

Le anomalie citogenetiche degli spermatozoi

Cytogenetic abnormalities in human sperm

C. BOTTAZZI, M. COSTA

S.S. Diagnosi e Terapia dell'Infertilità, Dipartimento di Scienze Genetiche, Perinatali e Ginecologiche, E.O. Ospedali "Galliera", Genova, Italy

Parole chiave: Aneuploidie spermatiche, FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*), Infertilità maschile

Key words: *Sperm aneuploidies, FISH (Fluorescence In Situ Hybridization), Male infertility*

Riassunto

Abbiamo compiuto una revisione dei dati presenti in letteratura riguardanti la frequenza di anomalie citogenetiche spermatiche confrontando i dati ottenuti mediante la cariotipizzazione della cellula spermatica dopo penetrazione nell'ovocita di criceto con quelli ottenuti mediante la tecnica di ibridazione *in situ* non isotopica (*Fluorescence In Situ Hybridization*, FISH).

In uomini normali è stata riscontrata una frequenza media totale delle disomie pari a 2,2% ed una stima delle aneuploidie totali pari a 4,5%. Inoltre, l'età avanzata associata ad anomalie dello spermogramma, la radio- e la chemio-terapia, l'esposizione ad agenti inquinanti, la caffeina, il fumo e l'alcool costituiscono fattori di rischio che comportano un aumento delle cellule spermatiche con assetto genetico sbilanciato. In pazienti infertili si è evidenziata una correlazione inversa fra i tassi di aneuploidie e il numero di spermatozoi mentre non ancora completamente chiare sono le correlazioni con la motilità e la morfologia. La tecnica FISH su spermatozoi è oggi talvolta proposta alle coppie infertili candidate ad un programma di fecondazione assistita. È importante sottolineare però che tale tecnica non offre vantaggi per un quadro predittivo sull'*outcome* di tecniche di fecondazione assistita di II livello, mentre potrebbe offrire un importante approfondimento diagnostico in coppie con abortività ripetuta.

Summary

A review is presented of the literature on the frequency and distribution of chromosome abnormalities in spermatozoa from normal men, obtained by sperm karyotyping after in vitro penetration of hamster oocytes and by multicolour-FISH analysis. The total mean dysomy in sperm nuclei is 2.2% and the estimated aneuploidy is 4.5%. An increased risk of producing aneuploid spermatozoa was observed in men who smoke cigarettes, use alcohol and/or caffeine. The effects of therapeutic agents used in the treatment of cancer have been reviewed. In infertile males, a large number of studies demonstrated an inverse correlation between the frequency of sperm aneuploidy and sperm concentration. As far as concerns sperm motility and morphology, data are controversial. Multicolour-FISH on sperm nuclei is sometimes suggested to infertile couples who undergo an ART (Assisted Reproductive Technology) programme. However, it is important to point out that multicolour-FISH on sperm nuclei does not allow prediction of the outcome of assisted reproduction, but might be of diagnostic value in couples suffering from recurrent spontaneous abortion

Nella specie umana le anomalie cromosomiche degli embrioni costituiscono la patologia più frequente al concepimento e presentano una frequenza del 50% negli aborti spontanei, del 6% nei feti morti e dell'1% nei nati vivi. È stato stimato che almeno l'8,1% delle gravidanze cliniche hanno anomalie cromosomiche numeriche (~7%) o strutturali (~1%)¹.

La maggior parte di queste alterazioni cromosomiche sono dovute ad errori meiotici durante la gametogenesi e studi condotti mediante l'analisi di polimorfismi del DNA hanno dimostrato che l'origine parentale è strettamente legata al tipo di anomalia.

Inoltre, è stato stimato che l'origine paterna si ha nello 0-30% delle trisomie che interessano gli autosomi, nel 50-100% delle trisomie dei cromosomi sessuali², nel 60% delle triploidie³ e nell'84% delle anomalie cromosomiche strutturali *de novo*⁴.

Studi condotti sui gameti maschili indicano che complessivamente circa l'1-2% degli spermatozoi presenta alterazioni cromosomiche numeriche mentre il 7-14% presenta anomalie strutturali⁵.

Nell'ultimo decennio, l'applicazione della tecnica di ibridazione *in situ* non isotopica (FISH) per l'analisi cromosomica degli spermatozoi ha consentito la valuta-

zione della frequenza delle aneuploidie dei gameti maschili per quasi tutti i cromosomi, ha permesso l'identificazione dei cromosomi più frequentemente coinvolti e la comprensione dei meccanismi che determinano le aneuploidie stesse.

L'utilizzo della FISH è risultato più vantaggioso superando importanti limiti tecnici degli approcci precedenti, quali il basso numero di spermatozoi analizzati, offrendo riproducibilità e affidabilità dei risultati.

Infatti, la cariotipizzazione della cellula spermatogonica dopo penetrazione nell'ovocita di criceto consente l'analisi di un numero limitato di spermatozoi (nell'ordine di alcune centinaia) a causa del basso numero di metafasi ottenute ed esclude dall'analisi gli spermatozoi, potenzialmente anche aneuploidi, privi di capacità fecondante⁶⁻¹¹.

I dati ottenuti con la cariotipizzazione sono risultati comunque compatibili con i dati successivamente ottenuti con la FISH¹²⁻¹⁶.

Tuttavia è necessario osservare che entrambe le metodiche non sono in grado di fornire dati precisi sulle frequenze nullisomiche. Infatti, spesso si nota un eccesso di queste ultime rispetto alle frequenze disomiche. Tale eccedenza è riconducibile alla possibile perdita parziale di cromosomi nella procedura di preparazione del vetrino nella tecnica di cariotipizzazione¹⁷ oppure a mancata ibridazione nella FISH¹⁸⁻¹⁹.

Il principale meccanismo che sta all'origine delle aneuploidie negli spermatozoi umani è la non-disgiunzione cromosomica che comporta la produzione contemporanea di un gamete nullisomico e di un gamete disomico²⁰. Tenendo conto di ciò, valutata la frequenza delle disomie, è possibile compiere una stima della frequenza delle aneuploidie (uguale cioè a 2 volte la frequenza delle disomie) sebbene sia necessario tener presente che la nullisomia può anche aver origine da un meccanismo di *lagging* anafasico mitotico delle cellule progeneratrici dei gameti maschili.

