

# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CATANIA

FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE BIOMEDICHE

Sezione di Endocrinologia, Andrologia e Medicina Interna

Dottorato di Ricerca in Scienze Andrologiche e della Riproduzione Umana:  
aspetti endocrini, genetici, molecolari e clinici – XXII Ciclo

---

Dott.ssa Oriana Francesca Bonanno

Valutazione dei principali parametri genetici,  
biochimici e molecolari in pazienti astenozoospermici

—————  
TESI DI DOTTORATO  
—————

*Tutor:*  
**Chiar.mo Prof. A. E. CALOGERO**

*Coordinatore:*  
**Chiar.mo Prof. R. D'Agata**

---

ANNO ACCADEMICO 2009-2010

## **Indice**

<b>1.</b>	Introduzione .....	1
<b>2.</b>	Scopo dello studio .....	24
<b>3.</b>	Materiali e metodi .....	25
<b>4.</b>	Risultati .....	36
<b>5.</b>	Discussione .....	40
<b>6.</b>	Bibliografia .....	47

## Introduzione

L'infertilità di coppia è un problema di vaste proporzioni e anche in Italia coinvolge decine di migliaia di persone. L'organizzazione mondiale della sanità (OMS) stima intorno al 15-20% le coppie con problemi di fertilità nei paesi industrializzati. Tale percentuale è purtroppo destinata ad aumentare per varie ragioni soprattutto per l'aumento dell'inquinamento ambientale, per la sofisticazione degli alimenti e lo stile di vita.

L'infertilità di coppia è dovuta nel 35% circa dei casi ad un fattore femminile di infertilità, nel 30% ad un fattore maschile; nel 20% dei casi si rilevano problemi in ambedue i partner e nel 15% dei casi l'infertilità rimane sconosciuta (infertilità inspiegata). Le cause sono molteplici (Tab. 1).

**Tabella 1.** Principali cause di infertilità

Cause di infertilità femminile	Cause di infertilità maschile
Fattore cervicale Fattore utero-tubarico Fattore ovulatorio Endometriosi Infiammazioni Fattore immunologico Cause genetiche Sterilità inspiegata	Male accessory gland infection Varicocele Criptorchidismo Ipogonadismo Ostruzione delle vie seminali Anticorpi antispermatozoi Disfunzione erettile e/o eiaculatoria Cause genetiche

Le cause maschili di infertilità causano un'alterazione dei vari parametri del liquido seminale con conseguente incapacità del seme maschile a fecondare l'ovocita. Questa incapacità può essere dovuta ad una alterazione delle caratteristiche degli spermatozoi (scarso numero, scarsa motilità, morfologia alterata) o alla presenza di alterazioni del tratto genitale maschile che impediscono agli spermatozoi, normalmente prodotti dal testicolo, di essere emessi con l'eiaculato o, infine, alla mancata produzione di spermatozoi.

Per capire come mai queste condizioni possono essere causa di infertilità è di fondamentale importanza fare alcuni cenni sulle caratteristiche della struttura dello spermatozoo e sulle vie di deflusso. In rapporto al tipo di alterazione alla base della condizione di infertilità maschile si distinguono quindi essenzialmente due forme:

- L'infertilità secretoria: in cui le vie di deflusso degli spermatozoi sono normali, ma sussistono delle alterazioni a carico della qualità o della quantità del seme;
- L'infertilità escretoria: in cui esiste una alterazione delle vie di deflusso degli spermatozoi;

La presenza di una condizione di infertilità maschile può essere evidenziata su base anamnestica, cioè sulla raccolta delle informazioni circa la storia clinica del paziente, dell'esame clinico andrologico, nonché

sull'analisi del liquido seminale. Tali indagini possono inoltre essere integrate da ulteriori esami quali i dosaggi ormonali, test immunologici, esami genetici, ecc.

