

**PRIMO CONVEGNO REGIONALE LOMBARDO DELLA SOCIETÀ ITALIANA DI
RIPRODUZIONE UMANA (S.I.R.U.)
XXXIX SABATO DELL'ANDROLOGIA**

COLLOQUI IN PMA TRA GINECOLOGI, ANDROLOGI E BIOLOGI

**16 FEBBRAIO 2019 PADERNO DUGNANO (MI)
CLINICA SAN CARLO**

**STRESS OSSIDATIVO E CAPACITA' ANTIOSSIDANTE DEL SEME:
IMPATTO CLINICO**

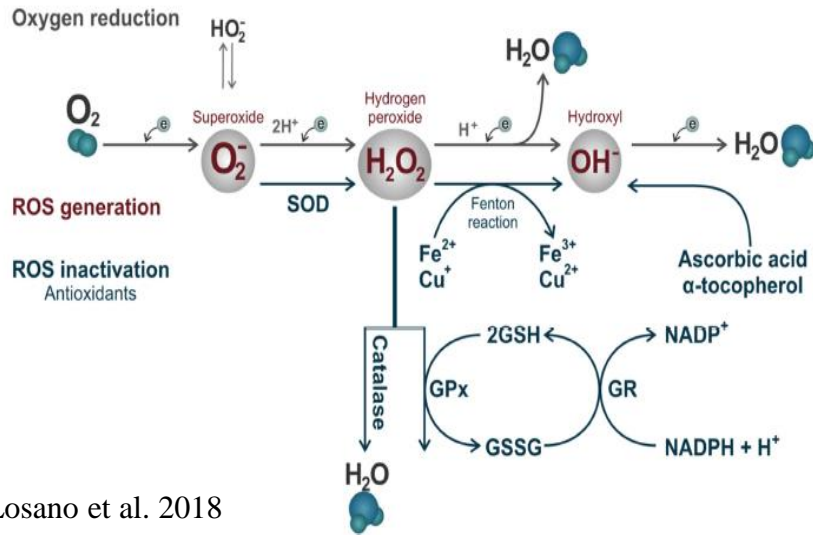
Saverio Muzzi, Filomena Scarselli



Reproductive Medicine, European Hospital, Rome, Italy

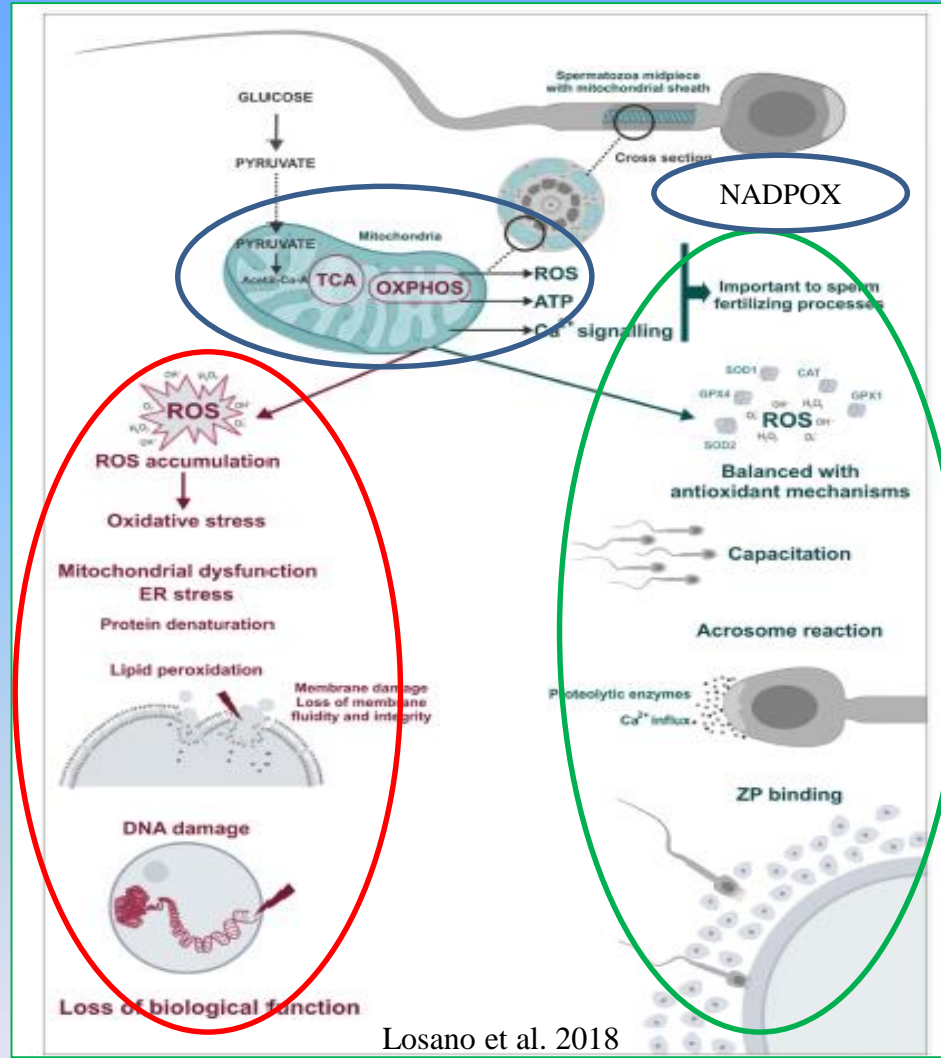


ROS (SPECIE REATTIVE DELL'OSSIGENO)



Losano et al. 2018

I mitocondri sono la sede principale di produzione dei ROS. Conseguentemente, la disfunzione mitocondriale porta ad un rilascio massivo di ROS che causano danni ai mitocondri come la perossidazione lipidica, la denaturazione delle proteine e frammentazione del DNA degli spermatozoi. (Treulen 2015 Human Reproduction)