Numerosi sono gli studi presenti in letteratura compiuti su spermatozoi di uomini normali mediante la *multicolour* FISH¹⁸⁻¹⁹⁻²¹⁻²².

Si osservano considerevoli differenze relative alle frequenze delle disomie per i singoli cromosomi. Tali differenze possono essere dovute a eterogeneità interindividuale o alle diverse metodologie utilizzate nei diversi laboratori (diversi tipi di sonda).

Inoltre, studi condotti su uomini infertili hanno chiarito possibili correlazioni esistenti tra i parametri spermatici convenzionali (concentrazione, motilità e morfologia) e la frequenza delle disomie, nullisomie e diploidie spermatiche.

Una importante discussione scientifica si è sviluppata sui possibili alti rischi di trasmissione di difetti genetici alla prole dopo l'introduzione della ICSI (*Intra Cytoplasmic Sperm Injection*) nelle tecniche di Procreazione Medicalmente Assistita²³⁻²⁴. Ricordiamo infatti che nella fecondazione dell'ovocita mediante microiniezione non avviene la selezione naturale del gamete maschile e i rischi genetici ed epigenetici associati alla tecnica ICSI non sono a tutt'oggi completamente chiari.

Aneuploidie su spermatozoi

I dati presenti in letteratura ottenuti mediante la tecnica di cariotipizzazione mostrano valori della frequenza totale di disomie che vanno da 0,7 a 1,7% e le frequenze più elevate sono quelle del cromosoma 1 (0,09%), del cromosoma 21 (0,09%) e dei cromosomi del sesso (0,11%)²⁵⁻²⁷. La media delle disomie per ciascun cromosoma è 0,03% per gli autosomi e 0,11% per i cromosomi sessuali.

Inoltre, essendo 0,9% la media dei valori delle disomie totali riportate in questi studi, si può stimare un'incidenza delle aneuploidie di 1,8%.

Mediante la *multicolour* FISH sono stati analizzati diciotto dei ventiquattro cromosomi umani. Nel 2005, Templado et al. hanno effettuato una revisione degli studi in cui erano stati analizzati almeno 10.000 spermatozoi per campione²⁸. In tali studi i valori delle disomie risultano omogenei per la maggior parte dei cromosomi fatta eccezione per i cromosomi 3, 21, 22 e i cromosomi sessuali che mostrano frequenze aumentate.

Quindi, sia mediante la cariotipizzazione sia mediante la FISH, si osservano frequenze aumentate per il cromosoma 21 e per gli eterocromosomi. Questi cromosomi sono maggiormente coinvolti in meccanismi di non-disgiunzione.

È stato dimostrato da alcuni autori che il cromosoma 21 e i cromosomi sessuali presentano un singolo chiasma alla prima divisione meiotica²⁹⁻³⁰. Ciò spiegherebbe un'aumentata suscettibilità alla non-disgiunzione dal momento che la presenza di più chiasmi fra cromosomi omologhi garantirebbe una corretta segregazione meiotica durante l'anafase 1³¹.

Skakkebaek et al. avevano dimostrato che il 15% degli spermatozoi primari non presentavano un corretto appaiamento dei cromosomi sessuali³².

Tale ipotesi è in accordo con studi più recenti che evidenziano che almeno il 27% dei bivalenti sessuali non presentano ricombinazione³⁰. Inoltre, frequen-

ze di ricombinazione significativamente più basse si sono riscontrate in casi di trisomia 21 e Klinefelter con origine paterna² e in spermatozoi aneuploidi 24XY³³.

Per quanto riguarda le frequenze aumentate relative ai cromosomi 3 e 22 sarebbero necessari ulteriori studi mediante la FISH per confermare i dati riportati^{34 35}.

Escludendo i cromosomi 3 e 22, la media delle disomie risulta pari a 0,09% per gli autosomi e 0,26% per gli eterocromosomi, mentre la media totale delle disomie è di 2,2% e la stima delle aneuploidie totali è 4,5%, valore superiore rispetto a quello ottenuto mediante la tecnica di cariotipizzazione (1,8%)²⁸.

Studi recenti hanno individuato uomini con cariotipo normale, perfettamente sani e fertili, che presentano costituzionalmente tassi di aneuploidie aumentati³⁶. Mentre alcuni fra questi donatori sani presentano frequenze di aneuploidie aumentate solo per alcuni cromosomi, altri presentano frequenze aumentate per tutti i cromosomi. Questi donatori risultano quindi più frequentemente soggetti a meccanismi alterati della gametogenesi e, avendo osservato anche un aumento delle aneuploidie nei linfociti periferici, gli Autori suggeriscono una possibile maggior suscettibilità allo sviluppo di tumori in tali soggetti.

Esistono fattori di rischio che comportano un aumento delle aneuploidie spermatiche?

I dati presenti in letteratura indicano che l'età avanzata associata ad anomalie dello sperma, la radio- e chemio-terapia, l'esposizione ad alcuni agenti inquinanti, la caffeina, il fumo e l'alcool³⁷ sono fattori di rischio.

Per quanto concerne gli effetti della radio- e chemio-terapia si è visto che entrambe comportano un aumento della frequenza di gameti cromosomicamente sbilanciati.

Studi condotti su animali hanno dimostrato che le cellule meioiche (spermatociti) e post-meiotiche (spermatidi e spermatozoi) sono più sensibili al danno rispetto alle cellule pre-meiotiche (spermatozoni)^{38 39}.

Inoltre, analizzando 13 pazienti affetti da seminoma trattati con dosi di 30-40 Gy (con dose testicolare di 0,4-5 Gy) si è visto che la percentuale di spermatozoi con anomalie cromosomiche raggiungeva un valore medio di 20,9%, valore aumentato rispetto ai controlli (8,5%)⁴⁰.

Anche la chemioterapia ha effetti negativi sul processo meiotico. Robbins et al. hanno dimostrato un netto aumento delle iperaploidie dei cromosomi X, Y e 8, di tutte le loro combinazioni e delle diploidie nei

100 giorni successivi alla terapia con NOVP (novantrone, oncovin, vinblastina, prednisone)⁴¹. Si è visto però che, a distanza di due anni di terapia, la percentuale dei gameti aneuploidi risulta uguale a quella presente prima del trattamento⁴².