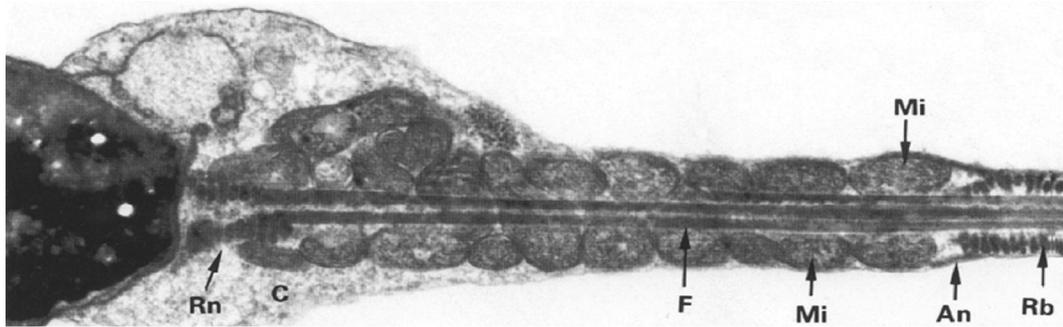
### **Struttura dello spermatozoo (Figura 1)**

La testa dello spermatozoo contiene il nucleo con i cromosomi, cioè con il materiale genetico destinato ad unirsi al materiale genetico dell'ovocita. Al riguardo dobbiamo, infatti, sottolineare come mentre una cellula normale ha 46 cromosomi, sia lo spermatozoo che l'ovocita ne hanno solo 23. Uno di questi 23 cromosomi è il cromosoma sessuale che, mentre nell'ovocita è sempre X, nello spermatozoo può essere X o Y, ciò fa sì che il sesso del nascituro sia proprio determinato dal tipo di cromosoma sessuale contenuto nello spermatozoo che feconda l'ovocita.

La testa dello spermatozoo è ricoperta da due membrane che delimitano una struttura denominata acrosoma la quale riveste un ruolo fondamentale nel processo di fecondazione in quanto esso contiene delle sostanze (enzimi acrosomiali) che vengono liberate al momento in cui lo spermatozoo entra in contatto con l'ovocita permettendo quindi allo spermatozoo di penetrare all'interno di quest'ultimo.

Il tratto intermedio (contenente i mitocondri) unisce la testa alla coda. A livello di questo tratto (che comprende anche il collo) è presente una struttura detta centriolo la quale è di fondamentale importanza per la

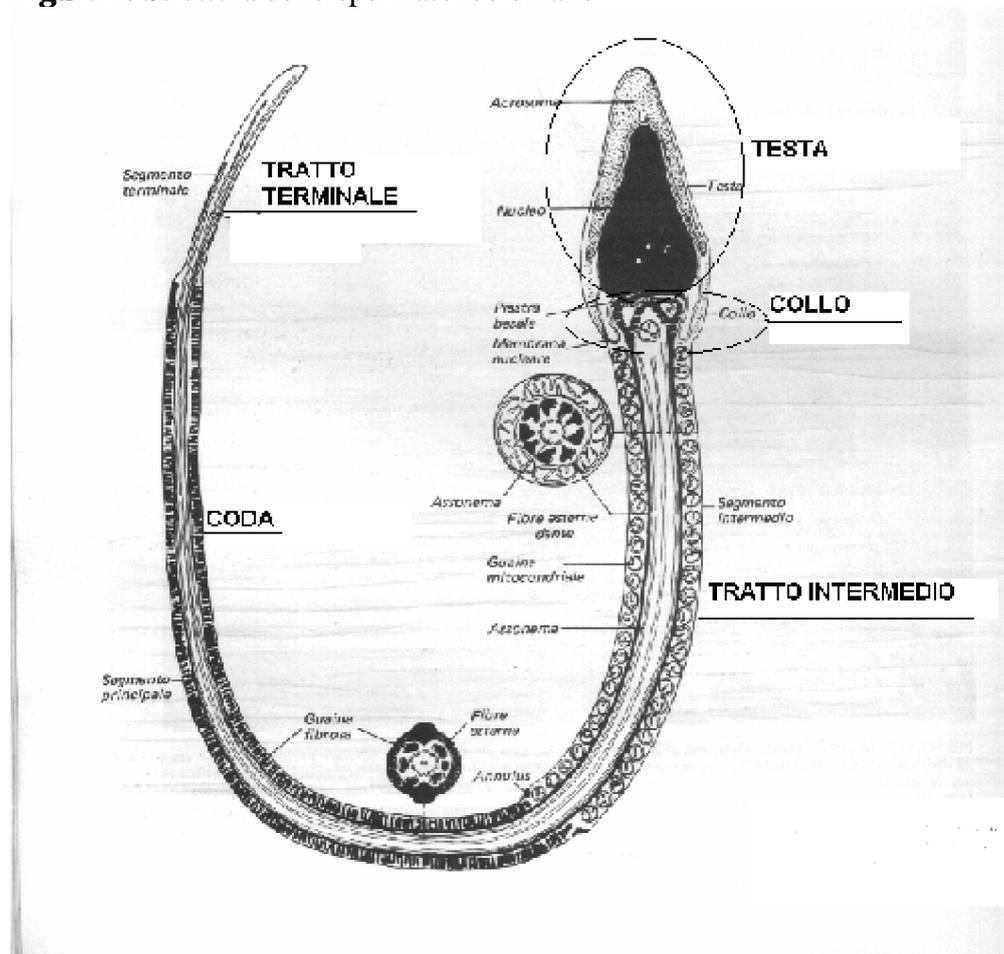
motilità dello spermatozoo; un'alterazione del centriolo può provocare infatti immobilità dello spermatozoo e quindi essere alla base di una condizione di infertilità.



