



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale in Biologia Molecolare e Applicata

**MICRODELEZIONI DEL CROMOSOMA Y : RUOLO
DELLE REGIONI AZF NELL'INFERTILITÀ
MASCHILE**

**Y CHROMOSOME MICRODELETIONS : ROLE OF
AZF REGIONS IN MALE INFERTILITY**

Tesi di laurea magistrale di:

Benedetta Bernacchia

Relatore:

Chiar.mo Prof. Giancarlo Balercia

Sessione Straordinaria Supplementare

Anno Accademico 2021/2022

A mio nonno

A me stessa

INDICE

Capitolo 1 : INTRODUZIONE	1
1.1 Determinazione e differenziazione sessuale	2
1.2 Spermatogenesi	8
1.3 Regolazione della spermatogenesi	17
1.4 Il gamete maschile	23
1.5 Infertilità maschile	30
1.5.1 <i>Cause legate al testicolo</i>	32
1.5.2 <i>Cause legate allo spermatozoo</i>	36
1.6 Infertilità maschile: cause genetiche	42
1.6.1 <i>Anomalie cromosomiche</i>	43
1.6.2 <i>Mutazioni geniche: KAL e CFTR</i>	45
1.6.3 <i>Microdelezioni del cromosoma Y</i>	47
1.7 Descrizione del cromosoma Y	48
1.8 Azoospermia factor (AZF)	56
1.8.1 <i>Descrizione delle regioni di AZF</i>	60
1.8.2 <i>Analisi del meccanismo di delezione</i>	73
1.9 Scopo del lavoro	78

Capitolo 2 : MATERIALI E METODI	79
2.1 Raccolta dei campioni	80
2.2 Estrazione DNA genomico	81
2.3 Quantizzazione del DNA	82
2.4 Multiplex PCR	83
2.5 Elettroforesi su gel d'agarosio	87
Capitolo 3 : RISULTATI	90
Capitolo 4 : DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	96
Capitolo 5 : BIBLIOGRAFIA	105

Capitolo 1

INTRODUZIONE

1.1 Determinazione e differenziazione sessuale

La maggior parte delle specie animali sono dioiche, ciò significa che all'interno della stessa specie esistono individui caratterizzati dalla presenza di testicoli o di ovari. Gli individui che sono caratterizzati dalla presenza di ovari producono le uova e vengono considerate femmine, mentre gli individui che sono dotati di testicoli producono spermatozoi e sono maschi. Il processo mediante il quale un individuo di una specie dioica definisce il suo sesso viene chiamato determinazione sessuale. Questo processo di determinazione sessuale ha delle sostanziali conseguenze nella vita di un individuo perché è proprio attraverso di esso che un organismo andrà a produrre spermatozoi o uova e sarà di conseguenza caratterizzato da dalla presenza di tipici caratteri sessuali secondari. (1) La determinazione del sesso può verificarsi attraverso due meccanismi differenti. Il primo meccanismo avviene dopo la fecondazione per l'intervento di fattori ambientali, come la temperatura e/o il sesso di individui presenti nella popolazione. Questo tipo di determinazione è chiamata determinazione ambientale del sesso. (2) In altre specie invece la determinazione del sesso avviene durante la fecondazione per la combinazione di specifici geni ereditati dal futuro zigote. Questo tipo di determinazione è chiamata determinazione cromosomica del sesso.

Era stato osservato che la sex ratio nei mammiferi e anche nella specie umana era di 0,5, un'osservazione che non si addiceva con le prime ipotesi di determinazione ambientale del sesso. Inoltre ciò faceva pensare al fatto che nella specie umana un sesso fosse omozigote e l'altro eterozigote per un qualche gene responsabile della determinazione del sesso. Con il progredire degli studi hanno dimostrato quindi una correlazione sempre più forte tra sesso femminile e presenza di una coppia di cromosomi XX e sesso maschile e presenza di una coppia di cromosomi XY. Le due coppie di cromosomi XX e XY sono dette cromosomi sessuali. Tutti gli altri cromosomi presenti non sono distinguibili nei due sessi e son detti cromosomi autosomici. I maschi producono due tipi di gameti XA e YA e per questo costituiscono il sesso eterogametico. Le femmine invece producono un solo tipo di gameti XA e per questo costituiscono il sesso omogametico. Al momento della fecondazione si ha che dall'incontro di uno spermatozoo XA con una cellula uovo XA si forma uno zigote XXAA, che si sviluppa come femmina, mentre dall'incontro di uno spermatozoo YA con una cellula uovo XA si forma uno zigote XYAA che si sviluppa come maschio. (3) I cromosomi X sono caratterizzati dalla presenza di un elevato numero di geni, che non solo non sono legati alla determinazione del sesso, ma soprattutto sono assenti nel cromosoma Y. La presenza di questi geni in duplice copia nella femmina e in unica copia nel maschio potrebbe

causare delle ripercussioni significative nell'organizzazione dei due fenotipi. L'attività di ogni gene è connessa all'attività degli altri geni che cooperano quindi tutti in sintonia, costituendo una rete all'interno della quale non sono ammessi riduzioni o aumenti del numero di copie di ogni singolo gene. Proprio per questo motivo i differenti taxa animali hanno sviluppato dei sistemi noti come compensazione del dosaggio che uniformano l'espressione dei geni che non sono legati al sesso. (4) Nei mammiferi la compensazione del dosaggio di uno dei due cromosomi X si realizza durante lo stadio di blastocisti: in ogni cellula la scelta del cromosoma da inattivare è casuale. In ogni cellula il cromosoma X inattivato si replicherà durante la mitosi e continuerà a rimanere inattivo nelle cellule che si formeranno in seguito alla divisione. Invece nelle cellule che costituiscono la linea germinale femminile, il cromosoma X inattivato sarà riattivato nel momento in cui gli ovogoni entrano nella I profase meiotica. Nella linea germinale maschile il cromosoma X viene temporaneamente inattivato tra la meiosi e la fecondazione. I cromosomi X inattivati sono riconoscibili nei nuclei interfasicci come corpi sferici con elevata colorazione, che vengono definiti corpi di Barr o cromatina sessuale. (5)

Per quanto riguarda invece le differenze morfologiche tra maschio e femmina, le prime strutture a mostrare un differenziamento sessuale sono le gonadi. Esse attraversano differenti stadi, il primo è quello di gonade indifferente o anche detta gonade bipotente. In questa fase esse possono differenziarsi in senso sia maschile che femminile. Nell'uomo questa fase dura fino alla sesta settimana. Successivamente si ha la fase di determinazione primaria del sesso, durante la quale le gonadi acquisiscono un fenotipo di tipo maschile o femminile. Questa fase non dipende da livelli ormonali, ma è legata a una differente attività genica delle cellule somatiche presenti nelle gonadi in formazione. Queste cellule, nella fase successiva che viene chiamata determinazione secondaria del sesso, incominceranno a produrre ormoni e proteine, che andranno ad influenzare l'organizzazione delle gonadi, delle vie genitali e dell'intero organismo. (6) La presenza nei mammiferi di maschi con cariotipo XXAA e di femmine con cariotipo XYAA ha portato alla luce il ruolo del cromosoma Y. Si era ipotizzato infatti che proprio sul cromosoma Y potessero esserci fattori responsabili del differenziamento della gonade indifferente in senso maschile. La regione del cromosoma Y responsabile di ciò è stata inizialmente indicata come regione responsabile della sintesi del fattore di determinazione testicolare TDF (Testis-Determining Factor) nell'uomo, oggi identificata come SRY (Sex determining region Y). (7)

La regione SRY contiene una sequenza nucleotidica di 35 kb che è localizzata sul braccio corto del cromosoma Y, vicino alla regione pseudoautosomica. Esso codifica per una proteina costituita da 223 amminoacidi, che si comporta come fattore di trascrizione. E' formata da un omeodominio, costituito da circa 80 amminoacidi, che va a legare il DNA andando a stimolare la trascrizione dei geni attivi nelle cellule di Sertoli. (8) La determinazione primaria del sesso è sotto il controllo genetico: infatti l'espressione del gene SRY determina lo sviluppo della gonade bipotente in testicolo o l'espressione in ovario di un gene con Wnt-4. La fase successiva, la determinazione secondaria del sesso, è invece sotto il controllo ormonale. Nel testicolo viene prodotto sia il testosterone, a carico delle cellule di Leydig, sia l'ormone anti dotto di Müller a carico delle cellule di Sertoli. Successivamente il testosterone determina il differenziamento del dotto di Wolff in epididimo, dotto deferente e vescicole seminali. Parte del testosterone prodotto viene invece trasformato in diidrotestosterone che determina il differenziamento degli organi genitali esterni. L'ormone anti dotto di Müller (AMH) determina la degenerazione del dotto di Müller. Con la pubertà il testosterone promuove lo sviluppo dei caratteri sessuali secondari. Nel sesso femminile abbiamo invece che nell'ovario, le cellule della teca producono testosterone. Esso viene convertito in estrogeni per l'azione dell'enzima aromatasi presente nelle cellule della

granulosa. Lo sviluppo dei genitali esterni, visto che la concentrazione degli estrogeni prima della pubertà è bassa, avviene probabilmente per default e si completa comunque dopo la pubertà, grazie agli altri livelli di estrogeni presenti. (9) Il fatto però che SRY agisca in un periodo di tempo circoscritto fa pensare che esistano altri segnali che partecipino alla determinazione del sesso femminile e allo stesso tempo competano con quelli maschili. Con il tempo si è affermata infatti l'ipotesi di un altro gene, il gene Z, che interverrebbe attivamente nello sviluppo del fenotipo femminile. Allo stesso tempo esso va a reprimere l'espressione di tutti i geni che sono invece coinvolti nel differenziamento maschile, primo tra tutti Sox9. (10)

1.2 Spermatogenesi

La spermatogenesi è il processo che porta gli spermatogoni a differenziarsi in spermatozoi. Essa può avere due andamenti, quello ciclico, come nelle specie che hanno un'attività stagionale legata al periodo degli amori e quello continuo, come nella specie umana, dove la produzione non è legata a un momento del ciclo vitale ma avviene per tutto il periodo in cui gli individui sono fertili. La spermatogenesi si realizza nei testicoli, che nei rettili, uccelli e mammiferi hanno un'organizzazione tubulare, che si distingue da quella cistica tipica dei pesci e degli anfibi. Nel testicolo con struttura tubulare la spermatogenesi avviene all'interno di strutture convolute definite tubuli seminiferi, che costituiscono le unità strutturali dei testicoli. In questi tubuli abbiamo che le cellule germinali sono presenti in tutti gli stati differenziativi, dagli spermatogoni agli spermatozoi. (11) Oltre alle cellule germinali sono presenti anche le cellule di natura somatica, le cellule del Sertoli che svolgono un ruolo importante nel controllo della spermatogenesi. Esse si distinguono dalle cellule germinali in primis per le dimensioni che sono maggiori e per la presenza di un nucleo bilobato con cromatina più addensata che ne permette una più facile visualizzazione al microscopio ottico. Il loro ruolo invece è quello di sintetizzare tutta una serie di fattori essenziali nella spermatogenesi. Si parte con l'ormone anti-dotto di Muller (AMH), che è responsabile della regressione

per apoptosi del dotto di Muller, durante lo sviluppo embrionale; l'inibina e l'attivina che sono due ormoni che regolano la produzione degli ormoni sessuali nella spermatogenesi; ABP, androgen binding protein, una proteina in grado di legare gli androgeni che controllano la fase finale della spermatogenesi e lo sviluppo dei caratteri sessuali secondari; l'attivatore del plasminogeno, che modifica la permeabilità delle giunzioni strette permettendo il passaggio delle cellule germinali dal compartimento basale a quello adluminale. Infine si hanno tutta una serie di fattori di crescita che controllano il ritmo di proliferazione delle cellule, come ad esempio il fattore steroidogenetico che controlla il ciclo cellulare delle cellule del Sertoli o il fattore GDNF che promuove l'entrata degli spermatogoni in meiosi. Oltre a queste funzioni esse svolgono un ruolo essenziale sul controllo endocrino della spermatogenesi. Esse presentano infatti recettori per il testosterone e l'FSH e sono in grado di aromatizzare il testosterone a 17- β estradiolo. (12) Importanti però sono anche le cellule di Leydig, che attraverso l'interazione con cellule del Sertoli ed ormoni gonadotropici ipofisari permettono il corretto andamento della spermatogenesi. Esse costituiscono una componente del tessuto interstiziale. Sono riunite in piccoli gruppi attorno ai vasi sanguigni presenti nel tessuto interstiziale. Il loro citoplasma è caratterizzato dalla presenza di un numero elevato di mitocondri con creste tubulari, gocce lipidiche ed elementi del reticolo endoplasmico

liscio. La loro funzione è quella di sintesi di ormoni steroidei. Esse producono alti livelli di androgeni (testosterone o androstenedione, a seconda della specie) necessari per la differenziazione dei genitali maschili e la mascolinizzazione del cervello. (13) Per quanto riguarda invece le cellule germinali, esse sono localizzate lungo la membrana basale del tubulo, negli spazi tra le cellule di Sertoli e lungo la parte apicale delle cellule di Sertoli, da dove vengono rilasciate nel lume del tubulo, dopo aver completato il processo di spermiogenesi. La distribuzione di tali cellule segue quindi un gradiente differenziativo. All'inizio del processo gli spermatogoni sono localizzati lungo la parete del tubulo a contatto della membrana basale, mentre le cellule completamente differenziate, ovvero gli spermatozoi, si trovano nel lume del tubulo, incuneate sull'apice delle cellule di Sertoli. In posizione intermedia, nello spazio intercellulare tra le cellule di Sertoli, sono localizzati gli spermatociti primari, gli spermatociti secondari e infine gli spermatidi, ai quali seguiranno poi gli spermatozoi. Tra gli spermatogoni troviamo cellule che hanno i caratteri tipici delle cellule staminali. Queste cellule presentano eterocromatina, un ritmo di divisione più lento rispetto agli altri spermatogoni ed inoltre danno origine a due cellule completamente separate le une dalle altre. Oltre a questo tipo di spermatogoni, chiamati spermatogoni staminali, ve ne sono altri che, dopo una serie di divisioni, intraprendono il processo

differenziativo che li porterà a diventare spermatozoi. A differenza degli spermatogoni staminali, gli spermatogoni di questo tipo sono determinati (spermatogoni determinati), sono cioè destinati a trasformarsi in spermatozoi. Gli spermatogoni determinati si originano dagli spermatogoni staminali i quali, dividendosi, possono dare origine o a due spermatogoni, che conservano entrambi il carattere di cellula staminale, oppure a uno spermatogone staminale e a uno spermatogone determinato. Gli spermatogoni determinati sono caratterizzati da un nucleo eucromatico, si dividono più rapidamente e nel dividersi, rimangono collegati attraverso un ponte citoplasmatico, residuo di una incompleta citodieresi. Tutte le cellule germinali che si formano da questi spermatogoni, sia che si dividano mitoticamente che meioticamente, rimangono sempre collegate da ponti citoplasmatici. La citodieresi incompleta di queste cellule causa la formazione di un ampio sincizio, che rimarrà fino al momento del rilascio degli spermatozoi nel lume del tubulo. La presenza di ponti citoplasmatici, nelle cellule destinate a diventare spermatozoi, è particolarmente importante perché garantisce una sincronia nello sviluppo delle cellule e permette lo scambio di molecole e organuli citoplasmatici. Esso fa sì che tutti gli spermatozoi che si sono originati da un'unica cellula iniziale, si possano differenziare grazie all'insieme dei trascritti genici originatisi a loro volta dal corredo cromosomico di entrambi i genitori. Questo è importante

soprattutto nel caso dei geni che sono localizzati sui cromosomi sessuali, che per la maggior parte non sono omologhi. In assenza di questi ponti citoplasmatici infatti, metà degli spermatociti secondari e dei loro discendenti mancherebbe completamente dei trascritti genici dovuti al cromosoma Y e l'altra metà mancherebbe di quelli dovuti al cromosoma X. (1) La spermatogenesi può essere quindi suddivisa in tre parti: spermatocitogenesi, meiosi e spermiogenesi. (Fig. 1) Durante la spermatocitogenesi, le cellule germinali si impegnano in un ciclo di diverse divisioni mitotiche che aumentano la resa della spermatogenesi e rinnovano le cellule staminali e producono spermatogoni. Questi ultimi, prima di iniziare la meiosi, duplicano il proprio DNA e si trasformano in spermatociti I che andranno incontro alla prima divisione meiotica dando origine agli spermatociti secondari, che risultano più piccoli degli spermatociti primari e con cromatina maggiormente addensata. Gli spermatociti secondari, così come gli spermatociti primari, presentano una discreta attività di trascrizione che riguarda essenzialmente molecole come la tubulina, le proteine di membrana implicate nella interazione con la cellula uovo e le protammine, proteine altamente basiche ricche di arginina e cisteina, che sostituiranno gli istoni nell'interazione con il DNA durante la fase di spermiogenesi. Dalla divisione di ogni spermatocita secondario si originano poi due spermatidi, che inizieranno il processo di

spermiogenesi andando poi a differenziarsi in spermatozoi. (11) Alla fine della meiosi ciascun spermatocita primario ha dato origine a quattro cellule aploidi, gli spermatidi, che appaiono come cellule rotondeggianti. Il processo che porterà gli spermatidi a differenziarsi in spermatozoi prende il nome di spermiogenesi. Questi cambiamenti interessano sia il nucleo che il citoplasma degli spermatici. Il nucleo progressivamente diventa allungato ed eterocromatico. Il cambiamento di forma è dovuto principalmente a una sorta di manicotto di microtubuli, la manchette, che si dispone intorno al nucleo costringendolo in una sorta di busto che determina il suo progressivo allungamento. La eterocromatizzazione del materiale nucleare è dovuta a una progressiva compattazione della cromatina favorita dal fatto che gli istoni preesistenti vengono sostituiti dalle protammine, che oltre a favorire la compattazione, salvaguardano il genoma dello spermatozoo da eventuali danni ambientali dopo la eiaculazione. Tutto ciò porta a una profonda riorganizzazione del nucleo presente negli spermatidi che finisce per assumere una forma più idrodinamica e tipica della specie in esame. A livello citoplasmatico si osserva soprattutto la formazione dell'acrosoma e del flagello, che si disporranno ai due poli opposti della cellula, facendo sì che lo spermatozoo diventi una cellula altamente polarizzata. L'acrosoma è un grosso lisosoma che si forma a partire dall'apparato di Golgi, che all'inizio della

spermiogenesi risulta caratterizzato dalla presenza di numerosi granuli di secrezioni, granuli preacrosomici, che fondendosi danno origine all'acrosoma. Una volta formatosi esso aderisce all'involucro nucleare, nella regione che diventerà la parte anteriore del futuro spermatozoo. Successivamente l'acrosoma si disporrà intorno al nucleo ricoprendone circa i due terzi e lasciando scoperta la parte posteriore. Contemporaneamente alla formazione dell'acrosoma si verifica lo spostamento dei due centrioli (il prossimale e il distale) verso la parte opposta a quella dove è localizzato l'acrosoma. Tale regione diventerà la parte posteriore dello spermatozoo. In contemporanea si organizza la coda (o flagello), la cui parte centrale è caratterizzata dall'assonema, una struttura microtubulare che nei mammiferi presenta un'organizzazione 9+2, ovvero nove coppie di microtubuli periferiche più una centrale. La formazione dell'assonema avviene a partire dal centriolo distale, localizzato lontano dal nucleo. Man mano che si forma l'assonema avviene la deposizione di un materiale denso agli elettroni, che si dispone attorno all'assonema e partecipa alla formazione del collo e delle fibre dense, riscontrabili a livello della coda. La formazione della coda avviene attraverso una fascia di mitocondri, che vanno a disporsi esternamente al materiale denso, localizzato nella regione dell'assonema più vicina al centriolo distale. Alla fine della spermiogenesi, il citoplasma dello spermatidio, chiamato corpo residuo,

viene allontanato dalla cellula. Questo ultimo comprende la maggior parte del citoplasma presente nello spermatidio e i ponti intercellulari. Successivamente sarà fagocitato dalle cellule di Sertoli, dove verrà degradato dai lisosomi. Una parte del citoplasma, la goccia citoplasmatica, può ancora rimanere adesa allo spermatozoo, essa però sarà definitivamente allontanata durante il passaggio attraverso l'epididimo. Con la perdita dei ponti intercellulari si perde così anche l'organizzazione sinciziale che caratterizza tutta la spermatogenesi. Gli spermatozoi possono essere così liberati nel lume del tubulo seminifero ed essere trasportati nelle vie genitali maschili, dove completano il differenziamento. (1)