I dati riportati sottolineano l'importanza della crioconservazione del seme per questi pazienti prima della terapia e indicano un intervallo di tempo minimo necessario (2 anni) per superare gli effetti negativi dei trattamenti sull'assetto genetico delle cellule spermatiche.

L'esposizione professionale a pesticidi non sembra aumentare il tasso di aneuploidie negli agricoltori^{43 44}, ma è un fattore di rischio per gli operai delle fabbriche dove essi vengono prodotti^{45 46}.

Aneuploidie su spermatozoi e infertilità

La frequenza delle aneuploidie dei gameti è stata ampiamente studiata anche in uomini infertili, tuttavia la letteratura presenta dati discordanti.

L'infertilità risulta spesso associata a tassi aumentati di aneuploidie. È interessante osservare che, mentre tassi aumentati di aneuploidie potrebbero costituire di per sé causa di infertilità, nel contempo le anomalie delle sinapsi ed un aumento dei cromosomi privi di foci di ricombinazione potrebbero altresì essere la causa di una ridotta o assente produzione di spermatozoi dovuta alla rimozione dal *pool* meiotico delle cellule aneuploidi durante il pachitene.

Studi compiuti su modelli animali di sterilità maschile hanno evidenziato che la diminuita produzione di spermatozoi non è necessariamente sempre associata ad un aumento dei tassi di aneuploidie⁴⁷. Tuttavia, almeno il 6% dei maschi infertili e il 17% dei maschi affetti da oligoastenoteratozoospermia grave hanno anomalie della meiosi. Disordini meiotici si sono riscontrati nel 40% dei pazienti con una concentrazione di spermatozoi mobili inferiore a 0,5 mil/ml⁴⁸. Tali disordini meiotici potrebbero essere causati da anomalie dei geni che intervengono nei meccanismi di controllo e riparazione del DNA, da difetti dei processi di sinapsi, o anche da un ambiente testicolare alterato da alti livelli di FSH (*follicle stimulating hormone*).

Come correlano le aneuploidie spermatiche con i parametri dello spermiogramma?

Per quanto riguarda le correlazioni esistenti tra la concentrazione degli spermatozoi e i tassi di aneuploidie, i dati presenti in letteratura riportano un aumento di gameti sbilanciati associato ad un basso nu-

mero di spermatozoi⁴⁹. Quindi, questi studi concordano nel ritrovare una correlazione inversa tra la concentrazione spermatica e la frequenza di aneuploidie.

In effetti, Bonduelle et al., studiando i concepimenti da ICSI, hanno evidenziato un significativo incremento dell'incidenza di anomalie cromosomiche prenatali. Nella revisione pubblicata nel 2002 della casistica ICSI di Bruxelles sulla diagnosi genetica prenatale un cariotipo fetale anomalo è stato reperito in 47 campioni su 1.586 (3,0%; 95% CI 2,2-3,9%). Di queste 47 anomalie 25 erano *de novo* (1,6%; 95% CI 1,0-2,3%, vs. 0,5% nel gruppo di controllo, differenza significativa con $p < 0,007$). Si trattava di 10 anomalie dei cromosomi del sesso e di 15 anomalie autosomiche sia numeriche ($n = 8$) che strutturali ($n = 7$).

Le altre 22 anomalie (21 bilanciate, 1 sbilanciata) erano ereditate (1,4%; 95% CI 0,9-2,1% vs. una incidenza dello 0,3-0,4% nella popolazione generale, differenza significativa con $p < 0,001$).

Un dato interessante a questo proposito era che l'aumento delle anomalie *de novo* si presentava solo nei casi in cui la concentrazione degli spermatozoi del padre era inferiore a 20 milioni/ml (2,1% di anomalie) rispetto a quelli con concentrazione superiore (0,24% di anomalie). Nessun incremento ulteriore della percentuale di anomalie fu rilevato nei sottogruppi con concentrazioni inferiori ($\leq 1, \leq 5, \leq 10, \leq 15$ milioni/ml). Anche il peggioramento della motilità, ma non quello della morfologia correlavano con un aumento del rischio di anomalie cromosomiche *de novo*⁵⁰.

Un altro dato da considerare è che esiste sicuramente una forte selezione degli embrioni dopo il *transfer*, poiché è noto dai dati della diagnosi pre-impianto che nei casi di ICSI eseguita per azoospermia ostruttiva (OA) o non ostruttiva (NOA) più di metà degli embrioni formati presenta aneuploidie⁵¹.

Pochi e controversi sono i dati riguardanti la motilità. Tuttavia è necessario tener presente che risulta molto difficile trovare una condizione di astenozoospermia isolata, poiché i difetti della motilità sono spesso associati ad alterazioni di altri parametri spermatici.

È stato dimostrato che in casi di astenozoospermia isolata dovuta ad alterazioni gravi del flagello, quali irregolarità del diametro e coda mozza, si hanno tassi di aneuploidie aumentati. Inoltre, le abituali tecniche di selezione degli spermatozoi (*swim-up*) non migliorano la percentuale di aneuploidie spermatiche⁵².

Machev et al. hanno recentemente compiuto una revisione della letteratura per chiarire le correlazioni

esistenti tra la morfologia spermatica e la frequenza di gameti sbilanciati⁵³.

Sono state individuate tre diverse forme di teratozoospermia. Nella teratozoospermia polimorfica, dove la maggior parte degli spermatozoi presenta più di un difetto morfologico, si osserva un lieve incremento statisticamente non significativo dei tassi di aneuploidia.

Nella globozoospermia si è invece riscontrato un aumento significativo delle aneuploidie per i cromosomi acrocentrici e in particolare per i cromosomi del sesso. A tale proposito ricordiamo anche che in pazienti affetti da globozoospermia si ha un'elevata decondensazione della cromatina associata ad un incremento dei processi apoptotici^{54,55}.

Una percentuale molto elevata di gameti cromosomicamente sbilanciati che raggiunge valori del 90-100% si ha invece nella macrocefalia, dove la maggior parte degli spermatozoi presenta anche acrosoma gigante e code multiple.

Queste associazioni non si rivelano predittive sui singoli spermatozoi. Infatti, studi condotti mediante la FISH, associata all'analisi morfologica a contrasto di fase del singolo spermatozoo, hanno dimostrato che anomalie cromosomiche numeriche sono presenti in spermatozoi con teste di tutte le dimensioni e che alcuni spermatozoi disomici sono perfettamente normali dal punto di vista morfologico⁵⁶.

