

# 10

## STUDIO DEI CROMOSOMI IN SPERMATOZOI E CELLULE UOVO

---



## INDICE

Le cellule germinali	p.03
Il gamete maschile: lo spermatozoo	p.05
Il gamete femminile: la cellula uovo	p.06
Gli errori cromosomici: le aneuploidie	p.07
Studio delle aneuploidie	p.07
Gli spermatozoi	p.08
• Risultati	p.11
L'ovocita: biopsia del globulo polare	p.14
• Risultati	p.16
A chi consigliare il test delle aneuploidie	p.19
Gli errori cromosomici: le traslocazioni	p.19
Nuove strategie	p.21
Riferimenti bibliografici	p.24



# Studio dei cromosomi in spermatozoi e cellule uovo

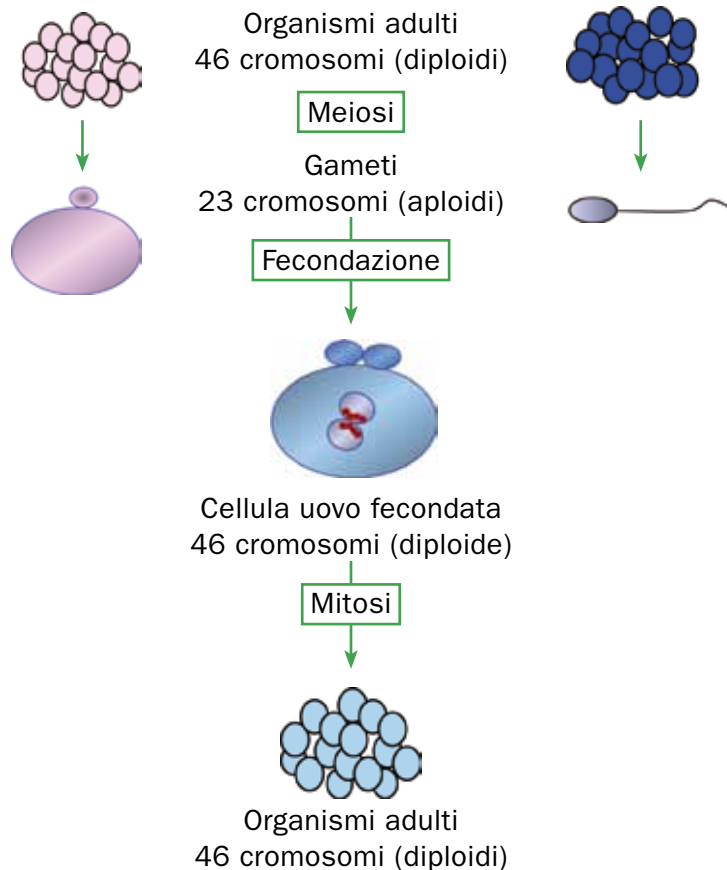
## *Le cellule germinali*

Tutte le creature viventi sono costituite da cellule, piccoli compartimenti circondati da una membrana al cui interno si trovano organelli, strutture e composti deputati al conferimento delle caratteristiche funzionali e strutturali della cellula stessa. Gli organismi superiori, tra i quali i mammiferi e quindi l'uomo, sono costituiti da insiemi di più cellule che svolgono funzioni specializzate e che sono collegate tra di loro da complessi sistemi di comunicazione. Una delle caratteristiche fondamentali delle cellule è la loro capacità di riprodursi, generando cellule figlie con le stesse caratteristiche funzionali delle cellule di origine. Il nucleo, contenuto all'interno delle cellule, riveste una grande importanza nel processo riproduttivo e funzionale in quanto preposto alla direzione dei processi sintetici cellulari e alla trasmissione dei caratteri ereditari da una generazione all'altra. È all'interno del nucleo che si trovano i cromosomi, strutture formate da proteine nucleari associate a molecole di DNA in cui hanno sede i geni, depositari dell'informazione del codice genetico. I cromosomi sono in numero costante per ogni specie, 46 in quella umana: 22 coppie di cromosomi definiti autosomi, identificati con una numerazione progressiva che va dall'1 al 22, e una coppia di cromosomi sessuali denominati X e Y.

Alcune delle cellule che costituiscono l'organismo, denominate cellule germinali, sono deputate alla riproduzione sessuata che comporta la mescolanza dei genomi di due individui, cioè dei loro cromosomi e tra questi, uno maschile e uno femminile. Questo processo conduce a una discendenza i cui componenti sono geneticamente differenti tra di loro e dai propri genitori, pur mantenendo le caratteristiche tipiche della specie. Affinché l'unione dei due genomi mantenga inalterato il numero di 46 cromosomi nella cellula figlia, è necessario che le cellule germinali passino attraverso un processo di dimezzamento del numero di cromosomi che le costituiscono dando origine a gameti, la cellula uovo e lo spermatozoo, portatori di un corredo cromosomico aploide, contenente ognuno 23 cromosomi. L'unione dei due gameti nella cel-

lula uovo fecondata ricostituirà il numero diploide corrispondente a 46 cromosomi tipico della specie umana. La riduzione del numero di cromosomi avviene nel corso di un processo denominato meiosi durante la quale i cromosomi si scambiano segmenti di DNA mediante un processo conosciuto come ricombinazione genica. In questo modo si origina un nuovo assortimento di geni che garantiscono la diversità della nuova generazione in cui combinazioni precedenti di geni si associano a nuovi assortimenti.

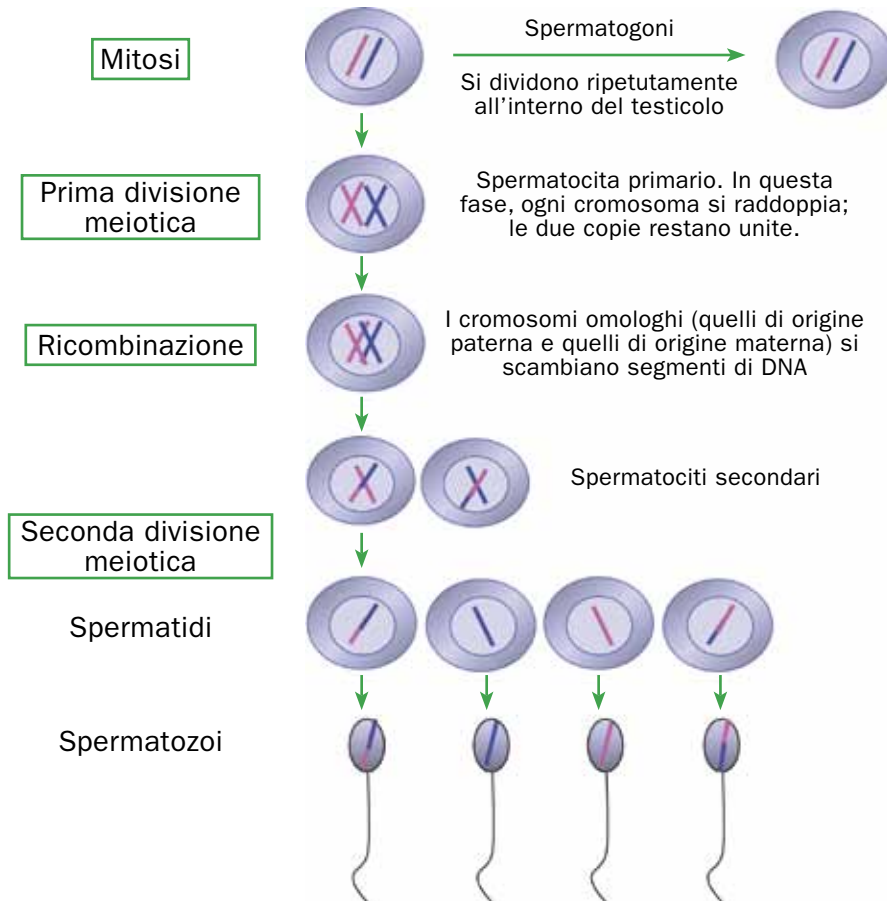
Dopo la fecondazione della cellula uovo da parte dello spermatozoo che, come già detto, ricostituisce il numero diploide di cromosomi, segue un'intensa attività di proliferazione cellulare, o mitosi, che conduce alla formazione dell'organismo cellulare adulto. Questa serie di eventi è schematizzata nella **figura 1**.