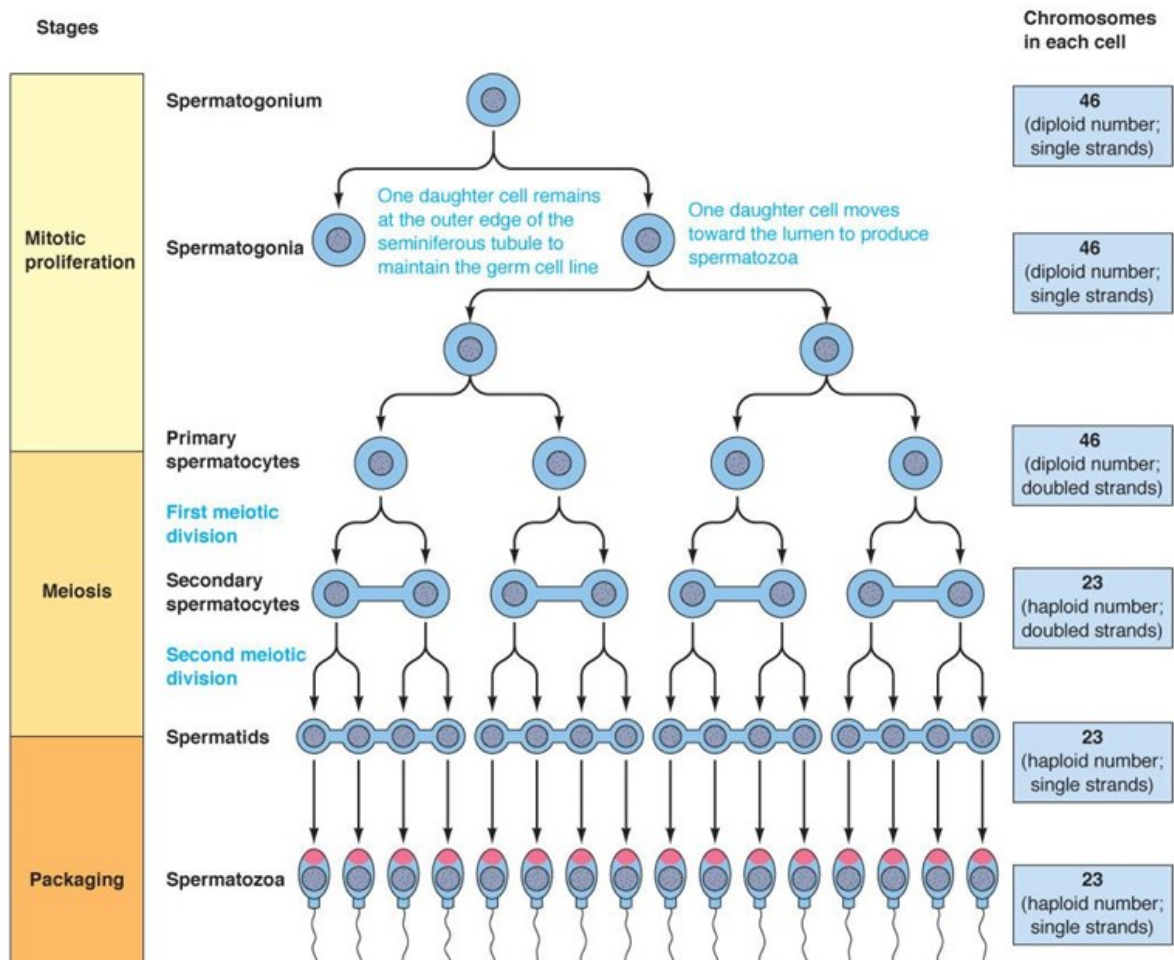


Figura 1: *Spermatogenesi nei mammiferi*

1.3 Regolazione della spermatogenesi

La spermatogenesi rappresenta uno dei momenti più importanti ed essenziali nella vita di un organismo. Questo ha fatto sì che nel corso dell'evoluzione si sviluppassero dei meccanismi di controllo sempre più efficienti, sia a livello sistemico che periferico. Il primo controllo che avviene è a livello sistemico, lungo l'asse ipotalamo-ipofisi-gonade. La sua attività in molte specie dipende da tutta una serie di fattori quali temperatura, fotoperiodo, disponibilità di cibo ecc. Tali fattori stimolano l'ipotalamo, centro neurosecretorio, localizzato nella regione ventrale del diencefalo, al fine di secernere il GnRH (gonadotropin releasing hormone), ormone che determina il rilascio delle gonadotropine. Successivamente il GnRH, tramite il sistema portale ipotalamo-ipofisario, viene riversato nella regione anteriore dell'ipofisi (adenoipofisi) dove stimola la secrezione delle gonadotropine ipofisarie: l'ormone follicolo stimolante (FSH) e l'ormone luteinizzante (LH). (14) FSH e LH sono attivi sia nel maschio sia nella femmina ed hanno come bersaglio lo stesso tipo di cellule. Nel maschio FSH agisce a livello delle cellule di Sertoli, il cui corrispettivo nella femmina è rappresentato dalle cellule follicolari. LH agisce a livello delle cellule di Leydig, il cui corrispettivo nella femmina è costituito dalle cellule della teca. (Fig. 2) Nelle cellule di Leydig, l'LH promuove la sintesi degli androgeni, il cui maggior rappresentante è il testosterone. Gli androgeni

vengono rilasciati per la maggior parte nel torrente circolatorio attraverso il quale vengono distribuiti in distretti differenti dell'organismo e sono poi responsabili dell'insorgenza dei caratteri sessuali secondari. Nel testicolo, il testosterone agisce a livello delle cellule di Sertoli, che sono le uniche cellule somatiche del tubulo che hanno i recettori per gli androgeni. Il testosterone, dopo essere entrato nelle cellule di Sertoli, si lega ai propri recettori e induce modifiche a livello delle stesse cellule di Sertoli, che sono anche sotto il controllo dell'FSH. Quindi grazie al testosterone e ad altre molecole prodotte a livello locale, le cellule di Sertoli producono ABP che andrà a legarsi al testosterone. Dopo che si è formato il complesso testosterone-ABP, esso viene secreto nel fluido tubulare dove stimola le cellule germinali a completare sia la meiosi sia la spermiogenesi. Successivamente dal fluido tubulare passa nell'epididimo dove potrà contribuire alla maturazione degli spermatozoi. Una volta raggiunte le cellule dell'epididimo stimola la secrezione di molecole come le sialomucoproteine, la carnitina e la glicerilfosforil-colina, che andranno ad adsorbirsi sulla superficie degli spermatozoi contribuendo alla loro maturazione. Un'altra conseguenza dell'effetto del testosterone sulla spermatogenesi è quella di agire sull'organizzazione del citoscheletro, in particolar modo sulla vinculina e sull'actina, implicate nell'interazione tra spermatidi e cellule di Sertoli. Infine il testosterone induce la sintesi nelle

cellule mioidi di due proteine, P-Mod-SA e P-Mod-SB, che agiscono sulle cellule di Sertoli, inducendole a liberare fattori ad azione paracrina che influenzano la spermiogenesi. (15) La produzione del testosterone, oltre che dall'LH, è stimolata indirettamente anche dalla prolattina, ormone ipofisario che induce sulle cellule di Leydig la sintesi e il mantenimento di recettori per l'LH. Quando la concentrazione del testosterone raggiunge valori molto elevati si attiva un meccanismo di regolazione a feedback negativo che va ad inibire sia la secrezione di GnRH sia la secrezione delle gonadotropine, andando a diminuire la responsività delle cellule dell'adenipofisi al GnRH. Per quanto riguarda invece l'FSH, esso regola l'attività delle cellule di Sertoli. Prima della pubertà l'FSH promuove la divisione mitotica nelle cellule di Sertoli, attività che nelle specie a spermatogenesi continua come l'uomo, cessa con il raggiungimento della maturità sessuale. Le cellule di Sertoli, dopo aver raggiunto la maturità sessuale, cessano di dividersi e costituiscono una popolazione stabile di cellule. Grazie allo stimolo dell'FSH esse sono indotte a sintetizzare un elevato numero di fattori che controllano la spermatogenesi sia a livello locale (fattori ad azione paracrina e autocrina) sia a livello sistemico (fattori ad azione ormonale). Le cellule di Sertoli rilasciano anche fattori che stimolano gli spermatogoni a dividersi mitoticamente. Quest'attività è particolarmente importante visto che le cellule di Sertoli riescono a lavorare

efficacemente solo legandosi a un determinato numero di cellule germinali. Perciò, quando il rapporto cellule di Sertoli cellule germinali è alterato e le cellule germinali si trovano in un numero diverso rispetto a quello caratteristico, si attivano dei processi apoptotici che rimuovono il numero di cellule germinali in eccesso. L'apoptosi è infatti un importante meccanismo in grado di regolare il corretto andamento della spermatogenesi. Essa agisce prevalentemente a livello degli spermatogoni, ma può intervenire anche in altri momenti della spermatogenesi. L'azione endocrina delle cellule di Sertoli si attua attraverso la sintesi e la successiva secrezione di inibine, che bloccano selettivamente il rilascio di FSH da parte dell'adenoipofisi attraverso un meccanismo di feedback negativo. (16) Oltre alle inibine è possibile trovare nel testicolo anche le attivine, molecole che appartengono ai fattori di crescita trasformanti di tipo β (TGF-B) e che hanno una struttura chimica simile alle inibine. Nonostante il loro ruolo non sia ancora pienamente chiaro, è noto però che esse sono potenti induttori della secrezione dell'FSH e che le cellule germinali maschili contengono gli opportuni recettori. Si può quindi ipotizzare che quando cala la produzione di FSH le attivine possano indurre l'ipofisi a incrementare la produzione di FSH, giocando quindi un ruolo nella regolazione della spermatogenesi. Le cellule di Sertoli producono anche molti fattori di crescita, tra i quali i fattori di crescita dei fibroblasti (FGF-1, FGF-2), i fattori

di crescita insulinosimili (IGF-1, IGF-2), il fattore di crescita trasformante di tipo α (TGF- α) e il fattore di crescita epidermico (EGF), la cui attività è in grado di condizionare la funzione delle cellule di Sertoli e di altre cellule limitrofe come le cellule mioidi. Si evidenzia infine che le cellule di Sertoli sono in grado di aromatizzare il testosterone trasformandolo in 17- β (E2) estradiolo. Gli estrogeni agiscono sia sulle cellule di Leydig sia sulle cellule che producono gonadotropine. Hanno quindi un'azione locale, nella quale sono coinvolte anche le cellule germinali. Queste ultime sono caratterizzate dalla presenza sia di recettori per gli estrogeni sia di molecole di aromatasi e quindi dalla capacità di produrre estrogeni a partire dal testosterone e/o dai suoi derivati. Nonostante sia ancora poco chiaro il meccanismo di azione del 17- estradiolo nella spermatogenesi è però sempre più probabile un suo coinvolgimento nell'omeostasi della spermatogenesi. Si evidenzia infatti che mutanti per l'aromatasi mostrano significative alterazioni nella spermatogenesi e in particolare una ridotta fertilità. Allo stesso modo, alterazioni della capacità riproduttiva nella specie umana, come criptorchidismo, ipospadia, cancro testicolare, possono essere dovuti non solo all'azione di molecole che modificano l'attività degli androgeni, ma anche degli estrogeni stessi. Infine è utile sottolineare come anche la presenza di xenoestrogeni, molecole presenti nell'ambiente quali fitofarmaci, disinfestanti ad attività estrogeno-simile ecc.,

1.4 Il gamete maschile

Gli spermatozoi o spermatozoi sono cellule altamente differenziate. Quelli umani sono classificati come spermatozoi flagellati o nemaspermici per la presenza di un flagello. Essi sono costituiti da tre regioni: una testa, un collo e una coda detta anche flagello appunto. Quest'ultimo è poi diviso in segmento intermedio, segmento principale e segmento finale. Il tutto per una lunghezza di 50-60 μm .

(1) La testa è caratterizzata dalla presenza del nucleo e dell'acrosoma. Il nucleo si presenta fortemente eterocromatico (tranne in alcune regioni indicate come vacuoli nucleari) ed è circondato da un involucro nucleare privo di pori nucleari, ad eccezione della regione posteriore. Il nucleo è sormontato dall'acrosoma che ricopre la parte anteriore del nucleo. L'acrosoma è una sorta di estesa cisterna, esso presenta due membrane, quella in prossimità della membrana plasmatica che è la membrana acrosomiale esterna e quella localizzata in prossimità dell'involucro nucleare che è la membrana acrosomiale interna. L'acrosoma contiene differenti tipi di materiali, tra cui enzimi (ialuronidasi, neuroaminidasi, N-acetilglucosaminidasi, acrosina ecc) coinvolti nella fecondazione. La parte posteriore del nucleo è priva di acrosoma ed è caratterizzata dalla presenza di materiale denso, la lamina densa post-acrosomiale, importante anch'essa per la fecondazione. Tra l'acrosoma e il nucleo può essere riconoscibile una regione denominata regione sub

acrosomica o anche perforatorio. La forma del nucleo e dell'acrosoma sono estremamente variabili nei mammiferi, per cui la testa finisce per apparire differente nelle diverse specie dei differenti mammiferi. Il collo costituisce una parte molto ristretta dello spermatozoo, ed è di circa 1 μm . È caratterizzato dalla presenza del centriolo prossimale e da materiale denso organizzato in colonne, che favorisce l'adesione della coda alla testa. La coda o flagello, è la parte più estesa dello spermatozoo ed ha come struttura portante l'assonema. Ciò che favorisce la distinzione dei tre segmenti della coda è la presenza di un diverso tipo di materiale associato all'assonema. Nel segmento intermedio, alla periferia dell'assonema, sono presenti 9 fibre dense, ciascuna delle quali è disposta in associazione con una coppia di microtubuli. Anteriormente esse prendono connessione con gli elementi presenti a livello del collo e posteriormente si associano con le fibre presenti nel segmento principale. Queste fibre dense sono state identificate in tutti gli spermatozoi di specie con fecondazione interna, per cui è stato ipotizzato che esse giochino un ruolo determinante nel movimento tridimensionale tipico degli spermatozoi delle specie con fecondazione interna. Il segmento intermedio è inoltre caratterizzato dalla presenza di una guaina di mitocondri che favoriscono la produzione di ATP, indispensabile per il movimento degli spermatozoi. Il segmento intermedio termina con l'annulus o anello di Jansenn, un ripiegamento della

membrana plasmatica rafforzata dalla presenza di materiale che al microscopio elettronico a trasmissione si presenta elettrondenso. Il segmento principale costituisce la parte più estesa della coda. Oltre che dall'assonema e dalle fibre dense, esso è caratterizzato dalla presenza di una guaina fibrosa a organizzazione metamerica, che si estende intorno alle fibre dense e che continua in parte anche nel segmento finale. Il segmento finale rappresenta l'ultimo tratto della coda ed è costituito per la maggior parte dall'assonema e da un sottile strato di citoplasma, circondati esternamente dalla membrana plasmatica. (Fig.3) Questo tipo di organizzazione, che si caratterizza per la presenza di un acrosoma esteso e di un segmento intermedio, ricco di mitocondri disposti in modo elicoidale, è tipica degli spermatozoi delle specie più evolute. (18) Gli spermatozoi vengono quindi identificati come cellule mobili specializzate nel trasferimento del genoma paterno nella cellula uovo. Quelli di specie a fecondazione esterna acquisiscono la loro motilità nel momento in cui vengono a contatto con l'acqua. La motilità in questione è di tipo sinusoidale, essa si propaga dalla base della testa fino all'apice dell'assonema. Ciò è dovuto non solo all'assonema ma anche alle fibre-dense, alla guaina fibrosa e ad altre proteine dell'assonema, come i raggi di connessione. È importante ricordare che il movimento autonomo si manifesta effettivamente solo durante la fase finale del passaggio degli spermatozoi nelle vie genitali

femminili. Nelle vie genitali maschili e nei primi tratti delle vie genitali femminili, infatti gli spermatozoi si muovono passivamente, grazie a delle contrazioni peristaltiche delle pareti, che sono sotto il controllo del sistema nervoso autonomo. Durante il passaggio nell'epididimo gli spermatozoi acquisiscono la capacità di muoversi e vanno incontro a tutta una serie di ulteriori cambiamenti, che prendono il nome di maturazione spermatica. (19) Tali cambiamenti riguardano, ad esempio, la presenza di colesterolo a livello della membrana plasmatica. Durante la maturazione infatti si assiste ad un incremento del colesterolo a livello della membrana plasmatica, ciò la rende meno fusogena. In questo modo si impedisce che si verifichino prematuramente fenomeni di fusione tra la membrana plasmatica e la membrana acrosomiale esterna. Numerose proteine di superficie vengono dislocate lungo la membrana plasmatica affinché possano essere collocate in posizioni diverse rispetto a quelle che occuperanno al momento della fecondazione. Alcune proteine secrete dalle cellule dell'epididimo vengono assorbite sulla superficie degli spermatozoi, in modo tale da impedirne una loro utilizzazione precoce. Durante la maturazione spermatica viene allontanata la goccia citoplasmatica, ancora presente sugli spermatozoi, dopo che erano stati rilasciati nel lume del tubulo. Nei mammiferi gli spermatozoi, prima di passare nell'uretra ed essere eiaculati, possono permanere in un compartimento del

condotto deferente, l'ampolla, dove possono rimanere alcuni giorni. Successivamente o sono eiaculati o vengono riassorbiti dalle cellule delle pareti dell'ampolla. Normalmente il passaggio nell'uretra è impedito dalla presenza di uno sfintere che, quando viene rilasciato in concomitanza con le contrazioni dell'ampolla, determina la fuoruscita degli spermatozoi. Nel sito in cui l'ampolla confluisce nel tratto dell'uretra si trovano anche i dotti delle ghiandole connesse alle vie genitali maschili, come le vescichette seminali e la prostata, che favoriscono la secrezione del liquido spermatico. Esso assieme agli spermatozoi costituisce lo sperma che sarà eiaculato. Gli spermatozoi che sfuggono dall'ampolla sono generalmente pochi e vengono eliminati con le urine. Gli spermatozoi eiaculati, nonostante tutti i cambiamenti avvenuti, non sono ancora in grado di fecondare la cellula uovo. La capacità fecondante verrà acquisita durante il passaggio attraverso le vie genitali femminili. (20)

L'insieme dei cambiamenti che avvengono a livello dello spermatozoo prende il nome di capacitazione. La mancata capacità di fecondare degli spermatozoi appena eiaculati è per la maggior parte causata sia dalla presenza di molecole che sono state legate sulla superficie degli spermatozoi durante il transito nelle vie genitali maschili, sia alle secrezioni delle ghiandole sessuali come la prostata. Queste molecole permettono inoltre agli spermatozoi di transitare liberamente lungo le vie genitali femminili senza essere attaccati dal sistema

immunitario della femmina. Esse infatti nascondono antigeni di superficie, propri degli spermatozoi che rappresentano un non-self per le cellule del sistema immunitario della femmina. I cambiamenti che si verificano durante la capacitazione riguardano soprattutto l'organizzazione della superficie e il movimento degli spermatozoi. Le molecole di colesterolo vengono allontanate dalla superficie grazie a molecole di albumina, presenti nelle secrezioni delle vie genitali femminili. La differente concentrazione di colesterolo fa sì che le membrane plasmatiche degli spermatozoi siano più fluide e più fusogeniche, ciò facilita la realizzazione della reazione acrosomiale. Le molecole precedentemente adsorbite sulla superficie cellulare degli spermatozoi vengono ora allontanate. In questo modo si ha uno smascheramento di proteine di superficie, le quali poi potranno interagire con la superficie dell'uovo al momento della fecondazione. Queste molecole di superficie inoltre si collocano in punti strategici della testa, in modo da permettere il legame e la successiva fusione tra lo spermatozoo e la cellula uovo. (21) La differente organizzazione della superficie cellulare permette anche un cambiamento della permeabilità per cui alcuni ioni, come il Ca^{2+} , si muovono dall'esterno verso l'interno della cellula. La maggior concentrazione di ioni Ca^{2+} nella cellula determina poi un aumento di motilità degli spermatozoi, che diventano così ipermobili. Questo rappresenta un carattere distintivo degli spermatozoi capacitati rispetto a quelli

non capacitati. Gli spermatozoi umani possono sopravvivere nelle vie genitali per circa 2-3 giorni, durante i quali possono prendere connessione con le cellule delle tube.

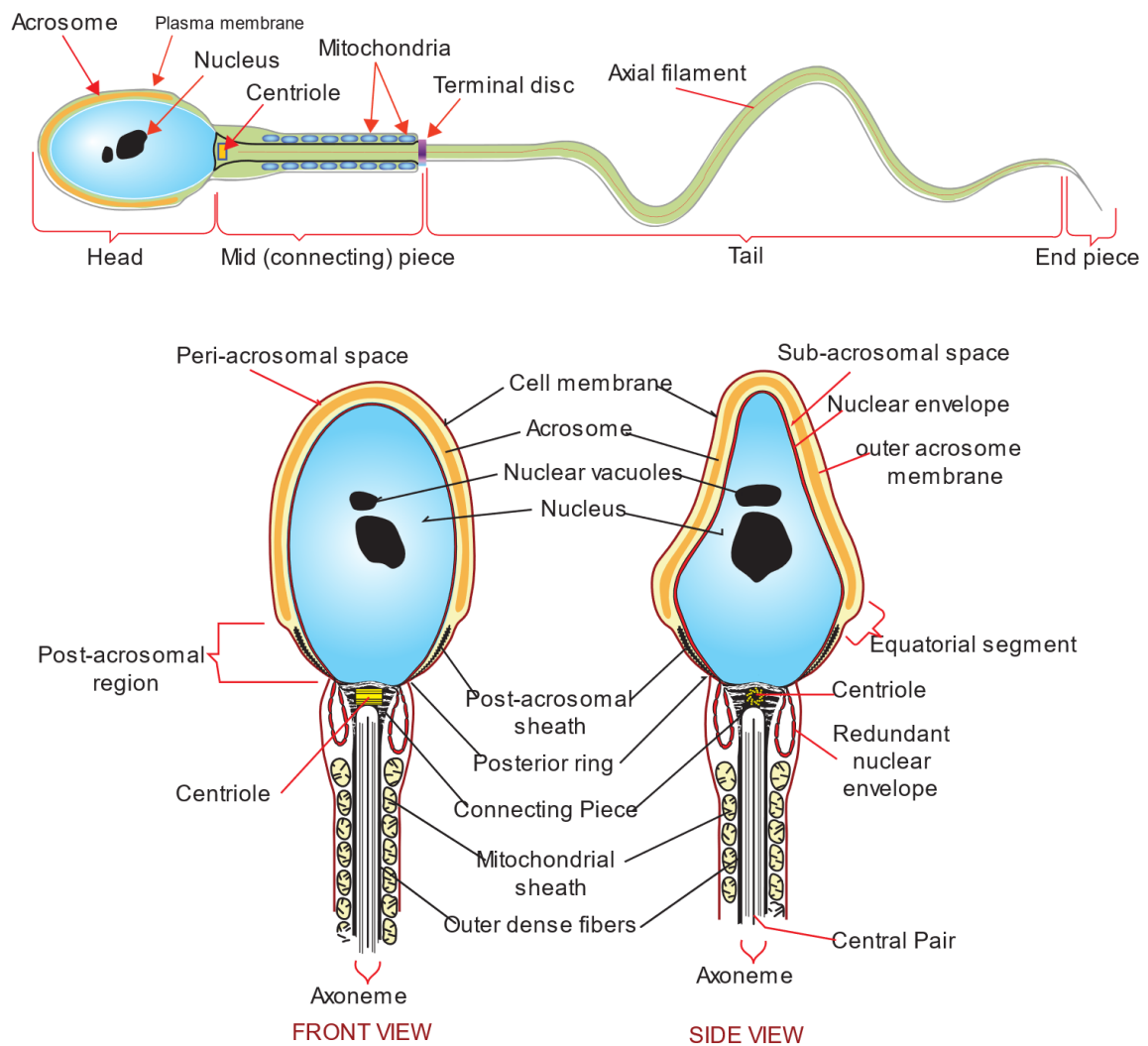


Figura 3: *Struttura di uno spermatozoo (Villareal. 1980)*

1.5 Infertilità maschile

L'infertilità è oggi considerata dall'OMS (Organizzazione Mondiale della Sanità) una patologia. Per infertilità si intende infatti l'impossibilità di concepire dopo almeno 12 mesi di rapporti liberi con un partner in perfette condizioni di fertilità. (22) Secondo le diverse stime disponibili tale fenomeno riguarda circa il 15% delle coppie. Tra di esse si ha che un 30-40% dei casi associato al sesso maschile, esso presenta infatti anomalie di tipo qualitativo o qualitativo nella produzione di spermatozoi. (23) Il termine infertilità infatti è quasi sempre associato al termine dispermia, con la quale si indica una patologia maschile in cui si ha un'alterazione di uno o più valori del liquido seminale, che possono essere sia quantitativi (ossia la concentrazione di spermatozoi) o qualitativi (ossia le caratteristiche degli spermatozoi). (24) Una percentuale significativa di maschi infertili è affetta da oligozoospermia (ridotta produzione di spermatozoi) o azoospermia (mancanza di spermatozoi nell'eiaculato). Tali alterazioni nella produzione di spermatozoi possono essere correlate, a loro volta, a diverse patologie istologiche testicolari sottostanti, che vanno dalla completa assenza di cellule germinali (sindrome delle sole cellule di Sertoli) all'ipospermatogenesi e all'arresto della maturazione. L'alterazione della spermatogenesi può essere la conseguenza di molte cause, come malattie sistemiche, criptorchidismo, disturbi endocrinologici, ostruzione/assenza delle

vie seminali o infezioni. Tuttavia, la causa dell'infertilità maschile è però sconosciuta in circa il 50% dei casi e fino a poco tempo fa relativamente poche ricerche si concentravano sulle possibili eziologie genetiche. Si può affermare quindi che una buona parte dell'infertilità sia idiopatica. (25) Una diagnosi preventiva di infertilità si effettua principalmente attraverso lo spermioγραμμα, analisi che permette di determinare il numero, la motilità, la morfologia e la vitalità degli spermatozoi presenti nell'eiaculato. Preventiva perché non c'è stretta correlazione tra numero di spermatozoi e fertilità. Altrettanto importanti però sono tutta un'altra serie di fattori come lo stile di vita, il fumo, l'esposizione ad agenti inquinanti, patologie in grado di alterare la struttura e funzione dei testicoli e l'età del paziente. Essi infatti sono fattori che possono andare ad alterare il numero, la morfologia e la motilità degli spermatozoi, diminuendo la capacità fecondante dell'individuo. Vanno esaminati quindi contemporaneamente diversi parametri seminali, sia qualitativi che quantitativi, caratteristiche e funzioni della popolazione spermatica e del singolo spermatozoo. In caso di sospetta infertilità, si possono condurre altri esami più approfonditi come esami ematici per valutare la presenza di problemi endocrini nella produzione di ormoni che controllano la funzione dei testicoli (FSH, LH e testosterone). (24)

