

5

Interazione tra spermatozoi e muco cervicale

5.1 Introduzione

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 (estrogeno) stimola la produzione di una grossa quantità di muco acquoso, mentre il progesterone (progestinico) 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 μ l a metà ciclo fino a meno di 100 μ l 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, quindi, una secrezione eterogenea, composta per oltre il 90% da acqua. Esso mostra particolari proprietà fisiche: consistenza, *spinnbarkeit* e *ferning* (cristallizzazione a foglia di felce).

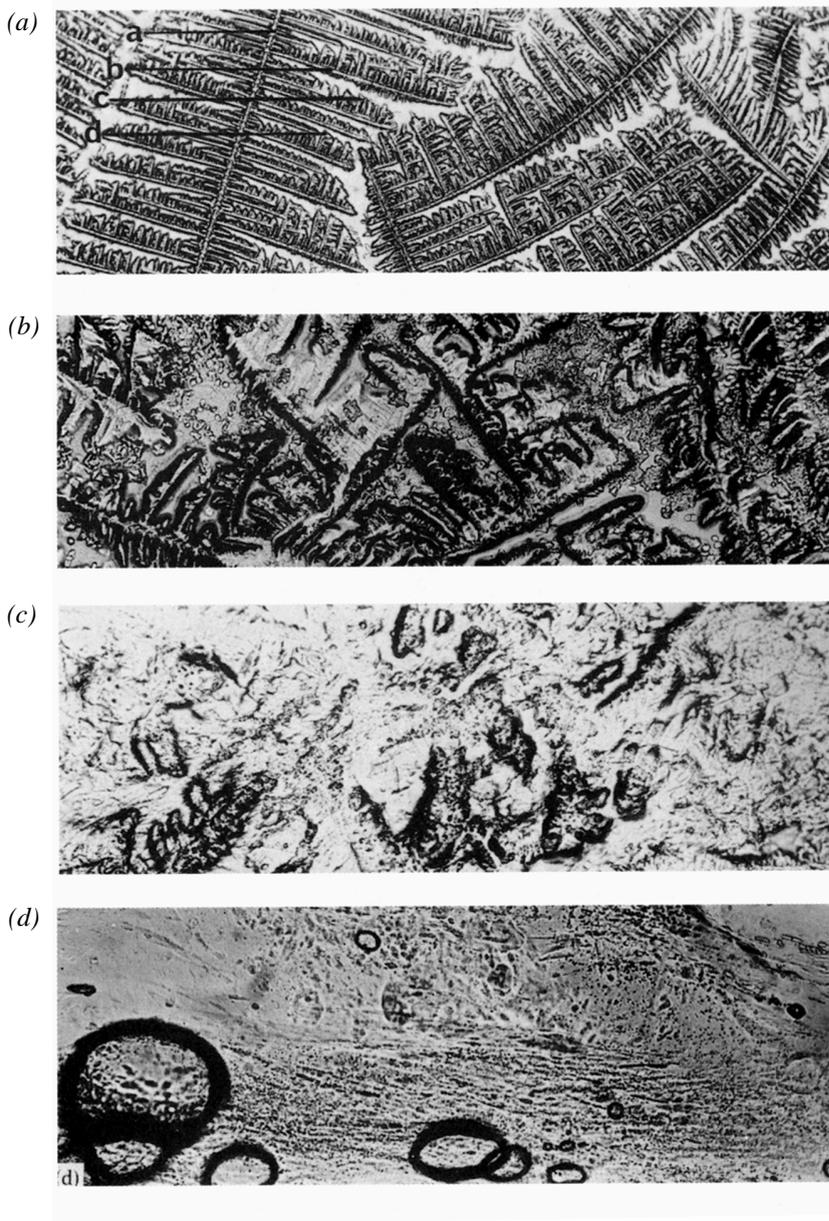
La *consistenza* è influenzata dalla aggregazione molecolare e dalla concentrazione di proteine e ioni. Il muco varia in consistenza durante il ciclo: è assai viscoso nella fase premenstruale (spesso ricco di cellule), mentre ha una consistenza acquosa a metà ciclo, subito prima dell'ovulazione. Appena avvenuta l'ovulazione, la viscosità del muco comincia nuovamente ad aumentare.

Lo *spinnbarkeit* (filanza) descrive le caratteristiche di fibrosità, filanza ed elasticità del muco cervicale.