**Fig. 1** - Le cellule degli organismi adulti sono costituite da 46 cromosomi. Mediante un processo conosciuto come meiosi, questo numero si riduce a 23 nei gameti, l'ovocita e lo spermatozoo, che rappresentano le cellule deputate alla riproduzione. Una volta avvenuta la fecondazione, i corredi cromosomici dei gameti si fondono ricostituendo il numero di 46 cromosomi, o corredo diploide, che caratterizza la specie umana. La cellula fecondata darà origine all'individuo attraverso una serie di divisioni cellulari, denominate mitosi, durante le quali il numero di cromosomi viene mantenuto costante.

## Il gamete maschile: lo spermatozoo

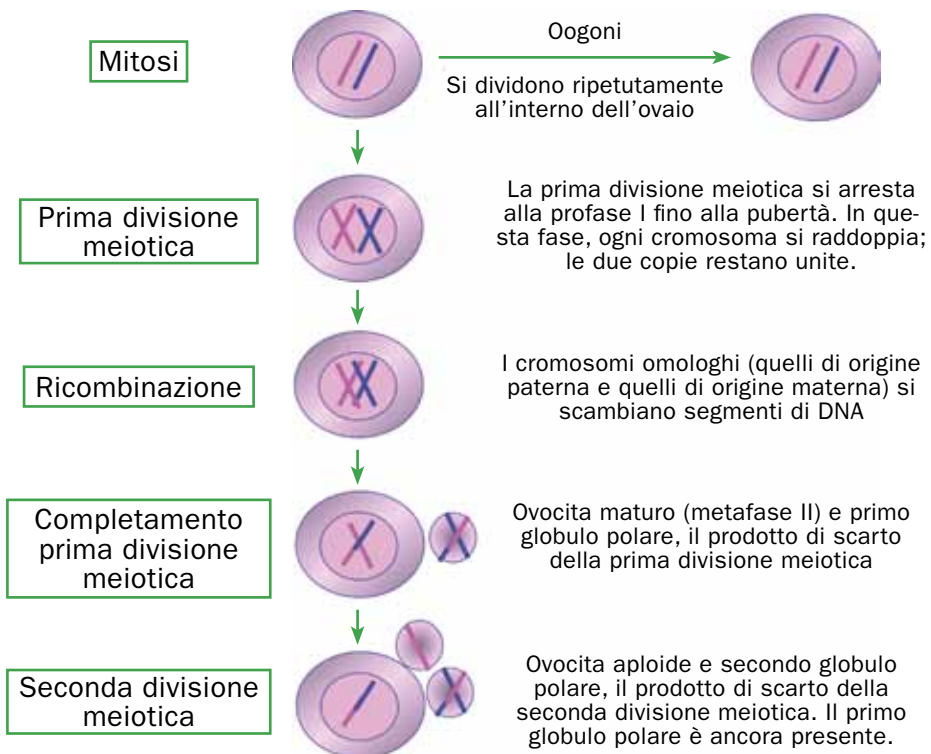
Gli spermatozoi, o gameti maschili, sono le cellule germinali maschili mature prodotte negli organi deputati alla riproduzione sessuale detti testicoli. Come schematizzato nella **figura 2**, i precursori dei gameti maschili sono gli spermatogoni, dotati di un corredo cromosomico diploide. Analogamente alle cellule germinali femminili, gli spermatogoni dimezzano il proprio corredo cromosomico attraverso due divisioni cellulari successive, dando origine a cellule denominate spermatidi. Mediante un successivo processo maturativo, si ha la formazione delle cellule germinali maschili mature, gli spermatozoi. La riduzione del numero di cromosomi da diploide ad aploide prepara lo spermatozoo all'unione con la cellula uovo, anch'essa dotata di un corredo cromosomico aploide.




**Fig. 2 -** Processo di maturazione dello spermatozoo all'interno dei testicoli, gli organi maschili deputati alla riproduzione. Nel nucleo delle cellule progenitrici ci sono 46 cromosomi: 23 di origine paterna (segmento blu) e 23 di origine materna (segmento rosa). Ogni figura rappresenta solo una coppia di cromosomi (ad es. il cromosoma 1).

## Il gamete femminile: la cellula uovo

Le cellule uovo, o ovociti, sono le cellule germinali femminili mature prodotte in particolari organi deputati alla riproduzione sessuale detti ovaia. Il processo di formazione dei gameti femminili, descritto nella **figura 3**, avviene a partire da cellule immature, gli oogoni, i quali, come tutte le cellule somatiche che costituiscono l'organismo adulto, posseggono un corredo cromosomico diploide. Dopo un certo numero di divisioni mitotiche, gli oogoni iniziano il processo di divisione meiotica che avviene attraverso due divisioni cellulari successive. Nel corso della prima di queste divisioni, la cellula uovo va incontro ad un lungo periodo di quiescenza che terminerà quando l'individuo di sesso femminile diventa sessualmente maturo, alla pubertà.



**Fig. 3** - Processo di maturazione dell'ovocita all'interno delle ovaie, gli organi femminili deputati alla riproduzione. Nel nucleo degli oogoni ci sono 46 cromosomi: 23 di origine paterna (segmento blu) e 23 di origine materna (segmento rosa). Ogni figura rappresenta solo una coppia di cromosomi (ad es. il cromosoma 1).



In questa fase, a seguito dell'azione degli ormoni che inducono l'ovulazione, alcuni ovociti maturano e completano la prima divisione meiotica. La seconda divisione è ultimata in seguito all'ingresso dello spermatozoo fecondante nell'ovocita. Si ricostituisce così nella cellula uovo fecondata, il corredo cromosomico diploide tipico degli organismi adulti.

## *Gli errori cromosomici: le aneuploidie*


Il processo di ripartizione dei cromosomi dalle cellule immature a quelle mature, da cui dipende la conservazione del numero esatto di cromosomi, non avviene sempre in modo corretto. Errori durante la meiosi danno origine a ovociti o spermatozoi che contengono un numero di cromosomi alterato. In questo modo, alcune cellule aploidi mancano di un cromosoma, mentre altre ne hanno più di una copia. Tali alterazioni numeriche dei cromosomi sono dette aneuploidie e conducono alla formazione di embrioni anomali, la maggior parte dei quali si arrestano durante i primi stadi di sviluppo. Alcuni tuttavia sono compatibili con l'impianto e anche con la vita, ma sono portatori di gravi malformazioni che determinano, nella maggior parte dei casi, aborto spontaneo o morte poche ore dopo la nascita.

Alcuni individui hanno una tendenza maggiore, rispetto ad altri, a sviluppare gameti aneuploidi. In particolare è stata stabilita una stretta correlazione tra l'età della donna e l'aumento del rischio di concepimenti aneuploidi. Ne consegue una performance riproduttiva che si va riducendo con l'avanzare dell'età, con una diminuzione del tasso di impianto e un aumento dell'incidenza di aborti spontanei.

Anche per il sesso maschile sono state definite delle categorie a rischio di aneuploidie. Pur essendo presenti, in minima percentuale, in tutti i campioni seminali, gli spermatozoi aneuploidi sono, infatti, più frequenti nei campioni seminali patologici.

## *Studio delle aneuploidie*

Il test FISH (dall'inglese Fluorescence In Situ Hybridization) consente di contare i cromosomi contenuti nel nucleo cellulare mediante l'utilizzo di sonde di DNA colorate con sostanze fluorescenti di colori diversi, de-



nominate fluorocromi, che si legano in forma specifica a ciascun cromosoma. I segnali emessi sono letti attraverso uno speciale microscopio a fluorescenza in grado di rilevare le differenze tra i singoli cromosomi. In questo modo, è possibile eseguire un'indagine sull'assetto cromosomico numerico delle cellule germinali. Mentre nei campioni seminali questa tecnica è applicata direttamente agli spermatozoi, per gli ovociti si ricorre alla diagnosi del globulo polare per dedurre l'assetto cromosomico della cellula uovo.

La scarsità del materiale disponibile per l'analisi cromosomica (una cellula nel caso del globulo polare, rari spermatozoi nei campioni severamente oligospermici o derivati direttamente dalle vie seminali) impone una restrizione nel numero di cromosomi da analizzare. Tra i prescelti, ci sono quelli che più frequentemente danno origine a feti malformati, quali il 13, il 18 e soprattutto il 21, che sono compatibili con gravidanze a termine, mentre il 16 e il 22 sono associati ad abortività.