1.5.1 Cause legate al testicolo

L'infertilità si instaura tutte le volte in cui si verifica un'alterazione della normale produzione, maturazione, vitalità e liberazione degli spermatozoi. Il maschio infertile, infatti, non riesce a produrre e/o a liberare nell'eiaculato un'adeguata quantità di spermatozoi perfettamente maturi e funzionali (26). Le cause di infertilità maschile sono quindi molteplici, come accennato precedentemente. In questo caso verranno analizzate quelle legate al testicolo, che si dividono in testicolari e post-testicolari. Le cause testicolari sono di gran lunga le cause più frequenti di infertilità maschile (50-70%). (27) Comprendono un gruppo eterogeneo di patologie a carico del testicolo che alterano la normale produzione degli spermatozoi. Tra queste abbiamo criptorchidismo, orchiti, varicocele, infezioni, neoplasie, torsioni testicolari.. Per quanto riguarda il varicocele, esso è una patologia del testicolo caratterizzata da una dilatazione e da un'incontinenza delle vene testicolari (o spermatiche). Quando queste vene sono dilatate si verifica un reflusso di sangue dall'alto verso il testicolo, che provoca un aumento della temperatura e una condizione ambientale sfavorevole per una normale produzione di spermatozoi (spermatogenesi). Interessa circa il 10-20% della popolazione generale maschile. Nel 70% dei portatori di varicocele si riscontrano alterazioni più o meno evidenti del liquido seminale. Il varicocele può infatti causare alterazioni

della spermatogenesi, quali riduzione del numero degli spermatozoi, alterazioni della motilità e della morfologia, per ipertermia intrascrotale (aumento della temperatura di 1-1,5°C), per reflusso di cataboliti dalla vena surrenalica e/o secondari a fenomeni ischemici. (28)

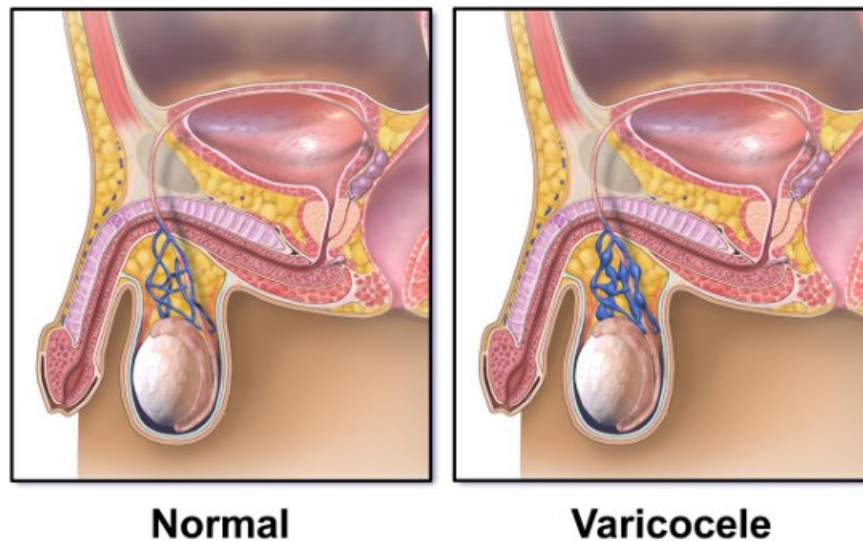


Figura 4: *Varicocele*

Con criptorchidismo invece si intende la mancata discesa di uno o di entrambi i testicoli all'interno della borsa scrotale. Normalmente la discesa del testicolo comincia tra la decima e la quindicesima settimana di gestazione e la prima fase è un processo già programmato nello sviluppo embrionale ed è indipendente dagli ormoni. La seconda fase avviene invece con una decina di settimane di ritardo, a partire dalla ventiseiesima fino alla quarantesima settimana ed è ormone-dipendente. Il testicolo produce testosterone e stimola la discesa finale

a livello dello scroto. Il criptorchidismo può essere unilaterale o bilaterale. Esso è stato associato ad un aumentato rischio di cancro ai testicoli e ad una ridotta fertilità. (29).

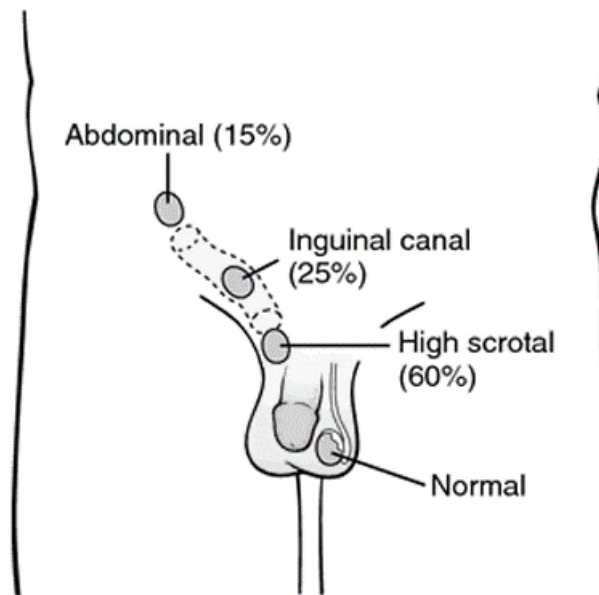


Figura 5: *Criptorchidismo*

Infine si ha la torsione testicolare. Essa si verifica quando il cordone spermatico si attorciglia, interrompendo l'afflusso di sangue al testicolo. Il sintomo principale è il dolore testicolare. Si tratta di una situazione che richiede un imminente intervento chirurgico, non appena compaiono i sintomi. L'alterazione della fertilità dipende infatti dalla prontezza con cui il problema viene risolto. (30) Per quanto riguarda le cause post testicolari invece, esse sono

per lo più ostruzioni congenite del tratto seminale, riguardanti cioè i dotti deferenti e l'epididimo. Esse possono essere prossimali o distali. Quelle prossimali colpiscono in tutto o in parte l'epididimo e/o i dotti deferenti. Ostruzioni complete determinano azoospermia, mentre ostruzioni parziali portano ad oligozoospermia. L'ostruzione prossimale può essere indotta da processi infiammatori, alterazioni funzionali o malformazioni. Quelle distali invece colpiscono i dotti eiaculatori e raramente i dotti delle vescicole seminali. In tal caso l'ostruzione può essere parziale o totale. Esse rappresentano solo l'1% delle cause di sterilità. (31)

1.5.2 Cause legate allo spermatozoo

Il termine infertilità come accennato in precedenza viene quasi sempre associato al termine dispermia, con il quale si indica un'alterazione di uno o più parametri del liquido seminale. In questo caso i parametri che vengono presi in esame sono sia di tipo qualitativo che quantitativo. Attraverso un'attenta analisi tramite spermioγραμμα è quindi possibile determinare il numero, la motilità, la morfologia e la vitalità degli spermatozoi presenti nell'eiaculato. A tal fine è utile l'utilizzo del Manuale di WHO, all'interno del quale si trovano le linee guida per l'esecuzione e l'interpretazione dell'analisi del liquido seminale. I criteri da esso citati non hanno un carattere di obbligatorietà ma sono utili però per poter standardizzare ed interpretare i risultati di tutto il mondo. Dalla Figura 6 è possibile quindi osservare il limite minimo necessario per definire un individuo normozoospermico. (32) Per quanto riguarda i parametri di tipo quantitativo si vanno ad analizzare: volume del campione, numero totale di spermatozoi e concentrazione spermatica. Il volume del campione, prodotto dalle ghiandole accessorie, riflette l'attività secretoria delle ghiandole e non deve essere inferiore di 1,5 ml. Il numero totale di spermatozoi riflette la produzione nemaspermica dei testicoli e la pervietà dei dotti eiaculatori post-testicolari. Esso si ottiene moltiplicando la concentrazione nemaspermica per il volume del liquido seminale. Non deve essere sotto ai 39

milioni. Infine si ha la concentrazione nemaspermica che si riferisce al numero di spermatozoi per unità di volume del liquido seminale, essa non deve essere al di sotto dei 15 milioni di spermatozoi per millilitro. Per quanto riguarda invece i parametri di tipo qualitativo si vanno ad analizzare: motilità, morfologia e vitalità. La motilità spermatica rappresenta uno dei determinanti principali dell'infertilità maschile, essendo una condizione essenziale ai fini della fecondazione. Essa è divisa in tre categorie: motilità progressiva (PR), motilità non progressiva (NP) e immobili (IM). La prima indica il movimento di spermatozoi che si muovono liberamente indipendentemente dalla velocità, con un andamento lineare. Quella non progressiva invece è tipica di spermatozoi con assenza di progressione o presenza del solo battito di coda. Sommate esse danno la motilità totale, che deve essere uguale o maggiore al 40%. La PR invece deve essere maggiore o uguale al 32%. Si parla di astenozoospermia quando avviene una riduzione della percentuale di spermatozoi mobili. La vitalità nemaspermica invece viene valutata mediante l'integrità della membrana su quei campioni con meno del 40% di motilità progressiva. La percentuale di vitalità viene valutata esaminando l'integrità della membrana cellulare dello spermatozoo e ciò avviene attraverso specifiche colorazioni. La presenza di colorante all'interno della testa dello spermatozoo è un indice di danneggiamento della membrana e quindi di non vitalità. Essa

deve essere superiore al 58%. (33) Infine si ha la morfologia. Grazie al recupero di spermatozoi nelle vie genitali femminili e nella zona pellucida è stato possibile stabilire il prototipo di spermatozoo morfologicamente normale, in grado quindi di fecondare. Per considerare uno spermatozoo normale, testa e coda devono avere specifiche caratteristiche. La presenza di un minimo di 4 forme tipiche è sufficiente per parlare di normale morfologia, altrimenti si rientra all'interno di quella che viene identificata come teratozoospermia.

Parameter	Lower reference limit
Semen volume (ml)	1.5 (1.4–1.7)
Total sperm number (10 ⁶ per ejaculate)	39 (33–46)
Sperm concentration (10 ⁶ per ml)	15 (12–16)
Total motility (PR + NP, %)	40 (38–42)
Progressive motility (PR, %)	32 (31–34)
Vitality (live spermatozoa, %)	58 (55–63)
Sperm morphology (normal forms, %)	4 (3.0–4.0)
Other consensus threshold values	
pH	≥7.2
Peroxidase-positive leukocytes (10 ⁶ per ml)	<1.0
MAR test (motile spermatozoa with bound particles, %)	<50
Immunobead test (motile spermatozoa with bound beads, %)	<50
Seminal zinc (μmol/ejaculate)	≥2.4
Seminal fructose (μmol/ejaculate)	≥13
Seminal neutral glucosidase (mU/ejaculate)	≥20

Figura 6: *Limiti inferiori di riferimento per le caratteristiche del liquido seminale*

La testa dovrebbe essere liscia, con contorni regolari e di forma ovale. Deve essere presente una regione acrosomiale ben definita che occupa dal 40 al 70% della testa e non devono essere presenti difetti al collo, nel tratto intermedio e nella coda. Si nota quindi come i difetti nella morfologia sono di solito misti, essi hanno solitamente un potenziale di fecondazione più basso che varia in base alla tipologia di anomalia. I difetti della morfologia sono stati associati a un aumento di frammentazione del DNA, a un incremento di incidenza di alterazioni strutturali dei cromosomi, a cromatina immatura e aneuploidie. Notevole importanza viene data quindi alla forma della testa, sebbene venga presa in considerazione anche la coda degli spermatozoi. Una testa troppo grande o troppo piccola infatti è indice del fatto che ci sono stati probabilmente degli errori a livello della duplicazione poiché lo spermatozoo va incontro a numerosissime mitosi e anche meiosi, ragion per cui è più probabile che siano avvenuti degli errori in itinere. Teste tonde sono di solito sintomo di qualche problema a livello dell'acrosoma. Rigonfiamenti a livello citoplasmatico non sono un problema di cariotipo, ma probabilmente un indice di una mancata espulsione di citoplasma durante le fasi di maturazione. Queste rendono lo spermatozoo più pesante, quindi più lento nel movimento e perciò costituiscono un problema di motilità. Sono state quindi sviluppate delle tabelle nelle quali vengono riassunte tutte le possibili forme atipiche, divise per : difetti della testa,

difetti del collo e del tratto intermedio, difetti della coda e difetti relativi al residuo citoplasmatico in eccesso. (34)

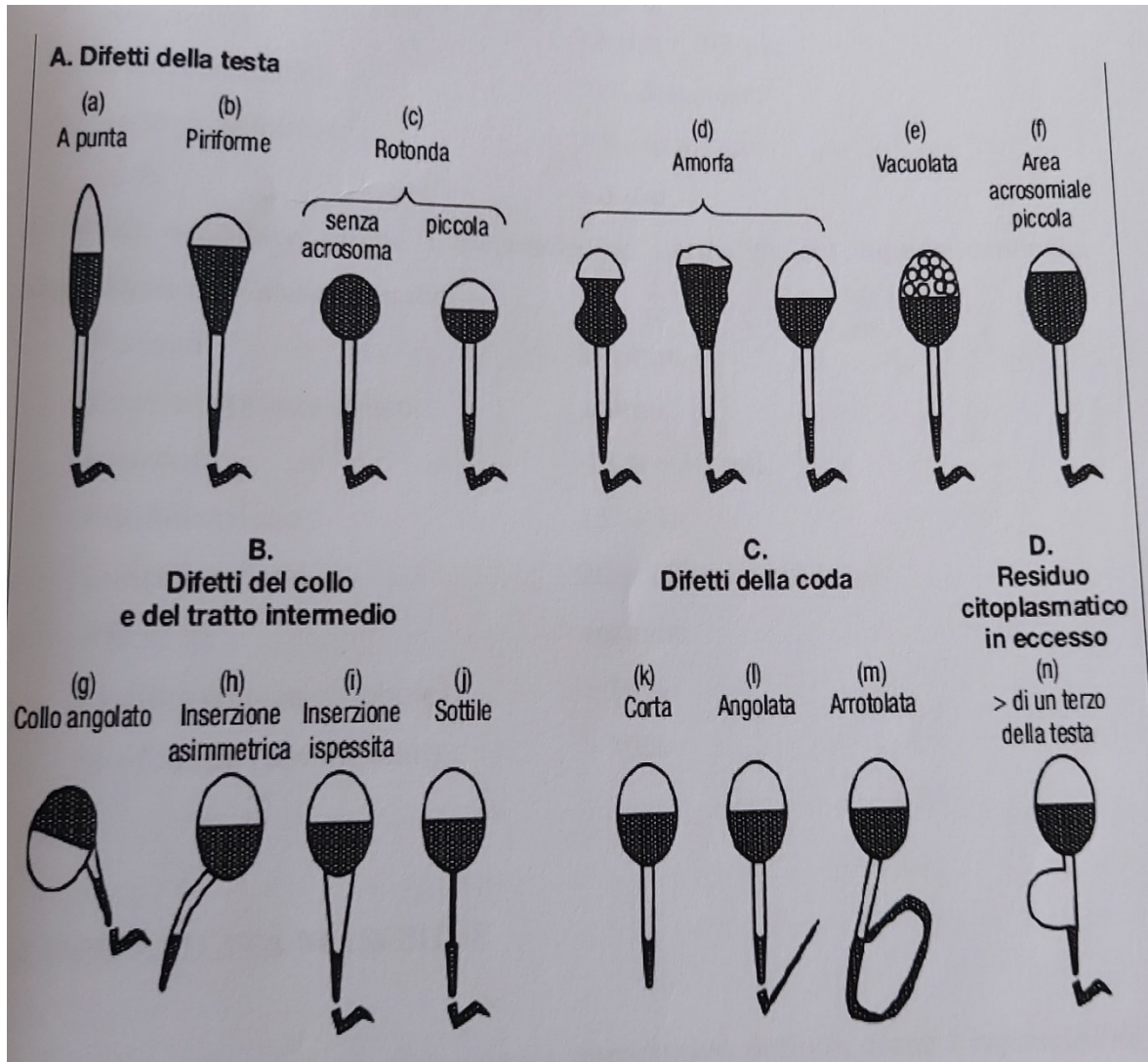


Figura 7: Rappresentazione di forme atipiche di spermatozoi umani

L'ultimo fattore importante da analizzare è la correlazione tra DNA nucleare danneggiato dello spermatozoo ed infertilità maschile: la condensazione della cromatina è direttamente correlata alla capacità dello spermatozoo di fecondare un ovocita. La fecondazione da parte di spermatozoi con DNA frammentato potrebbe causare infatti uno scarso sviluppo embrionale, una diminuzione dell'impianto, tassi di gravidanza più bassi o aborti. Diversi studi hanno mostrato che gli uomini sterili con scarsa motilità e morfologia dello spermatozoo anormale hanno frammentazione del DNA maggiore rispetto agli uomini con parametri normali dello sperma. (35)

1.6 Infertilità maschile: cause genetiche

L'infertilità colpisce circa il 15% delle coppie e anomalie genetiche contribuiscono almeno per il 15% all'infertilità maschile. Esse contribuiscono a tutte e quattro le principali categorie eziologiche dell'infertilità maschile: difetti quantitativi e qualitativi spermatogenici, ostruzione o disfunzione duttale e disturbi dell'asse ipotalamo-ipofisario. Gli uomini con azoospermia sono a più alto rischio di essere portatori di anomalie genetiche (25%), e questo rischio diminuisce progressivamente con l'aumentare della produzione di sperma. (36) Tra le principali cause genetiche di infertilità abbiamo: anomalie cromosomiche, mutazioni dei geni KAL e CFTR e microdelezioni del cromosoma Y.

1.6.1 Anomalie cromosomiche

Alterazioni cromosomiche possono essere autosomiche cioè interessare i cromosomi dall'1 al 22 oppure sessuali che sono a carico del cromosoma X o Y. Negli uomini infertili le più comuni anomalie cromosomiche sono le aneuploidie ossia presenza di un incorretto numero di cromosomi. Tra queste si ha la Sindrome di Klinefelter (KLFS). Essa è al tempo stesso: l'aneuploidia cromosomica più comune osservata negli uomini azoospermici (10%) (37) e la causa più comune di ipogonadismo e infertilità nei maschi (1/500) (38) In particolare l'azoospermia viene rilevata nel 74% degli uomini con KLFS. (37) È caratterizzata dalla presenza nell'uomo di tre cromosomi sessuali XXY anziché XY. Generalmente si osservano due forme di KLFS: non a mosaico (47, XXY, 85% dei casi) e a mosaico (47, XXY/46, XY, 15% dei casi). Il 25% dei pazienti con KLFS non a mosaico ha lo sperma nel loro eiaculato. (39) Le caratteristiche generali di un individuo che ne è affetto sono: testicoli molto piccoli (1-3 ml) e sodi, ginecomastia (40%) e caratteristiche dell'ipogonadismo maschile, come la scarsa crescita dei peli del viso e del pube, la perdita della libido e la disfunzione erettile. Un basso livello di testosterone si osserva nell'80% degli uomini, un effetto attribuito alla piccola crescita testicolare nonostante la presenza di iperplasia delle cellule di Leydig. Essendo un caso di ipogonadismo ipergonadotropo si hanno elevati livelli di gonadotropine e

quindi di FSH e LH. (38) Un'altra fonte di anomalie cromosomiche sono le traslocazioni. Le traslocazioni autosomiche avvengono dalle 4-10 volte in più negli infertili rispetto agli uomini normali. La traslocazione Robertsoniana è la più frequente nell'uomo ed influenza la fertilità di 1/1000 uomini. Consiste nella fusione di due cromosomi, causando la riduzione del numero cromosomico da 46 a 45. Può coinvolgere i cromosomi 13, 14, 15, 21 e 22, ma il tipo più comune coinvolge i cromosomi 13 e 14. Nonostante la loro prevalenza sia solo dell'0,8% negli uomini infertili è comunque nove volte più alta di quella della popolazione generale. Le traslocazioni Robertsoniane sono più comuni negli oligozoospermici e azoospermici con frequenza 1.6% e 0.09% rispettivamente. (40)

1.6.2 Mutazioni geniche: KAL e CFTR

Altra causa di infertilità sono le mutazioni geniche. In particolar modo esse possono riguardare due importanti geni: il gene KAL e il gene CFTR. Il primo di essi è associato alla sindrome di Kallmann. Essa rientra all'interno dei casi di ipogonadismo ipogonadotropo, ciò comporta un basso livello di gonadotropine e quindi di FSH e LH. In questo caso, viceversa dalla sindrome di Klinefelter, l'ipogonadismo è però causato non da una alterazione a livello cromosomico ma da mutazione genica. Quest'ultima avviene a livello del gene KAL. Esso si trova sul braccio corto del cromosoma X e codifica per l'anosmina, una proteina il cui ruolo è coinvolto nel processo di migrazione degli assoni olfattivi e dei neuroni ipotalamici. La migrazione dal placode olfattivo verso l'ipotalamo porta alla formazione di quella regione ipotalamica che produce GnRH. Un'assenza di anosmina comporta quindi la mancata formazione di questa regione e conseguentemente anche della produzione di quel fattore. Questa sindrome può colpire sia i maschi che le femmine e comporta sterilità per mancata produzione di qualsiasi ormone derivato dallo stimolo del GnRH. (41) Il secondo gene in questione è invece il gene CFTR, regolatore della conduttanza transmembrana della fibrosi cistica, che codifica per una proteina del canale del cloruro. Mutazioni a suo carico sono responsabili della fibrosi cistica, malattia autosomica recessiva pericolosa,

caratterizzata dalla presenza di secrezioni dense e viscosi nei polmoni, nel pancreas, nell'intestino e nel fegato. Tali secrezioni anormali provocano la formazione di tappi che ostruiscono i lumi duttali in questi organi, causando dilatazioni, infezioni frequenti e fibrosi. Questi problemi si riflettono quindi anche sulla fertilità dell'uomo, dal momento in cui il gene è anche espresso nella testa dell'epididimo e nel dotto deferente. Si possono infatti creare delle ostruzioni al momento dell'eiaculazione, responsabili di azoospermia ostruttiva. Inoltre il liquido seminale si presenta più denso e non permette agli spermatozoi di muoversi liberamente ed adempiere al proprio dovere fecondando l'ovocita poiché intrappolati dalla densità del liquido stesso, di conseguenza si ha infertilità. Infine questa malattia è associabile ad agenesia bilaterale congenita dei vasi deferenti (CBAVD), che trasportano lo sperma dall'epididimo alle vescicole seminali, perciò una loro anomalia provoca oligozoospermia e azoospermia. (42)

1.6.3 Microdelezioni del cromosoma Y

I bracci lunghi e corti del cromosoma Y contengono molti geni che regolano rispettivamente la spermatogenesi e lo sviluppo dei testicoli. Le microdelezioni sul braccio lungo del cromosoma Y (Yq) sono ben correlate con l'infertilità maschile. (43) Le microdelezioni Yq sono rilevate in circa il 13% degli uomini con azoospermia non ostruttiva e nel 5% degli uomini con grave oligozoospermia (conta spermatica inferiore a 5 milioni/mL) . (44) Una microdelezione è definita come una delezione cromosomica che abbraccia diversi geni ma che è di piccole dimensioni e non può essere rilevata utilizzando metodi citogenetici convenzionali (ad esempio il cariotipo). Nei capitoli seguenti verrà analizzato quindi nel dettaglio il ruolo delle microdelezioni dell'infertilità maschile.