La coda o flagello comprende un segmento principale ed un segmento terminale. I movimenti della coda permettono allo spermatozoo di avanzare in modo rettilineo e progressivo, pertanto anche un'alterazione della coda può determinare un'anomalia della motilità degli spermatozoi con conseguente infertilità (Turner et al., 2006). Il flagello si muove con un movimento sinusoidale ed ha una struttura complessa. La parte motrice principale del flagello è l'assonema che è formato da microtubuli emanati dal centriolo, localizzato alla base del nucleo dello spermatozoo. Il centro dell'assonema è costituito da due microtubuli centrali, circondati da una fila di nove coppie di microtubuli. In ogni coppia solo un microtubulo è completo, formato da 13 protofilamenti, l'altro ha forma di C ed è formato da 11 protofilamenti. I protofilamenti sono composti da dimeri della proteina tubulina e formano la base strutturale del flagello; tuttavia sono presenti anche altre proteine importanti per la funzione del flagello. La forza di propulsione è data dalla dineina, proteina attaccata ai microtubuli e

che idrolizza le molecole di ATP, convertendo l'energia chimica liberata dall'idrolisi dell'ATP in energia meccanica. Nel flagello sono presenti ancora anelli di guaina fibrosa ad intervalli regolari lungo tutta l'estensione dell'assonema, mantenuti da due lunghe costole fibrose longitudinali (parallele ai microtubuli). Queste due ultime strutture fanno sì che la spinta possa avvenire in direzione opposta nei tratti adiacenti, in modo da realizzare il movimento sinusoidale. Il controllo della distribuzione delle spinte permette anche un movimento elicoidale della coda.

**Figura 1.** Struttura dello spermatozoo umano



## **Le vie di deflusso degli spermatozoi**

Gli spermatozoi vengono prodotti nel testicolo a livello dei tubuli seminiferi, da qui passano attraverso una serie di ulteriori canali presenti a livello testicolare comprendenti i tubuli retti, la rete testis, i dotti efferenti e l'epididimo. Quindi gli spermatozoi passano nel dotto deferente che convoglia nel dotto eiaculatorio. Prima di convogliare nel dotto eiaculatorio il dotto deferente si dilata dando luogo all'ampolla ed è proprio a livello del dotto deferente, ed in particolare nell'ampolla, che si raccolgono gli spermatozoi prima di essere emessi con l'eiaculazione. I dotti eiaculatori infine si aprono nell'uretra prostatica da cui passano poi nel tratto terminale dell'uretra a livello del pene. Tutte queste strutture non agiscono solo come semplici canali di deflusso degli spermatozoi, ma agiscono anche sulla loro qualità, per cui anche una loro alterazione può essere alla base di una condizione di infertilità maschile.

## **Infertilità secretoria**

Come già detto tale forma di sterilità si caratterizza per una alterazione qualitativa e/o quantitativa del seme maschile. Possiamo infatti osservare condizioni caratterizzate da una ridotta concentrazione di spermatozoi nell'eiaculato (oligozoospermia) o in cui gli spermatozoi presentano una scarsa motilità (astenozoospermia) o alterazioni

morfologiche (teratozoospermia). Peraltro nella maggior parte dei casi tali condizioni si trovano variamente rappresentate contemporaneamente.

### *Cause*

Nel complesso dobbiamo sottolineare come l'infertilità secretoria rappresenti quella di più comune riscontro nell'ambito del fattore maschile di infertilità; riconosce cause di tipo congenito (talora su base cromosomica) o acquisite. In particolare occorre sottolineare come spesso varie cause possano coesistere nel determinare la condizione di infertilità.