## *Gli spermatozoi*

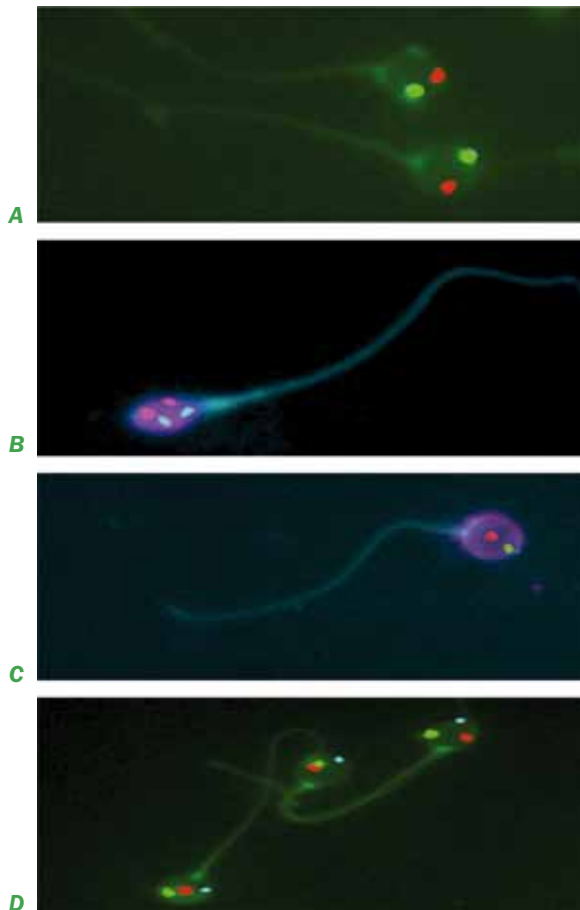
Analogamente a quanto avviene per gli ovociti, il processo di ripartizione dei cromosomi dalle cellule immature agli spermatozoi, da cui dipende la conservazione del numero esatto di cromosomi, è soggetto a errore. Si ottengono, in tal caso, spermatozoi contenenti un numero di cromosomi alterato, condizione nota, come detto in precedenza, con il termine di aneuploidia. Percentuali minime di spermatozoi aneuploidi sono presenti in tutti i campioni seminali, mentre si trovano in proporzioni aumentate nei campioni seminali patologici.

Il test FISH è applicabile sia a spermatozoi ottenuti dall'eiaculato, sia a spermatozoi ottenuti direttamente dalle vie seminali, siano essi freschi o crioconservati. I cromosomi più comunemente analizzati sono: X, Y, 13, 15, 16, 17, 18, 21 e 22. Nei campioni seminali con un numero di spermatozoi superiore al milione, il test FISH è effettuato eseguendo un'analisi statistica su di un numero relativamente alto di spermatozoi (da 1000 a 5000 cellule spermatiche). A questo scopo, si allestiscono 4 preparati dello stesso campione seminale su vetrini da microscopio, ognuno dei quali si ibridizza con una combinazione di 2 o 3 sonde (**Figura 4**).

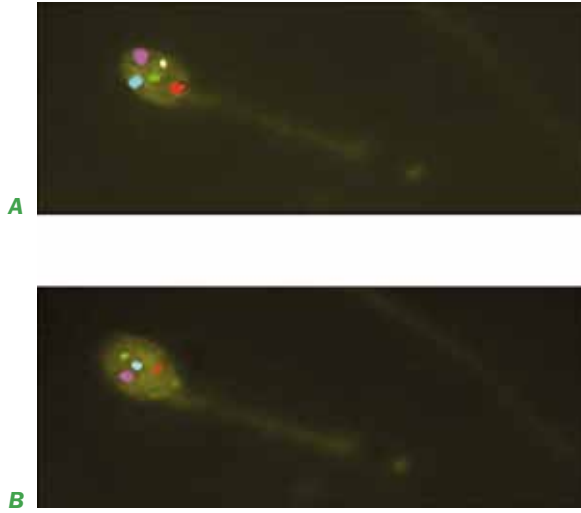
Nel caso di pazienti con oligospermia severa che hanno, cioè, un numero di spermatozoi al di sotto del milione nell'intero eiaculato, e in casi di cellule spermatiche ottenute chirurgicamente dalle vie seminali maschili mediante gli interventi microchirurgici di TESE (TEsticular



Sperm Extraction o prelievo di spermatozoi dal testicolo) o MESA (Microsurgical Epididymal Sperm Aspiration o prelievo degli spermatozoi dall'epididimo), l'esiguo numero di cellule disponibili non consente di allestire 4 preparati. La tecnica è stata quindi modificata: si allestisce un unico preparato con le poche cellule spermatiche disponibili e ogni spermatozoo, opportunamente identificato, viene analizzato in due cicli di ibridizzazione successivi. Nel primo ciclo si utilizzano le sonde specifiche per i cromosomi 13, 16, 18, 21 e 22 (**Figura 5A**). Ultimata la lettura al microscopio a fluorescenza, il preparato è opportunamente lavato e nuovamente ibridizzato, utilizzando questa volta una miscela di sonde specifiche per i cromosomi X, Y, 15 e 17 (**Figura 5B**). In questo modo, ogni spermatozoo è caratterizzato per 9 cromosomi.



**Fig. 4 -** Con gli spermatozoi ottenuti da un campione seminale con conta superiore al milione, si allestiscono 4 preparati, ognuno dei quali viene analizzato per 2 o 3 cromosomi: i cromosomi 15 (verde) e 17 (rosso)(fig. A), il 16 (rosso) e il 22 (azzurro) (fig. B), il 13 (verde) e il 21 (rosso) (fig. C), l'X (verde), l'Y (rosso) e il 18 (azzurro) (fig. D). Tutti gli spermatozoi rappresentati, avendo un segnale per cromosoma, sono normali ad eccezione di quello che appare nella fig. B che ha due copie dei cromosomi 16 e 22.

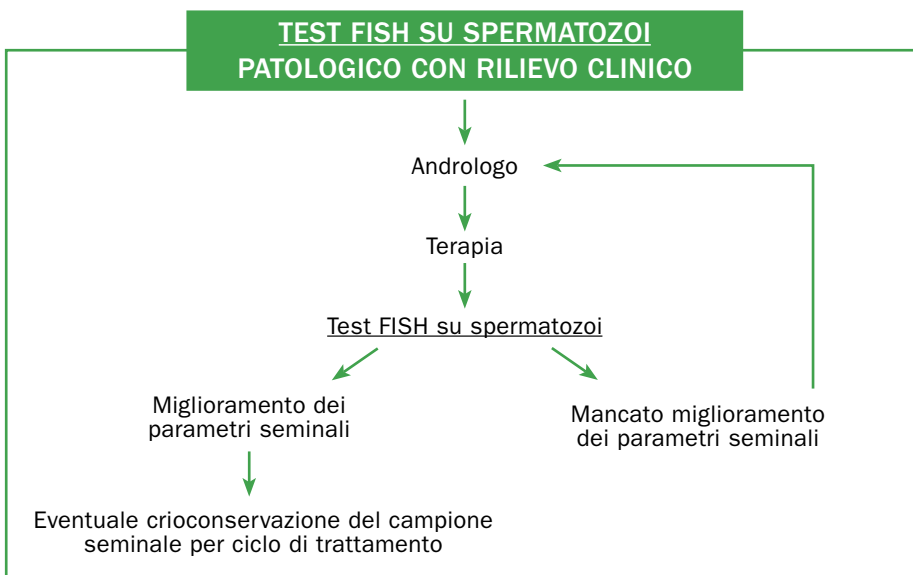


**Fig. 5** - Gli spermatozoi appartenenti a campioni con oligospermia severa si analizzano mediante due cicli di ibridizzazione successivi. Nel primo ciclo si utilizzano le sonde specifiche per i cromosomi 13 (rosso), 16 (azzurro), 18 (rosa), 21 (verde) e 22 (giallo)(fig. A); nel secondo ciclo, quelle specifiche per i cromosomi X (azzurro), Y (rosa pallido), 15 (rosso) e 17 (verde) (fig. B). Lo spermatozoo è normale per tutti i cromosomi ad eccezione di quelli sessuali, X e Y, che sono entrambi presenti.