1.7 Descrizione del cromosoma Y

Il cromosoma Y è uno dei due cromosomi umani determinanti il sesso (l'altro cromosoma sessuale è il cromosoma X). I cromosomi sessuali sono una delle 23 coppie di cromosomi omologhi umani. Ci si riferisce a X e Y come cromosomi sessuali o eterosomi, per distinguerli dagli altri 44, definiti autosomi, che sono presenti sia negli individui di sesso maschile che in quelli di sesso femminile. Nei mammiferi, i cromosomi sessuali X e Y sono emersi da una coppia autosomica circa 300 milioni di anni fa (45). Da allora hanno incominciato a divergere a causa dei loro diversi ruoli funzionali. Con il tempo il cromosoma Y si è specializzato nella determinazione del sesso maschile, andando a variare progressivamente il suo contenuto genico attraverso l'azione di eventi come delezioni, mutazioni, inserzioni, ricombinazioni e trasposizioni, ecc., (46). La divergenza tra i cromosomi X e Y è così aumentata sempre più, rendendo difficoltosa la loro ricombinazione. Questo processo evolutivo ha prodotto quindi cromosomi Y con notevoli differenze, anche tra specie strettamente imparentate come l'uomo e lo scimpanzé (47). Il cromosoma Y conta circa 57 milioni di paia di basi, è lungo circa un terzo del cromosoma X, quindi la maggior parte dei geni presenti sull'X non ha il proprio corrispondente sul cromosoma Y. Si stima infatti che il cromosoma Y contenga circa 60 geni codificanti e 140 non codificanti. (48)

Questi ultimi svolgono un ruolo critico nel determinismo del sesso, nel differenziamento del testicolo e nella produzione degli spermatozoi. (49) Citogeneticamente il cromosoma Y umano è un cromosoma acrocentrico composto da due regioni pseudoautosomiche presenti alle estremità (PAR1 e PAR2), un braccio corto (Yp) e un braccio lungo (Yq) dove si trovano i pochi geni deputati al differenziamento delle caratteristiche sessuali maschili ed al controllo della spermatogenesi. Essi sono separati da un centromero. La regione al di fuori delle PAR è chiamata invece regione non ricombinante del cromosoma Y (NRY) (50) Il braccio corto (Yp) e la parte prossimale dell'Yq, sono costituiti da eucromatina, mentre il centromero e il resto del braccio lungo, sono formati da eterocromatina, a livello di quest'ultimo si trovano sequenze non codificanti altamente ripetute. Questa ultima regione può variare in lunghezza fino a costituire da metà a due terzi di Yq. (Fig.8)

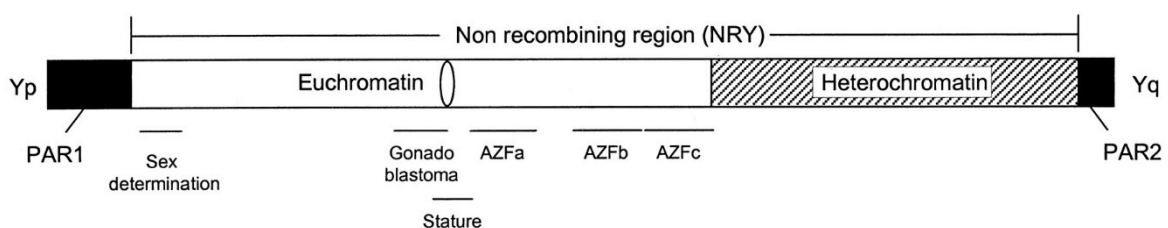


Figura 8: *Rappresentazione schematica del cromosoma Y. I PAR sono rappresentati in nero, la regione eucromatica in bianco e la regione eterocromatica è a strisce. Al di fuori dei PARs c'è la regione non ricombinante del cromosoma Y (NRY) (C. Foresta et al., 2001)*

Il braccio lungo del cromosoma Y può essere diviso citogeneticamente in una regione prossimale eucromatica (Yq11, suddivisa in Yq11.1, 11.21, 11.22 e 11.23) e una regione distale eterocromatica (Yq12), mentre il braccio corto eucromatico è chiamato Yp11. Costruire la sua mappa cromosomica non fu affatto facile, proprio a causa della mancanza della ricombinazione con altri cromosomi. Vergnaud è stato il primo a proporre una mappa. Egli ha diviso il cromosoma Y in 7 intervalli: gli intervalli 1 a 4 vanno dalla regione telomerica del braccio corto al centromero: gli intervalli 5 e 6 si trovano a livello della parte eucromatica di Yq, mentre l'intervallo 7 corrisponde alla regione eterocromatica. A livello dell'intervallo 5 si trovano le subregioni Yq11.21 e metà dell'Yq11.22, mentre l'intervallo 6 si trova a metà di Yq11.22-Yq11.23 (51). Successivamente Vollrath ha suddiviso la mappa a sette intervalli in ulteriori 43 sottointervalli. Oggigiorno essa è la mappa più comunemente usata. (52) (Fig.9)

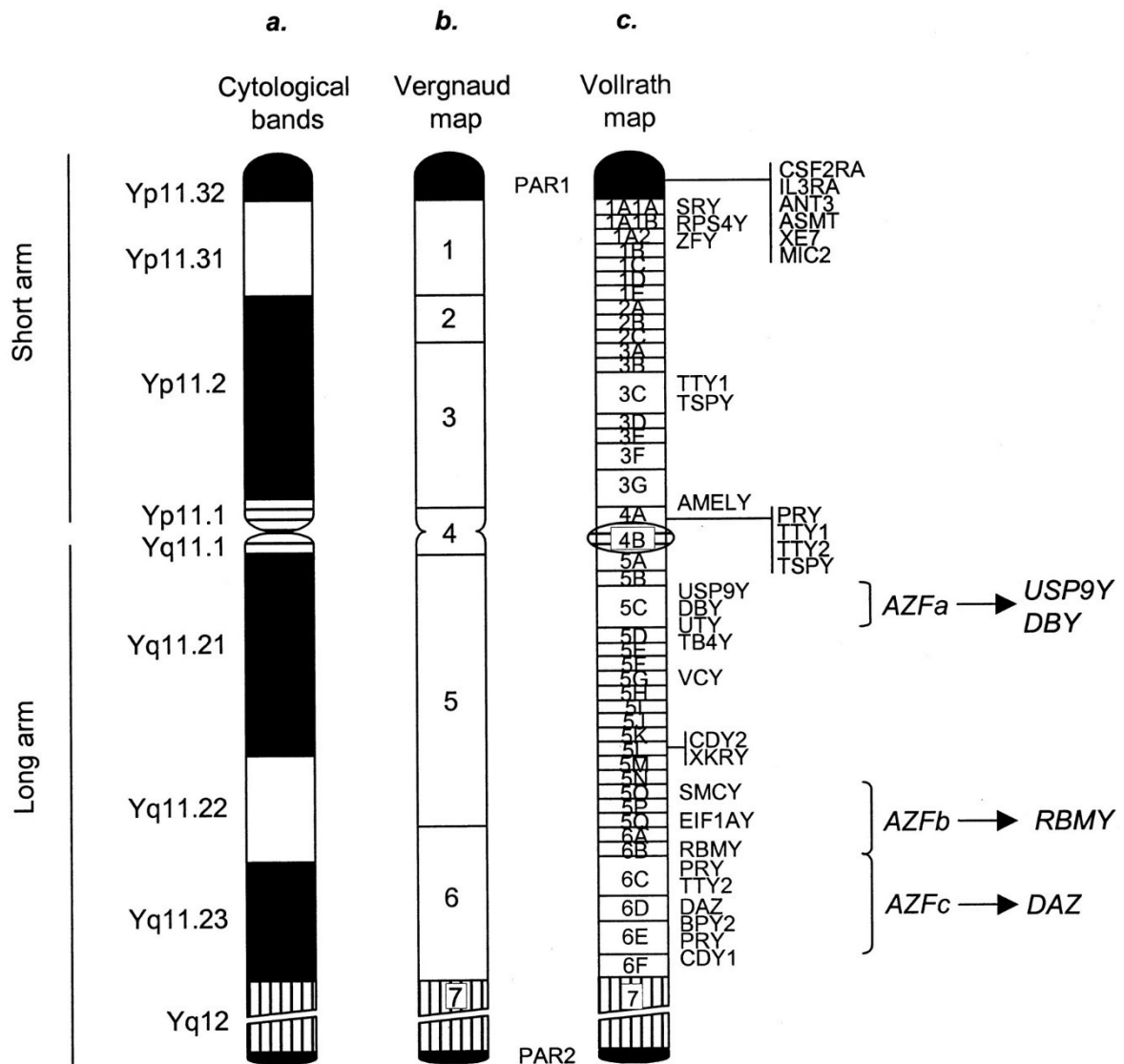


Figura 9: (a) Rappresentazione delle bande citologiche del cromosoma Y. Il braccio corto è chiamato Yp11 e il braccio lungo è Yq11 (regione eucromatica) e Yq12 (regione eterocromatica, a strisce). (b) I sette intervalli della mappa di Vergnaud del cromosoma Y, dove gli intervalli 1–4 coprono il braccio corto e il centromero, gli intervalli 5 e 6 coprono la regione eucromatica e l'intervallo 7 abbraccia la regione eterocromatica. (c) La mappa a 43 intervalli del cromosoma Y (C. Foresta et al., 2001)

Nell'ultimo decennio però la conoscenza della struttura del cromosoma Y è aumentata a dismisura, questo grazie ad una serie di fattori come: lo sviluppo delle tecniche di biologia molecolare, che hanno permesso l'integrazione dei dati citogenetici, dati delle mappe di delezione e dati del sequenziamento del DNA. Come accennato inizialmente si hanno due regioni PAR all'estremità e una regione centrale denominata NYR. Per quanto riguarda le regioni pseudoautosomiche, PAR1 e PAR2, esse vengono descritte come brevi regioni di omologia tra i cromosomi X e Y dei mammiferi. PAR1 si trova sulla punta del braccio p e PAR2 sulla punta del braccio q. A causa della diversità delle sequenze genetiche dei cromosomi X e Y, non subiscono l'accoppiamento durante la meiosi, ad eccezione delle regioni in PAR che si accoppiano e si ricombinano con i PAR nel cromosoma X durante la meiosi. Tuttavia, la ricombinazione e l'accoppiamento dei PAR è temporalmente e geneticamente distinta da quella del resto del genoma. (53) Cinque Kb prossimalmente alla regione PAR dell'Yp è localizzato il gene SRY (sex-reversal-Y-"Regione determinante il Sesso sul cromosoma Y") che produce il "fattore di differenziazione testicolare (TDF)", in grado di guidare lo sviluppo della gonade maschile nell'embrione. L'SRY appartiene alla famiglia dei geni SOX (ha omologia con SOX3), molti dei quali sono coinvolti nei processi di sviluppo durante l'embriogenesi. (49) Nel complesso il 95% del cromosoma è occupato

dalla NYR, nella quale non avvengono scambi con altri cromosomi durante la meiosi. Recenti studi hanno però dimostrato che questa regione è sede di un'intensa attività di ricombinazione intracromosomica tra sequenze altamente omologhe. Questa regione è stata rinominata "Male Specific Region" (MSY) e copre l'intero cromosoma Y ad eccezione delle regioni PAR. (54) Essa contiene tre classi di sequenze: X-transposed (con il 99% di identità al cromosoma X), X-degenerate (geni a copia singola o pseudogeni omologhi di geni legati all'X) e sequenze ampliconiche (49). (Fig.14) Durante l'evoluzione i geni MSY sono stati portati al decadimento o alla specializzazione, con funzioni selettivamente vantaggiose per i maschi. Come conseguenza del progressivo decadimento genico, il numero di geni sul cromosoma Y si è estremamente ridotto rispetto al cromosoma X. (55) La regione MSY contiene 156 unità di trascrizione, inclusi 78 geni codificanti per 27 proteine. Per quanto riguarda le sequenze ampliconiche, esse provengono dalla trasposizione sul cromosoma Y di geni appartenenti ad autosomi che, nel corso dell'evoluzione si sono duplicati e/o invertiti. Comprendono 60 geni codificanti e 74 unità di trascrizione non codificanti. Si ricombinano attraverso la conversione genica, ovvero il trasferimento non reciproco di informazioni di sequenza, che avviene tra sequenze duplicate all'interno del cromosoma. Esse sono caratterizzate da coppie di sequenze che mostrano un'identità quasi completa (>99,9%) con una

o più regioni su MSY e sono divise in otto blocchi organizzati in palindromi. Questa identità quasi totale è appunto dovuta al processo di conversione genica. (Fig.10) Per quanto riguarda invece il processo di specializzazione nelle funzioni riproduttive maschili, la maggior parte dei geni, che hanno un ruolo previsto nella spermatogenesi, sono mappati infatti proprio in queste sequenze ampliconiche.

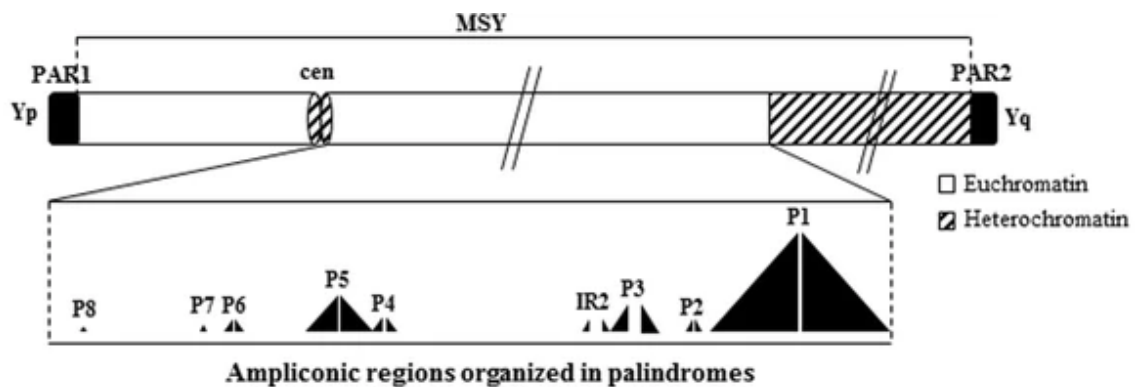


Figura 10: *Rappresentazione schematica della regione MSY nel cromosoma Y e delle sequenze ampliconiche organizzate in otto blocchi palindromi (Krausz, C. et al., 2017)*

I geni MSY con un ruolo previsto nella spermatogenesi sono classificabili in due categorie: geni a copia singola e geni multicopia ampliconici. I geni appartenenti alla prima categoria hanno un omologo a singola copia sul cromosoma X . Per quanto riguarda invece i geni MSY multicopia essi sono mappati nelle regioni ampliconiche e sono divisi in nove famiglie geniche (TSPY, VCY, XKRY, CDY, HSFY, RBMY, PRY, BPY2, DAZ), otto delle quali si trovano su Yq e una su Yp. Ad eccezione di due geni (*BPY2* e *PRY*), gli altri hanno o un omologo autosomico (*CDY/CDYL* e *DAZ/DAZL*) o un omologo legato all'X. (56) (Fig.11)

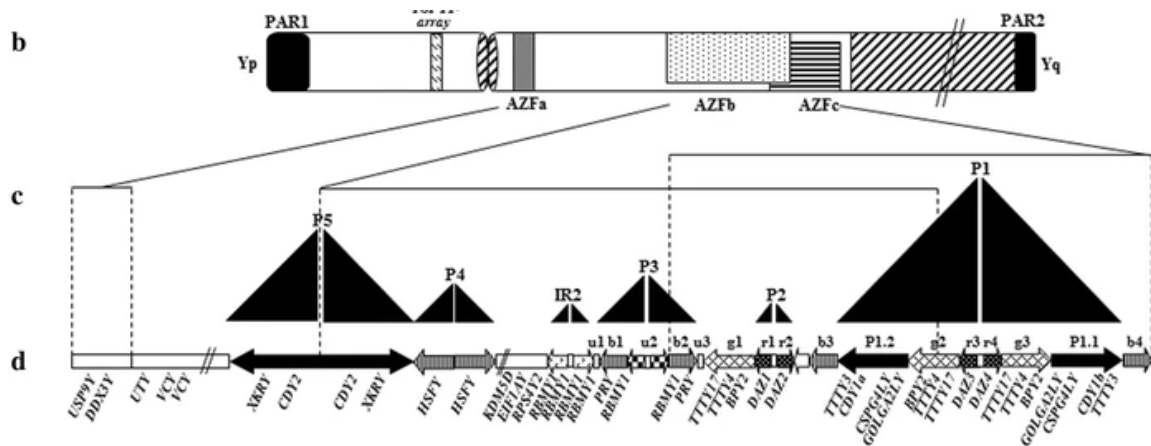


Figura 11: Rappresentazione schematica del cromosoma Y con focus sulle diverse regioni e geni coinvolti nella spermatogenesi (Krausz, C. et al., 2017)

1.8 Azoospermia factor (AZF)

Con il termine di azoospermia si intende la completa mancanza di spermatozoi nel liquido seminale. Essa è identificata in circa l'1% di tutti gli uomini e nel 10-15% dei maschi infertili. (57) Sono presenti due forme di azoospermia, quella ostruttiva e quella idiopatica. Nella prima, la spermatogenesi risulta essere normale e solitamente vi è una presenza abbondante di spermatozoi nell'epididimo e nei tubuli seminiferi testicolari. Essa può essere dovuta a vasectomia, interruzione dei vasi deferenti assenza bilaterale dei vasi deferenti o dell'epididimo post-chirurgica o da infezioni epididimali. La seconda invece è dovuta ad importanti difetti nella produzione di spermatozoi che vengono comunemente definiti come: arresto maturativo ipospermatogenesi o sindrome da sole cellule del Sertoli. L'epididimo di questi pazienti è solitamente privo di spermatozoi. (58) Nel 1976 Tiepolo e Zuffardi si soffermarono sullo studio di 6 uomini azoospermici e notarono che vi erano importanti delezioni a livello del cromosoma Y, che includevano la regione eterocromatica (Yq12) ed una porzione indefinita della parte eucromatica (Yq11). Essi furono quindi i primi a riconoscere il legame tra delezioni del cromosoma Y e infertilità maschile. (59) Successivamente ipotizzarono quindi che dovesse esserci un fattore genetico localizzato in Yq, importante per lo sviluppo delle cellule germinali maschili. Definirono quindi questa regione mancante col termine di

“AZOOSPERMIA FACTOR” (o AZF region). Grazie alle modifiche apportate da Vollrath si è poi potuto localizzare l’AZF nell’intervallo 6 della banda Yq11.23, usando campioni di cromosomi Y deleti. (60) (Fig.12) Queste delezioni submicroscopiche di Yq vengono chiamate microdelezioni, perchè sono delezioni molto piccole che non evidenziate con l'esame classico del cariotipo. Possono essere identificate attraverso l’utilizzo di marker specifici come le STS (Sequence Target Sites) e l’eventuale delezione può essere evidenziata attraverso la PCR, che sarà quindi caratterizzata da una mancata amplificazione. (Fig.13) Con l’avvio di queste analisi ci si accorse in realtà che l’ipotesi iniziale, secondo cui era presente un singolo locus per la spermatogenesi, era così errata. Esistono infatti altre regioni non ricombinanti, che possono essere delete negli individui infertili. La regione AZF è stata quindi suddivisa in senso prossimo-distale in tre regioni non sovrapposte, indicate come AZFa, AZFb e AZFc. (61) Tali regioni contengono geni ed unità trascrizionali, la maggioranza dei quali presenta un'espressione specifica testicolare.

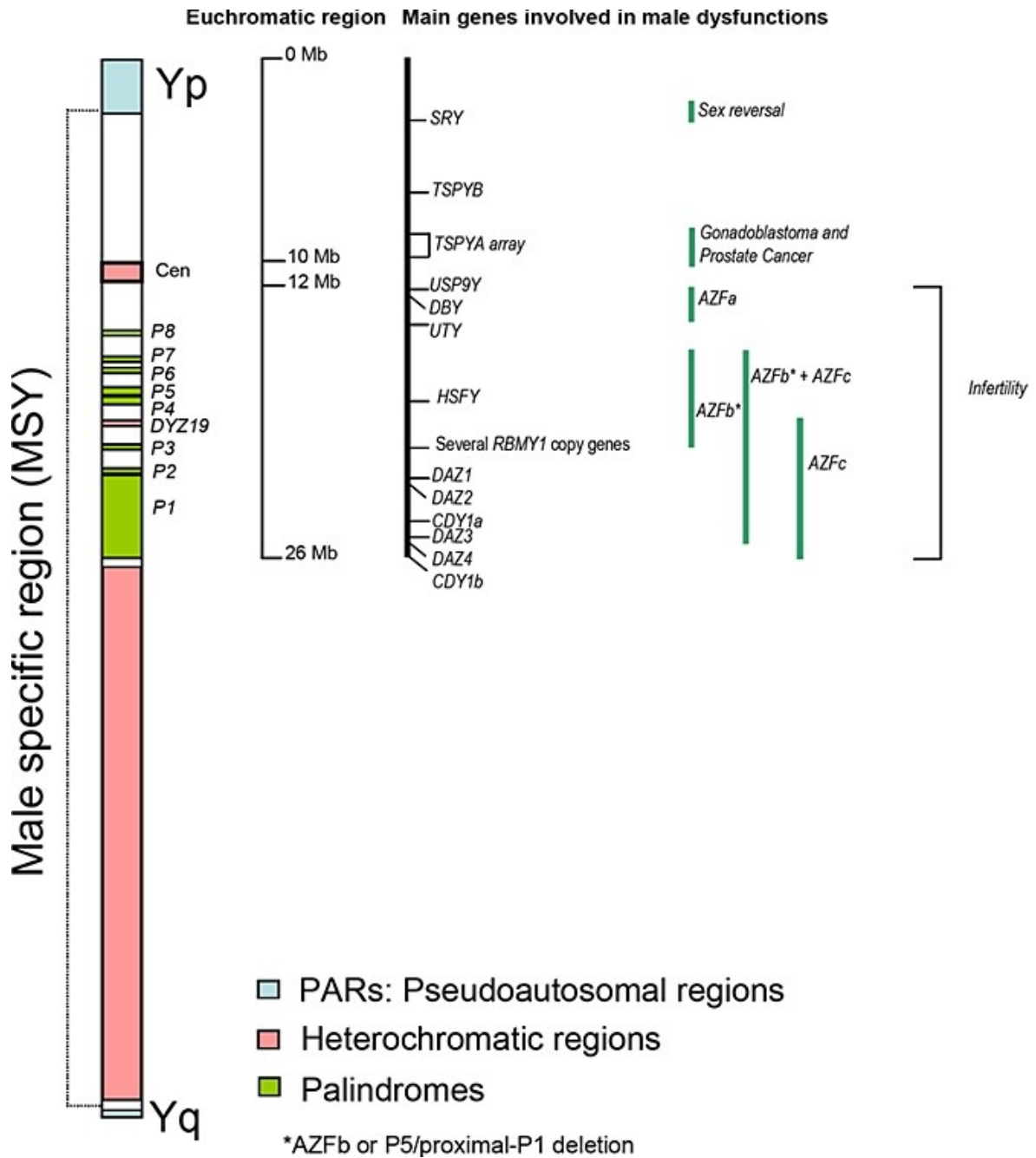


Figura 12: Visualizzazione schematica del cromosoma Y umano che mostra le regioni pseudo-autosomiche (PAR), la regione specifica maschile (MSY o NRY), le regioni eterocromatiche, i principali geni sulla regione euromatica e le regioni associate alle disfunzioni maschili (de Carvalho CM et al.,2005)

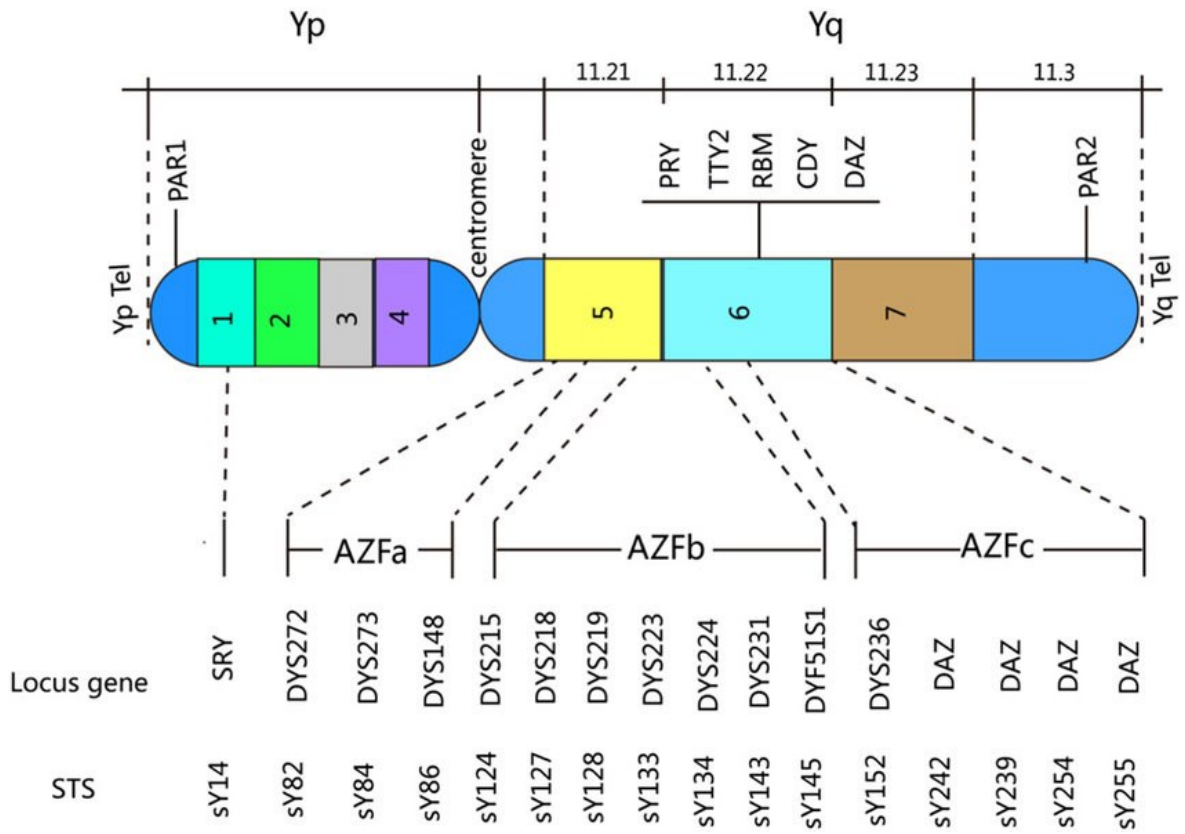


Figura 13: Focus delle principali STS utilizzate nello screening delle microdelezioni (Yuanchang Z. et al., 2015)

1.8.1 Descrizione delle regioni di AZF

Le microdelezioni dell'Yq determinano una grave testicolopatia che va dall'oligozoospermia severa all'azoospermia, esse coinvolgono una o più regioni AZF. Ciascun tipo di microdelezione insorge con frequenza diversa nella popolazione ed è associata a quadri clinici distinti di anomalie della spermatogenesi. La microdelezione più frequente è quella della regione AZFc (60%), seguono poi le delezioni della regione AZFb (16%). Nel complesso quelle che coinvolgono AZFb (AZFb, AZFb+c e AZFa+b+c) rappresentano il 35%. Le delezioni della regione AZFa invece sono estremamente rare (5%).