Il *ferning* si riferisce al grado ed alle caratteristiche di cristallizzazione (appunto a foglia di felce) che si osservano quando il muco si essicca su una superficie di vetro (Fig. 5.1).

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 subunità che sono costituite da un *core* peptidico e da catene laterali di

Fig. 5.1. Esempi di cristallizzazione con simmetria a felce del muco cervicale essiccato all'aria su vetrino portaoggetti (ingrandimento 100x). Il tipo di cristallizzazione è molto variabile, e dipende, per esempio, dallo spessore del preparato e dalla quantità di cellule presenti. Inoltre, una preparazione può presentare più di un tipo di cristallizzazione e, talvolta, sono evidenziati tutti i tipi possibili in un solo striscio. (a) Cristallizzazione di grado 3: a, ramo primario; b, ramo secondario; c, ramo terziario; d, ramo quaternario. (b) Prevalenza di rami primari e secondari (grado 2), con presenza di alcuni rami terziari. (c) Cristallizzazione a felce atipica (grado 1). (d) Nessuna cristallizzazione (grado 0). Le strutture rotondeggianti con parete ispessita sono bolle d'aria.



oligosaccaridi. Le alterazioni cicliche dei costituenti del muco cervicale umano possono influenzare la capacità penetrativa degli spermatozoi e la loro sopravvivenza: la penetrabilità agli spermatozoi inizia approssimativamente alla nona giornata di un ciclo normale di 28 giorni, ed aumenta gradualmente per raggiungere il massimo in corrispondenza dell'ovulazione. Successivamente, la penetrabilità inizia a diminuire, prima ancora che siano evidenti cambiamenti delle caratteristiche del muco. Esistono ampie variazioni individuali della durata e del grado di penetrabilità del muco agli spermatozoi. Gli spermatozoi possono venire guidati da filamenti di muco verso le cripte cervicali, dove sono trattenuti e successivamente rilasciati gradualmente in utero e nelle tube di Falloppio.

Le proprietà seguenti possono essere attribuite alla cervice ed alle sue secrezioni: (a) recettività alla penetrazione degli spermatozoi in corrispondenza dell'ovulazione e interferenza a tale ingresso negli

altri periodi del ciclo, (b) protezione degli spermatozoi nei confronti dell'ambiente ostile della vagina e contro i rischi di fagocitosi, (c) completamento delle richieste energetiche degli spermatozoi, (d) effetto filtro (per es. selezione degli spermatozoi in base alla motilità), (e) serbatoio a breve termine per gli spermatozoi, e (f) luogo di inizio della capacitazione degli spermatozoi.

Gli spermatozoi nel muco sono sospesi in un mezzo fluido. L'interazione con le secrezioni del tratto riproduttivo femminile è di importanza critica per la sopravvivenza e per la capacità funzionale degli spermatozoi. Al momento non esiste un metodo per valutare l'effetto del fluido uterino e tubarico, ma il muco cervicale può essere prelevato e studiato agevolmente. La valutazione dell'interazione tra spermatozoi e muco cervicale è perciò un importante criterio che deve essere incluso in ogni studio completo sull'infertilità. Il reperto di una alterata interazione tra sperma e muco cervicale può rappresentare un'indicazione per l'inseminazione o per qualche altra tecnica di riproduzione assistita.

5.2 Raccolta e conservazione del muco cervicale

5.2.1 Metodo di raccolta

La cervice viene esposta con uno speculum e l'orifizio esterno deve essere delicatamente pulito con un tampone di cotone per rimuovere eventuali contaminanti vaginali esterni. Il muco viene prelevato dall'endocervice aspirandolo con una siringa da tubercolina (senza ago), una siringa da muco, una pipetta o un capillare di polietilene. Se possibile, la qualità del muco dovrebbe essere valutata immediatamente dopo il prelievo, in caso contrario dovrà essere conservato con cura fino al momento dell'osservazione (Sezione 5.2.2).

Quando il muco viene raccolto per aspirazione, è importante standardizzare il metodo con cui si applica la pressione di aspirazione agli strumenti per la raccolta (siringhe, cateteri, ecc.). L'aspirazione deve iniziare dopo che la punta dello strumento sia stata introdotta di circa 1 cm nel canale cervicale, e va poi continuata fino a quando si estrae lo strumento. Solamente prima di estrarre lo strumento dalla bocca esterna della cervice bisogna interrompere l'azione di aspirazione. Durante questa estrazione è consigliabile serrare il catetere piegandolo, per evitare l'aspirazione di bolle o materiale vaginale.