## Risultati

Un campione seminale è considerato normale dal punto di vista cromosomico quando la percentuale di spermatozoi anormali per i 9 cromosomi studiati non supera il 2.56%. Tuttavia, per l'interpretazione corretta dei risultati ottenuti è stato appositamente disegnato un modello statistico che valuta la differenza in termini di aneuploidie tra frequenza teorica attesa (è la frequenza media delle aneuploidie nei pazienti normospermici, cioè portatori di un campione seminale normale) e frequenza rilevata nel campione in oggetto di studio. La differenza tra frequenza teorica e frequenza riscontrata viene considerata clinicamente rilevante, cioè significativamente superiore rispetto alla norma, quando essa supera un determinato valore.

In questo caso, allo scopo di valutare la possibilità di migliorare la qualità del campione seminale in oggetto, il paziente è inviato all'andrologo che valuterà l'opportunità di prescrivere un trattamento. Dati preliminari riferiscono, infatti, un miglioramento dei parametri seminali in seguito alla prescrizione di una terapia mirata. Tale miglioramento, che interessa non solo il numero e la motilità degli spermatozoi, ma anche la frequenza delle aneuploidie, può determinare un incremento nella capacità fecondante degli spermatozoi. In tal caso, l'andrologo potrà consigliare di eseguire una crioconservazione del campione seminale che sarà eventualmente utilizzato per l'inseminazione degli ovociti in un successivo ciclo di trattamento. Qualora non vi sia miglioramento dei parametri seminali in seguito alla terapia andrologica, il paziente potrà essere riferito di nuovo all'andrologo per una rivalutazione del caso.



L'esperienza clinica ha invece indicato che la terapia andrologica non è di solito necessaria nel caso di un aumento moderato della frazione di spermatozoi aneuploidi, pur essendo il campione definito come patologico, ma moderatamente inferiore alla norma.

La **tavola 1** riporta i risultati della frequenza delle aneuploidie in relazione alla tipologia di campione seminale analizzato.

**Tavola 1.** Analisi cromosomica in campioni seminali. I dati si riferiscono al periodo 2003-2010.

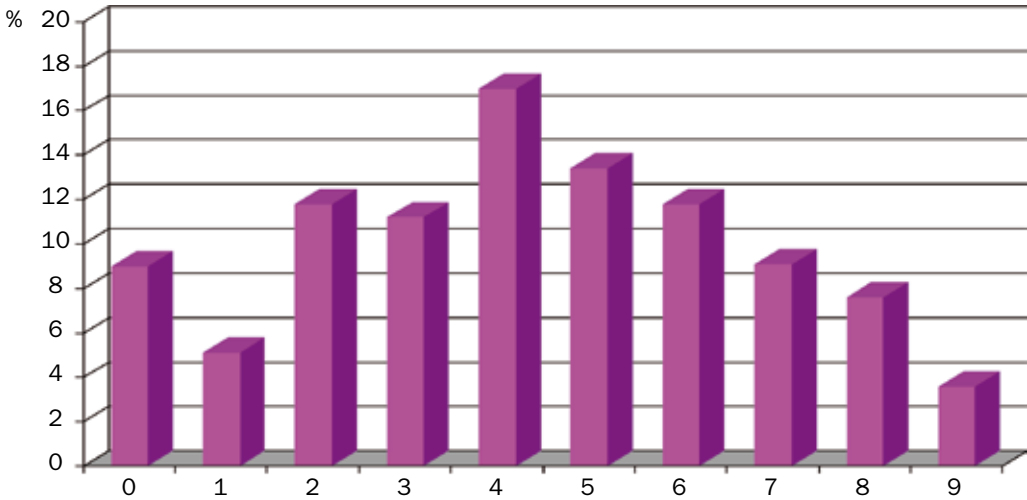
DIAGNOSI CROMOSOMICA						
	N° campioni	Normali (%)	Patologici - necessitano di terapia andrologica (%)	Patologici - non necessitano di terapia andrologica (%)	Senza risultato (%)	Percentuale di cellule spermatiche aneuploidi nei campioni patologici che necessitano di terapia (%)
Normospermici	267	258 (97) <sup>abcd</sup>	0 <sup>efgh</sup>	9 (3)	0	0
OAT	430	373 (87) <sup>a</sup>	25 (6) <sup>e</sup>	32 (7)	0	5.4
OAT severi	237	51 (21) <sup>b</sup>	147 (62) <sup>f</sup>	35 (15)	4 (2)	6.1
TESE	15	1 (7) <sup>c</sup>	12 (79) <sup>g</sup>	1 (7)	1 (7)	7.8
MESA	10	6 (60) <sup>d</sup>	4 (40) <sup>h</sup>	0	0	6.0

I numeri contrassegnati da una lettera uguale sono significativamente diversi quando confrontati l'uno all'altro, in seguito all'analisi statistica. Il valore di questa differenza è espresso dai seguenti indici di probabilità: <sup>abcde</sup> $P < 0.001$ .

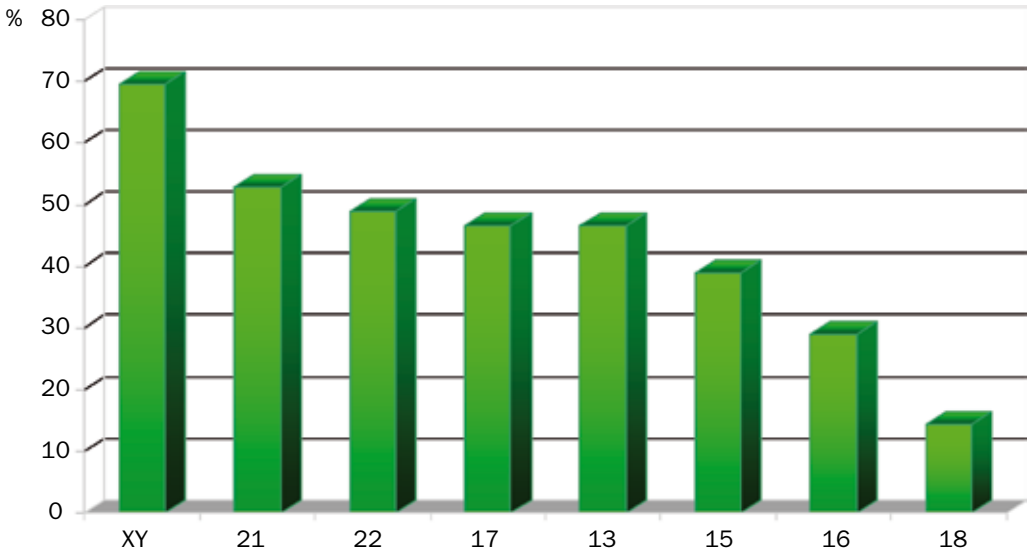
La sigla OAT (oligoastenoteratospermici) si riferisce a pazienti con un liquido seminale che presenta difetti relativi al numero (oligospermia), alla motilità (astenospemia) e alla morfologia (teratospermia) degli spermatozoi. Le sigle TESE e MESA si riferiscono a campioni seminali ottenuti mediante tecniche chirurgiche dal testicolo (TESE) e dall'epididimo (MESA).

L'analisi dei campioni patologici ha fornito alcune considerazioni interessanti. Innanzitutto, si è visto come la maggior parte di questi campioni presenti anomalie a carico di più di un cromosoma con una variabilità significativa comprendente un numero di cromosomi che varia tra 4 e 5 (**Figura 6**). Questa osservazione suggerisce che la condizione di infertilità maschile associata ad un campione seminale severamente patologico può trovare la sua spiegazione, almeno in buona parte, nell'alterazione del processo maturativo degli spermatozoi che conduce ad una ripartizione errata di cromosomi.

Si è inoltre osservato che alcuni cromosomi, più ad altri, sono suscettibili di alterazioni numeriche, originando così spermatozoi aneuploidi. Tra di essi, sono particolarmente rappresentati i cromosomi sessuali, X e Y, seguiti dai cromosomi 21 e 22 (**Figura 7**).



**Fig. 6** - Percentuale di campioni patologici in relazione al numero di cromosomi che presentano un'incidenza aumentata di aneuploide.



**Fig. 7** - Percentuale di variazioni significative valutate per ogni singolo cromosoma. Predominano le variazioni per i cromosomi sessuali, X e Y, seguiti dai cromosomi 21 e 22.