(62)

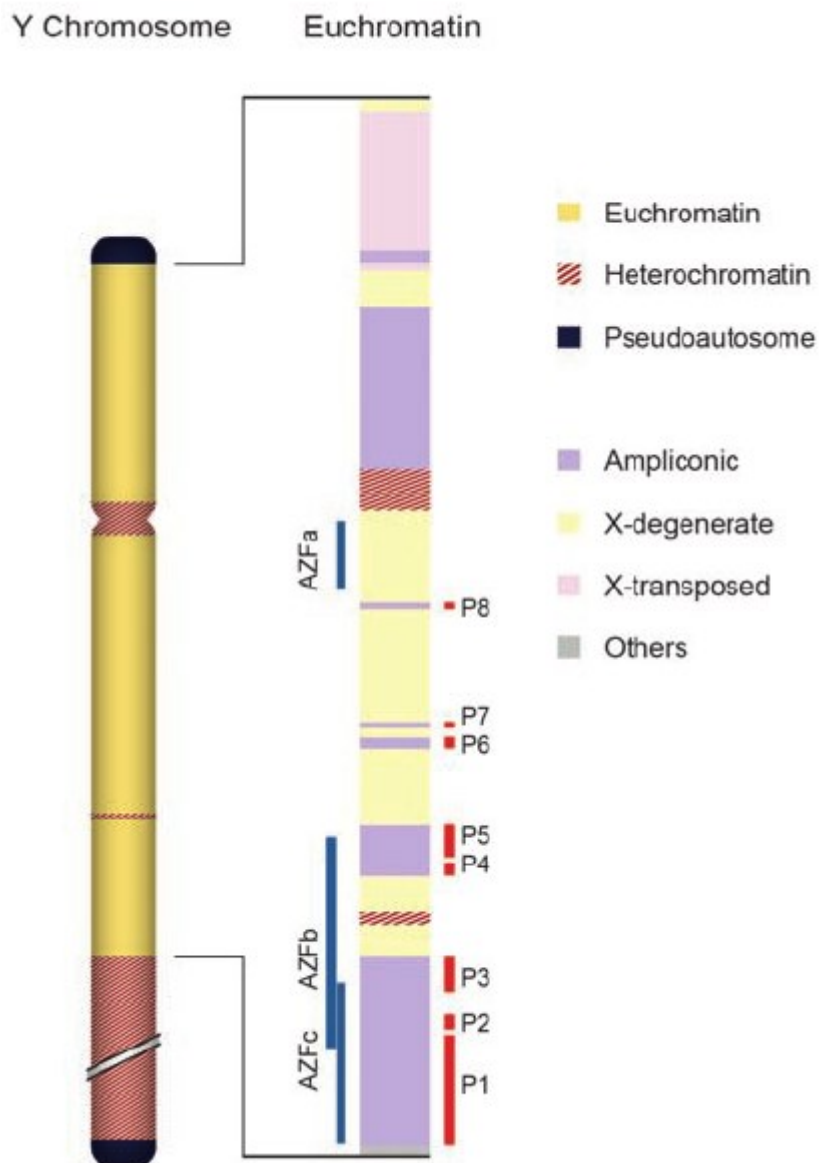


Figura 14: *Rappresentazione delle tre regioni AZF sull'eucromatina del cromosoma Y. La regione AZFa è localizzata nella regione X-degenerata, tutti i geni dell'AZFc sono localizzati sulla regione ampliconica; i geni dell'AZFb sono localizzati sia sulla regione ampliconica che sulla regione X-degenerata (Yuanchang Z. et al., 2015)*

Si parte dalla regione AZFa. Delezioni a suo carico si trovano raramente tra i maschi infertili, ma di solito presentano conseguenze più gravi rispetto alle delezioni AZFc. Questa regione si estende per circa 800 kb (63) di Yq ed è mappata prossimalmente al centromero. E' localizzata nella porzione prossimale dell'intervallo di delezione 5, sottointervallo 5c. (Fig. 9) L'AZFa codifica solo geni a copia singola ed è costituito esclusivamente da questo tipo di geni, essi sono espressi in modo ubiquitario nel cromosoma X con omologhi che sfuggono all'inattivazione. (Fig.14) Quattro geni sono stati mappati su AZFa: DFFRY (Drosophila development fat facetes), DBY (dead box Y), UTY (ubiquitous TPR motif Y) e TB4Y (Y isoform thymosin B4). (50) Precedentemente noto come DFFRY o Drosophila fat facets related Y, USP9Y è stato il primo gene identificato nella sottoregione AZFa, con una lunghezza di 170 kb, è costituito da 46 esoni (64). Questo gene codifica per un grande polipeptide di 2555 amminoacidi che ha una dimensione di circa 300 kDa e appartiene alla famiglia C19 cisteina peptidasi, con attività proteasica specifica dell'ubiquitina. USP9Y regola il turnover proteico prevenendo la degradazione delle proteine da parte del proteasoma attraverso la rimozione dell'ubiquitina dai coniugati proteina-ubiquitina (65) e stabilizza anche le proteine bersaglio de-ubiquitinate, svolgendo così un ruolo importante nello sviluppo delle cellule germinali nei maschi. (66) USP9Y è ubiquitariamente espresso nei tessuti

adulti ed embrionali e condivide il 91% di identità con il suo omologo X (USP9X) , che sfugge all'inattivazione dell'X ed è anche espresso in molti tessuti. L' USP9Y è uno dei geni candidati dell'AZFa in quanto esistono uomini infertili con delezione o mutazione in USP9Y (67). Tuttavia, confutando questo punto di vista, sono disponibili anche prove che descrivono le delezioni di USP9Y negli uomini con conta spermatica normale (68) suggerendo che USP9Y non è essenziale per la normale produzione di spermatozoi e fertilità nei maschi. L'USP9Y occupa meno della metà dell'intervallo AZFa, mentre la maggior parte dei soggetti infertili che hanno delezioni dell'AZFa mostrano assenza dell'intero intervallo. Queste scoperte suggeriscono che altri geni, singolarmente o in combinazione con l'USP9Y, possono alterare la spermatogenesi nei pazienti deleti nell'AZFa. Sono stati descritti solo pochi casi di pazienti con delezioni chiaramente limitate alla regione AZFa e su questa base sembra che la mancanza dell'USP9Y causi sterilità maschile e che la perdita aggiuntiva del DBY (dead box on the Y) possa peggiorare il fenotipo. (25) Quest'ultimo invece, noto anche come DDX3Y, è stato identificato per la prima volta da Lahn e Page (69) nella regione 5C del braccio lungo del cromosoma Y nella posizione citogenetica Yq11.21. DBY , che si estende per 15,5 kb, consiste di 17 esoni e codifica per un'elicasi di RNA dead-box conservata ATP-dipendente che è espressa solo nelle cellule germinali, con una

presunta funzione nella fase G1-S del ciclo cellulare. (70) DBY ha un omologo sul cromosoma X, DBX ed è stato riportato che entrambi questi geni hanno una somiglianza di sequenza > 95% pur essendo espressi in due diversi stadi della linea cellulare germinale maschile. Mentre l'espressione della proteina DBY è limitata alle sole cellule germinali maschili pre-meiotiche, la proteina DBX è espressa negli spermatidi post-meiotici e in più tessuti somatici. L'analisi della delezione per la regione AZFa nei maschi infertili ha rivelato che i maschi privi di DBY mostrano o la sindrome delle sole cellule di Sertoli (SCOS) o una grave ipospermatogenesi, suggerendo che la DBY gioca un ruolo chiave nel processo spermatogenico. (71) Per quanto riguarda invece il ruolo dei due geni UTY e TB4Y, non si hanno ancora certezze riguardo il loro coinvolgimento delle funzioni testicolari.

La regione AZFb si trova nella regione centrale di Yq11 (intervalli 5M-6B) e si estende su 3,2 Mb di cui 1,5 Mb si sovrappongono con AZFc. (Fig.9) Contiene: la famiglia di geni RBMY (RNA binding motif), i geni CDY (chromodomain Y), XKRA (XK-related Y), SMCY (selected mouse cDNA of the Y) e EIF1AY (eukaryotic translation initiation factor 1A). Il gene RBMY è uno dei geni più importanti della regione AZFb, con circa sei copie disperse all'interno del cromosoma Y. (72) E' espresso esclusivamente nel testicolo e la proteina codificata è presente nei nuclei delle cellule germinali a partire dagli

spermatogoni fino agli spermatidi e si pensa che sia coinvolta nei processi di splicing. L'RBM1Y è presente in multicopie in tutti i mammiferi euteri (placentari). Le proteine codificate dall'RBM1Y sono formate da un singolo dominio di legame all'RNA, indicato come RRM (RNA Recognition Motif) che è situato all'estremità N-terminale e un dominio C-terminale che comprende 4 ripetizioni in tandem di 37 aminoacidi chiamati SRGY box, perché formato da una sequenza serina-argininaglicina-tirosina. L'RBM1Y, a causa della sua natura multicopia, è un gene difficile da studiare e quindi ancora oggi non è chiaro il suo ruolo nella spermatogenesi umana. In ogni caso esso è il gene di maggior interesse nelle microdelezioni della regione AZFb, vista la sua esclusiva espressione a livello testicolare. (73) Il gene EIF1AY invece codifica per eIF-1A, un fattore essenziale per l'inizio della trascrizione, che ha un omologo sul cromosoma X. Esso non è tessuto specifico ma, presentando un abbondante trascritto a livello testicolare, si pensa possa essere coinvolto nel determinare il fenotipo del gene AZFb. (74) Il gene CDY si trova localizzato nel subintervallo 5L dell'Yq, è un gene multicopia che si esprime in maniera specifica nel testicolo. Esso codifica trascritti ubiquitari. (75) Il gene XKRY è un gene multicopia che si esprime solo nel testicolo. (76) Infine il gene SMCY occupa il subintervallo 5O dell'AZF, è un gene a singola copia e codifica per

un antigene (H-Y) coinvolto nel complesso dell'istocompatibilità del maschio.

(77)

Infine la regione AZFc. Essa si trova nella parte distale dell'intervallo di delezione 6 (sottointervalli 6C-6E) sul cromosoma Y. (Fig.9) Mentre le regioni AZFa e AZFb sono essenziali per iniziare la spermatogenesi, la regione AZFc è essenziale per completare il processo della spermatogenesi. L'AZFc è la regione più comunemente deleta del locus AZF negli uomini infertili. (78) La regione AZFc si estende su 4,5 Mb e codifica per 21 geni candidati e 11 famiglie di unità di trascrizione che sono espresse esclusivamente nel testicolo.

(79) Presenta sottointervalli di delezione: AZFc prossimale (AZFd), AZFc medio e AZFc distale. Essa è formata da molte sequenze ripetute, che la rendono particolarmente suscettibile a delezioni, come la delezione b2/b4, che elimina interamente la regione AZFc ed è la principale causa genetica di fallimento spermatogenetico. Recentemente è stata descritta un altro tipo di delezione chiamata "gr/gr" (g1/g2, r1/r3, r2/r2). (80) (Fig.15)

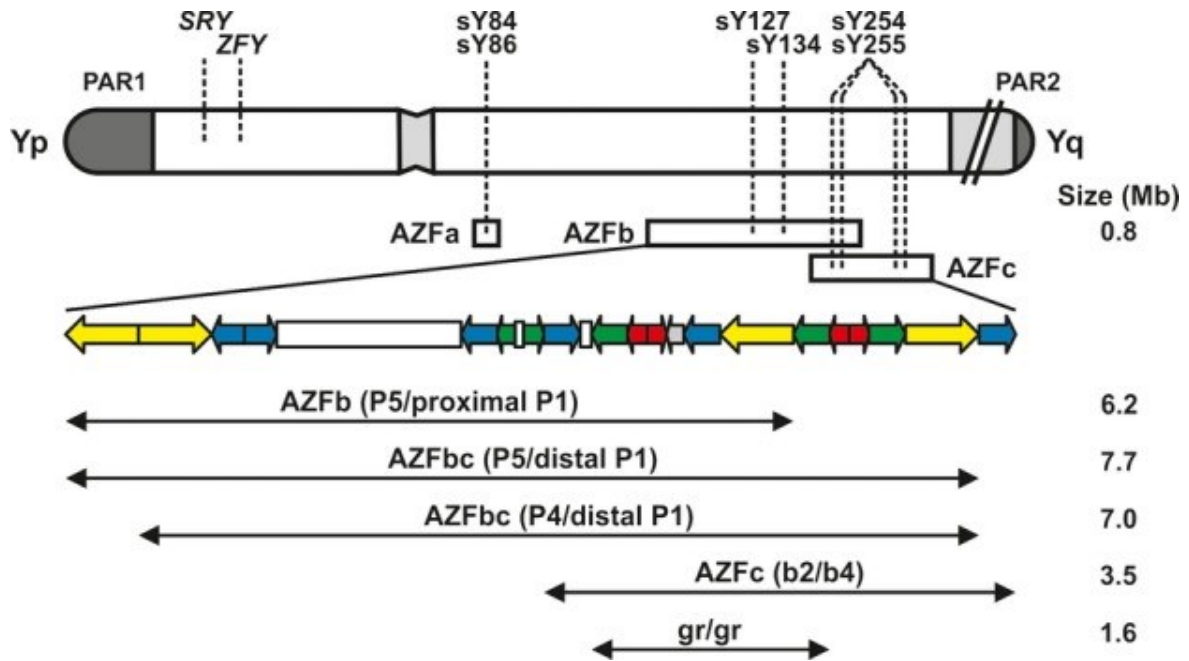


Figura 15: Rappresentazione schematica del cromosoma Y e dell'attuale modello di microdelezione. La delezione AZFc (b2/b4) è di gran lunga il tipo più frequente (~80%) di microdelezioni del cromosoma Y riscontrate negli uomini con grave oligo/azoospermia. (Krausz, C. et al., 2014)

L'intera regione AZFc contiene il cluster di geni DAZ, almeno due copie dei geni PRY (PTP-BL related Y), TTY2 (testis transcript Y2), BPY2 (basic protein Y2), e copie aggiuntive di RBM e CDY. DAZ è stato il primo gene candidato ad essere isolato dal locus AZFc ed è stato originariamente identificato come un gene frequentemente deletato sul cromosoma Y dei maschi infertili (81). Successivamente è stato scoperto che la regione AZFc conteneva duplicazioni palindromiche di DAZ come due cluster di quattro geni, DAZ 1 e

2 e DAZ 3 e 4. (82) Le quattro copie DAZ sono espresse negli spermatogoni e codificano una proteina legante l'RNA. Quest'ultima è importante per la spermatogenesi e questi geni sono espressi in tutte le fasi dello sviluppo delle cellule germinali. Utilizzando cellule staminali embrionali umane, è stato dimostrato che i geni della famiglia DAZ funzionano nella formazione delle cellule germinali e nella progressione meiotica. Tutti i geni della famiglia DAZ sono quindi essenziali per lo sviluppo delle cellule germinali. (83) Come i geni RMBY, anche i geni DAZ contengono un motivo di riconoscimento dell'RNA (RRM). Esso è espresso nel citoplasma delle cellule germinali testicolari pre-meiotiche, in questo modo questi geni risultano candidati per il mantenimento delle popolazioni di cellule staminali germinali. (84) La delezione di DAZ rappresenta il 10% dei casi di maschi con difetti spermatogenici. I maschi infertili che mostrano una perdita di copie dei geni DAZ sono altamente predisposti all'azoospermia o all'oligozoospermia grave. (85) Il PRY invece è un gene multicopia localizzato nel braccio corto (subintervallo 4A) e lungo (subintervallo 6B) del cromosoma Y. Si esprime esclusivamente nel testicolo. Il TTY2 è localizzato nel subintervallo 6C del cromosoma Y. E' un gene multicopia che si esprime esclusivamente a livello testicolare. Il BPY2 si trova nel subintervallo 6E. E' stato rinominato VCY (variable charge Y). (86) Infine VCY è espresso solo nel testicolo e codifica

per una piccola proteina carica positivamente dalle funzioni sconosciute. Copie di questo gene sono presenti sia sul cromosoma Y che sul cromosoma X, dove prende il nome di VCX. (50)

L'ultimo aspetto importante riguarda invece la correlazione genotipo-fenotipo associata ad ogni singola delezione. (Fig.16) Le delezioni dell'intera regione AZFa causano inevitabilmente la SCOS, ovvero la sindrome delle sole cellule del Sertoli (assenza totale di cellule germinali nei tubuli seminiferi) e l'azoospermia. (87) Poiché i geni all'interno del locus AZFa sono espressi nelle cellule germinali in fase prenatale, è possibile quindi che la perdita di questi geni possa causare la morte delle cellule germinali causando SCOS. (88) Per quanto riguarda le delezioni parziali invece, esse sono associate a fenotipi che vanno dall'azoospermia alla normozoospermia. Ciò indica quindi che la quantità di contenuto genetico che va perso è determinante. (89) Una delezione completa della regione AZFa implica quindi l'impossibilità di recuperare gli spermatozoi testicolari attraverso l'ICSI, iniezione intracitoplasmatica di spermatozoi. I geni nel locus AZFb favoriscono invece la crescita e la maturazione degli spermatozoi e sono considerati fondamentali per lo sviluppo degli spermatozoi durante la meiosi nella spermiogenesi. I pazienti con delezioni della regione AZFb hanno un fenotipo testicolare di arresto della maturazione, solitamente nello stadio di spermatociti, con assenza di cellule

germinali post-meiotiche nella maggior parte dei tubuli. (90)

L'ipospermatogenesi è frequentemente osservata nei campioni con delezione parziale di AZFb/b + c, ma si osservano casi più severi nei campioni con delezione completa di AZFb e AZFb+c. Esse indicano che le delezioni di AZFb causano azoospermia determinata da un quadro istologico di arresto della spermatogenesi (SGA) (91) Il fenotipo di arresto della maturazione, causato dalle delezioni di AZFb, deriva molto probabilmente da un'associazione tra disgregazione genetica e difetti strutturali del cromosoma. (92) Gli uomini con delezioni AZFc hanno invece il fenotipo più variabile, che può andare dall'azoospermia completa all'oligozoospermia lieve (93) . Solitamente i testicoli degli uomini, che presentano delezioni AZFc, hanno spermatidi allungati ed in questo caso lo sperma può essere recuperato, anche in quantità ragionevoli. Nella maggior parte degli uomini con delezione AZFc, la spermatogenesi è completata, ma non totalmente, motivo per cui è presente oligozoospermia (94). Dall'analisi del seme è emerso che le delezioni complete di AZFc sono associate a una drastica riduzione del numero di spermatozoi e la maggior parte dei maschi con delezione di AZFc sono gravemente oligozoospermici, se non azoospermici (95). Nonostante esse siano meno patogene, è però emerso che in alcuni uomini con microdelezioni di AZFc vi è un progressivo declino della conta spermatica e il paziente passa così

dall'oligozoospermia alla sua forma grave o addirittura diventa azoospermico.(96) Ciò implica quindi un peggioramento temporaneo sia nel numero che nella qualità dello sperma. Gli uomini con delezione AZFc devono avere quindi la possibilità della crioconservazione del seme, per prevenire tecniche invasive, come TESA, nelle fasi successive della vita. La regione AZFc è più vulnerabile alle delezioni, essendo composta da sequenze ripetute e palindromi. Una delezione completa di AZFc coinvolge la regione b2/b4 la quale contiene 12 geni e unità trascrizionali in più numeri di copie. (97) Oltre a b2/b4, il locus AZFc ha molte delezioni parziali che includono b1/b3 (1,6 Mb), b2/b3 (1,8 Mb) e gr/gr (1,6 Mb). Le delezioni parziali portano quindi a variazioni estese del numero di copie nell'AZFc, che potrebbero alterare le quantità della proteina prodotta, influenzando così la spermatogenesi. (98) Una stretta correlazione tra genotipo e fenotipo è invece abbastanza certa quando la delezione coinvolge tutta la regione AZF (AZFa-b-c): in questi casi si osserva sempre una sindrome a sole cellule del Sertoli.