In generale, quindi, la morfologia del singolo spermatozoo non correla con l'assetto genetico.

Tutto ciò implica che fino ad oggi non si hanno criteri specifici per la scelta dello spermatozoo migliore da utilizzare nella tecnica ICSI, fatta eccezione per l'esclusione di quei gameti con grossolane anomalie della testa.

Anche i pazienti azoospermici con cariotipo normale presentano tassi aumentati di aneuploidie⁵⁶. È stata riportata un'evidente differenza tra pazienti affetti da azoospermia non ostruttiva (% aneuploidie 19,6) e pazienti con azoospermia ostruttiva (% aneuploidie 8,2). Questi dati sono in accordo con recenti studi che hanno valutato il tasso di ricombinazione al pachitene in pazienti azoospermici riportando basse frequenze di ricombinazione nei pazienti con azoospermia ostruttiva (46,3) e frequenze di ricombinazione ancor più basse in pazienti affetti da azoospermia non ostruttiva (40,4) rispetto ai valori di controllo (48,0)⁵⁷.

Questi dati dimostrano che nei pazienti affetti da azoospermia non ostruttiva sono più frequentemente presenti disturbi meiotici.

Inoltre, è interessante osservare che l'incremento delle disomie e diploidie osservato in pazienti con

azoospermia non ostruttiva risulta superiore a quello riscontrato in pazienti con sindrome di Klinefelter⁵⁸. Le conseguenze cliniche di queste anomalie sono però di portata limitata: dati ottenuti da uno studio retrospettivo in coppie infertili, per solo fattore maschile, dimostrano che non si hanno significative differenze del tasso di abortività tra ICSI compiute utilizzando spermatozoi eiaculati (18,55%) e ICSI compiute utilizzando spermatozoi estratti chirurgicamente (19%)⁵⁹. Significative differenze non si sono riscontrate neppure confrontando il tasso di abortività delle ICSI fatte per solo fattore maschile con quello delle ICSI fatte per altri fattori (18,7%).

In uno studio multicentrico prospettico controllato di coorte condotto su 2.809 gravidanze ottenute da ICSI mediante l'uso di spermatozoi eiaculati, epididimari e testicolari non è stata evidenziata nessuna influenza dell'origine spermatica sull'andamento della gravidanza e delle sue complicazioni, compresa la pre-eclampsia⁶⁰. I dati alla nascita dei neonati sono risultati simili nei tre gruppi. Il rischio di malformazioni negli aborti, nei nati morti, nei nati vivi e negli aborti indotti non era diverso nei tre gruppi e la percentuale di malformazioni non correlava con i parametri riguardanti il numero degli spermatozoi.

Con le limitazioni dovute alla bassa numerosità di alcuni sottogruppi ed al fatto che le gravidanze erano arruolate tardivamente per il follow-up, per cui non sono stati studiati gli aborti precoci e le gravidanze ectopiche, gli Autori concludono che il corso della gravidanza non è influenzato né dall'origine né dal numero degli spermatozoi.

Inoltre, in uno studio da noi condotto mediante l'utilizzo delle tecniche FISH e *multicolour* FISH per la valutazione delle aneuploidie spermatiche in uomini provenienti da coppie con aborto ripetuto *sine causa* abbiamo osservato che solo il 10% dei maschi studiati presentava tassi di aneuploidie elevati (30-34%), indipendentemente dal quadro seminale, e che i parametri seminali tradizionali non danno alcuna informazione predittiva sull'aborto abituale⁶¹.

Considerando poi altri studi presenti in letteratura riguardanti la frequenza di aneuploidie spermatiche e l'aborto abituale, possiamo concludere che la percentuale di uomini a rischio di produrre gameti aberranti in misura significativamente rischiosa per l'effetto sul concepito è di circa il 4,1%⁶²⁻⁶⁵ e che soltanto nel 10,8% degli aborti ripetuti si è dimostrata l'origine paterna della anomalia⁶⁶. Risulta quindi raro il contributo paterno nella ricorrenza delle aneuploidie negli aborti ripetuti. Questi dati trovano supporto anche nell'alta percentuale di suc-

cessi ottenuti mediante l'ovodonazione in tali pazienti⁶⁷.

Diversa è la situazione delle aneuploidie seminali nel caso in cui il paziente sia portatore di una anomalia cromosomica nota.

Circa il 2-14% dei pazienti infertili presenta cariotipo alterato. Anomalie cromosomiche sono state individuate nel 5% dei pazienti affetti da oligozoospermia e nel 14% dei pazienti azoospermici⁶⁸⁻⁷⁰.

Pazienti infertili 47,XXY hanno una frequenza di spermatozoi 24,XY e 24,YY inferiore all'1% mentre pazienti Klinefelter (47,XXY) e Klinefelter-mosaicismo hanno rispettivamente tassi di aneuploidie pari a 2-2,5% e 1,5-7%.

Nei pazienti portatori di traslocazioni Robertsoniane la percentuale di spermatozoi con cromosomi sbilanciati va dal 3 al 27% per i cromosomi coinvolti nella traslocazione⁷¹⁻⁷³.

In tali pazienti sono stati identificati effetti intercromosomici: un aumento della frequenza di trisomia 21 associato a t(13q;14q), un aumento delle disomie X,Y,1,18,13 associate a t(14;21)(q10;q10), un aumento delle disomie 18 e 21 associato a t(13;15)(q10;q10) ed un aumento delle disomie 6 e 21 associato a t(13;22)(q10;q10).

Per quanto riguarda le traslocazioni reciproche si è evidenziato un quadro più grave: in questi pazienti il 40-50% dei gameti presenta un corredo cromosomico sbilanciato.

Ricordiamo che, nel caso di traslocazione reciproca, durante la I divisione meiotica, all'appaiamento dei cromosomi, anche i segmenti traslocati si affiancano ai loro tratti omologhi e formano complessi a croce detti quadrivalenti. Come nelle normali meiosi, le fibre del fuso si fissano poi ai centromeri e i cromosomi omologhi vengono attirati ai poli opposti. In particolare, i cromosomi del quadrivalente possono disgiungere e segregare secondo disgiunzione 2:2 alternata, adiacente 1 o adiacente 2, o secondo disgiunzione 3:1 o disgiunzione 4:0. L'unica segregazione che produce gameti normali è quella alternata.