È quindi possibile che i pazienti il cui campione seminale ha valori aumentati di aneuploidie per questi cromosomi siano particolarmente esposti a generare embrioni aneuploidi. In considerazione della compatibilità della trisomia 21 con la vita (sindrome di Down) e dell'elevata incidenza delle trisomie 22 negli aborti spontanei, così come per le aneuploidie dei cromosomi X e Y, è fondamentale che ogni coppia sia informata del proprio rischio riproduttivo.

È importante rilevare che anche campioni seminali in cui la percentuale totale degli spermatozoi aneuploidi è al disotto del valore soglia, per cui sono definiti normali dal punto di vista cromosomico, possono presentare percentuali significativamente maggiori a carico di singoli cromosomi. Questa situazione, che può verificarsi anche in campioni normospermici, espone comunque il paziente al rischio di generare embrioni anormali dal punto di vista cromosomico.

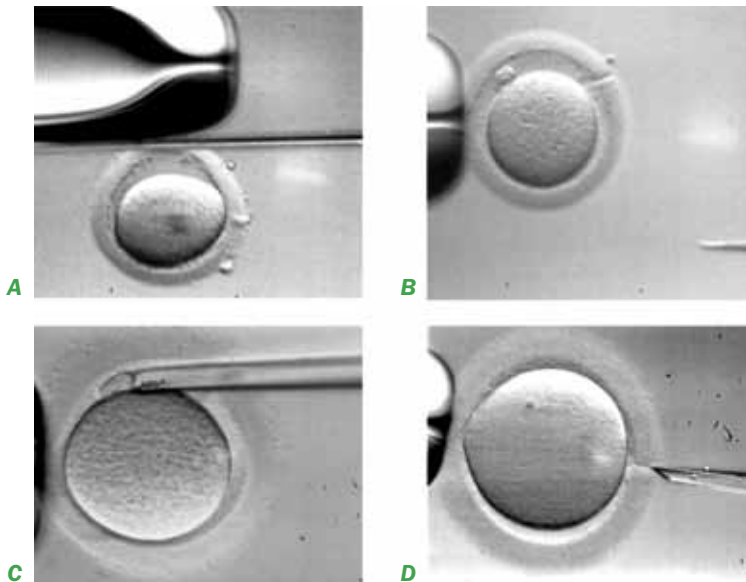
Il test FISH eseguito sugli spermatozoi contribuisce alla valutazione di questo rischio. Inoltre, stiamo applicando, presso il centro SISMeR di Bologna, una tecnica che, mediante l'uso di un microscopio con fascio di luce particolare, sfrutta le proprietà di birifrangenza degli spermatozoi associate alla loro osservazione a alto ingrandimento. Queste proprietà, quando presentano determinate caratteristiche, consentono, con ottima approssimazione, di distinguere l'assetto cromosomico degli spermatozoi.

## *L'ovocita: biopsia del globulo polare*

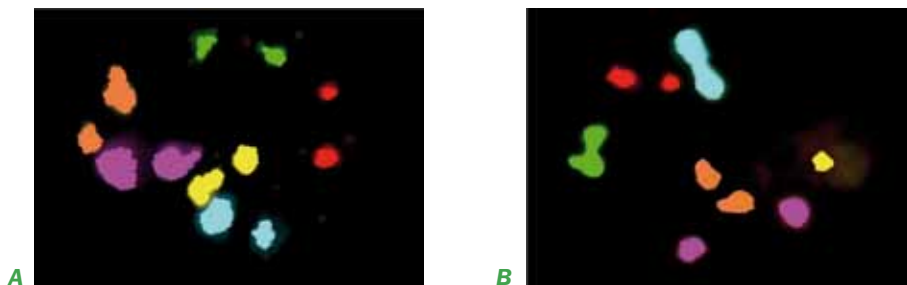
I globuli polari contengono un assetto cromosomico che rappresenta l'immagine speculare dei cromosomi dell'ovocita. Come accennato in precedenza e illustrato nella **figura 3**, il primo globulo polare, che contiene un set di 23 cromosomi ciascuno in doppia copia, viene espulso dall'ovocita prima della sua fecondazione, mentre il secondo è estruso dall'ovocita già fecondato.

Il prelievo dei globuli polari prevede l'apertura parziale della zona pellucida, l'involucro che racchiude l'ovocita, attraverso la quale si introduce un microago di vetro in grado di aspirare il globulo polare (**Figura 8**). Terminata la biopsia, l'ovocita viene rimesso in coltura, mentre ogni globulo polare viene preparato per la lettura e per la diagnosi. Dopo essere stato fissato su di un vetrino da microscopio, si ibridizza durante 2 ore con una miscela di sonde fluorescenti specifiche per i cromosomi 13, 15, 16, 18, 21 e 22 (**Figura 9**).

Nel caso in cui la selezione degli ovociti da inseminare si basi sui risultati dell'analisi del primo globulo polare, i tempi da osservare sono strettissimi. Per questo, l'applicazione della tecnica segue uno schema articolato che richiede una stretta coordinazione, spaziale e temporale, tra le equipe dei medici e dei biologi, sia quelli del laboratorio di fecondazione assistita che quelli del laboratorio di citogenetica. Questa collaborazione, che coinvolge di base 7-8 professionisti, consente di ottenere i risultati entro le 5-6 ore dal prelievo degli ovociti. Si procede così all'inseminazione degli ovociti che sono risultati normali per i cromosomi analizzati (**Figura 8D**).



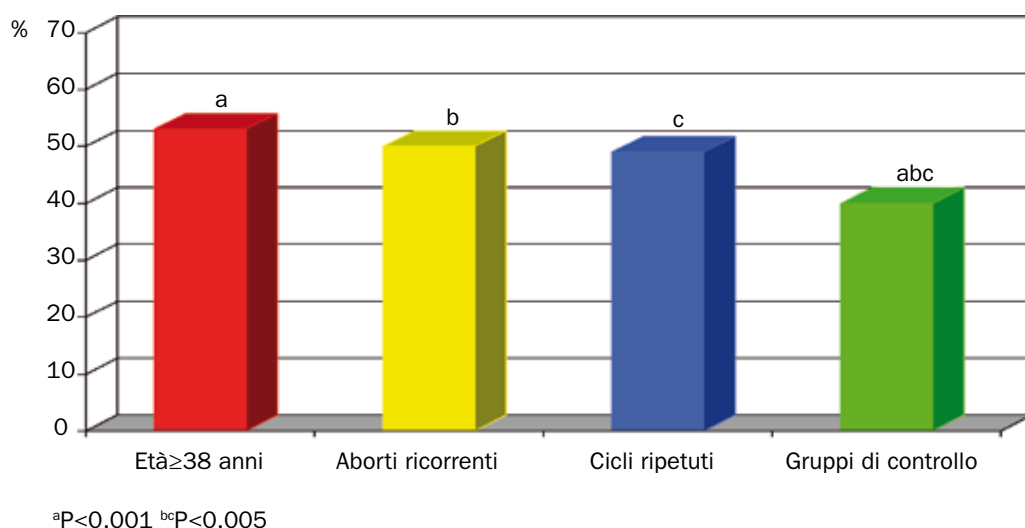
**Fig. 8** - Rimozione del primo globulo polare. Un sottile microago di vetro è utilizzato per aprire una fessura nell'involucro che circonda l'ovocita, la zona pellucida (fig. A). L'ovocita è quindi posizionato con l'apertura alle ore 2 (fig. B) in forma tale da consentire l'inserimento, attraverso di esso, di un microago di vetro a margini arrotondati (fig. C). Mediante una delicata aspirazione, si preleva il globulo polare, lo si estrae dall'ovocita e lo si analizza per i cromosomi in esso contenuti. Una volta ottenuti i risultati, l'ovocita prescelto sarà inseminato introducendo l'apposito microago contenente lo spermatozoo attraverso la stessa fessura aperta in precedenza nella zona pellucida (fig. D).



**Fig. 9** - Analisi del primo globulo polare per i cromosomi 13 (rosso), 15 (arancione), 16 (azzurro), 18 (rosa), 21 (verde) e 22 (giallo). La presenza di due segnali per ogni cromosoma è sinonimo di una condizione di normalità (fig. A), mentre la mancanza di un segnale (cromosoma 22 nella fig. B) indica che la copia mancante è rimasta nell'ovocita. Solo l'ovocita normale sarà candidato all'inseminazione.