Losano et al. 2018



STRESS OSSIDATIVO: CAUSE

3. Lifestyle:

- smoking
- alcohol
- obesity
- stress
- advanced paternal age
- poor diet

4. Environmental

- heat
- pollution
- heavy metals
- plasticizers
- pesticide/ herbicides

5. Infection

- genito-urinary tract
- systemic infection

2. Iatrogenic

- centrifugation
- medications

6. Autoimmune

- vasectomy
- torsion
- chronic prostatitis

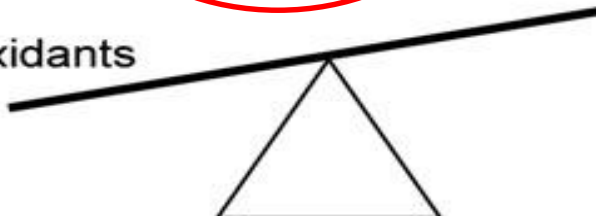
1. Idiopathic

8. Chronic Disease

- diabetes
- CRF
- haemaglobinopathies
- hyperhomocysteinaemia

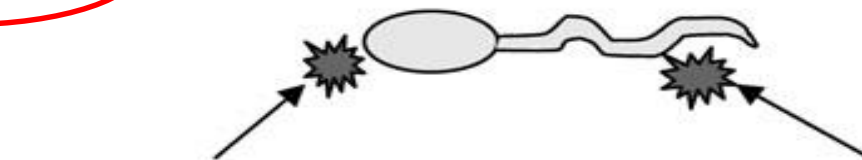
7. Testicular

Anti-Oxidants



ROS

oxidative stress



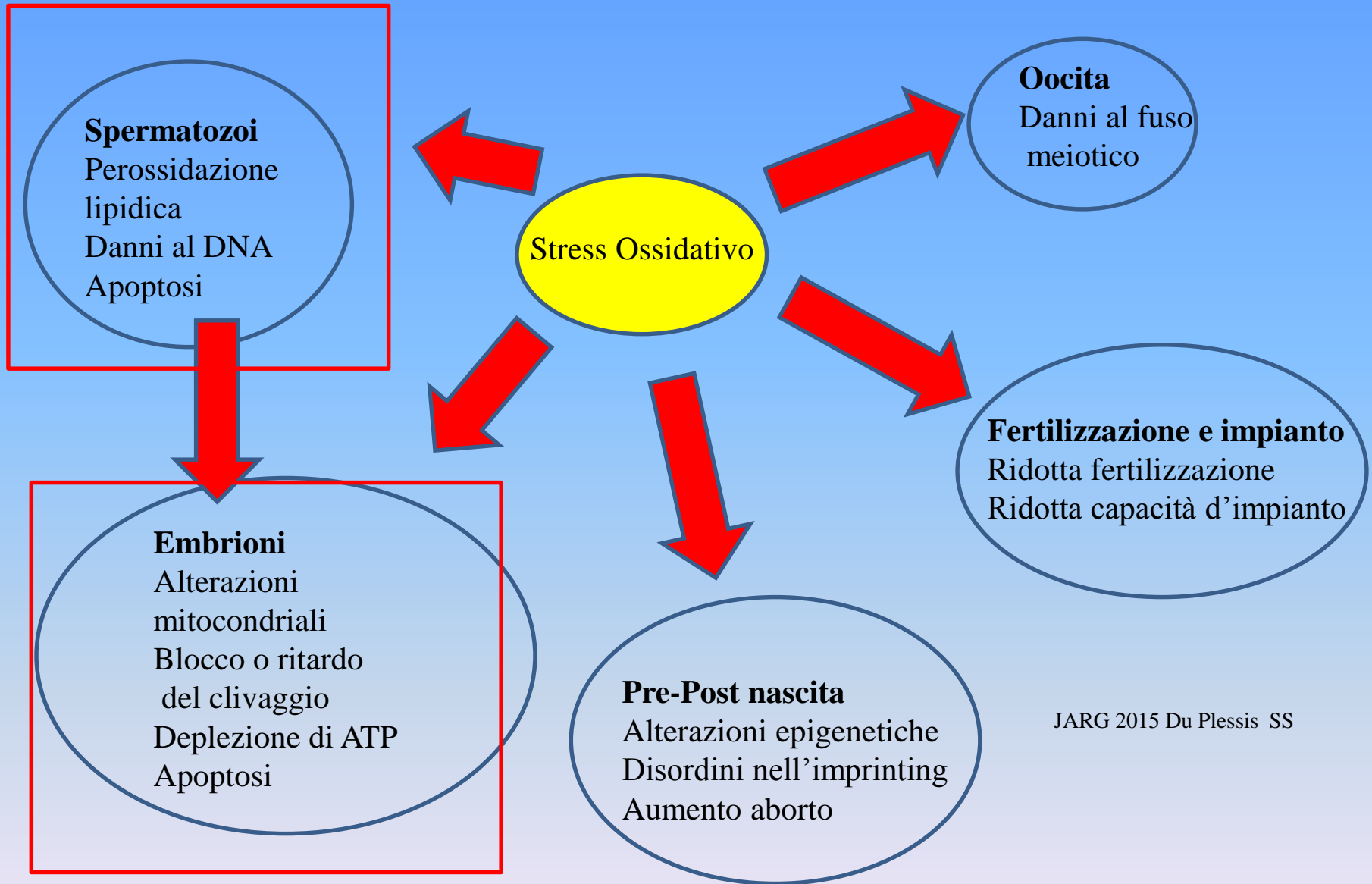
Damage to **sperm DNA** results
In infertility and miscarriage

Damage to **sperm membrane**
Decreases motility and the
sperm's
ability to fuse with oocyte