È stato dimostrato che in pazienti portatori di traslocazioni reciproche la segregazione alternata è la più comune presentando una frequenza del 44-51% mentre la segregazione adiacente 1 ha una frequenza che va dal 16 al 40% e quella adiacente 2 è la segregazione meno comune con frequenza pari al 9%. Per la disgiunzione 3:1 si è calcolata una frequenza media pari all'11%.

Teoricamente i gameti di un individuo con traslocazione reciproca bilanciata dovrebbero dare origine a prole in cui il 50% di individui ha cariotipo sbilan-

ciato, il 25% bilanciato e il 25% con cariotipo normale. Fortunatamente, la percentuale di neonati con cariotipo sbilanciato è inferiore all'atteso. Ciò dipende da varie ragioni, quali la configurazione spaziale dell'appaiamento cromosomico che condiziona prevalentemente un tipo di segregazione, la selezione dei gameti con cariotipo anomalo, la fecondazione preferenziale di gameti normali e/o bilanciati, la selezione abortiva di zigoti aneuploidi a vari stadi dello sviluppo e il sesso del genitore portatore della traslocazione.

I dati derivanti dalla diagnosi prenatale indicano che la frequenza media di traslocazioni sbilanciate con origine paterna è pari al 12%⁷⁴. In letteratura sono descritti casi di segregazione sbilanciata provenienti da ICSI⁷⁵. Ciò sottolinea l'importanza dell'analisi del cariotipo e della consulenza genetica nel caso in cui si siano riscontrate alterazioni in uomini candidati ad ICSI.

Conclusioni e prospettive

La tecnica FISH utilizzata per la valutazione del tasso di aneuploidie spermatiche viene oggi talvolta proposta alle coppie infertili candidate alle tecniche di fecondazione assistita di II livello quali ICSI, TE-SA/E (*Testicular Sperm Extraction*) o PESA (*Percutaneous Epididymal Sperm Aspiration*) associate ad ICSI.

Tuttavia, benché tale analisi sia in grado di offrire un approfondimento diagnostico in pazienti infertili, è importante sottolineare che non fornisce alcun vantaggio nel condizionare l'*outcome* delle tecniche di fecondazione assistita. Inoltre il tasso di aneuploidie seminali anche nei casi più gravi resta in ogni caso largamente inferiore a quello abitualmente e fisiologicamente presente nel gamete femminile.

La *multicolour* FISH su nuclei spermatici assume invece un probabile valore diagnostico nei casi di abortività ripetuta *sine causa*, dove alte frequenze di aneuploidie spermatiche potrebbero suggerire, nei Paesi dove sia consentito, l'impiego della tecnica pre-impianto (*Pre-implantation Genetic Screening*, PGS) nell'ambito di un programma riproduttivo mediante tecniche di II livello.

Fino ad oggi non si dispone di tecniche che consentano di scegliere facilmente lo spermatozoo con assetto cromosomico normale da utilizzare nella ICSI. La capacità fecondante di uno spermatozoo e la sua capacità di dare vita ad un embrione con buone possibilità evolutive non dipendono poi dal solo assetto

cromosomico, ma pure da una serie di caratteristiche strutturali e funzionali, che vanno molto al di là del semplice cariotipo. Esiste perciò una intensa attività di ricerca sulle tecniche miranti a selezionare lo spermatozoo ideale. Recentemente è stata descritta in letteratura la prima gravidanza ottenuta mediante l'utilizzo di uno spermatozoo elettroforeticamente selezionato avente alti livelli di integrità del DNA⁷⁶. Questa tecnica si basa sul fatto che gli spermatozoi di migliore morfologia e con minore frammentazione del DNA sono più elettronegativi. L'elettroforesi è in grado di separare una quota di spermatozoi con caratteristiche migliori di quelli del campione di partenza, sia esso fresco, crioconservato o addirittura un campione da biopsia. Il legame tra la migliore qualità degli spermatozoi e la loro capacità di migrare elettroforeticamente è probabilmente dovuto alla presenza di sialoproteine di superficie (es. CD 52), significativamente più rappresentate sugli spermatozoi morfologicamente normali.

Il gruppo dell'Università di Yale propone invece la selezione di spermatozoi dopo *binding* con acido ialuronico⁷⁷. Soltanto gli spermatozoi maturi, che hanno eliminato il *surplus* di citoplasma ed hanno subito un rimodellamento di membrana, sono capaci di legarsi alla zona pellucida dell'ovocita ed all'acido ialuronico. Essi hanno maggiori livelli di una proteina del gruppo delle chaperonine (HspA2) componente del complesso sinaptonemiale, implicata nella meiosi e nella riparazione del DNA, il loro DNA è meno frammentato, i fenomeni apoptotici sono meno frequenti e gli istoni sono completamente rimossi; alla maturità spermatozoaria si associa un minor tasso di aneuploidie. Gli spermatozoi selezionati con questa tecnica presentano minor tasso di aneuploidie, comparabile a quelli di campioni selezionati con *binding* alla zona pellucida, indipendentemente dal livello di aneuploidie del campione di partenza. Il metodo non è ancora stato applicato *in vivo* e manca quindi una prova sul campo della sua efficacia terapeutica.

In ultimo, il gruppo di Berkovitz ha messo a punto una metodica di selezione basata sullo studio "a fresco" degli aspetti morfologici più fini degli spermatozoi (*MSOME motile sperm organellar morphology examination*)⁷⁸. Un ingrandimento fino a 6.300 volte viene ottenuto combinando l'ingrandimento ottico e l'ingrandimento digitale dell'immagine. I singoli spermatozoi mobili vengono analizzati e selezionati per la regolarità del nucleo, l'acrosoma, la lamina post-acrosomiale, il collo, i mitocondri e la coda. Utilizzando l'iniezione intracitoplasmica di questi

nemaspermi (IMSSI, *intracytoplasmic morphologically selected sperm injection*) gli Autori hanno dimostrato un aumento della *fertilization rate*, del numero dei “*top quality embryos*”, della *implantation rate*, *pregnancy rate* e *live birth rate*.