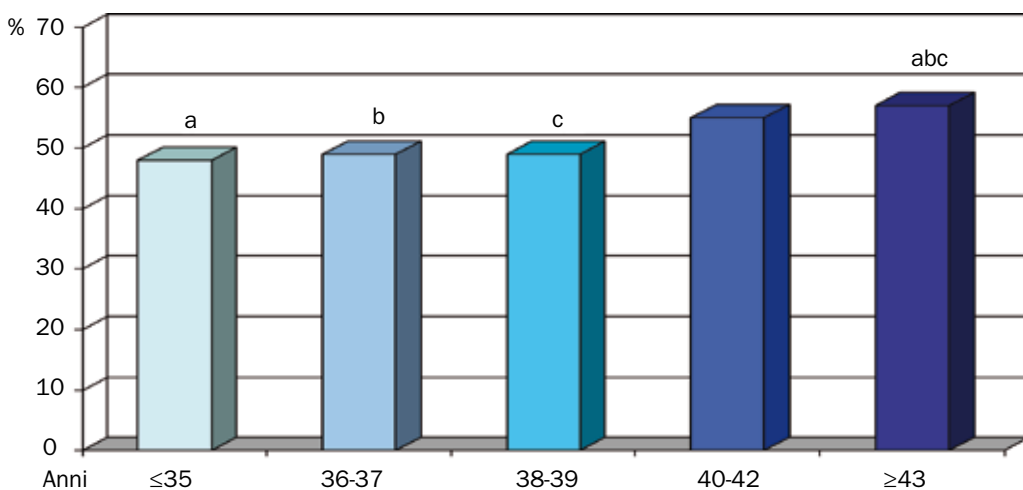
## Risultati

La metodica di analisi del primo globulo polare è stata applicata nel corso degli anni 2004-2010 a 868 cicli di trattamento realizzati in 664 pazienti. La tecnica è stata inoltre applicata su 119 pazienti che hanno eseguito 165 cicli di scongelamento di ovociti durante lo stesso periodo. Le indicazioni alla tecnica sono quelle che presuppongono un rischio elevato di generare ovociti aneuploidi. Questo è particolarmente frequente in pazienti che si sottopongono a programmi di concepimento assistito con scarse possibilità di successo perché la loro storia riproduttiva ha già dimostrato una difficoltà al concepimento, sia naturale sia assistito. In particolare, coppie in cui la partner femminile abbia compiuto 38 anni, coppie che hanno fallito tre o più cicli di trattamento pur avendo eseguito un trasferimento di embrioni considerati potenzialmente in grado di dare origine ad una gravidanza, oppure coppie con una storia di poliabortività.



**Fig. 10** - Percentuale di ovociti aneuploidi sulla base dell'analisi del primo globulo polare. L'indagine è stata eseguita su pazienti a rischio di aneuploidie e su di un gruppo di controllo. La percentuale di ovociti aneuploidi è risultata maggiore nei pazienti con indicazioni all'analisi rispetto al gruppo di controllo. I valori con la stessa lettera sono statisticamente diversi.





<sup>a</sup>P<0.001 <sup>bc</sup>P<0.005

**Fig. 11** - Percentuale di ovociti cromosomicamente anormali sulla base dell'analisi del primo globulo polare. Come previsto, la percentuale aumenta proporzionalmente all'aumentare dell'età della donna. I valori con la stessa lettera sono statisticamente diversi.

I risultati ottenuti mostrano come la percentuale di ovociti cromosomicamente anormali sia maggiore nel caso di pazienti a rischio di aneuploidie rapportate a un gruppo di controllo rappresentato da pazienti prive delle indicazioni menzionate (**Figura 10**).

Risulta inoltre evidente, e in accordo a quanto previsto, come la tendenza a generare ovociti con un numero anormale di cromosomi aumenti in proporzione all'età della donna (**Figura 11**).

La **tavola 2** riporta i risultati totali ottenuti dall'applicazione della metodica sugli ovociti freschi, mentre la **tavola 3** descrive i dati prodotti nel caso di ovociti scongelati.

È importante ricordare che per gravidanze cliniche si intende il numero di gravidanze a termine o in corso con evidenza all'ecografia di battito cardiaco fetale (BCF); l'indice d'impianto rappresenta il rapporto tra i feti che all'ecografia in gravidanza mettono in evidenza il BCF e il numero di embrioni trasferiti.

**Tavola 2.** Analisi del primo globulo polare su ovociti freschi. I dati si riferiscono al periodo 2004-2010.

N° cicli	868
N° pazienti	664
Età (media ± deviazione standard)	38.4±4.0
N° cicli precedenti (media ± deviazione standard)	2.2±2.0
N° ovociti	6671
N° ovociti analizzati (%)	5154 (77)
N° ovociti con diagnosi (%)	4739 (92)
N° ovociti normali per i cromosomi 13, 15, 16, 18, 21, 22	2313 (49)
N° ovociti inseminati	2166
N° ovociti fertilizzati (%)	1733 (80)
N° embrioni totali (%)	1650 (95)
N° trasferimenti (%)	750 (86)
N° gravidanze cliniche (%)	159 (21)
N° aborti	34
N° gravidanze extrauterine	5
Indice d'impianto (%)	(12.4)
Gravidanze evolutive per paziente (%)	120 (18)

**Tavola 3.** Analisi del primo globulo polare su ovociti scongelati. I dati si riferiscono al periodo 2004-2010.

N° cicli	165
N° pazienti	119
Età (media ± deviazione standard)	36.6±3.8
N° cicli precedenti (media ± deviazione standard)	2.0±1.5
N° ovociti	1343
N° ovociti analizzati (%)	1015 (76)
N° ovociti con diagnosi (%)	891 (88)
N° ovociti normali per i cromosomi 13, 15, 16, 18, 21, 22	447 (50)
N° ovociti inseminati	475*
N° ovociti fertilizzati (%)	368 (77)
N° embrioni totali (%)	328 (89)
N° trasferimenti (%)	147 (89)
N° gravidanze cliniche (%)	24 (16)
N° aborti	6
N° gravidanze extrauterine	1
Indice d'impianto (%)	(8.0)
Gravidanze evolutive per paziente (%)	17 (14)

\*Inseminati 28 ovociti senza risultato all'analisi cromosomica.

## *A chi consigliare il test delle aneuploidie*

Il test è particolarmente indicato nei seguenti casi:

	Analisi dei globuli polari	Analisi degli spermatozoi
Donne in età maggiore o uguale a 38 anni	√	
Coppie che hanno fallito tre o più cicli di trattamento	√	√
Coppie con una storia di poliabortività	√	√
Fattore maschile severo		√
Fattore maschile severo dopo terapia andrologica		√

È importante ricordare che, mentre nel caso dell'analisi dell'ovocita il risultato ottenuto può consentire la selezione degli ovociti da inseminare e si esegue, quindi, durante il ciclo di trattamento, il test sugli spermatozoi fa parte degli esami preliminari e si esegue prima del ciclo. In ogni caso, l'interpretazione dei risultati ottenuti può essere di aiuto per valutare un eventuale futuro programma terapeutico. È inoltre utile per discriminare l'origine di percentuali elevate di anomalie cromosomiche negli embrioni generati in vitro.

## *Gli errori cromosomici: le traslocazioni*

Come accennato in precedenza, il processo di ripartizione dei cromosomi dalle cellule immature a quelle mature non avviene sempre in modo corretto e può condurre all'insorgere di anomalie numeriche, le aneuploidie, o strutturali, le traslocazioni.

Queste ultime consistono, durante la formazione delle cellule riproduttive (gli spermatozoi e gli ovociti), nello scambio tra due cromosomi diversi di porzioni più o meno estese di DNA. Qualora questo scambio avvenga in forma bilanciata, cioè senza alterazione della quantità totale del materiale cromosomico, l'individuo che ne è portatore non presenta alcuna anomalia o malformazione. Tuttavia, a causa del meccanismo che interviene nel processo meiotico, la presenza di traslocazioni bilanciate si traduce in un rischio riproduttivo più elevato rispetto alla norma. Infatti, la formazione di cellule riproduttive portatrici della traslocazione in forma sbilanciata può portare alla nascita di bambini malformati con alterazioni cromosomiche gravi. Molto spesso inoltre, queste alterazioni impediscono il concepimento sia naturale sia assistito o causano aborti ricorrenti. Dal punto di vista medico, le traslocazioni si suddividono in robertsoniane e reciproche. Per le modalità in cui sono strutturate, ogni traslocazio-

ne, in particolare le reciproche, rappresenta un caso a se stante per cui è opportuna la valutazione dei singoli casi.