Tremellen et al. 2009



ROS E RIPRODUZIONE



JARG 2015 Du Plessis SS

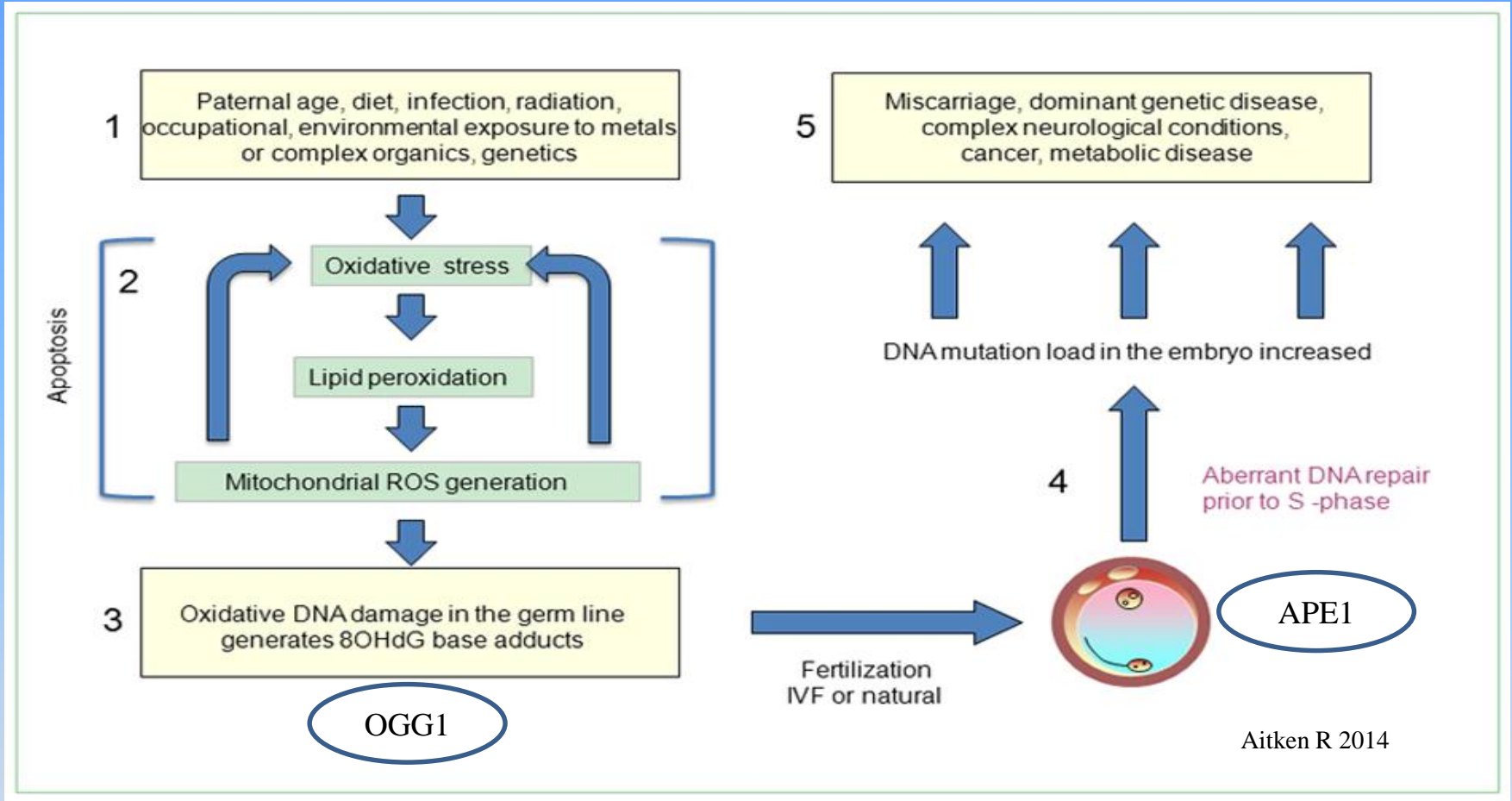


EFFETTO PATERNO TARDIVO

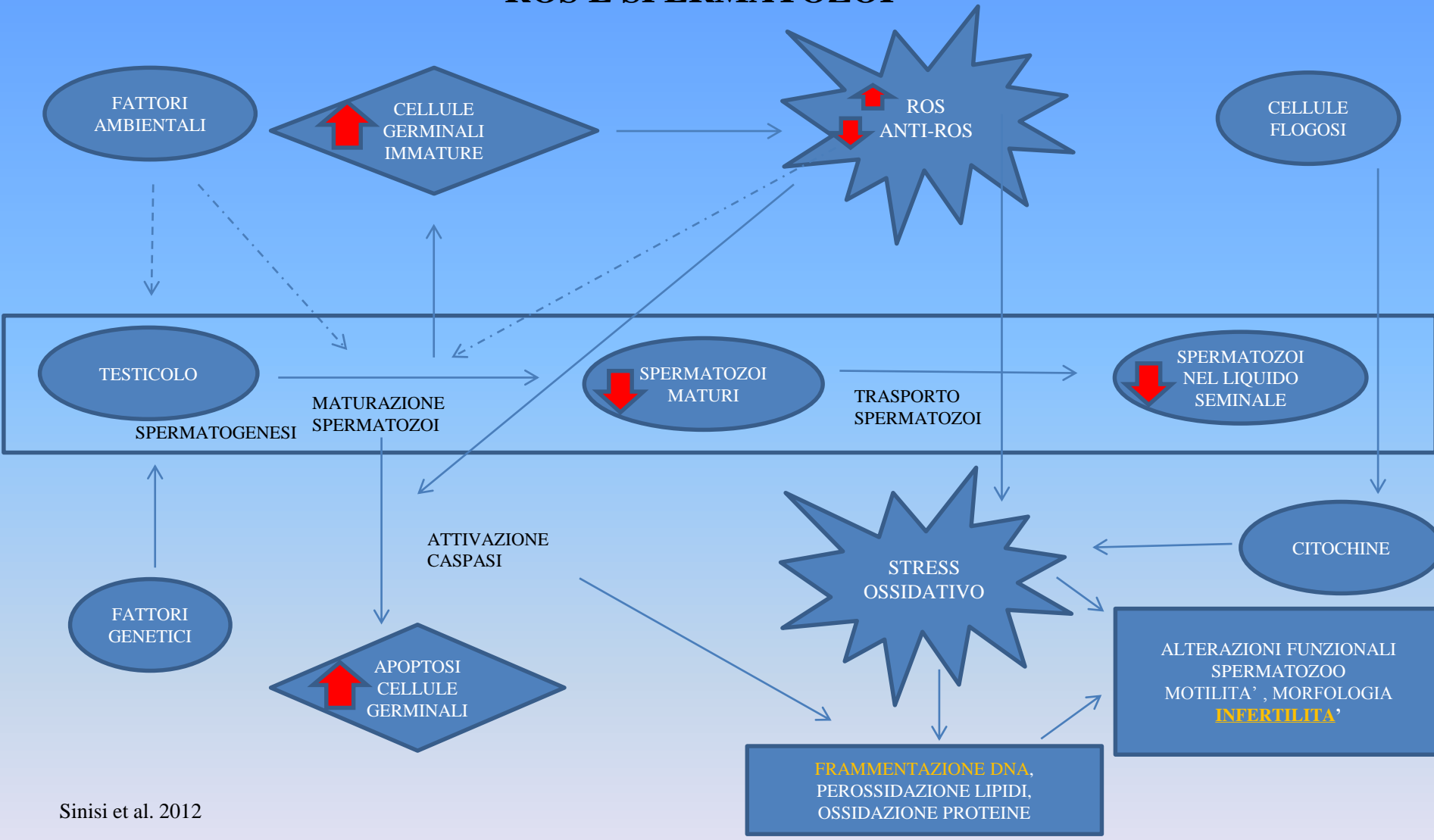
- Normale percentuale di fertilizzazione ovocitaria
- Normale morfologia degli zigoti ($\geq 50\%$ è di grado 0)
- Bassa percentuale di impianto, che è spesso causa di ripetuti fallimenti con la metodica ICSI
(Shoukir et al., 1998; Sanchez et al., 1996)
- Basso tasso di formazione di blastocisti *in vitro* in assenza di fattori femminili (Seli et al., 2004)



CONSEGUENZE DELLO STRESS OSSIDATIVO



ROS E SPERMATOZOI



Sinisi et al. 2012

TESTICOLO

EPIDIDIMO-DEFERENTE E VIE GENITALI

EIACULATO

STRESS OSSIDATIVO E FRAMMENTAZIONE DEL DNA

- ✓ Lo stress ossidativo è una comune patologia vista approssivamente nella metà o in tutti gli uomini infertili (McLachlan and de Kretser 2001)
- ✓ Il danno mediato dai ROS (reactive oxygen species) sugli spermatozoi contribuisce dal 30% all'80% dei casi di infertilità (Agarwal et 2006)
- ✓ Lo stress ossidativo è un'importante causa di frammentazione del DNA negli spermatozoi nei pazienti infertili (Aitken et al, 2012)
- ✓ La frammentazione del DNA degli spermatozoi è una causa universalmente riconosciuta di infertilità maschile (Aitken 1999; Host et al. 2000; Henkel et al. 2004)
- ✓ Tuttavia, non sono ancora completamente conosciuti i meccanismi che determinano la frammentazione del DNA nè esiste ancora un trattamento specifico per l'infertilità dovuto a questa causa (Aitken et. 2012)

SELEZIONE DEGLI SPERMATOZOI IN VITRO

 Reproductive Medicine, European Hospital, Rome, Italy 

Test	Oggetto di valutazione	Risultati
Annessina V	Esternalizzazione fosfatidilserina	Apoptosi iniziali e finali
Arancio di acridina SCD	Integrità cromatinica	Stress ossidativo ed alterazione dei meccanismi di riparazione del DNA
JC-1	Potenziale di membrana mitocondriale	Apoptosi in fase iniziale
TUNEL	Frammentazione del DNA nucleare	Necrosi e apoptosi del DNA in fase tardiva
Blu di Anilina	Protaminazione del DNA nucleare	Alterazione dei processi di maturazione nucleare
Integrità Nucleare SCSA	Condensazione nucleare	Alterazione dei processi di condensazione nucleare
FISH	Aneuploidie spermatiche	Alterazioni nel numero dei cromosomi
Spermocitogramma	Morfologia dello spermatozoo	Anomalie della testa del collo e della coda dello spermatozoo



Il fattore maschile severo costituisce circa il 30% delle cause di infertilità. I pazienti NOA costituiscono circa il 60% degli azospermici e il 15% della popolazione infertile maschile