In particolare, tra le cause di ordine acquisito possiamo ricordare:

- le patologie di tipo infiammatorio: quali ad esempio l'orchite parotitica bilaterale (temibile complicanza della parotite quando questa si manifesta dopo la pubertà) o altre forme di orchite (cioè di infiammazione del testicolo);
- le patologie su base vascolare: fra queste l'esempio più tipico è rappresentato dal varicocele il quale è dato da una dilatazione di una vena testicolare. Questa patologia interessa dal 4 al 22% della popolazione generale ma, considerando la popolazione infertile, la sua incidenza raggiunga anche il 39%. In genere tale condizione si accompagna ad una riduzione del numero, della motilità e della morfologia degli spermatozoi;
- le patologie da ectopia: quali il criptorchidismo. In questa condizione si ha una mancata discesa del testicolo dalla cavità addominale (ove

si forma nel corso della vita fetale) al sacco scrotale. Tale condizione si associa in genere ad una ridotta produzione di spermatozoi. Nel complesso il criptorchidismo è una condizione che nella popolazione generale ha una incidenza dello 0,3-0,4%, mentre nei soggetti sterili esso si osserva nel 6% dei casi;

- impiego di farmaci particolari: tra questi dobbiamo in particolare ricordare alcuni farmaci citotossici quali la ciclofosfamide, utilizzati nelle terapie di forme neoplastiche. Anche altri farmaci quali ad esempio la sulfasalazina, utilizzata nel trattamento di malattie infiammatorie dell'intestino, possono determinare un deficit della produzione di spermatozoi. Inoltre altri farmaci quali il ketoconazolo (un antimicotico), lo spironolattone (un diuretico) possono interferire con la produzione di spermatozoi in quanto bloccano l'azione degli ormoni androgeni;
- abuso di alcol e droghe (in particolare la marijuana);
- l'ipertermia: al riguardo una malattia acuta febbrile può essere causa di transitoria infertilità;
- Sostanze tossiche ambientali: numerose sostanze tossiche presenti nell'ambiente possono avere un effetto lesivo sulla produzione di spermatozoi, tra questi citiamo il dibromocloropropano, il carbodisulfide (un solvente industriale), il piombo, il cadmio, il mercurio;

- le radiazioni ionizzanti.

### **Infertilità escretoria**

L'infertilità escretoria è una condizione caratterizzata dall'assenza di spermatozoi nell'eiaculato conseguente ad una alterazione delle vie seminali. Tale alterazione può aver luogo ad un qualsiasi livello e può essere conseguente a cause di natura congenita o acquisita. Le cause congenite sono quelle di più frequente riscontro, fra queste possiamo ricordare:

- l'agenesia dei dotti deferenti;
- l'agenesia dell'epididimo o di una sua porzione;
- l'obliterazione dei dotti eiaculatori;
- le alterazioni della rete testis.

Tra le cause acquisite possiamo invece annoverare forme infettive gravi o cause di tipo traumatico, talora conseguenti ad interventi chirurgici.

Per una valutazione sulle capacità riproduttive nella diagnostica della coppia infertile, l'analisi del liquido seminale è un test basilare. Lo studio basale dell'eiaculato è un test convenzionale che consiste nella valutazione del numero degli spermatozoi, della motilità e della morfologia che sono parametri fondamentali per stabilire se la causa dell'infertilità è attribuibile ad un fattore maschile. Le alterazioni seminali legate ai parametri appena

citati hanno un'importante conseguenza su quello che è lo scopo principale dello spermatozoo, ovvero la penetrazione della superficie esterna dell'ovocita e quindi la fecondazione. Sebbene in alcuni casi è possibile un trattamento farmacologico del paziente, nella stragrande maggioranza dei casi delle coppie con fattore maschile è necessario ricorrere a tecniche di procreazione medicalmente assistita (PMA), quali la fecondazione in vitro (IVF) e l'iniezione intracitoplasmatica dello spermatozoo (ICSI). Tra le anomalie più comuni del liquido seminale, ricordiamo:

- l'aspermia: la mancanza del liquido seminale;
- l'ipospermia: quando il volume del liquido seminale eiaculato è inferiore a 2 ml;
- l'iperspermia: se il volume del liquido seminale eiaculato è superiore a 6 ml;
- l'azoospermia: se il liquido seminale è privo di spermatozoi;
- l'oligozoospermia: se il numero degli spermatozoi è inferiore a 15 mil/ml o 39 mil/eiaculato;
- l'astenozoospermia: se gli spermatozoi che si muovono con motilità progressiva sono <32%;
- la teratozoospermia: quando più del 96% degli spermatozoi hanno forma atipica.