Quando il muco cervicale deve essere raccolto in un momento diverso dalla metà del ciclo, la sua produzione può essere aumentata dalla somministrazione di 20-80 µg/giorno di etinil-estradiolo, iniziando dal quinto giorno del ciclo; il muco può essere raccolto entro 7-10 giorni dall'inizio della somministrazione. Questa procedura induce la produzione di un muco più idratato, e quindi meno viscoso (Eggert-Kruse *et al.*, 1989). Per quanto tale approccio possa essere utile per lo studio *in vitro* delle interazioni tra spermatozoi e muco cervicale, non rifletterà necessariamente la situazione della coppia quando non vengono somministrati ormoni.

5.2.2 *Conservazione*

Il muco può essere conservato nella stessa siringa per tuberculina, in capillari di polietilene o in piccole provette, chiuse con un tappo o con carta paraffinata per evitarne la disidratazione, e facendo attenzione a ridurre al minimo la quantità di aria nel contenitore per la conservazione. I campioni dovranno essere conservati in frigorifero a 4 °C per un periodo che non superi i 5 giorni. Il muco dovrà essere utilizzato preferibilmente entro 2 giorni dal prelievo, registrando il tempo intercorso tra la raccolta e l'utilizzo. Non devono essere effettuati test di penetrazione spermatozoaria o prove reologiche su campioni di muco che siano stati congelati e scongelati.

5.3 **Valutazione del muco cervicale**

La valutazione delle proprietà del muco cervicale comprende lo studio della filanza, della cristallizzazione, della consistenza e del pH. L'Appendice XX propone un modulo per la registrazione del post coital test dove queste caratteristiche del muco cervicale sono quantificate secondo il sistema definito da Moghissi (1976), basato sull'originaria proposta di Insler *et al.* (1972). Il punteggio massimo è 15, ma un punteggio superiore a 10 è generalmente indice di una buona qualità di muco, capace cioè di favorire la penetrazione degli spermatozoi; un punteggio inferiore a 10, invece, indica un muco di qualità scadente. Il punteggio deriva dal volume del muco cervicale raccolto (Sezione 5.3.1) e da quattro variabili che descrivono il suo aspetto e le sue caratteristiche (Sezioni 5.3.2-5.3.5). Il pH del muco non compare nel calcolo del punteggio totale del muco cervicale, ma dovrebbe essere misurato come un importante fattore nell'interazione tra spermatozoi e muco cervicale (Eggert-Kruse *et al.*, 1993).

5.3.1 *Volume*

Il volume viene valutato come segue:

0 = 0 ml

1 = 0,1 ml

2 = 0,2 ml

3 = 0,3 ml o più.

5.3.2 *Consistenza*

La consistenza del muco cervicale è il più importante dei fattori che influenzano la penetrazione degli spermatozoi. Durante la fase ovulatoria, a metà ciclo, la resistenza alla progressione degli spermatozoi nel muco è minima, mentre un muco viscoso, come quello che si osserva nella fase luteinica, rappresenta una barriera impenetrabile. Detriti cellulari e leucociti, nel muco cervicale, possono impedire la migrazione degli spermatozoi, ed anche estese endocerviciti possono essere associate ad una ridotta fertilità.

Alla consistenza si attribuisce il seguente punteggio:

0 = muco premestruale, compatto, altamente viscoso

1 = muco di viscosità intermedia

2 = muco leggermente viscoso

3 = muco preovulatorio (metà ciclo), minimamente viscoso.

5.3.3 *Cristallizzazione*

La cristallizzazione (Fig. 5.1) viene valutata esaminando il muco asciugato all'aria sopra un vetrino portaoggetti. Una simile preparazione può evidenziare diversi pattern di cristallizzazione che possono avere un aspetto simile ad una felce. In funzione della composizione del muco, la "foglia di felce" può avere solo un ramo primario, o il ramo può essere ramificato una, due o tre volte, per formare, rispettivamente, rami secondari, terziari e quaternari. Devono essere analizzati diversi campi all'interno del preparato, ed il punteggio indica il più alto grado di cristallizzazione del campione, secondo le seguenti definizioni:

0 = mancanza di cristallizzazione

1 = cristallizzazione atipica

2 = cristallizzazione con ramificazioni primarie e secondarie

3 = cristallizzazione con ramificazioni terziarie e quaternarie.