Dabaja & Schlegel, 2013

Azospermia Ostruttiva: la produzione testicolare di spermatozoi è preservata

Azospermia Non-Ostruttiva (NOA): spermatogenesi compromessa

Criptozoospermia: presenza di spermatozoi identificabili dopo la centrifugazione del campione di liquido seminale

L'infertilità maschile può essere causata anche da una elevata **frammentazione del DNA**

Aitken, 1999; Host et al., 2000; Larson et al., 2000; Morris et al., 2002; Tomsu et al., 2002; Benchaib et al., 2003; Carrel et al., 2003; Henkel et al., 2004; Tesarik et al., 2004

E' stato ipotizzato che gli spermatozoi possano subire danni durante il passaggio nel tratto genitale (↑ ROS, ↑ frammentazione) e che quindi prelevare gli spermatozoi direttamente dal testicolo, anche quando sono presenti rare forme nell'ejaculato, possa aiutare ad ottenere embrioni con maggiori potenzialità di sviluppo e di impianto

Suganuma et al., 2005; Greco et al., 2005; Moscovtsev et al., 2010; Muratori et al., 2015; Abhyankar et al., 2016



Table I. Basic sperm parameters of the patients involved in this study and the incidence of DNA fragmentation in their ejaculated and testicular sperm samples

Patient	Basic sperm parameters			% Spermatozoa with fragmented DNA	
	Concentration ($\times 10^6/ml$)	Motility (%)	Normal forms (%)	Ejaculate	Testis
1	6	11	2	20	3
2	31	52	3	15	5
3	38	71	20	24	4
4	33	40	11	21	3
5	3	19	9	27	2
6	25	65	15	31	6
7	75	42	48	25	4
8	22	3	8	23	1
9	25	15	6	22	18
10	2	14	7	25	5
11	19	29	25	26	4
12	51	41	48	21	3
13	12	63	11	37	6
14	24	32	61	19	5
15	1	42	22	17	6
16	33	21	13	24	4
17	17	56	10	20	5
18	66	44	58	27	3

Efficient treatment of infertility due to sperm DNA damage by ICSI with testicular spermatozoa

Ermanno Greco¹, Filomena Scarselli¹, Marcello Iacobelli¹, Laura Rienzi¹, Filippo Ubaldi¹, Susanna Ferrero¹, Giorgio Franco¹, Nazareno Anniballo¹, Carmen Mendoza^{2,3} and Jan Tesarik^{2,4,5}

- 18 couples who had undergone at least two unsuccessful ICSI attempts with ejaculated spermatozoa and whose male partner had $\geq 15\%$ of ejaculated spermatozoa with damaged DNA);
- Male age: 28-55 years;
- Female age: 24-35 years;
- All of the couples first underwent another ICSI attempt with ejaculated spermatozoa and the subsequent attempt was performed with testicular spermatozoa (time interval 4 months)



Efficient treatment of infertility due to sperm DNA damage by ICSI with testicular spermatozoa

Ermanno Greco¹, Filomena Scarselli¹, Marcello Iacobelli¹, Laura Rienzi¹, Filippo Ubaldi¹, Susanna Ferrero¹, Giorgio Franco¹, Nazareno Anniballo¹, Carmen Mendoza^{2,3} and Jan Tesarik^{2,4,5}

Table II. Fertilization and embryo development after ICSI with ejaculated and testicular spermatozoa

Sperm source	Attempts	Oocytes injected	Normal zygotes ^a	Fertilization rate ^b	Cleaved embryos ^c	Good-morphology embryos ^d
Ejaculate	18	185	131	70.8% ^e	124 (94.7%) ^e	59 (47.6%) ^e
Testis	18	187	140	74.9% ^e	133 (95.0%) ^e	68 (51.1%) ^e

^aWith two equal-sized pronuclei.

^bPercentage of injected oocytes that developed to normal zygotes.

^cPercentages are calculated from the number of normal zygotes.

^dEmbryos with normal pronuclear morphology on day 1, ≥ 6 cells on day 3, equal sized blastomeres and $< 10\%$ of the intrazonal space occupied by fragments. The percentages are calculated from the number of cleaved embryos.

^eThe differences between data for the two sperm sources are not significant ($P > 0.05$).

Table III. Implantation and pregnancy after ICSI with ejaculated and testicular spermatozoa

Sperm source	Attempts	Embryos transferred	Clinical pregnancies ^a	Pregnancy rate ^b	Gestational sacs ^c	Implantation rate ^d
Ejaculate	18	56	1	5.6% ^e	1	1.8% ^f
Testis	18	58	8	44.4% ^e	12	20.7% ^f

^aWith at least one gestational sac with cardiac activity.

^bPercentage of attempts resulting in a clinical pregnancy.

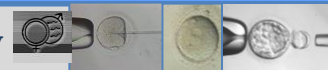
^cWith cardiac activity.

^dPercentage of embryos transferred that gave rise to a gestational sac with cardiac activity.

^e $P < 0.05$.

^f $P < 0.01$.

- 18 couples who had undergone at least two unsuccessful ICSI attempts with ejaculated spermatozoa and whose male partner had $\geq 15\%$ of ejaculated spermatozoa with damaged DNA);
- Male age: 28-55 years;
- Female age: 24-35 years;
- All of the couples first underwent another ICSI attempt with ejaculated spermatozoa and the subsequent attempt was performed with testicular spermatozoa (time interval 4 months)



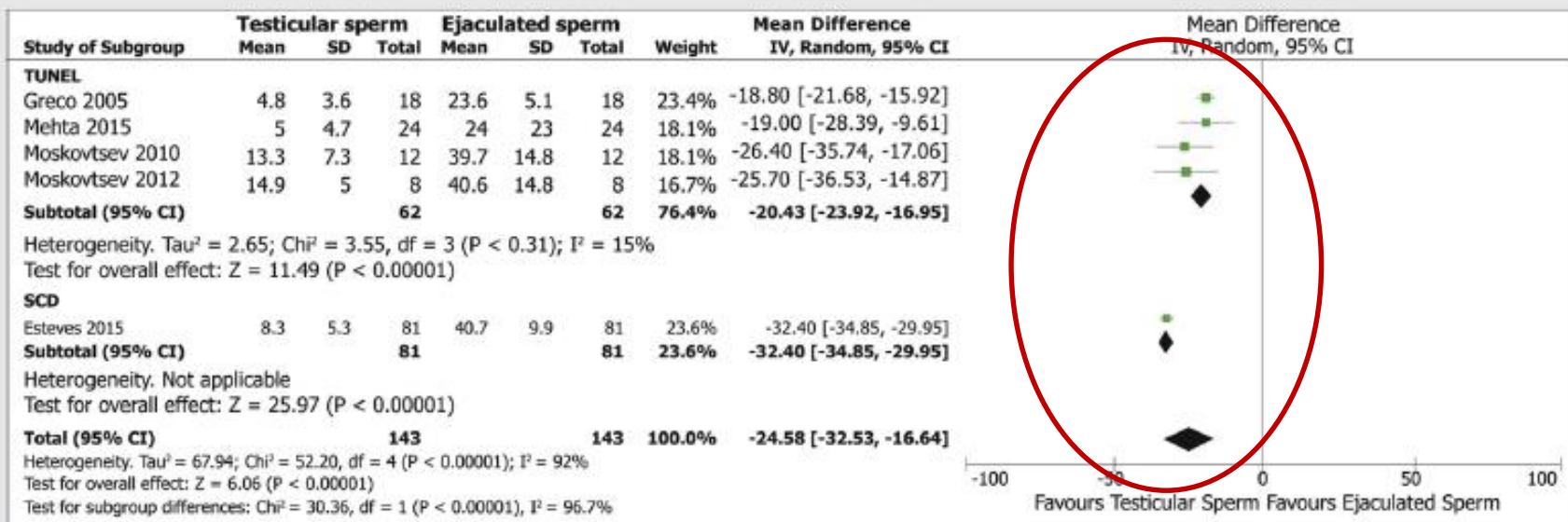
5 studies (>500 ICSI cycles) that compared:

- 1) Testi-ICSI vs Ejac-ICSI with high SDF in the ejaculate
- 2) SDF rates between testicular and ejaculated sperm

DNA fragmentation

Reproductive outcomes of testicular versus ejaculated sperm for intracytoplasmic sperm injection among men with high levels of DNA fragmentation in semen: systematic review and meta-analysis FS 2017

Sandro C. Esteves, M.D., Ph.D.,^a Matheus Roque, M.D.,^b Cara K. Bradley, Ph.D.,^c and Nicolás Garrido, Ph.D.^d

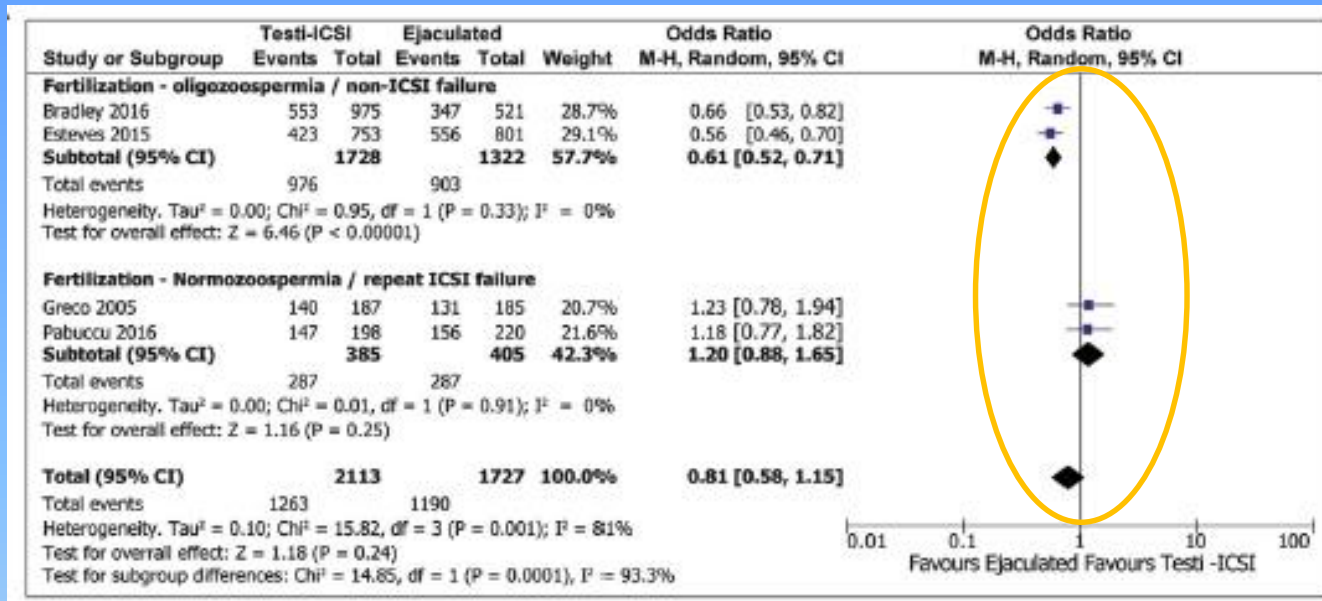


Forest plot showing mean difference for sperm DNA fragmentation (SDF) rates between testicular and ejaculated sperm in men with high SDF, including subgroup analysis according to SDF assay (TUNEL and sperm chromatin dispersion [SCD]). CI = confidence interval; IV = inverse variance.

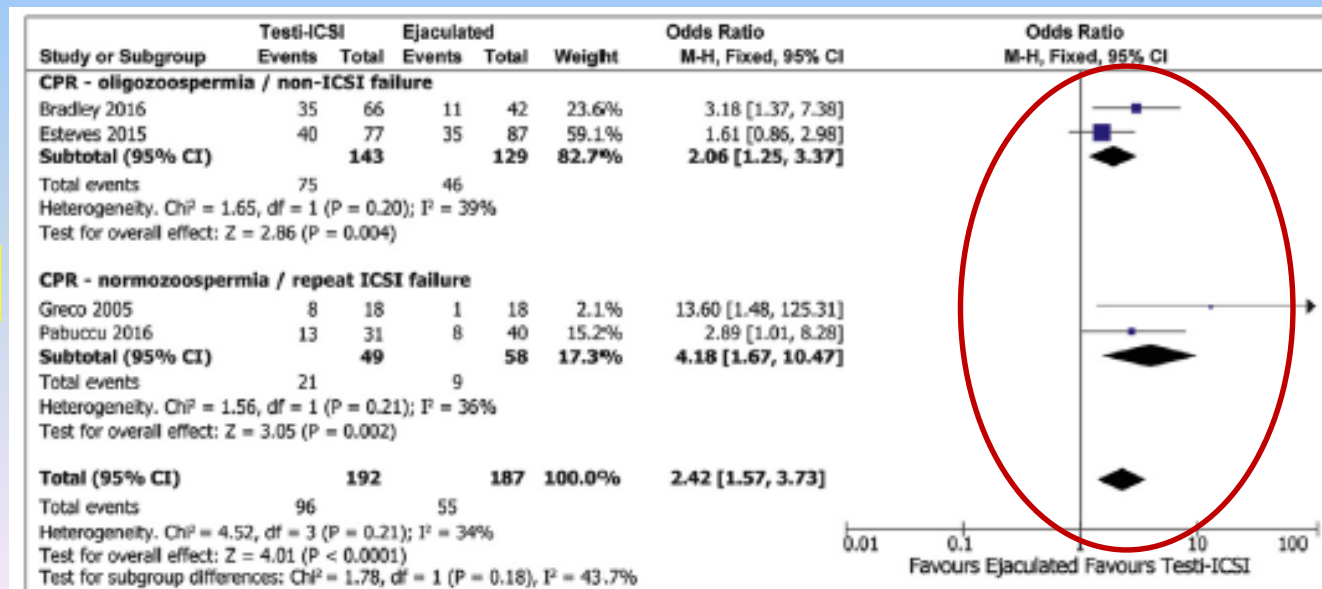
Esteves. Testicular sperm for ICSI in high-SDF patients. Fertil Steril 2017.