## **Motilità nemaspermica**

La motilità spermatica rappresenta uno dei principali determinanti dell'infertilità maschile ed una condizione necessaria ai fini della fertilizzazione. Con il termine di "motilità" si indicano fondamentalmente due concetti differenti: "la motilità progressiva" e la percentuale totale di spermatozoi dotati di movimento. La valutazione della motilità viene espressa come percentuale totale di spermatozoi mobili (aspetto quantitativo) e come percentuale delle diverse categorie cinetiche (aspetto qualitativo inteso come tipo di velocità e direzione degli spermatozoi mobili).

E' noto che gli spermatozoi testicolari nelle prime fasi successive alla spermioistogenesi sono immobili. Gli spermatozoi acquisiscono la capacità di movimento durante il transito attraverso l'epididimo. Infatti, in seguito all'interazione con le cellule ciliate dell'epitelio epididimario e con il loro secreto, essi vanno incontro a modificazioni soprattutto a carico della membrana citoplasmatica e ad un graduale sviluppo della motilità durante la progressione del gamete dalla testa alla coda dell'epididimo (Yanagimachi, 1994). Gli spermatozoi sono in grado di esibire movimenti di tipo diverso, che si adattano alle diverse esigenze funzionali. Così gli spermatozoi eiaculati, nel plasma seminale, mostrano una traiettoria lineare che corrisponde a quella presente durante la penetrazione nel muco cervicale. Una volta che lo spermatozoo abbandona il plasma seminale e

inizia la sua risalita lungo le vie genitali femminili, le caratteristiche di motilità cambiano. Quando avviene la capacitazione o poco prima, l'ampiezza del movimento del flagello aumenta e lo spermatozoo inizia una traiettoria con uno spostamento laterale della testa più pronunciato. Questa condizione dello spermatozoo corrisponde a quello che viene definito stato "transizionale" (Robertson, 1988). Quando ha realmente inizio la capacitazione, l'ampiezza dell'onda flagellare diventa asimmetrica, dando luogo ad un movimento non più progressivo ma vigoroso, noto come iperattivazione. Questa forma di motilità è tipica degli spermatozoi totalmente capacitati, e si pensa che fornisca allo spermatozoo la forza necessaria per attraversare la zona pellucida (Burkman, 1990). E' stato dimostrato che il contatto delle cellule apicali della tuba con gli spermatozoi offre un prolungamento della durata della motilità, con incremento della velocità progressiva e ritardo della capacitazione (Murray & Smith, 1997). In accordo con l'ultima edizione del "WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen" V edizione (2010), la motilità spermatica è suddivisa in tre categorie:

- Motilità progressiva (PR) - spermatozoi che si muovono linearmente indipendentemente dalla velocità.
- Motilità non progressiva (NP) - assenza di progressione o anche il solo battito della coda.
- Immobili (IM) - nessun movimento.

Nel maschio normalmente fertile la percentuale di spermatozoi con PR risulta maggiore del 32% oppure la somma della percentuale di spermatozoi con PR ed NP deve risultare superiore al 40%. Laddove ci si trovi di fronte ad una riduzione della percentuale di spermatozoi mobili si parla di astenozoospermia.

### **L'astenozoospermia**

Nonostante le strutture le strutture cellulari coinvolte nello sviluppo e nel mantenimento della motilità dello spermatozoo siano state ampiamente identificate, i meccanismi molecolari alla base di questa funzione e la loro concatenazione temporale e spaziale non sono stati del tutto chiariti e sono oggetto di studi (Luconi et al. 2001).

L'astenozoospermia può essere distinta in: *complessa* e *semplice*. Quella complessa è associata ad alterazione degli altri parametri del liquido seminale (oligozoospermia, teratozoospermia e/o necrozoospermia). Quella semplice è dovuta a varie cause che possono essere distinte in: anatomiche, flogistiche/infettive, da alterazione dei parametri reologici del liquido seminale, da alterazioni chimiche, biochimiche o del DNA mitocondriale e immunologiche. Esistono inoltre le forme idiopatiche.

### *Cause anatomiche*

Le cause anatomiche riguardano anomalie strutturali, quali quelle a carico dell'assonema, del periaxonema e della membrana citoplasmatica.