Oggi ci sono motivi etici, economici ed anche legali per perseguire con forza il fine di selezionare i mi-

gliori gameti, anziché effettuare la selezione “a valle” sugli embrioni. Tali motivazioni sono particolarmente sentite in Italia, dove la legge 40/2004 limita il numero di ovociti da fertilizzare. Ci aspettiamo quindi che queste linee di ricerca siano presto trasformate in realtà terapeutiche proprio nel nostro Paese.

Bibliografia

- 1 Jacobs PA. *The chromosome complement of human gamete*. Oxf Rev Reprod Biol 1992;14:47-72.
- 2 Hassold T, Hunt P. *To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy*. Nat Rev Genet 2001;2:280-91.
- 3 Zaragoza MV, Surti U, Redline RW, Millie E, Chakravarti A, Hassold TJ. *Parental origin and phenotype of triploidy in spontaneous abortions: predominance of diandry and association with the partial hydatidiform mole*. Am J Hum Genet 2000;66:1807-20.
- 4 Olson SD, Magenis RE. *Preferential paternal origin of the novo structural rearrangements*. In: Daniel A, ed. *The Cytogenetics of Mammalian Autosomal Rearrangements*. New York: Alan R Liss 1988, p. 583-99.
- 5 Martin RH. *Detection of genetic damage in human sperm*. Reprod Toxicol 1993;7:47-52.
- 6 Martin RH, Balkan W, Burns K, Rademaker AW, Linn CC, Rudd NL. *The chromosome constitution of 1000 human spermatozoa*. Hum Genet 1983;77:108-14.
- 7 Brandiff B, Gordon L, Ashworth L, Watchmaker G, Moore II D, Wyrobek AJ, et al. *Chromosomes of human sperm: variability among normal individuals*. Hum Genet 1985;70:18-24.
- 8 Kamiguci Y, Mikamo K. *An improved, efficient method for analyzing human sperm chromosomes using zona-free hamster ova*. Am J Hum Genet 1986;38:724-40.
- 9 Jenderny J, Röhrborn G. *Chromosome analysis of human sperm*. Hum Genet 1987;76:385-8.
- 10 Benet J, Navarro J, Genescà A, Egozcue J, Templado C. *Chromosome abnormalities in human spermatozoa after albumin or Test-Yolk capacitation*. Hum Reprod 1991;6:369-75.
- 11 Estpo AM, Cieply K, Van Kirk V, Munnè S, Garver K. *Cytogenetic studies in human sperm*. Hum Genet 1991;87:447-51.
- 12 Martin RH, Chan K. *Detection of aneuploidy in human interphase spermatozoa by fluorescence in situ hybridization (FISH)*. Cytogenet Cell Genet 1993;64:23-6.
- 13 Martin RH, Spriggs E, Ko E, Rademaker AW. *Multicolour fluorescence in situ hybridization analysis of aneuploidy and diploidy frequencies in 225846 sperm from 10 normal men*. Biol Reprod 1996;54:394-8.
- 14 Robbins WA, Segraves R, Pinkel D, Wyrobek AJ. *Detection of aneuploid human sperm by fluorescence in situ hybridization: evidence for a donor difference in frequency of sperm disomic for chromosome 1 and Y*. Am J Hum Genet 1993;52:799-807.
- 15 Spriggs EL, Rademaker AW, Martin RH. *Aneuploidy in human sperm: the use of multicolour FISH to test various theories of non-disjunction*. Am J Hum Genet 1996;58:356-62.
- 16 Van Hummelen P, Lowe XR, Wyrobek AJ. *Simultaneous detection of structural and numerical chromosome abnormalities in sperm of healthy men by multicolour fluorescence in situ hybridization*. Hum Genet 1996;98:608-15.
- 17 Templado C, Benet J, Genescà A, Navarro J, Caballin MR, Mirò R, et al. *Human sperm chromosomes*. Hum Reprod 1988;2:133-8.
- 18 Downie SE, Flaherty SP, Matthews CD. *Detection of chromosomes and estimation of aneuploidy in human spermatozoa using fluorescence in-situ hybridization*. Mol Hum Reprod 1997a;3:585-98.
- 19 Guttenbach M, Engel W, Schmid M. *Analysis of structural and numerical chromosome abnormalities in sperm of normal men carriers of constitutional chromosome aberrations. A Review*. Hum Genet 1997;100:1-21.
- 20 Marquez C, Egozcue J, Martorell MR, Moreno V, Templado C. *Colcemid increases the frequency of chromosome abnormalities in human sperm*. Cytogenet Cell Genet 1996;72:164-70.
- 21 Egozcue J, Blanco J, Vidal F. *Chromosome studies in human sperm nuclei using fluorescence in-situ hybridization (FISH)*. Hum Reprod Update 1997;5:441-52.
- 22 Shi Q, Martin RH. *Aneuploidy in human sperm: a review of frequency and distribution of aneuploidy, effects of donor age and lifestyle factors*. Cytogenet Cell Genet 2000a;90:219-26.
- 23 Devroey P, Van Steirteghem A. *A review of ten years experience of ICSI*. Hum Reprod Update 2004;10:19-28.
- 24 Retzlöff MG, Hornstein MD. *Is intracytoplasmic sperm injection safe?* Fertil Steril 2003;80:851-9.
- 25 Brandiff B, Gordon L. *Human sperm cytogenetics and the one cell zygote*. In: Allen JW, Bridges BA, Lyon MF, Moses MJ, Russel RB, eds. *Biology of Mammalian Germ Cell Mutagenesis*. Banbury Report 34, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor 1990, p. 183-94.
- 26 Martin RH, Rademaker AW. *The frequency of aneuploidy among individual chromosomes in 6,821 human sperm chromosome complements*. Cytogenet Cell Genet 1990;53:103-7.
- 27 Templado C, Marquez C, Munnè S, Colls P, Martorell MR, Cieply K, et al. *An analysis of human sperm chromosome aneuploidy*. Cytogenet Cell Genet 1996;74:194-200.
- 28 Templado C, Bosch M, Benet J. *Frequency and distribution of chromosome abnormalities in human spermatozoa*. Cytogenet Genome Res 2005;111:199-205.
- 29 Laurie DA, Hultén MA. *Further studies on chiasma distribution and interference in the human male*. Ann Hum Genet 1985;49:203-14.
- 30 Sun F, Oliver-Bonet M, Liehr T, Starke H, Ko E, Rademaker