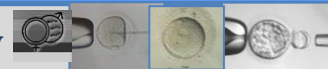


Fertilization Rate

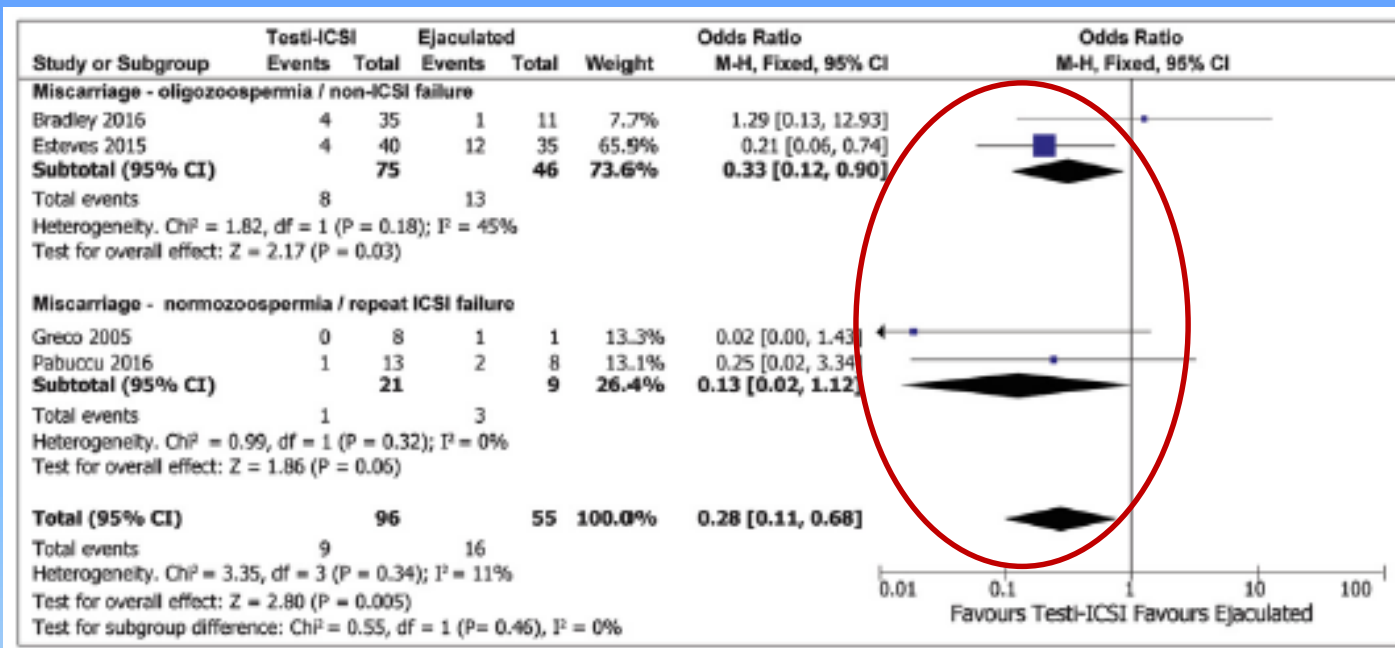


Clinical Pregnancy Rate

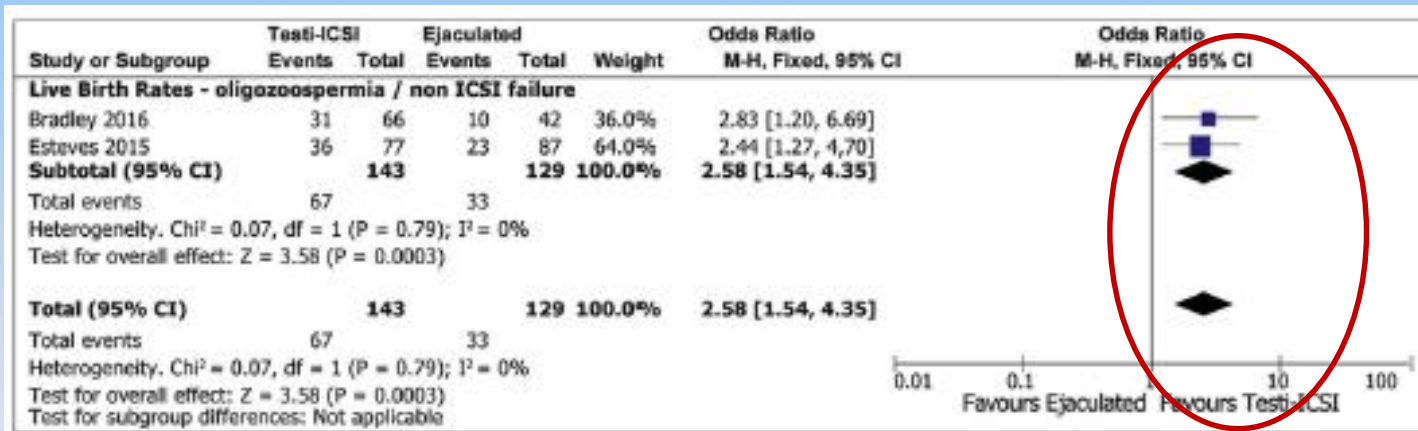




Miscarriage Rate

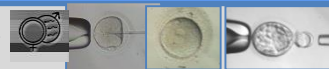


Live Birth Rate



Conclusion(s): Testicular sperm have lower levels of SDF than ejaculated sperm, with Testi-ICSI for high post-testicular SDF men improving reproductive outcomes compared with Ejac-ICSI. Infertile couples may benefit from Testi-ICSI if male partners have confirmed high SDF in the ejaculate. (Fertil Steril® 2017;108:456–67. ©2017 by American Society for Reproductive Medicine.)

Key Words: Semen, male infertility, intracytoplasmic sperm injection, sperm DNA fragmentation, testicular sperm



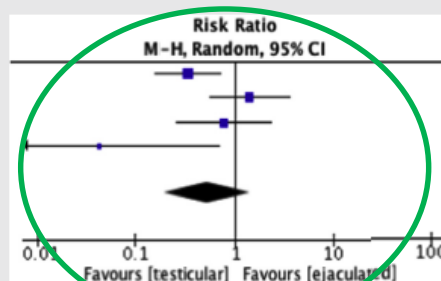
5 studies, 272 ICSI cycles, 4596 injected oocytes

Use of testicular versus ejaculated sperm for intracytoplasmic sperm injection among men with cryptozoospermia: a meta-analysis

Nikita Abhyankar, M.B.Ch.B.,^a Martin Kathrins, M.D.,^b and Craig Niederberger, M.D.^a

FS 2016

Study	Ejaculated Sperm		Testicular sperm		Weight	Risk Ratio M-H, Random, 95% CI
	Events	Total	Events	Total		
Ben- Ami 2013	8	68	17	48	33.0%	0.33 [0.16, 0.71]
Bendikson 2008	9	27	5	21	30.0%	1.40 [0.55, 3.56]
Hauser 2011	4	34	9	59	27.2%	0.77 [0.26, 2.32]
Weissman 2008	0	13	2	2	9.8%	0.04 [0.00, 0.68]
Total (95% CI)	142	142	130	130	100%	0.53 [0.19, 1.42]
Total events	21		33			



Heterogeneity $Tau^2 = 0.64$, $Chi^2 = 9.21$, $df=3$, $I^2 = 67\%$
 Test for overall effect $Z=1.26$, ($P=.21$)

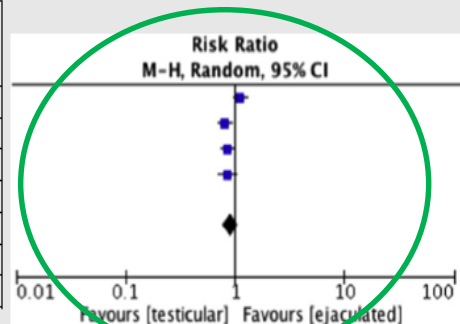
Forest plot demonstrating relative risk for pregnancy rates (PRs) with intracytoplasmic sperm injection (ICSI) when using testicular or ejaculated sperm from men with cryptozoospermia.

Abhyankar. ICSI sperm source in cryptozoospermia. Fertil Steril 2016.