5.3.4 *Filanza*

Il muco cervicale posto su un vetrino portaoggetti viene toccato con un coprioggetto o con un secondo vetrino, tenuto trasversalmente, che viene poi delicatamente sollevato. La lunghezza del filamento di muco cervicale che si forma tra i due vetrini viene misurata in centimetri, e classificata come segue:

0 = < 1 cm

1 = da 1 a 4 cm

2 = da 5 a 8 cm

3 = 9 cm o più.

5.3.5 *Cellularità*

Il conteggio di tutte le cellule dovrebbe essere espresso in cellule/mm³ (µl). Una stima del numero dei leucociti e di altre cellule nel muco cervicale, tradizionalmente, si basa sul numero contato in campo ad alto numero di ingrandimenti (HPF). Una combinazione di lenti che produce HPF è un oculare ad ampio campo (diametro di apertura 20 mm) da 10x ed un obiettivo da 40x. Dal momento che l'ampiezza del campo visivo del microscopio è uguale al diametro dell'apertura dell'oculare diviso per l'ingrandimento dell'obiettivo, questo sistema di lenti produce un campo microscopico con un diametro approssimativo di 500 µm. Lo spessore del preparato, allo stesso modo, può venire standardizzato appoggiando il coprioggetto sopra del grasso al silicone contenente sferette di vetro di 100 µm (Drobnis *et al.*, 1988). Se lo spessore del campo d'osservazione è di 100 µm, il suo volume dovrebbe essere 0,02 mm³. Di conseguenza, in queste condizioni, il conteggio di 10 cellule/HPF corrisponde ad approssimativamente a 500 cellule/mm³.

I valori per la classificazione delle cellule sono:

0 = > 20 cellule/HPF o > 1000 cellule/mm³

1 = 11-20 cellule/HPF o 501-1000 cellule/mm³

2 = 1-10 cellule/HPF o 01-500 cellule/mm³

3 = 0 cellule.

5.3.6 pH

Il pH del muco del canale endocervicale dovrebbe essere misurato con una apposita cartina, range 6,4-8,0, *in situ* oppure subito dopo la raccolta. Se il pH viene misurato *in situ*, bisogna prestare attenzione ad agire correttamente, dal momento che il pH del muco esocervicale è sempre più basso di quello del muco del canale endocervicale. E' necessario inoltre prendere precauzioni per evitare la contaminazione con le secrezioni vaginali, che hanno un pH acido.

Gli spermatozoi sono sensibili alle variazioni di pH del muco cervicale: un muco acido immobilizza gli spermatozoi, mentre un muco alcalino può esaltarne la motilità. Una eccessiva basicità del muco cervicale (pH superiore a 8,5) può, tuttavia, avere un effetto negativo sulla vitalità degli spermatozoi. Il valore ottimale del pH per la migrazione e la sopravvivenza degli spermatozoi nel muco cervicale è compreso tra 7,0 e 8,5, il range di pH, cioè, del muco periovulatorio normale. Un valore di pH compreso tra 6,0 e 7,0, tuttavia, può ancora essere ritenuto compatibile con la penetrazione degli spermatozoi.

In alcuni casi il muco cervicale può essere sensibilmente più acido, sia per una alterata secrezione, sia per la presenza di un'infezione batterica.

5.4 Interazione tra spermatozoi e muco cervicale

Il muco cervicale permette la penetrazione degli spermatozoi per un limitato periodo del ciclo, sotto l'influenza degli estrogeni. La lunghezza del periodo in cui gli spermatozoi possono penetrare il muco cervicale varia considerevolmente da una donna all'altra, e può variare nello stesso individuo da un ciclo all'altro. Anomalie dell'interazione tra spermatozoi e muco cervicale non dovrebbero essere prese in considerazione se non dopo aver ripetuto il test in cicli diversi.