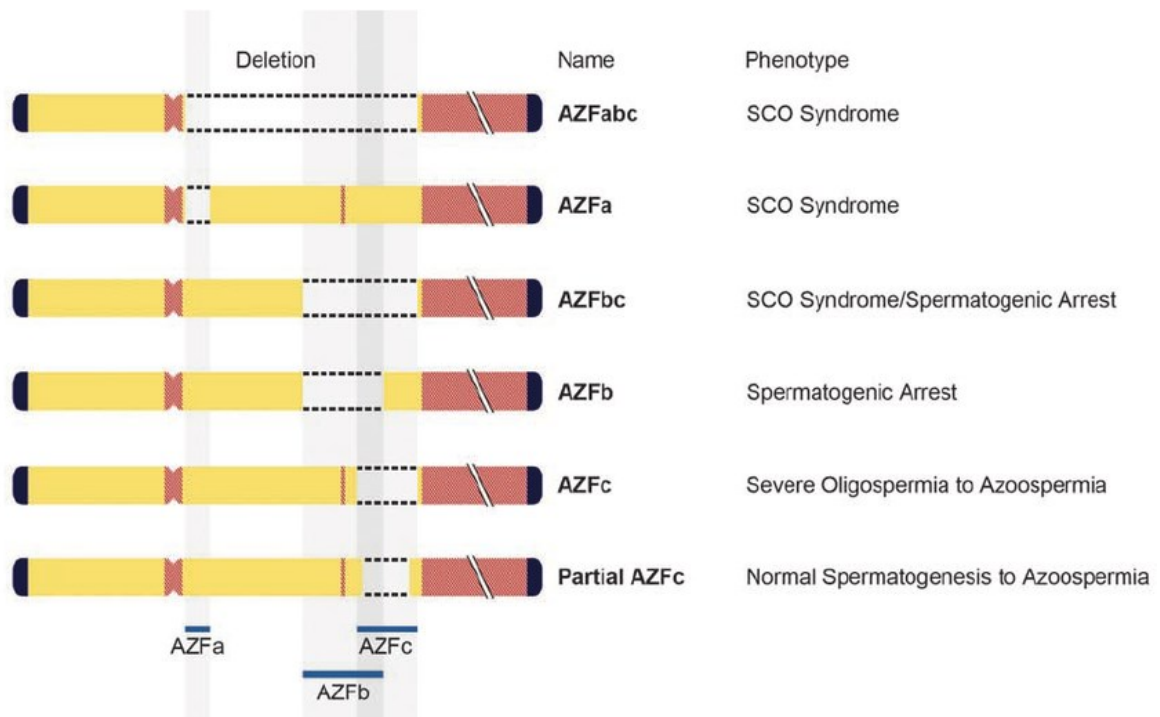


Figura 16: *I modelli di delezione più comuni sono le delezioni AZFc e parziali AZFc. Le delezioni parziali nell'AZFc hanno diverse forme con diversi fenotipi in ciascuna popolazione. AZFa parziale e AZFb sono le altre condizioni rare. (Hossein S. N. et al., 2007)*

1.8.2 Analisi del meccanismo di delezione

Grazie alla completa conoscenza della regione MSY del cromosoma Y, è ormai noto come l'elevata presenza di sequenze ripetute, sia essa stessa la causa dell'insorgenza delle microdelezioni, nonché della particolare instabilità del cromosoma. Le microdelezioni insorgono infatti a causa di un processo di ricombinazione omologa non allelica (NAHR), che avviene tra sequenze ripetute altamente omologhe (ampliconi) che presentano lo stesso orientamento. Considerando l'architettura del MSY, sono quindi possibili tutta una serie di delezioni, alcune più letali di altre. (99) E' stato infatti dimostrato che negli uomini infertili deleti, a livello della regione AZF, i punti di rottura ed il frammento di DNA rimosso sono comuni in ogni tipo di microdelezione. (62) Le due microdelezioni più frequenti, come già accennato, sono quelle che avvengono a livello della regione AZFb e AZFc, in particolar modo quest'ultima. Le delezioni si dividono in totali e parziali. (Fig.15) Partendo dalla regione AZFb si ha che la delezione totale prende il nome di P5/prossimale P1. Questo perché AZFb contiene i palindromi da P2 a P5 e la parte prossimale di P1. La presenza di ampi domini ampliconici consente il verificarsi di riarrangiamenti molto complessi (100). In particolar modo l'intervallo di AZFb, necessario per la maturazione degli spermatociti, si estende dal centro del palindromo P5 al bordo prossimale di P3, all'interno del

cluster RBMY1. Esso contiene oltre 4 Mb con 13 geni codificanti. (101) L'AZFb è soggetto a NAHR con AZFc, causando due frequenti delezioni, una di 6,23 e l'altra di 7,7 Mb. La delezione completa è di 6,23 Mb e corrisponde all'intervallo compreso tra gli ampliconi yel3 e yel1. (102) Questa delezione completa si sovrappone però a 1,5 Mb della porzione prossimale di AZFc e porta alla perdita di almeno 32 geni codificanti (103). La sovrapposizione delle due regioni porta alla formazione anche di microdelezioni parziali: tra P4/P1 distale (7,0 Mb, 38 copie geniche rimosse) e tra P5/P1 distale (7,7 Mb, 42 copie geniche rimosse). (104) (Fig.15 e 17) La regione AZFc invece comprende 12 geni e unità di trascrizione, ciascuno presente in un numero variabile di copie per un totale di 32 copie (98). La classica delezione completa di AZFc, ovvero il pattern più frequente tra gli uomini con delezioni del cromosoma Y, rimuove 3,5 Mb. Essa origina dalla ricombinazione omologa tra gli ampliconi b2 e b4 rispettivamente nei palindromi P3 e P1 e rimuove 21 copie di geni e unità di trascrizione. La lunghezza degli ampliconi b2 e b4 è maggiore rispetto a quella degli altri ampliconi, ciò può essere quindi il motivo della maggior frequenza di questo tipo di delezioni. Questa delezione comprende quattro geni DAZ, con conseguente azoospermia. (100) Le delezioni parziali o sub-delete sono indicate con gr/gr, b1/b3 e b2/b3. La sottodelezione gr/gr rimuove quasi la metà della regione AZFc e può sviluppare diversi fenotipi nelle differenti

popolazioni. Questa elevata variabilità indica la presenza di tutta un'altra serie di fattori che potrebbero essere coinvolti, come l'etnia e i fattori ambientali, che incidono appunto sull'espressione genica. Nonostante vi siano alcuni studi che hanno riconosciuto le delezioni *gr/gr* come un fattore di rischio per la spermatogenesi alterata (105), altri invece non sono riusciti a dimostrare con certezza questa correlazione. (106) La delezione di *b1/b3* causa la rimozione della porzione prossimale di AZFc. Vengono eliminate due delle sei copie di RBMY1, le due copie funzionali di PRY (107), una delle tre copie di BPY2 e due dei quattro geni DAZ. Tuttavia, sono state osservate grandi delezioni, di circa 1,8 Mb, sia in individui fertili normozoospermici (108), sia in uomini azoospermici (109). La delezione di *b2/b3* rimuove quasi la metà della regione AZFc (segmento di DNA di 1,8 Mb) e 12 geni, incluse due copie di DAZ e due copie di BPY. Essa prevede due step: un'inversione tra gli ampliconi *b2* e *b3*, seguita da una ricombinazione tra *g1* e *g3*. Per quanto riguarda *b1/b2*, non è stato invece determinato alcun ruolo diretto sulla spermatogenesi. (110) (Fig. 15 e 17)

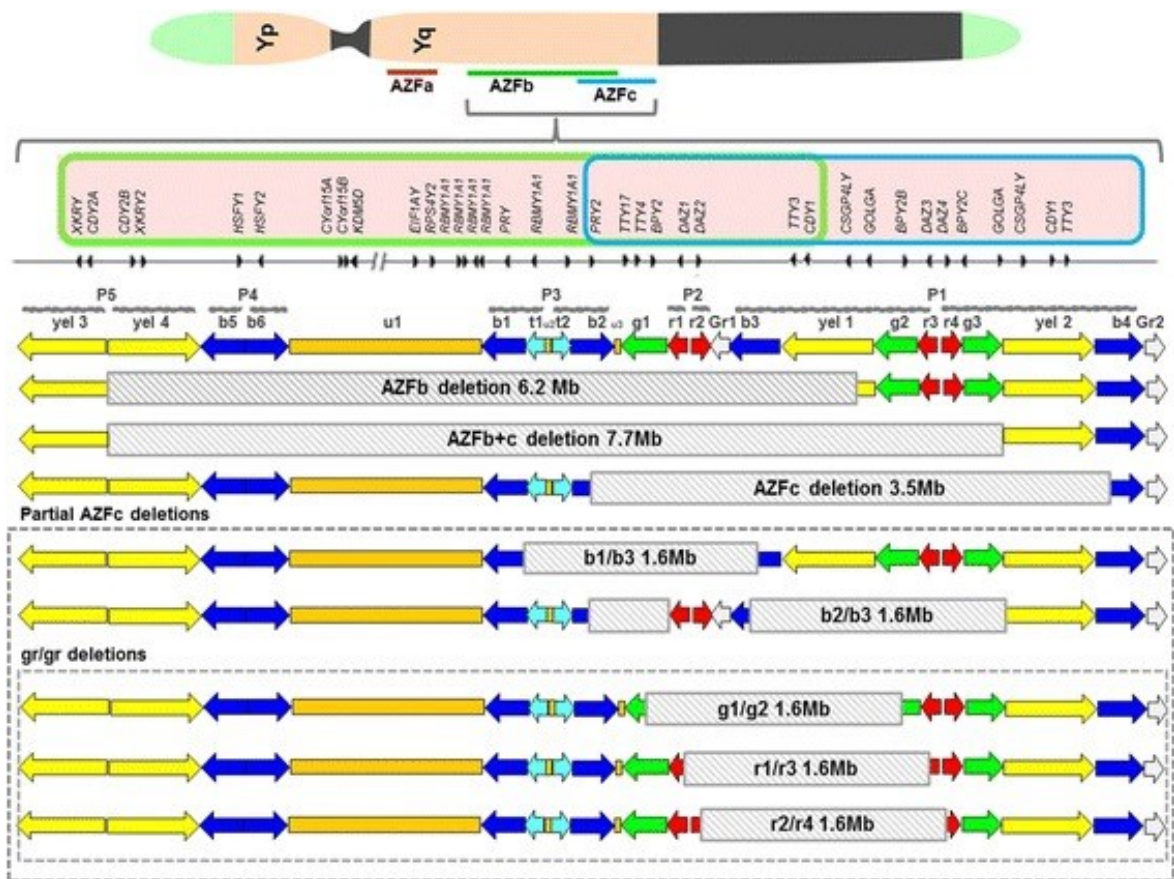


Figura 17: *Organizzazione schematica dei loci AZFb e c che illustra come nascono le varie microdelezioni. Le regioni AZFb e c si trovano nella regione eucromatica su Yq. Entrambe le regioni condividono un certo numero di geni (riquadro rosa), i geni presenti nella regione AZFb sono mostrati nel riquadro verde mentre i geni presenti nella regione AZFc sono presenti nel riquadro blu. Le frecce grigie rappresentano l'orientamento dei geni e le barre grigie rappresentano l'organizzazione degli ampliconi in palindromi (da P1 a P5). I loci AZFb e AZFc sono composti da numerosi tratti di sequenze ampliconiche (frecce a blocchi) che sono annotate come sei famiglie di sequenze codificate*

a colori (giallo, blu, turchese, verde, rosso e grigio) chiamate ampliconi. AZFb è definito dalla delezione P5/proximale P1 (yel3/yel1) che rimuove 6,23 Mb di DNA e AZFc dalla delezione b2/b4 che rimuove 3,5 Mb di DNA. Le delezioni parziali AZFc b1/b3, b2/b3 e le tre varianti delle delezioni gr/gr (g1/g2), (r1/r3) e (r2/r4) (nel riquadro tratteggiato) rimuovono quasi la metà del gene AZFc contenuto. Il blocco ombreggiato rappresenta la posizione esatta della cancellazione. (Colaco S, Modi D. 2018)

1.9 Scopo del lavoro

Alla luce di tutto ciò è possibile quindi affermare come la nostra tesi si focalizzi sullo studio della regione AZF, presente a livello del braccio lungo del cromosoma Y. In particolar modo la nostra attenzione è rivolta alle microdelezioni che avvengono in questa regione. Esse infatti sono rilevate in circa il 13% degli uomini con azoospermia non ostruttiva e nel 5% degli uomini con grave oligozoospermia (conta spermatica inferiore a 5 milioni/mL). (44) Il nostro scopo è quindi quello di effettuare diagnosi molecolari di eventuali microdelezioni del cromosoma Y, al fine di poter stabilire la causa dell'azoospermia/oligozoospermia dei nostri pazienti in esame. La nostra diagnosi molecolare si baserà sull'amplificazione (mediante PCR) di marker specifici come le STS (sequence-tagged sites), che sono presenti a livello delle regioni AZF a/b/c.

Capitolo 2

MATERIALI E METODI

2.1 Raccolta dei campioni

Nel nostro studio sono stati analizzati 62 pazienti di sesso maschile, affetti da oligospermia di vario grado, tutti cariotipicamente normali. Per effettuare le nostre analisi abbiamo però avuto bisogno anche di altre tipologie di pazienti, che potessero fungere da controlli: maschi fertili da utilizzare come controllo positivo e campioni di sesso femminile da utilizzare come controllo negativo. In generale l'analisi molecolare del cromosoma Y non è indicata nei pazienti con anomalie cromosomiche (tranne il cariotipo 46,XY/45,X), azoospermia ostruttiva o ipogonadismo ipogonadotropo. I pazienti sono stati tutti arruolati presso l'ambulatorio Andrologico della Clinica di Endocrinologia (Dipartimento di scienze cliniche e molecolari) dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria Ospedali riuniti di Ancona, nel periodo compreso tra settembre 2022 e maggio 2023. Le analisi genetiche sono state poi effettuate su DNA genomico proveniente da leucociti di sangue periferico, prelevato da ciascun paziente.

2.2 Estrazione del DNA genomico

Il DNA genomico proveniente da leucociti di sangue periferico è stato estratto utilizzando il kit della Qiagen : FlexiGene DNA Handbook. Le estrazioni sono state fatte a partire da 1 ml di sangue intero. Esistono diversi metodi di purificazione degli acidi nucleici, ma tutti si basano su alcuni principi generali: la fase di lisi della cellula o della parete che permette il rilascio del contenuto cellulare e/o nucleare. La fase di separazione degli acidi nucleici dal contenuto cellulare, in particolare dalle proteine (deproteinizzazione), dai lipidi e dai carboidrati. La fase di separazione degli acidi nucleici tra di loro nel caso in cui si voglia ottenere RNA o DNA puro. La fase di recupero degli acidi nucleici purificati (precipitazione alcolica e purificazione). Ed infine la fase di quantificazione e valutazione della purezza. La procedura utilizzata nel nostro caso è la seguente: si parte con l'aggiunta di un tampone di lisi ai nostri campioni. I nuclei cellulari e i mitocondri vengono pellettizzati mediante centrifugazione e risospesi in tampone di denaturazione contenente QIAGEN proteasi. Dopo la digestione delle proteine, il DNA viene precipitato mediante aggiunta di isopropanolo, recuperato mediante centrifugazione, lavato in etanolo al 70% ed essiccato. Il DNA viene risospeso nel tampone di idratazione ed è pronto per l'uso diretto nei test o per la conservazione a -20°C.

2.3 Quantizzazione del DNA

Una volta eseguita l'estrazione del DNA bisogna andarne a valutare la sua concentrazione e purezza. Nel nostro caso abbiamo utilizzato il NanoDrop ND-2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Esso è uno spettrofotometro che consente di determinare la concentrazione e la purezza di campioni di diversa natura come DNA, RNA, proteine e polisaccaridi. È costituito da una parte strumentale e un software, che permette di misurare l'assorbanza alle diverse lunghezze d'onda dei diversi composti: 260 nm per acidi nucleici, 230 nm per i polisaccaridi, 280 nm per le proteine ed infine calcola la concentrazione in ng/μl e la purezza del campione. Una buona estrazione viene considerata tale se si ottiene una concentrazione di minimo 80 ng/μl. Successivamente si calcolano anche altri due parametri che sono il rapporto 260/280 e 260/230. Il rapporto di assorbanza 260/280 è un buon indicatore di contaminazione da proteine: quando $\geq 1,8$, indica un campione di DNA puro. Invece il rapporto di assorbanza 260/230, se inferiore a 1,8, indica una contaminazione probabilmente causata da composti organici o agenti caotropici, che mostrano assorbanza a 230 nm. Nel nostro studio è stato utilizzato 1 μl per ogni campione e 1 μl di tampone di idratazione come bianco. Infine sono state fatte le opportune diluizioni per portare ogni campione ad una concentrazione di 80 ng/μl.

2.4 Multiplex PCR

Dopo aver effettuato correttamente le diluizioni, i campioni vengono sottoposti all'analisi molecolare della regione AZF del cromosoma Y attraverso la reazione polimerasica a catena (PCR) amplificando un set di STS specifico. (Tab.2) Attraverso la PCR andremo infatti ad amplificare in maniera esponenziale sequenze di acido nucleico di nostro interesse. Una condizione essenziale per l'amplificazione, è la conoscenza delle sequenze a monte e a valle del tratto che vogliamo amplificare, in modo tale da poter progettare oligonucleotidi che fungano da primers. La tecnica della PCR prevede l'alternanza ciclica di fasi, differenti per temperatura e durata. (Tab.1) Si parte con una fase iniziale di denaturazione che avviene a 94°C per 5 minuti, alla quale seguiranno poi circa 30-40 cicli, ognuno caratterizzato dalle seguenti fasi:

- Denaturation (denaturazione): nella quale avviene l'apertura della doppia elica del DNA
- Annealing (accoppiamento): i primers si legano alle due estremità del tratto da amplificare. Essa avviene ad una temperatura inferiore a quella di Melting
- Extension (estensione): la DNA polimerasi sintetizza i nuovi filamenti di DNA aggiungendo nucleotidi all'estremità 3'-OH libera

Fase	Temperatura	Durata	Cicli
Denaturazione	94°C	5 minuti	1 ciclo
Denaturazione	94°C	30 secondi	35 cicli
Annealing	60°C	30 secondi	
Estensione	72°C	30 secondi	
Estensione finale	72°C	7 minuti	1 ciclo

Tabella 1: *Profilo termico della PCR*

La reazione di amplificazione è stata condotta in un volume finale di 50 µL, contenente:

- DNA polimerasi: EmeraldAmp®MAX HS PCR Master Mix : 25 µL
- H₂O : 8 µL
- Primer: 2 µL ciascuno
- DNA : 5 µL

La diagnostica delle microdelezioni del cromosoma Y deve essere eseguita mediante PCR multiplex (almeno duplex) del DNA genomico. Il formato multiplex è utile per distinguere un risultato negativo da un guasto tecnico, attraverso l'uso di un controllo interno. I controlli interni utilizzati nel nostro caso sono due: il gene ZFX/ZFY (i primer amplificano un frammento unico rispettivamente nel DNA maschile e femminile) e il gene SRY, incluso

nell'analisi come controllo per il fattore determinante il testicolo sul braccio corto del cromosoma Y. Oltre ai controlli interni, bisogna utilizzare sia un controllo positivo che uno negativo. Essi devono essere eseguiti in parallelo con ciascun multiplex, ovvero con ogni serie di primer. I controlli positivi e negativi appropriati sono rispettivamente un campione di DNA di un uomo con spermatogenesi normale e di una donna. Infine si ha un campione d'acqua, che funge da controllo per la contaminazione. Esso contiene tutti i componenti di reazione ad eccezione del DNA e deve essere eseguito con ciascun set di primer. Per quanto riguarda invece la fase di analisi vera e proprio, è oggi ormai noto che essa deve essere eseguita almeno su due loci STS in ciascuna regione, questo rafforza infatti l'accuratezza diagnostica. Sono presenti infatti delle *Linee guida* da poter seguire, nelle quali sono elencati i set di primer che non devono mancare nelle analisi di microdelezioni. Essi sono:

- Per AZFa: sY84, sY86
- Per AZFb: sY127, sY134
- Per AZFc: sY254, sY255

I primer utilizzati nella nostra analisi sono riportati nella Tabella seguente.

(Tab.2)

STS	AZF	PRIMER F	PRIMER R	BASE PAIR
sY 84	AZFa	AGA AGG GTC TGA AAG CAG GT	GCC TAC TAC CTG GAG GCT TC	326
sY 86	AZFa	GTG ACA CAC AGA CTA TGC TTC	ACA CAC AGA GGG ACA ACC CT	320
sY 127	AZFB	GGC TCA CAA ACG AAA AGA AA	CTG CAG GCA GTA ATA AGG GA	274
sY 134	AZFB	GTC TGC CTC ACC ATA AAA CG	ACC ACT GCC AAA ACT TTC AA	301
sY 254	AZFc	GGG TGT TAC CAG AAG GCA AA	GAA CCG TAT CTA CCA AAG CAG C	400
sY 255	AZFc	GTT ACA GGA TTC GGC GTG AT	CTC GTC ATG TGC AGC CAC	126
sY 158	AZFc	CTC AGA AGT CCT CCT AAT ATT	ACA GTG GTT TGT AGC GGG CTA	231
sY 152	AZFc	TAC AGT CGG ACG CGT CCC TCA AGA CAG TCT GCC ATG TTT GCA	CTG GTC CGT ACT ACC GTG CGA CAG GAG GGT ACT TAG CAG	165
SRY	Controllo	GAA TAT TCC CGC TCT CCG GA	GCT GGT GCT CCA TTC TTG AG	472
ZFY	Controllo	ACC RCT GTA CTG ACT GTG ATT ACA	GCA CYT CTT TGG TAT CYG AGA AAG T	495

Tabella 2: *Elenco dei primer utilizzati (111) (112)*

2.6 Elettroforesi su gel d'agarosio

Una volta avvenuta l'amplificazione dei nostri campioni si prosegue con l'ultimo step della nostra analisi che consiste nella corsa elettroforetica su gel d'agarosio. Questa tecnica sfrutta le cariche presenti nelle molecole di DNA (caricate negativamente) per farle migrare, in un campo elettrico, attraverso un gel di agarosio. Il gel funge da setaccio. Esso infatti è costituito da una rete di pori, i quali consentono di separare le molecole in base alla loro grandezza: quelle più piccole attraversano più velocemente i pori rispetto a quelle più grandi. Con l'elettroforesi si va quindi a separare le molecole di DNA in funzione sia della loro dimensione, sia della loro carica. L'agarosio è un polisaccaride lineare e neutro formato da unità di D-galattosio e di 3,6-anidro-L-galattosio legate alternativamente con legami glicosidici. L'agarosio è uno zucchero solubile in acqua alla temperatura di ebollizione. Man mano che si raffredda esso solidifica, formando una matrice, grazie alla formazione di legami a idrogeno tra le catene lineari. Nel nostro caso la sospensione per la formazione del gel è stata preparata utilizzando agarosio in polvere in quantità tale da avere un gel alla concentrazione del 2%. (2 gr di agarosio) Successivamente questo è stato disciolto in 100 ml di buffer TAE (Tris-acetato 40 Mm, EDTA 1 mM), che consente la separazione delle cariche. Alla fine è stato aggiunto GelRed (8) , un colorante fluorescente , che intercalandosi tra le

basi del doppio filamento di DNA, ne facilita la visione in presenza di luce ultravioletta. Il composto che otteniamo viene poi versato a livello di una piastra di plastica, costituente la camera elettroforetica, in modo tale da formare una spessore di circa 1mm. I pozzetti per il caricamento dei campioni vengono invece creati attraverso la presenza di un “pettine”, che viene applicato quando la soluzione è ancora liquido e successivamente rimosso una volta che il gel si è solidificato. Alla fine si ricopre la camera elettroforetica con il buffer TAE e si procede con il caricamento dei campioni. Per quanto riguarda invece l'apparecchiatura, essa è composta da due parti: un alimentatore e una cella elettroforetica. L'alimentatore fornisce un flusso di corrente continua agli elettrodi applicati alla cella elettroforetica. I campioni, prima del caricamento, vengono mescolati con una piccola quantità di Loading Buffer (TAE 50X, glicerolo 100%, Blu di Bromofenolo 100%), circa 7 μ L. Il glicerolo appesantisce i campioni, favorendo la loro discesa all'interno dei pozzetti, senza diffondere. Mentre le molecole di colorante permettono di visualizzare più facilmente l'andamento della corsa elettroforetica. L'ultimo step consiste nel caricare un'aliquota di pesi molecolari di riferimento, che hanno dimensioni di lunghezza comprese tra 100 e 1517 paia di basi (100 bp DNA Ladder, England BioLabs, Beverly, MA). Il gel viene quindi sottoposto ad un campo

elettrico di circa 90 Volt per circa un'ora. L'analisi finale avviene attraverso l'utilizzo di un transilluminatore che emette luce ultravioletta con $\lambda = 312 \text{ nm}$.