Qualora il portatore della traslocazione sia il partner maschile, è possibile stimare il suo rischio riproduttivo valutando la proporzione di spermatozoi portatori della traslocazione nella forma sbilanciata. A tal proposito si utilizza la tecnica FISH con combinazioni particolari di sonde fluorescenti specifiche per ogni tipo di traslocazione.

La **tavola 4** presenta i risultati ottenuti dallo studio di 32 pazienti infertili portatori di traslocazioni bilanciate. Questi dati dimostrano come la percentuale di spermatozoi sbilanciati sia in genere superiore nel caso delle traslocazioni reciproche. Inoltre, i valori dei range riportati dimostrano come vi sia un'enorme variabilità per singolo caso in quanto a percentuali di spermatozoi portatori della traslocazione in forma sbilanciata.

**Tavola 4.** Valutazione del numero di spermatozoi sbilanciati in pazienti portatori di traslocazioni. I dati si riferiscono al periodo 2005-2010.

	Traslocazioni robertsoniane	Traslocazioni reciproche
N° pazienti	13	19
N° spermatozoi diagnosticati	7682	3443
N° spermatozoi sbilanciati (%)	1808 (23.5) <sup>a</sup>	2024 (59) <sup>a</sup>
range	5-83	10-84

<sup>a</sup>P<0.001. I valori con la stessa lettera sono statisticamente differenti.

Nel caso in cui la partner femminile sia portatrice della traslocazione, è possibile effettuare una valutazione diretta degli ovociti sbilanciati mediante l'analisi dei globuli polari. Anche in questo caso, si ricorre alla tecnica FISH con sonde specifiche per la traslocazione in oggetto. I risultati ottenuti dallo studio di 18 casi hanno confermato una maggior predisposizione da parte delle traslocazioni reciproche a produrre gameti sbilanciati (tavola 5).

**Tavola 5.** Valutazione del numero di ovociti sbilanciati in pazienti portatori di traslocazioni in seguito all'analisi del globulo polare.

	Traslocazioni robertsoniane	Traslocazioni reciproche
N° pazienti	8*	10**
N° ovociti diagnosticati	48	69
N° ovociti sbilanciati (%)	24 (50) <sup>a</sup>	52 (75) <sup>a</sup>
range	33-100	0-100

\*In 2 cicli l'analisi è stata eseguita su entrambi i globuli polari

\*\*In 4 casi l'analisi è stata eseguita su entrambi i globuli polari

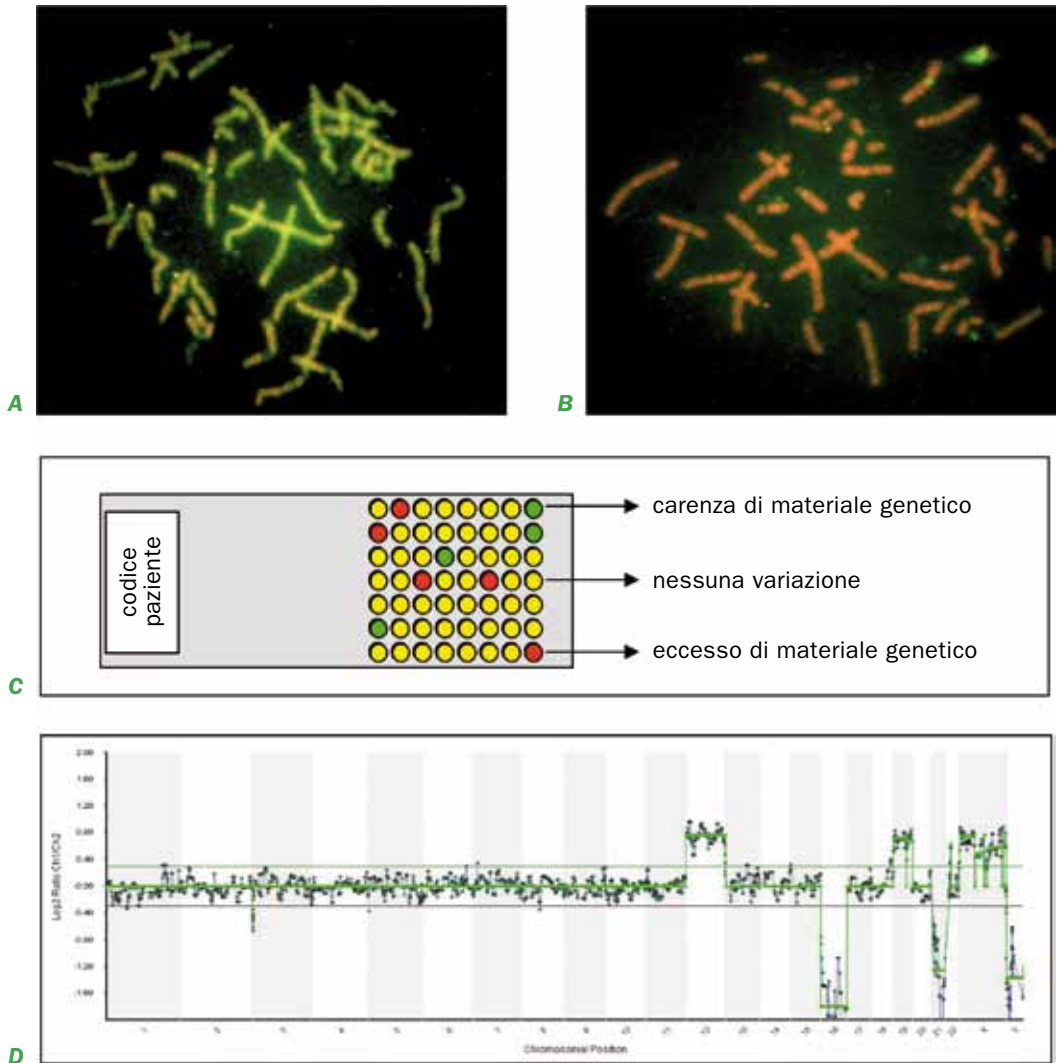
<sup>a</sup>P<0.025. I valori con la stessa lettera sono statisticamente differenti.

## *Nuove strategie*

L'analisi cromosomica dei globuli polari rappresenta un valido strumento per la selezione delle cellule uovo. Rispetto all'informazione ottenuta dallo studio del primo globulo polare (limitazione imposta dalla legge 40 e successive linee guida fino a maggio 2009) una maggior completezza nella diagnosi dell'ovocita si ottiene dall'analisi di entrambi i globuli polari della cellula uovo fecondata. In questo modo si possono valutare entrambi i processi di divisione meiotica che conducono alla ripartizione corretta dei cromosomi all'interno dell'ovocita. Questo approccio, già effettuato in SISMeR prima dell'avvento della legge 40, è di nuovo possibile in seguito alla nuova situazione legislativa italiana.

Nel corso dell'ultimo decennio sono state sviluppate metodiche che consentono l'analisi di tutti i cromosomi dei globuli polari e, pertanto delle cellule uovo. Per procedere in tal senso, è necessaria una quantità notevole di DNA e quindi queste tecniche richiedono l'amplificazione dell'unica copia del DNA contenuta nel globulo polare. Il prodotto così ottenuto è poi analizzato per tutti i cromosomi mediante la metodica di CGH (dall'inglese Comparative Genomic Hybridization), che è pertanto in grado di fornire un'informazione sull'assetto cromosomico dell'ovocita relativa a tutti i cromosomi in esso contenuti (**Figura 12**).

L'affinamento della CGH ha richiesto molti anni di ricerca e la sua applicazione clinica è già una realtà presso i centri SISMeR. Sotto il coordinamento di ESHRE, la Società Europea di Riproduzione Umana ed Embriologia, che ha organizzato uno studio per validare la metodica, abbiamo eseguito 22 cicli di trattamento nei quali i globuli polari di 100 ovociti sono stati analizzati mediante CGH. Ne è risultata una percentuale di anomalie cromosomiche molto elevata che ha portato a classificare come anormali l'81% degli ovociti studiati. Questo importante studio ha confermato l'applicabilità della CGH per la diagnosi dei globuli polari portando all'identificazione di quegli ovociti che, sulla base del loro corredo cromosomico, non sono compatibili con una gravidanza normale.