Pregnancy Rate

More advanced maternal and paternal age in the testicular versus the ejaculated sperm groups

Study	Ejaculated Sperm		Testicular sperm		Weight	Risk Ratio M-H, Random, 95% CI
	Events	Total	Events	Total		
Amirjannati 2012	1412	2076	68	113	25.3%	1.13 [0.97, 1.32]
Ben- Ami 2012	209	551	229	490	26.2%	0.81 [0.70, 0.94]
Bendikson 2008	151	292	139	232	25.3%	0.86 [0.74, 1.01]
Hauser 2011	110	303	229	539	23.1%	0.85 [0.71, 1.02]
Total (95% CI)	3222	3222	1374	1374	100%	0.91 [0.78, 1.06]
Total events	1882		665			



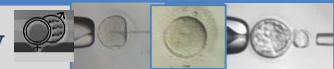
Heterogeneity $Tau^2 = 0.02$, $Chi^2 = 11.28$, $df=3$, $I^2 = 73\%$
 Test for overall effect $Z=1.26$, ($P=.21$)

Forest plot demonstrating relative risk for fertilization rates with intracytoplasmic sperm injection (ICSI) when using testicular or ejaculated sperm from men with cryptozoospermia.

Abhyankar. ICSI sperm source in cryptozoospermia. Fertil Steril 2016.

Fertilization Rate

Conclusion(s): The existing literature does not support a recommendation for men with cryptozoospermia to use testicular sperm in preference over ejaculated sperm for ICSI



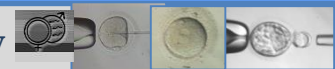
EUROPEAN HOSPITAL

DATI BIOLOGICI EH CRIPTOZOOSPERMICI VS TESTICOLARI (ESHRE 2018)

	GRUPPO EIACULATO	GRUPPO TESTICOLARE	VALORE p
Ovociti inseminati	136	103	
Fertilizzati (%)	69/136 (50.8%)	82/103 (79.6%)	P<0.05
Embrioni (%)	68/69 (98.5%)	82/82 (100.0%)	NS
Blastocisti (%)	30/69 (43.5%)	34/82 (41.5%)	NS
Blastocisti euploidi (%)	11/30 (36.7%)	11/34 (32.3%)	NS
Blastocisti aneuploidi (%)	13/30 (43.3%)	20/34 (58.8%)	NS
Blastocisti mosaico (%)	6/30 (20.0%)	3/34 (8.8%)	NS

N. CICLI: 19 ETA' MEDIA FEMMINILE: 35.4±3.9 ETA' MEDIA MASCHILE: 37.1±4.7

ESCLUSI TUTTI I CICLI CON OVOCITI SCONGELATI, EMBRIONI CONGELATI E QUELLI CHE HANNO FATTO TRANSFER IN DAY 3 SENZA DIAGNOSI



EUROPEAN HOSPITAL

DATI CLINICI EH CRIPTOZOOSPERMICI VS TESTICOLARI

	GRUPPO EIACULATO	GRUPPO TESTICOLARE	VALORE p
ET cryo	6	8	
Blastocisti trasferite	6 (5 euploidi+1 mosaico)	8 (7 euploidi+1 mosaico)	
Beta positive	5/6 (83.3%)	8/8 (100.0%)	
CPR	3/6 (50.0%)	5/8 (62.5%)	NS
IR	3/6/ (50%)	5/8 (62.5%)	NS
Aborti	0	1/5 (20.0%)	
LBR	3/6 (50%)	4/5 (80.0%)	NS

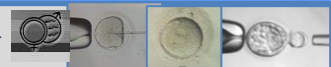


Table 1 Baseline characteristics (mean \pm standard deviation is shown when data are normally distributed, and median \pm IQR is shown when data are not normally distributed)

	Testicular sperm group (n = 18)	Control group (n = 54)	p-value
Mean female age	38.0 (\pm 3.79)	38.1 (\pm 3.67)	0.95
Mean male age	42.9 (\pm 5.59)	40.6 (\pm 5.83)	0.14
Mean IVF attempt number	3.8 (\pm 1.42)	3.8 (\pm 1.36)	0.84
Median basal semen volume	2.5 (\pm 1.5)	2.1 (\pm 2)	0.89
Mean sperm concentration	29.6 (\pm 47.60)	48.9 (\pm 58.11)	0.21
Median total sperm motility	25.5% (\pm 0.41)	47% (\pm 0.56)	0.30
Median normal morphology by Kruger strict criteria	3% (\pm 1.3)	4% (\pm 0.12)	1.00


Table 2 Reproductive outcomes (mean \pm standard deviation is shown when data are normally distributed, and percentages are shown when two independent proportions are examined)

	Testicular sperm group (n = 18)	Control group (n = 54)	p-value
Mean oocytes retrieved	2.2 (\pm 0.86)	2.0 (\pm 0.75)	0.54
Mean MII	1.8 (\pm 0.79)	1.6 (\pm 0.74)	0.21
Mean 2PN	1.2 (\pm 0.99)	1.0 (0.80)	0.58
Fertilization rate	54.7%	50.9%	0.71
No ET	33.3%	31.5%	0.88
Day 2 ET	8.3%	48.6%	0.01*
Day 3 ET	66.7%	45.9%	0.21
Day 5 ET	25.0%	5.4%	0.05*
Pregnancy rate	22.2%	16.7%	0.60
Miscarriage rate	25.0%	33.3%	0.76
LBR	16.7%	11.1%	0.54

*Statistical significance.

Does using testicular sperm retrieval rather than ejaculated spermatozoa improve reproductive outcomes in couples with previous ART failure and poor ovarian response? A case-controlled study

Andrology 2017

A.R. Gilman , G. Younes, S. Tannus, W.Y. Son, P. Chan and W. Buckett
MUHC Reproductive Centre, Montréal, QC, Canada

Eighteen poor-responder patients were matched 3:1 with 54 controls. Poor responders were defined as those with ≤ 3 oocyte pickup. Cases were identified as poor responders, and only those with previous IVF failure(s) as an indication for testicular-retrieved spermatozoa were included. Controls were age and cycle attempt number matched. All patients were included only once.

ANALISI DEL POTENZIALE OSSIDO-RIDUTTIVO STATICO COL MiOXSYS

✓ Il potenziale di ossido-riduzione è una misura dell'equilibrio tra ROS e antiossidanti, che fornisce indicazioni importanti sullo stress ossidativo (ORP);

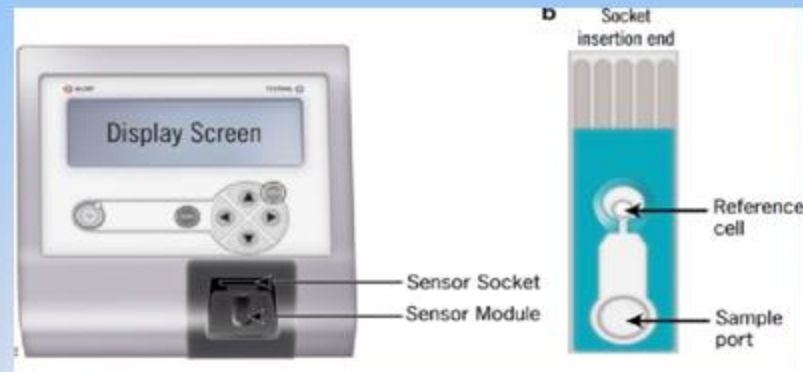
(McCord 2000, Costantini e Verhulst 2009)