5.4.1 Test in vivo (*post coital*)

(i) *Scelta del momento in cui eseguire il test.* - Il post coital test dovrebbe essere eseguito prima dell'ovulazione ed il più vicino possibile al momento dell'ovulazione, determinato con criteri clinici, come la lunghezza abituale del ciclo, la temperatura basale, le modificazioni del muco cervicale, la citologia vaginale e, se possibile, il dosaggio degli estrogeni sierici o urinari e l'ecografia. E' importante che ogni laboratorio valuti il muco ad un tempo standard dal coito, compreso tra 9 e 24 ore.

(ii) *Suggerimenti ai pazienti in preparazione per il post coital test.* -

- (a) Astenersi dai rapporti sessuali per almeno due giorni prima del test.
- (b) Il giorno più adatto per il test è: (giorno)(mese)(anno). Il rapporto sessuale deve aver luogo la notte precedente il giorno stabilito, secondo le proprie abitudini.
- (c) Non usare alcun lubrificante durante il rapporto e non eseguire irrigazioni vaginali dopo di esso. La donna può fare la doccia dopo il rapporto, ma non un bagno completo
- (d) Riferire al medico, per il test, l'ora e la data.

(iii) *Tecnica del post coital test.* - Introdurre in vagina uno speculum non lubrificato ed aspirare un campione di fluido dal fornice vaginale posteriore, utilizzando una siringa da tuberculina (senza ago), una pipetta o un catetere di polietilene. Mediante un'altra siringa o catetere, aspirare poi un campione di muco dal canale endocervicale (Sezione 5.2.1), depositarlo su un vetrino portaoggetto, coprirlo con un coprioggetto ed esaminarlo con un microscopio a contrasto di fase a medio ingrandimento (Sezione 5.3.5).

(iv) *Campione vaginale.* - Normalmente gli spermatozoi in vagina muoiono entro due ore. Lo scopo dell'esame del campione vaginale è quello di assicurarsi che il liquido seminale sia stato realmente depositato in vagina.

(v) *Campione del canale cervicale.* - Il numero di spermatozoi presenti nella parte inferiore del canale cervicale varia con il tempo trascorso dal rapporto. Circa 2-3 ore dopo il coito si ha un notevole accumulo di spermatozoi nella parte inferiore del canale cervicale.

E' consigliabile esprimere la concentrazione di spermatozoi nel muco in modo standard (numero di spermatozoi/mm³), allo stesso modo di come si misura la cellularità del muco (Sezione 5.3.5).

La motilità degli spermatozoi nel muco cervicale viene classificata come segue: a = motilità rapida progressiva; b = lenta o non lineare progressiva; c = non progressiva; d = spermatozoi immobili (Sezione 2.4.3). L'indicatore più importante della funzione cervicale normale è la presenza di spermatozoi con motilità rapida progressiva.

(vi) *Interpretazione.* - Lo scopo del post coital test non è solo quello di determinare il numero di spermatozoi attivi nel muco cervicale, ma anche quello di valutare la loro sopravvivenza ed il comportamento molte ore dopo il coito (funzione di riserva). Per questo, un test eseguito 9-24 ore dopo il rapporto sessuale fornisce informazioni sulla longevità e sopravvivenza degli spermatozoi.

La presenza di spermatozoi con motilità rapida progressiva nell'endocervice, testimonia contro la presenza di fattori cervicali come possibile causa di infertilità (Oei *et al.*, 1995).

Il post coital test deve essere ripetuto se il primo risultato è negativo o anormale. Quando non si ritrovino spermatozoi nel canale cervicale o in vagina, è necessario chiedere conferma alla coppia che vi sia stata la deposizione di sperma in vagina. Un test negativo può anche essere dovuto ad una scelta sbagliata del giorno del rapporto. Un test eseguito troppo presto o troppo tardi rispetto all'ovulazione può essere negativo anche in una donna fertile, ed in alcune donne il test risulta positivo solo in uno o due giorni nel corso dell'intero ciclo. Quando non si riesce a monitorare l'ovulazione con un ragionevole grado di precisione, può essere necessario ripetere il post coital test diverse volte durante un ciclo oppure eseguire numerosi test *in vitro*. Sono necessari ripetuti post coital test anormali in cicli con un buon *timing* dell'ovulazione per individuare in un fattore cervicale la possibile causa dell'infertilità.

5.4.2 Test in vitro

Una precisa valutazione delle interazioni tra spermatozoi e muco cervicale può essere ottenuta mediante i test di penetrazione *in vitro*. Questi test in genere vengono eseguiti dopo un reperto di post coital test negativo, e sono più informativi se vengono effettuati incrociati con liquido seminale e muco di donatori.