Capitolo 3

RISULTATI

Nel nostro studio sono stati esaminati 62 pazienti, ognuno dei quali presentava un differente grado di oligospermia. Il range di età dei pazienti si collocava tra i 19 e i 55 anni. Dei 60 pazienti, 38 presentavano oligospermia moderata (tra i 5 e i 15 mil/ml), 8 oligospermia severa (<5 mil/ml), 6 criptozoospermia (<100.00/ml) e 10 azoospermia (assenza spermatozoi). (Tab.3)

PATOLOGIA	NUMERO PAZIENTI	PERCENTUALE
Oligospermia moderata	38	61,3
Oligospermia severa	8	12,9
Criptozoospermia	6	9,7
Azoospermia	10	16,1
TOTALE	62	100

Tabella 3: *Elenco dei pazienti divisi per caratteristiche fenotipiche*

Tutti i 62 pazienti sono stati analizzati attraverso l'utilizzo della tecnica della multiplex-PCR (Tab.19), utilizzando i primers elencati precedentemente. (Tab.2). Tra i 62 casi esaminati abbiamo identificato microdelezioni a livello del cromosoma Y in 5 pazienti. Di seguito riportiamo le informazioni di ognuno dei 5 pazienti deleti. (Tab.4)

Paziente	Età	Patologia	Concentrazione spermatica	Motilità totale	Morfologia spermatozoi	Delezione
13	44	Oligospermia moderata	10 mil/ml	5%	3(T) – 97(A)	AZFc (completa)
27	33	Azoospermia	-	-	-	AZFb (parziale)
34	50	Oligospermia severa	4 mil/ml	15%	3(T) – 97(A)	AZFc (completa)
47	33	Azoospermia	-	-	-	AZFabc
56	20	Azoospermia	-	-	-	AZFc (completa)

Tabella 4: *Descrizione dei pazienti deleti*

Le delezioni riscontrate sono state identificate a partire dal paziente 13, il quale presentava una delezione completa di AZFc. I marker sY152, sY158, sY254 e sY255 erano infatti assenti. (Fig.18) Stessa situazione per il paziente 34 e 56. I pazienti 13 e 34 presentavano una condizione di oligospermia rispettivamente moderata e severa, mentre il paziente 56 una condizione di azoospermia. Un solo paziente, il 27, presentava invece una delezione parziale in AZFb, a livello del marker sY134. (Fig.19) Il paziente presentava una condizione di azoospermia. L'ultimo paziente delecto, il 47, presentava invece una completa delezione della regione AZF. I markers sY84, sY86, sY127, sY134, sY254 e sY255 erano assenti. (Fig.20) Il paziente presentava una condizione di azoospermia. In ognuno dei 5 pazienti deleti, la mancata amplificazione è stata poi confermata con PCR singole per i singoli marker, il tutto ripetuto per tre

volte consecutive. Non sono state riscontrate delezioni in AZFa, in nessun paziente. (Tab. 5) (Grafico 1)

Delezione	Numero pazienti	Percentuale (%)
AZFa	0/62	0
AZFb parziale	1/62	1,61
AZFb completa	0/62	0
AZFc parziale	0/62	0
AZFc completa	3/62	4,83
AZFabc	1/62	1,61

Tabella 5: Delezioni riscontrate nei 62 pazienti

Delezioni AZF nei 5 pazienti deleti (%)

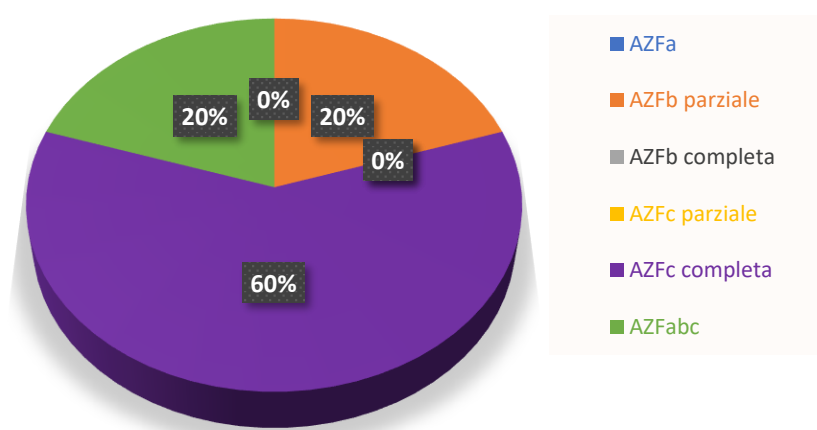
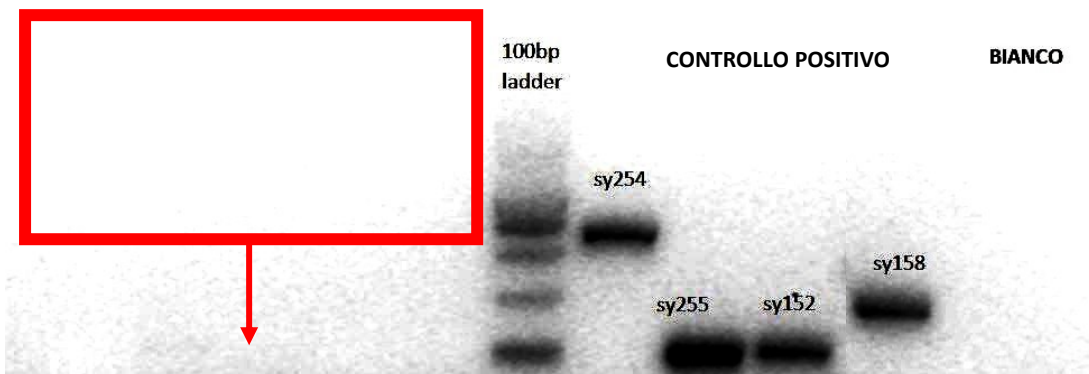


Grafico 1: Delezioni AZF nei 5 pazienti deleti (%)



ASSENZA DI AMPLIFICATI NEL PAZIENTE 13

Figura 18: *Delezione completa AZFc nel paziente 13*

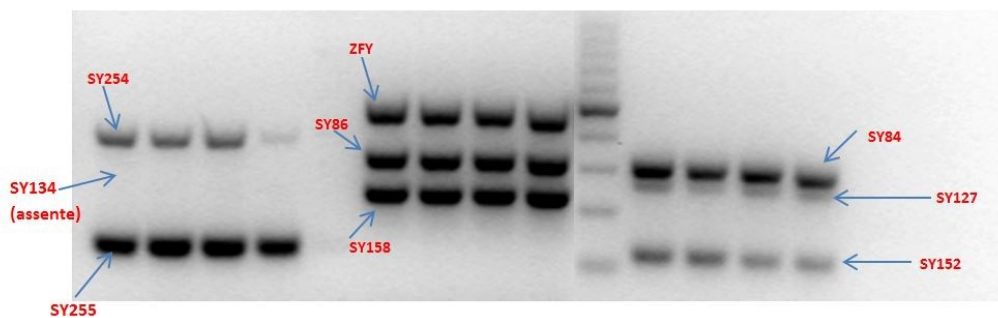
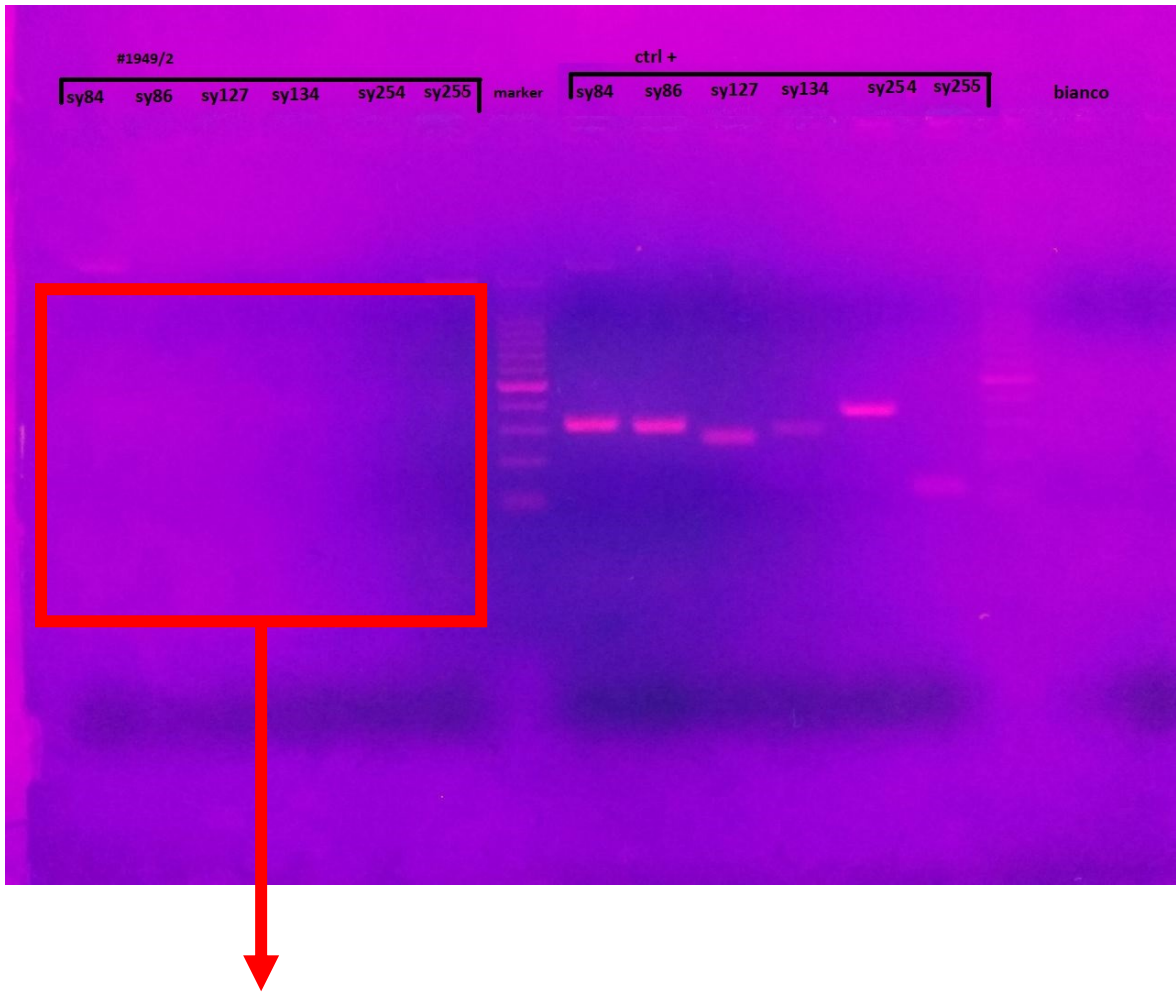


Figura 19: *Delezione parziale di sY134 nel paziente 27*



ASSENZA DI AMPLIFICATI NEL PAZIENTE 47

Figura 20: *Delezione totale della regione AZF nel paziente 47*

Capitolo 4

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Dopo 20 anni dalla prima definizione molecolare dell'AZF, oggi giorno è ormai noto non solo il ruolo del cromosoma Y nell'infertilità maschile, ma anche il ruolo e l'importanza delle microdelezioni in questa regione. Le microdelezioni Yq sono rilevate infatti in circa il 13% degli uomini con azoospermia non ostruttiva e nel 5% degli uomini con grave oligozoospermia. Grazie all'evolversi delle tecniche di biologia molecolare è stato possibile infatti affermare come una certa percentuale di pazienti con oligozoospermia severa e azoospermia, che erano prima classificati come pazienti idiopatici, non sono in realtà tali. Essi infatti sono affetti da microdelezioni a livello della regione AZF. La loro infertilità deriva quindi da una causa genetica. Le anomalie genetiche contribuiscono almeno per il 15% all'infertilità maschile. La regione AZF è suddivisa in senso prossimo-distale in tre regioni non sovrapposte, indicate come AZFa, AZFb e AZFc. (61) Tali regioni contengono geni ed unità trascrizionali, la maggioranza dei quali presenta un'espressione specifica testicolare. La microdelezione più frequente è quella della regione AZFc (60%), seguono poi le delezioni della regione AZFb (16%). Nel complesso quelle che coinvolgono AZFb (AZFb, AZFb+c e AZFa+b+c) rappresentano il 35%. Le delezioni della regione AZFa invece sono estremamente rare (5%). (62) Nel nostro studio sono stati presi in esame 62 pazienti, che sono stati sottoposti a screening attraverso il metodo della multiplex-PCR, attraverso

l'uso di marker specifici (STS) per il cromosoma Y. Dai risultati si è potuto vedere come su 62 pazienti, 5 presentavano microdelezioni a livello del cromosoma Y. Su 62 pazienti, 3 presentavano delezioni complete a livello della regione AZFc (4,83%). I marker sY152, sY157, sY158, sY254 e sY255 erano infatti assenti. Un solo paziente, il 27, presentava invece una delezione parziale in AZFb (1,61%), a livello del marker sY134. L'ultimo paziente delecto, il 47, presentava invece una completa delezione della regione AZF (1,61%). I markers sY84, sY86, sY127, sY134, sY254 e sY255 erano assenti. Nessun paziente presentava delezioni a livello della regione AZFa. Si nota quindi come tra i 5 pazienti delecti, ben il 60% riporta delezioni a livello della regione AZFc, il 20% a livello di AZFb e il restante 20% a livello dell'intera regione AZF. Non sono state riscontrate delezioni contemporanee a più regioni, ne delezioni al di fuori della regione AZF. I nostri studi risultano così in linea con quanto si riporta in letteratura nazionale (62): ovvero che le delezioni in AZFc risultano essere le più presenti. Tale delezione origina dalla ricombinazione omologa tra gli ampliconi b2 e b4 rispettivamente nei palindromi P3 e P1 e rimuove 21 copie di geni e unità di trascrizione. La lunghezza degli ampliconi b2 e b4 è maggiore rispetto a quella degli altri ampliconi, può essere quindi questo il motivo della maggior frequenza di tali delezioni. La seconda conferma che abbiamo potuto notare è stata invece quella della relazione genotipo-fenotipo.

Nei nostri 5 pazienti questa relazione viene quasi completamente rispettata. La letteratura afferma infatti che ad ogni particolare microdelezione è associato un particolare fenotipo. Le delezioni dell'intera regione AZFa causano inevitabilmente la SCOS ovvero la sindrome delle sole cellule di Sertoli (assenza totale di cellule germinali nei tubuli seminiferi) e l'azoospermia. Le delezioni di AZFb causano azoospermia determinata da un quadro istologico di arresto della spermatogenesi (SGA) (91) Gli uomini con delezioni AZFc hanno invece il fenotipo più variabile che può andare dall'azoospermia completa all'oligozoospermia lieve. Nel nostro studio questi fenotipi vengono quasi tutti rispettati. Nel paziente 27 si ha infatti che la microdelezione della regione AZFb è associata ad un fenotipo azoospermico. Nel paziente 47 si ha invece una condizione di azoospermia causata da una delezione completa della regione AZF. Nei pazienti 34 e 56, dove si ha una delezione completa della regione AZFc si ha invece un fenotipo variabile che va dalla condizione di oligospermia severa nel paziente 34 (4 mil/ml) ad azoospermia nel paziente 56. L'unico paziente dove si ha un fenotipo non completamente in linea con il genotipo è il paziente 13. Esso presenta infatti una condizione di oligospermia moderata con una concentrazione di 10 mil/ml, che non rispecchia perfettamente la presenza di una delezione completa a livello della regione AZFc. Normalmente infatti la delezione completa di tale regione è associata ad

azoospermia o oligospermia severa, piuttosto che moderata. Questo lieve discostamento è però plausibile, la correlazione genotipo-fenotipo rimane infatti ancora qualcosa di assai complesso e non sempre prevedibile, con tutta una serie di meccanismi ancora sconosciuti. La spiegazione biologica dei fenotipi insoliti rimane tutt'ora poco chiara, soprattutto nel caso di delezioni parziali come gr/gr. La letteratura conferma infatti come soggetti con questa delezione possono mostrare fenotipi spermatogenici altamente variabili che vanno dall'azoo- alla normozoospermia. (99) Un'attenzione particolare meritano invece i pazienti affetti da microdelezione a livello della regione AZFc. Nonostante queste delezioni siano meno patogene, è però emerso che in alcuni uomini con microdelezioni di AZFc vi è un progressivo declino della conta spermatica e il paziente passa così dall'oligozoospermia alla sua forma grave o addirittura all'azoospermia. (96) Ciò implica quindi un peggioramento temporaneo sia nel numero che nella qualità dello sperma. Proprio da questo fatto ci si può infine collegare all'importanza del test di microdelezione Yq, un'importanza clinica che vedremo essere multipla. La prima funzione è quella per l'identificazione della causa dell'infertilità. Se il test è positivo, quindi se è presente la delezione, si va a determinare l'eziologia genetica dell'infertilità, implementando strategie di screening appropriate per fenotipi anormali. La conoscenza di queste delezioni aiuterà anche i medici a fornire soluzioni più

efficaci ai problemi affrontati dalle coppie infertili. Molte volte infatti, vengono utilizzati trattamenti con ormoni, antiossidanti e cambiamenti dello stile di vita, per migliorare il seminogramma. Queste strategie di trattamento falliranno però se la causa dell'infertilità è genetica. Lo screening dell'AZF è importante anche prima della varicocelectomia poiché i portatori di delezione, molto probabilmente, non beneficeranno della procedura chirurgica. Pertanto, se nel partner maschile viene rilevata una delezione, si possono proporre alla coppia tecniche di riproduzione assistita (ART) ed evitare trattamenti medici. Il secondo importante aspetto riguarda i pazienti affetti da delezione a livello della regione AZFc che, come precedentemente affermato, possono subire un progressivo declino della conta spermatica. La conoscenza dello stato Yq aiuterebbe questi uomini e fornirebbe loro un'opzione di crioconservazione dello sperma per la futura genitorialità biologica. Il terzo punto riguarda invece la possibilità di ottenere informazioni sull'eventuale aspirazione di spermatozoi testicolari (TESA). Grazie alla correlazione genotipo-fenotipo, che si ha nelle microdelezioni, tale screening permette di ottenere informazioni riguardo il fenotipo testicolare e la possibilità di recupero dello sperma. E' possibile infatti prevedere il successo dell'ottenimento della paternità biologica prima di intraprendere procedure invasive. Al quarto posto si ha invece la possibilità di ottenere una previsione del successo dell'ART. La maggior parte degli uomini

con microdelezioni Yq può richiedere l'ART per la genitorialità biologica. Nonostante non ci siano ancora risultati certi, diversi studi affermano però che, in tutti gli uomini con delezioni AZF, vi è un tasso di fecondazione più lento, una scarsa qualità dell'embrione, un tasso di blastocisti compromesso e un successo complessivo inferiore della ART. (113) (114) Quindi, lo screening della microdelezione Yq può aiutare anche a consigliare le coppie, riguardo ai tassi di successo in seguito all'ART. Il quinto ed ultimo punto riguarda invece la prevenzione della trasmissione verticale dei difetti genetici. In seguito all'ICSI sono stati segnalati infatti diversi casi di bambini, nati da coppie in cui il partner maschile presentava una microdelezione Yq. In tutti questi casi però la microdelezione Yq viene trasmessa ai figli maschi, che saranno così anch'essi sterili. Ciò determina una trasmissione del 100% del difetto genetico e dell'infertilità dai padri. In alcuni casi, la delezione parziale di AZFc nel padre, ha portato alla delezione completa nella prole (115), si parla così di fallimento spermatogenico. Pertanto il test di microdelezione del cromosoma Y è altamente raccomandato per tutti i maschi infertili che optano per l'ICSI, in modo che la coppia sia a conoscenza del rischio di tramandare l'infertilità in famiglia. Alla luce di tutto ciò è possibile affermare come negli ultimi anni vi siano stati innumerevoli progressi in tale campo. Questioni inizialmente irrisolte, come la variabilità della frequenza delle delezioni, la presenza di

delezioni negli uomini fertili e il numero di STS da utilizzare, per ottenere un'elevata sensibilità e accuratezza, sono state oggi risolte. D'altro canto però ci sono ancora molte questioni irrisolte come la definizione della funzione dei geni AZF, l'incidenza di delezioni e mutazioni gene-specifiche, il ruolo delle delezioni di copie singole o multiple di famiglie di geni multicopia e il ruolo di altre anomalie strutturali quali inversioni e duplicazioni nel danno spermatogenico. Una delle questioni più dibattute rimane quella degli uomini con microdelezione, ma con produzione di spermatozoi. Questo infatti suggerisce che alcuni dei geni deleti non svolgano in realtà un ruolo essenziale nella spermatogenesi, ma servano solo ad ottimizzarla. Allo stesso tempo è possibile ipotizzare che uomini differenti sopportino in maniera differente le diverse delezioni, anche in relazione al loro background genetico e al differente grado di compensazione dei geni. Oppure si può ipotizzare che, delezioni che apparentemente sono uguali, in realtà differiscono nelle loro dimensioni. Nonostante l'analisi riporti la stessa perdita nel STS, è possibile però che le delezioni abbiano misure leggermente differenti e quindi automaticamente il fenotipo vari. Possiamo concludere affermando come l'infertilità sia un problema multifattoriale. Questo fa sì che oltre al danno genetico devono essere prese in considerazione tutta un'altra serie di fattori. In primis, le diverse origini della popolazione studiata, la loro composizione e la loro posizione geografica

(116). In secondo luogo bisogna tener in considerazione il rischio professionale della popolazione in studio: esposizione a pesticidi e metalli pesanti sono ad esempio fattori determinanti. Infine abbiamo tutta un'altra serie di fattori, come ad esempio il fumo, l'uso di derivati del tabacco, alcool, droghe, doping, obesità, radiazioni e specifici stili di vita che possono predisporre alcuni uomini ad avere delezioni de-novo (25). E' essenziale quindi studiare il background completo dei pazienti, al fine di poter effettuare una corretta e completa indagine delle microdelezioni del cromosoma Y.