✓ Il sistema MiOXSYS è una nuova tecnologia basata sulla capacità di misurare questo potenziale (tramite una misura galvanostatica di elettroni);

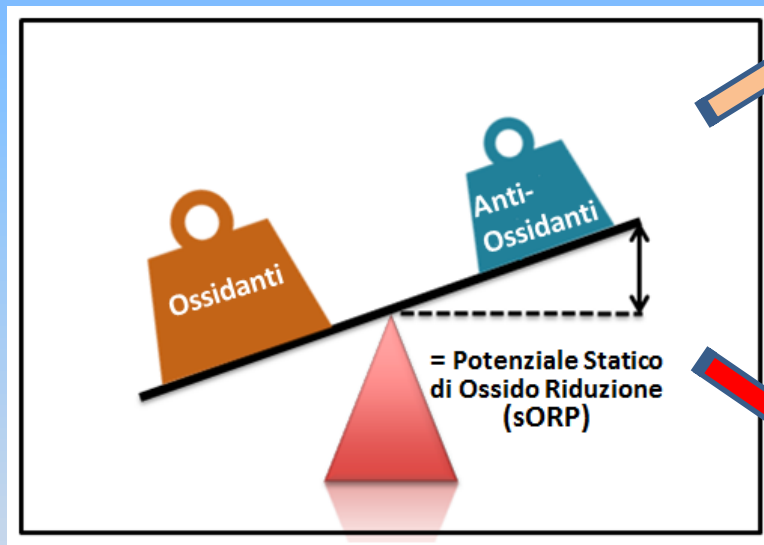
(Agarwal et al, 2016)

✓ L'ORP può essere misurato nel liquido seminale ed è stato visto essere negativamente correlato coi parametri seminali dei pazienti infertili (concentrazione, motilità, morfologia);

(Agarwal et al. 2016)



ANALISI DEL POTENZIALE OSSIDO-RIDUTTIVO STATICO COL SISTEMA MiOXSYS IN PAZIENTI NORMOZOOSPERMICI VS TERATOZOOSPERMICI: STUDIO RETROSPETTIVO (ESHRE 2018)



- ✓ Compattazione cromatinica
- ✓ Modificazioni lipidi di membrana
- ✓ Fusione spermatozoo-ovocita



- STRESS OSSIDATIVO:**
- ❖ perossidazione lipidica
 - ❖ apoptosi
 - ❖ Frammentazione del DNA spermatico



Analisi del potenziale ossido-riduttivo statico col sistema MiOXSYS in pazienti normozoospermici vs teratozoospermici: studio retrospettivo. (ESHRE 2018)

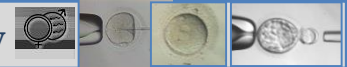
OBIETTIVO: il nostro studio si è focalizzato sulla eventuale correlazione tra i valori del potenziale ossido-riduttivo statico (sORP) analizzati col sistema MiOXSYS sia coi parametri seminali che con la frammentazione del DNA nei pazienti infertili

Studio randomizzato: 84 pazienti fra giugno e luglio 2017

Gruppo A: 45 pazienti con morfologia >4%

Gruppo B: 39 pazienti con morfologia <4%

Un'aliquota del seme (30 microlitri) è stata utilizzata per valutare il potenziale ossido-riduttivo statico (stress ossidativo) tramite MiOXSYS. I valori sono espressi in millivolt/concentrazione di spermatozoi $10^6/\text{mL}$



RISULTATI:

Gruppo A (Normozoospermici):

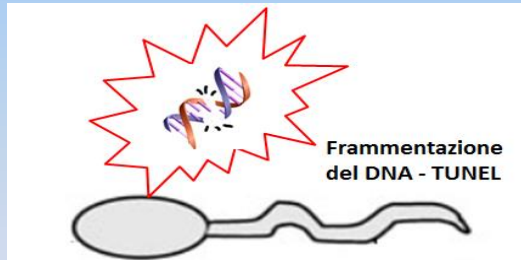
Età media uomini: 42.1 ± 6.3	($p < 0.05$)
Volume seme: 3.2 ± 2.3 ml	(NS)
Conc. Spermatozoi: 47.2 ± 18.0 mil/ml	($p < 0.05$)
Motilità totale (a+b+c): 66.7 ± 7.4 (%)	($p < 0.05$)
Morfologia: 4.2 ± 0.5 (%)	(NS)
Conc. Cellule rotonde: 2.3 ± 2.0 mil/ml	(NS)
Frammentazione DNA: 7.5 ± 6.4 (%)	($p < 0.05$)
Livello sORP: 1.6 ± 2.5 mV/ml	($p < 0.05$)

Gruppo B (Teratozoospermici)

Età media uomini: 38.2 ± 6.5	
Volume seme: 3.0 ± 2.0	
Conc. Spermatozoi: 24.7 ± 19.0 mil/ml	
Motilità totale (a+b+c): 44.3 ± 20.0 (%)	
Morfologia: 2.1 ± 0.7 (%)	
Conc. Cellule rotonde: 2.7 ± 2.0 mil/ml	
Frammentazione DNA: 11.0 ± 8.1 (%)	
Livello sORP: 15.5 ± 34.3 mV/ml	

L'analisi statistica è stata effettuata tramite il test t-student

- ✓ **Correlazione significativa tra i livelli del sORP e concentrazione, motilità, e frammentazione del DNA**
- ✓ **NO correlazione significativa tra i livelli del sORP e la morfologia, il volume seminale e la concentrazione di cellule rotonde**



LIMITI:

- **mancata inclusione dei pazienti con provata fertilità; Includere il gruppo di pazienti con provata fertilità potrebbe aumentare i valori di cutoff del sORP e la sensibilità del test;**
- **Possibile normalizzazione dei livelli del sORP con la concentrazione spermatica, con conseguente sovrastima nei pazienti con oligozoospermia**





Conclusioni

- Il tasso di frammentazione appare ridotto negli spz testicolari
- L'uso di spz testicolari in pazienti con **alta frammentazione del DNA** nell'eiaculato sembra essere associato a migliori tassi di gravidanza clinica e di nascita e a ridotti tassi di aborto
- L'uso di spz testicolari in pazienti **criptozoospermici** non sembra invece portare un miglioramento nel tasso di gravidanza
- Una bassa qualità degli spz potrebbe avere un effetto negativo su tasso di fecondazione e potenziale di sviluppo (effetto paterno terdivo)
- Il MiOXSYS è una tecnologia promettente che potrebbe aiutare a capire la condizione di stress degli spermatozoi



Centre for Reproductive Medicine European Hospital – Rome - Italy



Director: Ermanno Greco

Clinical Director: Maria Teresa Varricchio

Laboratory Director : Maria Giulia Minasi

Gynecology:

Cristiana Arrivi
Alina Caragia
Ermanno Greco
Katarzyna Litwicka
Maria Laura Tartaglia
Maria Teresa Varricchio

Endocrinology:

Cecilia Mencacci

Andrology:

Ermanno Greco
Maria Chiara Greco

Psicology:

Alessia Greco



Laboratory:

Valentina Casciani
Alessandro Colasante
Elisabetta Cursio
Simona Gatti
Erika Iovine
Maria Giulia Minasi
Saverio Muzzi
Giulia Pirastu
Andrea Prosterà
Alessandra Ruberti
Filomena Scarselli
Vincenzo Zazzaro
Davide Uva

WWW.ICSIROMA.IT