand and inhibits germ cell apoptosis in the human testis" *J of Clin End & Met* 2001, 86 (9): 4480-4488
40. La Montagna G. et al "Asthenozoospermia in patients receiving anti-tumor necrosis factor alpha agents." *Ann Rheum. Dis* 2005; 64: 1667
41. Suominen JS et al Tumor necrosis factor alpha (TNF α) promotes cell survival during spermatogenesis, and this effect can be blocked by infliximab, a TNF alpha antagonist. *Eur J Endocrinol.* 2004;151:629-40

42. Rehan N et al The semen of fertile men:statistical analysis of 1300 men. Fertli Steril 1975 Jun ; 26 (6): 492-502
43. Marcos Paulo P. Reproductive history and semen analysis in prevasectomy fertile men with and without varicocele J Androl 1984;5:17-20
44. Omu AE et al. Seminal immune response in fertile men with leukocytospermia: Effect on antioxidant activity. Eur J Obset Gynecol Reprod Biol 86:195-202,1999
45. Sikorski R. et al. Levels of proinflammatory cytokines (IL-1 alpha, IL6, TNF-alpha)in the semen plasma of male partners of infertile couples. Ginekol Pol 72: 1325-1328,2001
46. Wang YF Intraepithelial lymphocytes and macrophage in the epididymis. Cell Tissue Res 1983.233: 571-572
- 47.Brackett N. et al. Neutralization of cytokine activity at the receptor level improves sperm motility in men with spinal cord injuries. J Androl 2007; 28:717-721