**Fig. 12** - La tecnica di CGH consente di visualizzare tutti i cromosomi presenti all'interno del globulo polare (A) che riflette il contenuto cromosomico dell'ovocita (B). La tecnica utilizza sonde fluorescenti di diverso colore, rosso e verde, la cui intensità, letta da un appropriato scanner e valutata mediante un software specifico, indica la condizione di normalità o di anormalità rispetto a un DNA di controllo normale (C). Nella figura D tutti i cromosomi sono normali ad eccezione dei cromosomi 12 e 19 che sono presenti in eccesso (picchi di segnali nella parte superiore del grafico) e i cromosomi 16 e 21 che sono presenti in difetto (picchi di segnali nella parte inferiore del grafico). I cromosomi X e Y sono nella norma visto che il DNA di controllo è maschile (e pertanto portatore dei cromosomi XY) mentre il DNA dell'ovocita è femminile (e quindi portatore dei cromosomi XX).



## Riferimenti bibliografici.

- 1 - Benagiano G., Gianaroli L. (2010) The constitutional court modifies Italian legislation on assisted reproduction technology. *Reprod. Biomed. Online* 20, 261-266.
- 2 - Bernardini L., Costa M., Bottazzi C., Gianaroli L., Magli M.C., Francioso R., Conte N., Ragni N. (2004) Sperm aneuploidy and recurrent pregnancy loss. *Reprod. Biomed. Online* 9, 312-320.
- 3 - Bernardini L., Gianaroli L., Fortini D., Conte N., Magli M.C., Cavani S., Gaggero G., Tindiglia C., Ragni N., Venturini P.L. (2000) Frequency of hyper, hypohaploidy and diploidy in ejaculate, epididymal and testicular germ cells of infertile patients. *Hum. Reprod.* 15, 2165-2172.
- 4 - Cavallini G., Crippa A., Magli M.C., Cavallini N., Ferraretti A.P., Gianaroli L. (2008) A study to sustain the hypothesis of the multiple genesis of oligoasthenoteratospermia in idiopathic infertile males. *Biol. Reprod.* 79, 667-673.
- 5 - Cavallini G., Ferraretti A.P., Gianaroli L., Biagiotti G., Vitali G. (2004) Cinnoxicam and L-carnitine/acetyl-L-carnitine treatment for idiopathic and varicocele-associated oligoasthenospermia. *J. Androl.* 25, 761-770.
- 6 - Ferraretti A.P., Gianaroli L., Magli M.C., Farfalli V., Lappi M., Munné S. (2008) PGD for chromosomal anomalies. In *Infertility and Assisted Reproduction*. Eds. B. Rizk, J.A. Garcia-Velasco, H. Sallam, A. Makrigiannakis. Cambridge University Press, pp. 643-656.
- 7 - Fragouli E., Wells D., Thornhill A., Serhal P., Faed M.J.W., Harper J., Delhanty J.D.A. (2006) Comparative genomic hybridization analysis of human oocytes and polar bodies. *Hum. Reprod.* 21, 2319-2328.
- 8 - Geraedts J., Collins J., Gianaroli L., Goossens V., Handyside A., Harper J., Montag M., Repping S., Schmutzler A. (2010) What next for preimplantation genetic screening? A polar body approach! *Hum. Reprod.* 25, 575-577.
- 9 - Geraedts J., Montag M., Magli M.C., Repping S., Handyside A., Staessen C., Harper J., Schmutzler A., Collins J., Goossens V., Van der Ven H., Vesela K., Gianaroli L. (2011) Polar body array CGH can be achieved within 12 hours with an acceptable level of accuracy for prediction of the status of the corresponding oocyte. *Hum. Reprod.* In stampa.
- 10 - Gianaroli L., Magli M.C., Cavallini G., Crippa A., Capoti A., Resta S., Robles F., Ferraretti A.P. (2010) Predicting aneuploidy in human oocytes: key factors which affect the meiotic process. *Hum. Reprod.* 25, 2374-2386.
- 11 - Gianaroli L., Magli M.C., Cavallini G., Crippa A., Nadalini M., Bernardini L., Menchini – Fabris G.F., Voliani S., Ferraretti A.P. (2005) Frequency of aneuploidy in spermatozoa from patients with extremely severe male factor infertility. *Hum. Reprod.* 20, 2140-2152.



- 12 - Gianaroli L., Magli M.C., Collodel G., Moretti E., Ferraretti A.P, Baccetti B. (2008) Sperm head's birefringence: a new criterion for sperm selection. *Fertil Steril* 90, 104-112.
- 13 - Gianaroli L., Magli M.C., Ferraretti A.P (2002) Preimplantation genetic diagnosis. In: *Current practices and controversies in assisted reproduction*. Ed. E. Vayena, P Rowe, Griffin D. World Health Organization, Geneva, pp. 210-219.
- 14 - Gianaroli L., Magli M.C., Ferraretti A.P (2005) Sperm and blastomere aneuploidy detection in reproductive genetics and medicine. *J. Histochem. Cytochem.* 53, 261-268.
- 15 - Gianaroli L., Magli M.C., Ferraretti A.P, Crippa A., Lappi M., Capitani S., Baccetti B. (2010) Birefringence characteristics in sperm heads allow for the selection of reacted spermatozoa for ICSI. *Fertil. Steril.* 93, 808-813.
- 16 - Gianaroli L., Magli M.C., Ferraretti A.P, Iammarrone E. (2000) Preimplantation diagnosis after assisted reproduction techniques for genetically-determined male infertility. *J. Endocrinol. Invest.* 23, 711-716.
- 17 - Gianaroli L., Magli M.C., Ferraretti A.P, Lappi M., Borghi E., Ermini B. (2007) Oocyte euploidy, pronuclear zygote morphology and embryo chromosomal complement. *Hum. Reprod.* 22, 241-249.
- 18 - Gianaroli L., Magli M.C., Ferraretti A.P, Munné S. (1999) Preimplantation diagnosis for aneuploidies in patients undergoing in vitro fertilization with a poor prognosis: identification of the categories for which it should be proposed. *Fertil. Steril.* 72, 837-844.
- 19 - Magli M.C., Ferraretti A.P, Crippa A., Lappi M., Feliciani E., Gianaroli L. (2006) First meiosis errors in immature oocytes generated by stimulated cycles. *Fertil. Steril.* 86, 629-635.
- 20 - Magli M.C., Gianaroli L., Crippa A., Munné S., Robles F., Ferraretti A.P (2010) Aneuploidies of chromosomes 1, 4 and 6 are not compatible with human embryos' implantation. *Fertil. Steril.* 94, 2012-2016.
- 21 - Magli M.C., Gianaroli L., Ferraretti A.P, Gordts S., Fredericks V., Crippa A. (2009) Paternal contribution to aneuploidy in preimplantation embryos. *Reprod. Biomed. Online* 18, 536-542.
- 22 - Magli M.C., Gianaroli L., Ferraretti A.P, Toschi M., Esposito F., Fasolino M.C. (2004) The combination of polar body and embryo biopsy does not affect embryo viability. *Hum. Reprod.* 19, 1163-1169.
- 23 - Verlinsky Y. and Kuliev A. (1996) Preimplantation diagnosis of common aneuploidies in infertile couples of advanced maternal age. *Hum. Reprod.* 11, 2076-2077.





# In questa collana

- 1 Infertilità di coppia
- 2 Le metodiche di procreazione medicalmente assistita
- 3 Tappe di un ciclo di concepimento assistito
- 4 Risultati dei trattamenti PMA dei Centri SISMeR
- 5 Informazioni e preparazione al ciclo di trattamento PMA
- 6 La biopsia dell'embrione e la diagnosi pre-impianto
- 7 Consensi informati
- 8 Per saperne di più
- 9 Glossario
- 10 Studio dei cromosomi in spermatozoi e cellule uovo
- 11 Laboratorio di andrologia
- 12 Documentazione sugli aspetti legislativi in Italia
- 13 Progetti di ricerca SISMeR



Società Italiana di Studi di Medicina della Riproduzione

Via Mazzini, 12 - 40138 Bologna

T. +39 051 307307

F. +39 051 302933

pazienti@sismer.it

www.sismer.it

UNI EN ISO 9001:2008



SISTEMA DI GESTIONE  
QUALITÀ CERTIFICATO  
CERTIFICATO N. 1298

CERTIQUALITY  
E MEMBRO DELLA  
FEDERAZIONE CISO



AZIENDA CERTIFICATA DAL 1998