Capitolo 5

BIBLIOGRAFIA

- (1): *Biologia dello sviluppo*, Piero Andreuccetti, O. Carnevali
- (2): Pieau, C., *et al.* Temperature sensitivity of sexual differentiation of gonads in the European pond turtle. *Journal of Experimental Zoology* 270, 86–93 (1994)
- (3): Genetic Mechanisms of Sex Determination By: Laura Hake, Ph.D. (*Biology Department, Boston College*) & Clare O'Connor, Ph.D. (*Biology Department, Boston College*) © 2008 Nature Education Citation: Hake, L. & O'Connor, C. (2008) Genetic mechanisms of sex determination. *Nature Education* 1(1):25
- (4): Charlesworth B (1996) The evolution of chromosomal sex determination and dosage compensation. *Curr Biol* 6: 149–162.
- (5): Graves JA, Disteché CM, Toder R. Gene dosage in the evolution and function of mammalian sex chromosomes. *Cytogenet Cell Genet.* (1998); 80:94–103
- (6): Eggers S, Sinclair A. Mammalian sex determination—insights from humans and mice. *Chromosome Res.* 2012 (Jan 2012):215-38.
- (7): Greenfield A, Koopman P. SRY and mammalian sex determination. *Curr Top Dev Biol.* (1996)
- (8): de Carvalho CM, Santos FR. Human Y-chromosome variation and male dysfunction. *J Mol Genet Med.* (2005) Dec 6;1(2):63-75
- (9): Nassar GN, Leslie SW. Physiology, Testosterone. (2022) Jan 4. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan–. PMID: 30252384.
- (10): Bernard P, Sim H, Knowler K, Vilain E, Harley V. Human SRY inhibits beta-catenin-mediated transcription. *Int J Biochem Cell Biol.* (2008);40(12):2889-900. Epub 2008 Jun 28.
- (11): Filipe Tenorio Lira Neto, Phil Vu Bach, Bobby B. Najari, Philip S. Li, Marc Goldstein, Spermatogenesis in humans and its affecting factors, *Seminars in Cell & Developmental Biology.* (2016)

- (12): Liza O'Donnell, Lee B. Smith, Diane Rebourcet, Sertoli cells as key drivers of testis function, *Seminars in Cell & Developmental Biology*, Volume 121, (2022)
- (13): Barry R Zirkin, Vassilios Papadopoulos, Leydig cells: formation, function, and regulation, *Biology of Reproduction*, Volume 99, Issue 1, July 2018, Pages 101–111
- (14): O'Shaughnessy PJ. Hormonal control of germ cell development and spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol.* 2014 May;29:55-65. doi: 10.1016/j.semcd.2014.02.010. Epub 2014 Mar 2. PMID: 24598767
- (15): Zirkin BR. Spermatogenesis: its regulation by testosterone and FSH. *Semin Cell Dev Biol.* 1998 Aug;9(4):417-21. doi: 10.1006/scdb.1998.0253. PMID: 9813188
- (16): Griswold MD. The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol.* 1998 Aug;9(4):411-6. doi: 10.1006/scdb.1998.0203. PMID: 9813187
- (17): de Kretser DM. Endocrinology of male infertility. *Br Med Bull.* 1979 May;35(2):187-92. doi: 10.1093/oxfordjournals.bmb.a071568. PMID: 387166
- (18): Pesch S, Bergmann M. Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation. *Micron.* 2006;37(7):597-612. doi: 10.1016/j.micron.2006.02.006. Epub 2006 Mar 23. PMID: 16621580
- (19): Sullivan R, Mieuisset R. The human epididymis: its function in sperm maturation. *Hum Reprod Update.* 2016 Sep;22(5):574-87. doi: 10.1093/humupd/dmw015. Epub 2016 Jun 15. PMID: 27307387
- (20): James ER, Carrell DT, Aston KI, Jenkins TG, Yeste M, Salas-Huetos A. The Role of the Epididymis and the Contribution of Epididymosomes to Mammalian Reproduction. *Int J Mol Sci.* 2020 Jul 29;21(15):5377. doi: 10.3390/ijms21155377. PMID: 32751076; PMCID: PMC743278.
- (21): Purohit SB, Laloraya M, Kumar GP. Role of ions and ion channels in capacitation and acrosome reaction of spermatozoa. *Asian J Androl.* 1999 Sep;1(3):95-107. PMID: 11250775

- (22): WHO Laboratory Manual for the examination of Human Semen and Semen Cervical Mucus Interaction, Cambridge University Press, Cambridge. Appendice 2.1
- (23): www.iss.it, Registro Nazionale PMA, Istituto Superiore di Sanità
- (24): Andrea Lenzi et al., Guida al laboratorio di semiologia, La Nuova Italia Scientifica
- (25): Foresta C, Moro E, Ferlin A. Y chromosome microdeletions and alterations of spermatogenesis. *Endocr Rev.* 2001 Apr;22(2):226-39. doi: 10.1210/edrv.22.2.0425. PMID: 11294825
- (26): Sharif K. Reclassification of azoospermia: the time has come? *Hum Reprod.* 2000;15:237-8
- (27): Vicari E, La Vignera S, Garrone F, Aiello B, Calogero AE. Terapia ormonale e non ormonale nell'infertilità maschile: indicazioni e nuove prospettive. *Contracezione Fertilità Sessualità.* 2006;33:236-42
- (28): Jensen CFS, Østergren P, Dupree JM, Ohl DA, Sønksen J, Fode M. Varicocele and male infertility. *Nat Rev Urol.* 2017 Sep;14(9):523-533. doi: 10.1038/nrurol.2017.98. Epub 2017 Jul 4. PMID: 28675168
- (29): Kaleva M, Toppari J. Cryptorchidism: an indicator of testicular dysgenesis? *Cell Tissue Res.* 2005 Oct;322(1):167-72. doi: 10.1007/s00441-005-1143-3. Epub 2005 Nov 3. PMID: 15965655
- (30): Sharp VJ, Kieran K, Arlen AM. Testicular torsion: diagnosis, evaluation, and management. *Am Fam Physician.* 2013 Dec 15;88(12):835-40. PMID: 24364548
- (31): Sharma M, Leslie SW. Azoospermia. 2022 Nov 28. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan—. PMID: 35201719
- (32): WHO Laboratory Manual for the examination of Human Semen and Semen Cervical Mucus Interaction, Cambridge University Press, Cambridge. Appendice 1

- (33): WHO Laboratory Manual for the examination of Human Semen and Semen Cervical Mucus Interaction, Cambridge University Press, Cambridge
- (34): Lasiene K. Assessment of Human Sperm Cells Morphological Parameters. Spermatozoa - Facts and Perspectives [Internet]. 2018 Jun 13
- (35): Karavolos S. Sperm DNA Fragmentation. *Semin Reprod Med.* 2021 Nov;39(5-06):194-199. doi: 10.1055/s-0041-1736261. Epub 2021 Oct 18. PMID: 34662912
- (36): Krausz, C., Riera-Escamilla, A. male infertility. *Nat Rev Urol* 15, 369–384 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41585-018-0003-3>
- (37): Foresta C, Garolla A, Bartoloni L, Bettella A, Ferlin A. Genetic abnormalities among severely oligospermic men who are candidates for intracytoplasmic sperm injection. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(1):152–6
- (38): Hamada AJ, Esteves SC, Agarwal A. A comprehensive review of genetics and genetic testing in azoospermia. *Clinics (Sao Paulo).* 2013;68 Suppl 1(Suppl 1):39-60. doi: 10.6061/clinics/2013(sup01)06. PMID: 23503954; PMCID: PMC3583155
- (39): Ferlin A, Raicu F, Gatta V, Zuccarello D, Palka G, Foresta C. Male infertility: role of genetic background. *Reprod BiomedOnline* 2007; 14(6): 734–45
- (40): Almesned RK, Alsuhaibani SS, Alali HJ, Qubbaj WA, Al Hathal NK. Male Infertility in Robertsonian Translocation: A Case Report. *Am J Case Rep.* 2020 May 15;21:e921616. doi: 10.12659/AJCR.921616. PMID: 32413022; PMCID: PMC7252845
- (41): Cariboni A, Balasubramanian R. Kallmann syndrome and idiopathic hypogonadotropic hypogonadism: The role of semaphorin signaling on GnRH neurons. *Handb Clin Neurol.* 2021;182:307-315. doi: 10.1016/B978-0-12-819973-2.00022-8. PMID: 34266601; PMCID: PMC9039773
- (42): Bieniek JM, Lapin CD, Jarvi KA. Genetics of *CFTR* and male infertility. *Transl Androl Urol.* 2021 Mar;10(3):1391-1400. doi: 10.21037/tau.2020.04.05. PMID: 33850775; PMCID: PMC8039587

- (43): Reijo R, Lee TY, Salo P, Alagappan R, Brown LG, Rosenberg M, et al. Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. *NatGenet.* 1995;10(4):383–93
- (44): McLachlan RI, Mallidis C, Ma K, Bhasin S, de Kretser DM. Genetic disorders and spermatogenesis. *Reprod Fertil Dev.* 1998;10(1):97–104
- (45): Lahn BT, Pearson NM, Jegalian K. The human Y chromosome, in the light of evolution. *Nat Rev Genet.* 2001;2:207–216
- (46): Charlesworth D, Charlesworth B, Marais G. Steps in the evolution of heteromorphic sex chromosomes. *Heredity.* 2005;95:118–128
- (47): Hughes JF, Skaletsky H, Pyntikova T, Minx PJ, Graves T, Rozen S, et al. Conservation of Y-linked genes during human evolution revealed by comparative sequencing in chimpanzee. *Nature.* 2005;437:100–103
- (48):http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/Chromosome?r=Y%3A1-1000
- (49): Skaletsky, H., Kuroda-Kawaguchi, T., Minx, P. *et al.* The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature* 423, 825–837 (2003)
- (50): Colaco, S., Modi, D. Genetics of the human Y chromosome and its association with male infertility. *Reprod Biol Endocrinol* 16, 14 (2018)
- (51): Ferlin A, Moro E, Garolla A, Foresta C (1999) Human male infertility and Y chromosome deletions: role of the AZF-candidate genes DAZ, RBM and DFFRY. *Hum Reprod* 14:1710-1716
- (52): Vollrath D, Foote S, Hilton A, Brown LG, Beer-Romero P, Bogan JS, Page DC (1992) The human Y chromosome: a 43-interval map based on naturally occurring deletion. *Science* 258:52-59
- (53): Kauppi L, Barchi M, Baudat F, Romanienko PJ, Keeney S, Jasin M. Distinct properties of the XY pseudoautosomal region crucial for male meiosis. *Science.* 2011;331:916–20

- (54): Carlo Foresta, Enrico Moro, Alberto Ferlin, Y Chromosome Microdeletions and Alterations of Spermatogenesis, *Endocrine Reviews*, Volume 22, Issue 2, 1 April 2001, Pages 226–239
- (55): Bellott, D., Hughes, J., Skaletsky, H. *et al.* Mammalian Y chromosomes retain widely expressed dosage-sensitive regulators. *Nature* **508**, 494–499 (2014)
- (56): Krausz, Casamonti, E. Spermatogenic failure and the Y chromosome. *Hum Genet* 136, 637–655 (2017)
- (57): Jarow JP, Espeland MA, Lipshultz LI. Evaluation of the azoospermic patient. *J Urol.* 1989;142(1):62–5
- (58): Baker K, Sabanegh E Jr. Obstructive azoospermia: reconstructive techniques and results. *Clinics (Sao Paulo)*. 2013;68 Suppl 1(Suppl 1):61-73
- (59): Tiepolo L, Zuffardi O. Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm. *Hum Genet.* 1976 Oct 28;34(2):119-24
- (60): Vogt P, Chandley AC, Hargreave TB, Keil R, Ma K, Sharkey A. Microdeletions in interval 6 of the Y chromosome of males with idiopathic sterility point to disruption of AZF, a human spermatogenesis gene. *Hum Genet.* 1992 Jul;89(5):491-6. doi: 10.1007/BF00219172. PMID: 1634226
- (61): Vogt PH, Edelmann A, Kirsch S, Henegariu O, Hirschmann P, Kiesewetter F, Köhn FM, Schill WB, Farah S, Ramos C, Hartmann M, Hartschuh W, Meschede D, Behre HM, Castel A, Nieschlag E, Weidner W, Gröne HJ, Jung A, Engel W, Haidl G. Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. *Hum Mol Genet.* 1996 Jul;5(7):933-43. doi: 10.1093/hmg/5.7.933. PMID: 8817327
- (62): Krausz C, Forti G, McElreavey K. The Y chromosome and male fertility and infertility. *Int J Androl.* 2003 Apr;26(2):70-5. doi: 10.1046/j.1365-2605.2003.00402.x. PMID: 12641824
- (63): Sun C, Skaletsky H, Birren B, Devon K, Tang Z, Silber S, et al. An azoospermic man with a de novo point mutation in the Y-chromosomal gene USP9Y. *Nat Genet.* 1999;23:429–432

- (64): Luddi A, Margollicci M, Gambera L, Serafini F, Cioni M, De Leo V, Balestri P, Piomboni P. Spermatogenesis in a man with complete deletion of USP9Y. *N Engl J Med.* 2009;360:881–5
- (65): Brown GM, Furlong RA, Sargent CA, Erickson RP, Longepied G, Mitchell M, Jones MH, Hargreave TB, Cooke HJ, Affara NA. Characterisation of the coding sequence and fine mapping of the human DFFRY gene and comparative expression analysis and mapping to the Sxr-b interval of the mouse Y chromosome of the Dffry gene. *Hum Mol Genet.* 1998;7:97–107
- (66): Ho LK, Jee SG, Soo KI, Woong KS, Jae-Seung P, Ha CC, Kunsoo R. Ubiquitin-specific protease activity of USP9Y, a male infertility gene on the Y chromosome. *Reprod Fertil Dev.* 2003;15:129–33
- (67): Sun C, Skaletsky H, Birren B, Devon K, Tang Z, Silber S, Oates R, Page DC. An azoospermic man with a de novo point mutation in the Y-chromosomal gene USP9Y. *Nat Genet.* 1999;23:429–32
- (68): Tyler-Smith C, Krausz C. The will-o'-the-wisp of genetics—hunting for the azoospermia factor gene. *N Engl J Med.* 2009;360:925–7
- (69): Ditton HJ, Zimmer J, Kamp C, Rajpert-De Meyts E, Vogt PH. The AZFa gene DBY (DDX3Y) is widely transcribed but the protein is limited to the male germ cells by translation control. *Hum Mol Genet.* 2004;13:2333–41
- (70): Gueler B, Sonne SB, Zimmer J, Hilscher B, Hilscher W, Græm N, Rajpert-De Meyts E, Vogt PH. AZFa protein DDX3Y is differentially expressed in human male germ cells during development and in testicular tumours: new evidence for phenotypic plasticity of germ cells. *Hum Reprod.* 2012;27:1547–55
- (71): Foresta C, Ferlin A, Moro E. Deletion and expression analysis of AZFa genes on the human Y chromosome revealed a major role for DBY in male infertility. *Hum Mol Genet.* 2000;9:1161–9
- (72): Tahmasbpour E, Balasubramanian D, Agarwal A. A multi-faceted approach to understanding male infertility: gene mutations, molecular defects and assisted reproductive techniques (ART). *J Assist Reprod Genet.* 2014;31:1115–37

- (73): Delbridge ML, Harry JL, Toder R, O'Neill RJ, Ma K, Chandley AC, Graves JA (1997) A human candidate spermatogenesis gene, RBM1, is conserved and amplified on the marsupial Y chromosome. *Nat Genet* 15:131-136
- (74): Dever TE (1994) Determination of the amino acid sequence of rabbit, human, and wheat germ protein synthesis factor eIF-4C by cloning and chemical sequencing. *J Biol Chem* 269:3212-3218
- (75): Lahn BT, Page DC (1997) Functional coherence of the human Y chromosome. *Science* 278:675-680
- (76): Ho M, Chelly J, Cater N, Danek A, Crocker P, Monaco AP (1994) Isolation of the gene for MacLeod syndrome that encodes a novel membrane transport protein. *Cell* 77:869-880
- (77): Agulnik AI, Mitchell MJ, Lerner JL, Woods DR, Bishop CE (1994) A mouse Y chromosome gene encoded by a region essential for spermatogenesis and expression of male-specific minor Histocompatibility antigens. *Hum Mol Genet* 3:873-878
- (78): Song SH, Chiba K, Ramasamy R, Lamb DJ. Recenti progressi nella genetica dell'insufficienza testicolare. *L'asiatico J Androl.* 2016;18:350–5
- (79): Rozen SG, Marszalek JD, Irenze K, Skaletsky H, Brown LG, Oates RD, Silber SJ, Ardlie K, Page DC. AZFc deletions and spermatogenic failure: a population-based survey of 20,000 Y chromosomes. *Am J Hum Genet.* 2012;91:890–6
- (80): Repping S, de Vries JWA, van Daalen SKM, Korver CM, Leschot NJ, van der Veen F (2003) The use of spermHALO-FISH to determine DAZ gene copy number. *Mol Hum Reprod* 9:183-188
- (81): Saxena R, de Vries JW, Repping S, Alagappan RK, Skaletsky H, Brown LG, et al. Four *DAZ* genes in two clusters found in the *AZFc* region of the human Y chromosome. *Genomics.* 2000;67:256–67
- (82): Vogt PH, Fernandes S. Polymorphic *DAZ* gene family in polymorphic structure of *AZFc* locus: art work for functional for human spermatogenesis? *APMIS.* 2003;111:115–26.

- (83): Kim B, Lee Y, Kim Y, Lee KH, Chun S, Rhee K, et al. Polymorphic expression of DAZ proteins in the human testis. *Hum Reprod.* 2009;24:1507–15
- (84): Kee K, Angeles VT, Flores M, Nguyen HN, Reijo RA. Human DAZL, DAZ and BOULE genes modulate primordial germ-cell and haploid gamete formation. *Nature.* 2009;462:222–5
- (85): Lu C, Jiang J, Zhang R, Wang Y, Xu M, Qin Y, Lin Y, Guo X, Ni B, Zhao Y, Diao N. Gene copy number alterations in the azoospermia-associated AZFc region and their effect on spermatogenic impairment. *Mol Hum Reprod.* 2014;20:836–43
- (86): Stuppia L, Gatta V, Fogh I, Gaspari AR, Grande R, Morizio E, Fantasia D, Pizzati A, Calabrese G, Palka G (2000) Characterization of novel genes in AZF regions. *J Endocrinol Invest* 23:659-663
- (87): Kamp C, Huellen K, Fernandes S, Sousa M, Schlegel PN, Mielnik A, Kleiman S, Yavetz H, Krause W, Küpker W, Johannisson R. High deletion frequency of the complete AZFa sequence in men with Sertoli-cell-only syndrome. *Mol Hum Reprod.* 2001;7:987–994
- (88): Kleiman SE, Almog R, Yogev L, Hauser R, Lehavi O, et al. Screening for partial AZFa microdeletions in the Y chromosome of infertile men: is it of clinical relevance? *Fertil Steril.* 2012;98:43–47
- (89): Wei W, Fitzgerald T, Ayub Q, Massaia A, Smith BB, Dominiczak AA, Morris AA, Porteous DD, Hurles ME, Tyler-Smith C, Xue Y. Copy number variation in the human Y chromosome in the UK population. *Hum Genet.* 2015;134:789–800
- (90): Costa P, Gonçalves R, Ferrás C, Fernandes S, Fernandes AT, Sousa M, Barros A. Identification of new breakpoints in AZFb and AZFc. *Mol Hum Reprod.* 2008;14:251–258
- (91): Kleiman SE, Yogev L, Lehavi O, Hauser R, Botchan A, Paz G, Yavetz H, Gamzu R. The likelihood of finding mature sperm cells in men with AZFb or AZFb-c deletions: six new cases and a review of the literature (1994–2010) *Fertil Steril.* 2011;95:2005–2012.

- (92): Liu XY, Wang RX, Fu Y, Luo LL, Guo W, Liu RZ. Outcomes of intracytoplasmic sperm injection in oligozoospermic men with Y chromosome AZFb or AZFc microdeletions. *Andrologia*. 2017;49:e12602
- (93): Rozen SG, Marszalek JD, Irenze K, Skaletsky H, Brown LG, Oates RD, Silber SJ, Ardlie K, Page DC. AZFc deletions and spermatogenic failure: a population-based survey of 20,000 Y chromosomes. *Am J Hum Genet*. 2012;91:890–896
- (94): Abid S, Maitra A, Meherji P, Patel Z, Kadam S, Shah J, Shah R, Kulkarni V, Baburao V, Gokral J. Clinical and laboratory evaluation of idiopathic male infertility in a secondary referral center in India. *J Clin Lab Anal*. 2008;22:29–38
- (95): Chang PL, Sauer MV, Brown S. Y chromosome microdeletion in a father and his four infertile sons. *Hum Reprod*. 1999;14:2689–2694
- (96): Fu L, Xiong DK, Ding XP, Li C, Zhang LY, et al. Genetic screening for chromosomal abnormalities and Y chromosome microdeletions in Chinese infertile men. *J Assist Reprod Genet*. 2012;29:521–527
- (97): Simoni M, Gromoll J, Dworniczak B, Rolf C, Abshagen K, Kamischke A, et al. Screening for deletions of the Y chromosome involving the DAZ (deleted in Azoospermia) gene in azoospermia and severe oligozoospermia. *Fertil Steril*. 1997;67:542–547
- (98): Repping S, Skaletsky H, Brown L, van Daalen SK, Korver CM, Pyntikova T, Kuroda-Kawaguchi T, de Vries JW, Oates RD, Silber S, van der Veen F, Page DC, Rozen S. Polymorphism for a 1.6-Mb deletion of the human Y chromosome persists through balance between recurrent mutation and haploid selection. *Nat Genet*. 2003;35:247–251
- (99): Krausz C, Hoefsloot L, Simoni M, Tüttelmann F; European Academy of Andrology; European Molecular Genetics Quality Network. EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions: state-of-the-art 2013. *Andrology*. 2014 Jan;2(1):5-19. doi: 10.1111/j.2047-2927.2013.00173.x. PMID: 24357628; PMCID: PMC4065365.
- (100): Kuroda-Kawaguchi T, Skaletsky H, Brown LG, Minx PJ, Cordum HS, Waterston RH, Wilson RK, Silber S, Oates R, Rozen S, Page DC. The AZFc

region of the Y chromosome features massive palindromes and uniform recurrent deletions in infertile men. *Nat Genet.* 2001;29:279–286

(101): Kichine E, Rozé V, Di Cristofaro J, Taulier D, Navarro A, Streichemberger E, Decarpentrie F, Metzler-Guillemain C, Lévy N, Chiaroni J, Paquis-Flucklinger V. HSFY genes and the P4 palindrome in the AZFb interval of the human Y chromosome are not required for spermatocyte maturation. *Hum Reprod.* 2011;27:615–624

(102): Soares AR, Costa P, Silva J, Sousa M, Barros A, Fernandes S. AZFb microdeletions and oligozoospermia—which mechanisms? *Fertil Steril.* 2012;97:858–863

(103): Repping S, Skaletsky H, Lange J, Silber S, van der Veen F, Oates RD, Page DC, Rozen S. Recombination between palindromes P5 and P1 on the human Y chromosome causes massive deletions and spermatogenic failure. *Am J Hum Genet.* 2002;71:906–922

(104): Zorrilla M, Yatsenko AN. The genetics of infertility: current status of the field. *Curr Genet Med Rep.* 2013;1:247–260

(105): Nuti F, Krausz C. Gene polymorphisms/mutations relevant to abnormal spermatogenesis. *Reprod Biomed Online.* 2008;16(4):504–13

(106): Li X. Sex chromosomes and sex chromosome abnormalities. *Clin Lab Med.* 2011;31(4):463–79, vii

(107): Stouffs K, Lissens W, Verheyen G, Van Landuyt L, Goossens A, Tournaye H, et al. Expression pattern of the Y-linked PRY gene suggests a function in apoptosis but not in spermatogenesis. *Mol Hum Reprod.* 2004;10(1):15–21

(108): Repping S, van Daalen SK, Korver CM, Brown LG, Marszalek JD, Gianotten J, et al. A family of human Y chromosomes has dispersed throughout northern Eurasia despite a 1.8-Mb deletion in the azoospermia factor c region. *Genomics.* 2004;83(6):1046–52

(109): Cong XW, Tu XD, Yan AZ, Zeng J. [Partial AZfc region deletions of the Y chromosome in spermatogenic dysfunction patients] *Zhonghua Nan Ke Xue.* 2010;16(7):594–8

- (110): Eloualid A, Rhaissi H, Reguig A, Bounaceur S, El Houate B, Abidi O, et al. Association of spermatogenic failure with the b2/b3 partial AZFc deletion. *PLoS One*. 2012;7(4):e34902
- (111): Suganthi R, Vijesh V, Jayachandran S, Fathima Benazir JA. Multiplex PCR based screening for microdeletions in azoospermia factor region of Y chromosome in azoospermic and severe oligozoospermic south Indian men. *Iran J Reprod Med*. 2013 Mar;11(3):219-26. PMID: 24639749; PMCID: PMC3943221
- (112): Zheng HY, Li Y, Shen FJ, Tong YQ. A novel universal multiplex PCR improves detection of AZFc Y-chromosome microdeletions. *J Assist Reprod Genet*. 2014 May;31(5):613-20. doi: 10.1007/s10815-014-0204-5. Epub 2014 Mar 11. PMID: 24615019; PMCID: PMC4016378
- (113): Simoni M, Tuttelman F, Gromoll J, Nieschalg E. Clinical consequences of microdeletions of the Y chromosome: the extended Munster experience. *Reprod BioMed Online*. 2008;16:289–303
- (114): Mateu E, Rodrigo L, Martínez MC, Peinado V, Milán M, Gil-Salom M, Martínez-Jabaloyas JM, Remohí J, Pellicer A, Rubio C. Aneuploidies in embryos and spermatozoa from patients with Y chromosome microdeletions. *Fertil Steril*. 2010;94:2874–7
- (115): Zhang F, Lu C, Li Z, Xie P, Xia Y, Zhu X, Wu B, Cai X, Wang X, Qian J, Wang X. Partial deletions are associated with an increased risk of complete deletion in AZFc: a new insight into the role of partial AZFc deletions in male infertility. *J Med Genet*. 2007;44:437–44
- (116): Suganya J, Kujur S, Selvaraj K, Suruli M, Haripriya G, Samuel C. Y chromosome microdeletions and partial AZFc deletions in infertile men from South India. *Br J Med Med Res*. 2016;13:1–10