Quando lo scopo del test di interazione tra spermatozoi e muco cervicale è quello di comparare diversi campioni di muco cervicale, dovrebbe essere utilizzato un solo eiaculato, dotato di conta spermatozoaria, motilità e morfologia normali. D'altra parte quando l'intento è quello di comparare diversi campioni seminali, ci si dovrebbe attenere all'uso di un unico campione di muco cervicale per testare la capacità di penetrazione degli spermatozoi. Quando si ottiene un risultato patologico impiegando lo sperma del marito ed il muco della moglie, è necessario eseguire test incrociati con muco di donatrice e spermatozoi di donatore, per stabilire se il fallimento del test è dovuto al muco cervicale o agli spermatozoi. Il muco cervicale di donatrice può essere prelevato da donne, in fase ovulatoria, che sono in lista per una inseminazione artificiale. Il muco deve essere prelevato prima dell'inseminazione, in cicli naturali o in cicli in cui l'ovulazione sia stata indotta mediante trattamento con gonadotropine. Donne a cui è stato somministrato clomifene citrato per indurre l'ovulazione non dovrebbero essere impiegate come donatrici di muco a causa dell'effetto di questo farmaco antiestrogeno sulla cervice.

I test *in vitro* dovrebbero essere eseguiti entro un'ora dalla raccolta del liquido seminale, e deve essere usato muco periovulatorio. Sostanze sostitutive, come il muco cervicale bovino o gel sintetici non possono essere ritenuti equivalenti al muco cervicale umano per valutare *in vitro* l'interazione tra spermatozoi e muco cervicale.

(i) *Test su vetrino semplificato*. - Una goccia di muco cervicale viene posta su un vetrino e coperta con un coprioggetto (22 mm x 22 mm). Lo spessore del preparato può essere standardizzato mediante grasso di silicone contenente microsfere di vetro del diametro di 100 µm (Sezione 5.3.5). Si depone una goccia di liquido seminale da entrambi i lati, a contatto con il margine del coprioggetto, in modo che il liquido seminale penetri sotto di esso per capillarità. Si ottiene così una evidente interfaccia tra sperma e muco.

Il vetrino così preparato deve essere incubato in termostato a 37 °C per 30 minuti, in ambiente umidificato.

Dopo pochi minuti, all'interfaccia si formano proiezioni digitiformi di liquido seminale, dette falangi, che penetrano dentro il muco. La maggior parte degli spermatozoi percorre questi canali prima di entrare nel muco: in molti casi un unico spermatozoo sembra guidare la colonna di spermatozoi attraverso il muco. Una volta all'interno del muco cervicale gli spermatozoi si disperdono ed iniziano a muoversi a caso. Alcuni tornano nel plasma seminale, mentre la maggior parte migra profondamente nel muco cervicale, fino ad incontrare resistenza nei detriti cellulari e nei leucociti.

(ii) *Interpretazione.* - L'interpretazione di questo test è soggettiva, perché è impossibile standardizzare le dimensioni e la forma dell'interfaccia tra liquido seminale e muco in un preparato eseguito su un comune vetrino. Di conseguenza è necessario che questo test venga impiegato esclusivamente per valutare in modo qualitativo le interazioni tra spermatozoi e muco.

Da questo test, comunque, si possono ottenere le seguenti utili informazioni:

- (a) Gli spermatozoi penetrano nel muco e oltre il 90% di questi sono mobili con capacità progressiva (risultato normale).
- (b) Gli spermatozoi penetrano nel muco ma non avanzano oltre 500 μm (circa la lunghezza di 10 spermatozoi) dall'interfaccia tra sperma e muco (risultato insufficiente).
- (c) Gli spermatozoi penetrano nel muco ma presto si immobilizzano o presentano un movimento sussultorio *in situ* (*shaking*) (risultato anomalo che suggerisce la presenza di anticorpi antispermatozoo).
- (d) Non avviene alcuna penetrazione di spermatozoi attraverso l'interfaccia tra sperma e muco. Le falangi possono formarsi o non formarsi, ma gli spermatozoi si aggregano lungo l'interfaccia dal lato del liquido seminale (risultato anomalo).

(iii) *Test in capillare.* - (vedi Appendice XXI).