- A, et al. *Human male recombination maps for individual chromosomes*. *Am J Genet* 2004;74:521-31.
- ³¹ Koehler KE, Hawley RS, Sherman S, Hassold T. *Recombination and nondisjunction in humans and flies*. *Hum Mol Genet* 1996;5:1495-504.
- ³² Skakkebaek NE, Bryant JI, Philip J. *Studies on meiotic chromosomes in infertile men and controls with normal karyotypes*. *J Reprod Fertil* 1973;35:23-36.
- ³³ Shi Q, Spriggs E, Field LL, Ko E, Barclay L, Martin R. *Single sperm typing demonstrates that reduced recombination is associated with the production of aneuploidy 24,XY human sperm*. *Am J Med Genet* 2001;99:34-8.
- ³⁴ Downie SE, Flaherty SP, Swann NJ, Matthews CD. *Estimation of aneuploidy for chromosomes 3, 7, 16, X and Y in spermatozoa from 10 normospermic men using fluorescence in situ hybridization*. *Mol Hum Reprod* 1997b;3:815-9.
- ³⁵ Martin RH, Rademaker AW. *Non-disjunction in human sperm: comparison of frequencies in acrocentric chromosomes*. *Cytogenet Cell Genet* 1999;86:43-5.
- ³⁶ Rubes J, Vozdova M, Robbins WA, Rezacova O, Perreault D, Wyrobek AJ. *Stable variants of sperm aneuploidy among healthy men show association between germinal and somatic aneuploidy*. *Am J Hum Genet* 2002;70:1507-19.
- ³⁷ Robbins WA, Elashoff DA, Xun L, Jia J, Li N, Wu G, et al. *Effect of lifestyle exposures on sperm aneuploidy*. *Cytogenet Genome Res* 2005;111:37-77.
- ³⁸ Alder I, El Tarras A. *Clastogenic effects of cis-diaminedichloroplatinum II. Induction of chromosomal aberrations in primary spermatocytes and spermatogonia stem cells of mice*. *Mutat Res* 1990;243:173-8.
- ³⁹ Qui J, Hales B, Robaire B. *Adverse effects of cyclophosphamide on progeny outcome can be mediated through post-testicular mechanisms in rat*. *Biol Reprod* 1992;46:926-31.
- ⁴⁰ Martin R, Hildebrand K, Yamamoto J, Rademaker A, Barnes M, Douglas G. *An increased frequency of human sperm chromosomal abnormalities after radiotherapy*. *Mutat Res* 1986;174:219-25.
- ⁴¹ Robbins WA, Meistrich ML, Moore D, Hagemester FB, Weier HU, Cassel MJ. *Chemotherapy induces transient sex chromosomal and autosomal aneuploidy in human sperm*. *Nat Genet* 1997;16:74-8.
- ⁴² Martin R, Ernst S, Rademaker A, Barclay L, Ko E, Summers N. *Analysis of human sperm karyotypes in testicular cancer patients before and after chemotherapy*. *Cytogenet Cell Genet* 1997;78:120-3.
- ⁴³ Smith JI, Garry VF, Rademaker AW, Martin RH. *Human sperm aneuploidy after exposure to pesticides*. *Mol Reprod Dev* 2004;67:353-9.
- ⁴⁴ Härkönen K, Viitanen T, Larsen SB, Bonde JP, Lähdetie J. *Aneuploidy in sperm and exposure to fungicides and lifestyle factors*. *ASCLEPIOS. A European Concerted Action on Occupational Hazards to Male Reproductive Capability*. *Environ Mol Mutagen* 1999;34:39-46.
- ⁴⁵ Padungton C, Hassold TJ, Millie E, Ryan LM, Savitz DA, Christiani DC, et al. *Sperm aneuploidy among Chinese pesticide factory workers: scoring by the FISH method*. *Am J Ind Med* 1999;36:230-8.
- ⁴⁶ Xia Y, Bian Q, Xu L, Chen S, Song L, Liu J, et al. *Genotoxic effects on human spermatozoa among pesticide factory workers exposed to fenvalerate*. *Toxicology* 2004;203:49-60.
- ⁴⁷ Oppedisano L, Haines G, Hrabchak C, Fimia G, Elliott R, Sassone-Corsi P, et al. *The rate of aneuploidy in altered in spermatids from infertile mice*. *Hum Reprod* 2002;17:710-7.
- ⁴⁸ Vendrell JM, Garcia F, Veiga A, Calderon G, Egozcue S, Egozcue J, et al. *Meiotic abnormalities and spermatogenic parameters in severe oligoasthenozoospermia*. *Hum Reprod* 1999;14:375-8.
- ⁴⁹ Miharu N. *Chromosome abnormalities in sperm from infertile men with normal somatic karyotypes: oligozoospermia*. *Cytogenet Genome Res* 2005;111:347-51.
- ⁵⁰ Bonduelle M, Van Assche E, Joris H, Keymolen K, Devroey P, Van Steirteghem A, et al. *Prenatal testing in ICSI pregnancies: incidence of chromosomal anomalies in 1586 karyotypes and relation to sperm parameters*. *Hum Reprod* 2002;17:2600-14.
- ⁵¹ Platteau P, Staessen C, Michiels A, Tournaye H, Van Steirteghem A, Liebaers I, et al. *Comparison of the aneuploidy frequency in embryos derived from testicular sperm extraction in obstructive and non-obstructive azoospermic men*. *Hum Reprod* 2004;19:1570-4.
- ⁵² Rives NMD. *Chromosome abnormalities in sperm from infertile men with normal somatic karyotypes: asthenozoospermia*. *Cytogenet Cell Genet* 2005;111:358-62.
- ⁵³ Machev N, Gosset P, Vivile S. *Chromosome abnormalities in sperm from infertile men with normal somatic karyotypes: teratozoospermia*. *Cytogenet Cell Genet* 2005;111:1352-7.
- ⁵⁴ Vicari E, Perdichizzi A, De Palma A, Burrello N, D'Agata R, Calogero AE. *Globozoospermia is associated with chromatin structure abnormalities. Case report*. *Hum Reprod* 2002;17:2128-33.
- ⁵⁵ Strehler E, Sterzik K, De Santo M, Bacetti B, Capitani S, Colodel G, et al. *Apoptosis in human ejaculated sperm cells (notulae seminologicae 9)*. *J Submicrosc Cytol Pathol* 1996;28:587-96.
- ⁵⁶ Celic Ozenci C, Jakab A, Kovacs T, Catalanotti J, Demir R, Brayward P, et al. *Sperm selection for ICSI: shape properties do not predict the absence or presence of numerical chromosomal aberrations*. *Hum Reprod* 2004;19:2052-9.
- ⁵⁷ Levron J, Aviram-Goldring A, Madgar I, Raviv G, Barkai G, Dor J. *Sperm chromosome abnormalities in men with severe male factor infertility who are undergoing in vitro fertilization with intracytoplasmic sperm injection*. *Fertil Steril* 2001;76:479-84.
- ⁵⁸ Martin RH. *Meiotic chromosome abnormalities in human spermatogenesis*. *Reprod Tox* 2006;22:142-7.
- ⁵⁹ Bahceci M, Ulug U. *Does underlying infertility aetiology impact on first trimester miscarriage rate following ICSI? A preliminary report from 1244 singleton gestation*. *Hum Reprod* 2005;20:717-21.
- ⁶⁰ Ludwig M, Katalinic A. *Pregnancy course and health of children born after ICSI depending on parameters of male factor infertility*. *Hum Reprod* 2003;18:351-7.
- ⁶¹ Bernardini LM, Costa M, Bottazzi C, Gianaroli L, Magli MC, Venturini PL, et al. *Sperm aneuploidy and recurrent pregnancy loss*. *Reprod Biomed Online* 2004;9:312-20.

- ⁶² Rosenbusch B, Sterzik K. *Sperm chromosome and habitual abortion*. Fertil Steril 1991;56:370-2.
- ⁶³ Rubio C, Gil-Salmon M, Simon C, Vidal F, Rodrigo L, Minquez Y, et al. *Incidence of sperm chromosomal abnormalities in a risk population: relationship with sperm quality and ICSI outcome*. Hum Reprod 2001;16:2084-92.
- ⁶⁴ Carrell DT, Wilcox AL, Lowy L, Peterson CM, Jones KP, Erickson L, et al. *Elevated sperm chromosome abnormalities and apoptosis in patient with unexplained recurrent pregnancy loss*. Obst Gynecol 2003;101:1229-35.
- ⁶⁵ Giorlandino C, Calugi G, Laconianni L. *Spermatozoa with chromosomal abnormalities may result in a higher rate of recurrent abortion*. Fertil Steril 1998;70:576-7.
- ⁶⁶ Robinson WP, McFadden DE, Stephenson MD. *The origin of abnormalities in recurrent aneuploidy/polyploidy*. Am J Hum Genet 2001;69:1245-54.
- ⁶⁷ Remohi J, Gallardo E, Levy M, Valbuena D, de los Santos MJ, Simon C, et al. *Oocyte donation in women with recurrent pregnancy loss*. Hum Reprod 1996;11:2048-51.
- ⁶⁸ Meschede D, Louwen F, Eiben B, Horst J. *Intracytoplasmic sperm injection pregnancy with fetal trisomy 9p resulting from a balanced paternal translocation*. Hum Reprod 1997;12:1913-4.
- ⁶⁹ Johnson MD. *Genetic risks of intracytoplasmic sperm injection in the treatment of male infertility: recommendations for genetic counselling and screening*. Fertil Steril 1998;70:397-411.
- ⁷⁰ Shi Q, Martin RH. *Aneuploidy in human spermatozoa: FISH analysis in men with constitutional chromosomal abnormalities, and infertile men*. J Reprod Fertil 2001;121:655-66.
- ⁷¹ Rousseaux S, Chevret E, Monteil M, Cozzi J, Pelletier R, Delafontaine D, et al. *Sperm nuclei analysis of a Robertsonian t(14q21q) carrier, by FISH, using three plasmids and two YAC probes*. Hum Genet 1995;96:655-60.
- ⁷² Honda H, Miharu N, Samura O, He H, Ohama K. *Meiotic segregation analysis of a 14;21 Robertsonian translocation carrier by fluorescence in situ hybridization*. Hum Genet 2000;106:188-93.
- ⁷³ Escudero T, Lee M, Carrel D, Blanco J, Munne S. *Analysis of chromosome abnormalities in sperm and embryos from two 45,XY,t(13;14)(q10;q10) carriers*. Prenat Diagn 2000;20:599-602.
- ⁷⁴ Boué H, Gallano P. *A collaborative study of the segregation of inherited chromosome structural rearrangements in 1356 prenatal diagnoses*. Prenat Diagn 1984;4:45-67.
- ⁷⁵ Belin V, Farhat M, Monset-Couchard M. *Intracytoplasmic sperm injection pregnancy with trisomy 20p and monosomy 22q in a newborn resulting from a balanced paternal translocation*. Biol Neonate 1999;13:3406-13.
- ⁷⁶ Ainsworth C, Nixon B, Jansen RPS, Aitken RJ. *First recorded pregnancy and normal birth after ICSI using electrophoretically isolated spermatozoa*. Hum Reprod 2006;13:1-4.
- ⁷⁷ Jakab A, Sakkas D, Delpiano E, Cayli S, Kovanci E, Ward D, et al. *Intracytoplasmic sperm injection: a novel selection method for sperm with normal frequency of chromosomal aneuploidies*. Fertil Steril 2005;84:1665-73.
- ⁷⁸ Berkovitz A, Eltes F, Lederman H, Peer S, Ellenbogen A, Feldberg B, et al. *How to improve IVF-ICSI outcome by sperm selection*. Reprod Biomed Online 2006;12:634-8.

Domanda 1: Qual è la percentuale stimata di aneuploidie totali negli spermatozoi di uomini normali?

1. 10%
2. 2,5%
3. 4,5%

Domanda 2: Qual è la condizione in cui la frequenza di aneuploidie spermatiche è maggiormente aumentata in uomini infertili con cariotipo normale?

1. Oligozoospermia
2. Macrocefalia
3. Astenozoospermia

Domanda 3: Qual è la frequenza media di traslocazioni sbilanciate con origine paterna indicata dalla diagnosi prenatale?

1. 30%
2. 7%
3. 12%