- *Alterazioni dell'assonema.* L'alterazione dell'assonema può essere dovuta alla mancanza di dineina, proteina che connette i microtubuli dell'assonema (sindrome di Kartagener), alla riduzione del numero delle braccia di dineina, detta sindrome di Young (Wilton et al., 1991), alla mancanza dell'assonema dal quale possono mancare uno o entrambi i microtubuli centrali. Questi difetti vengono messi in evidenza mediante microscopia elettronica.
- *Alterazioni del periaxonema.* Queste alterazioni possono riguardare il numero o l'organizzazione dei microtubuli dell'assonema, che potrebbero essere persi, duplicati, traslocati in altri siti del flagello, così come perdita completa del midpiece o distorsione della guaina fibrosa (Escalier et al., 1984).
- *Membrana citoplasmatica.* L'integrità e l'attività funzionale della membrana plasmatica sono requisiti cruciali per la motilità e per i cambiamenti fisiologici che avvengono sulla superficie dello spermatozoo durante il processo di fecondazione, inclusi la capacitazione, la reazione acrosomiale, il legame alla zona pellucida e infine la fusione con l'oolemma. Quando la membrana degli

spermatozoi subisce alterazioni, la fosfatidilserina (PS) trasloca dalla porzione interna a quella esterna della membrana plasmatica; questo è uno dei primi segnali di apoptosi (Vermes et al., 1998). La rottura della membrana citoplasmatica, con conseguente morte cellulare, è associata a immobilità nemaspermica.

### *Cause flogistiche/infettive*

Le cause flogistiche/infettive possono essere indotte da meccanismi diretti, come l'adesione di microorganismi sul flagello, ed indiretti, attraverso la iperproduzione di radicali liberi dell'ossigeno (ROS), citochine, ecc.

- *Infezioni.* I microrganismi provocano, con le loro sostanze spermiossiche, danni alla motilità e alla morfologia degli spermatozoi (Auroux et al., 1991).
- *ROS.* I ROS sono prodotti dai leucociti e dagli stessi spermatozoi. Livelli fisiologici di ROS nel liquido seminale sono essenziali per la regolazione della normale funzione spermatica (capacitazione, reazione acrosomiale e fusione oocita-spermatozoo). L'iperproduzione di ROS, quale quella che si ha in corso di leucocitospermia, può superare i meccanismi di difesa antiossidanti degli spermatozoi con aumento dello stress ossidativo nel plasma seminale (Cocuzza et al., 2007). Tutto ciò è in grado di provocare danni all'integrità del DNA e/o della cromatina, danni all'integrità

della membrana citoplasmatica, in quanto questa essendo costituita da grandi quantità di acidi polinsaturi oleici (PUFA), è soggetta all'azione perossidica dei ROS, e alterazione della motilità nemaspermica. (Aitken et al., 1989; Saleh and Agarwal, 2002; Wang et al., 2003; Moustafa et al., 2004; Agarwal et al., 2008).

### *Alterazioni delle proprietà reologiche del liquido seminale*

Le alterazioni delle proprietà reologiche (pH elevato, variazione della temperatura, iperviscosità, alterata liquefazione) possono interferire con la motilità nemaspermica.

- *pH*. Il pH svolge un ruolo importante nella modulazione del complesso equilibrio della fosforilazione e defosforilazione delle proteine (chinasi e fosfatasi) coinvolte nella motilità spermatica.
- *La temperatura*. La temperatura, influenza la motilità spermatica infatti un aumento al di sopra dei 37° determina una riduzione della motilità che culmina nel blocco totale a 40-41°C.

### *Alterazioni chimiche*

- *Osmolarità*. L'osmolarità è un fattore che influenza il rapporto tra ambiente intra- ed extra-citoplasmatico di alcuni fattori quali: Ca, Na, K e glucosio. In presenza di un alterato rapporto ionico intra/extra citoplasmatico si verificano modificazioni sulla motilità spermatica. Ad esempio, alcuni studi hanno dimostrato che l'esposizione degli spermatozoi umani in un medium iposmotico

induce un incremento degli ioni  $\text{Ca}^{2+}$  attivando la reazione acrosomiale e la capacità fertilizzante. In particolare l'iperosmolarità seminale, sembra ridurre le percentuali della motilità spermatica supportando un suo possibile ruolo patogenetico nelle astenozoospermie (Liu et al., 1998).

- *Calcio*. Il ruolo del calcio appare più complesso. Infatti, un aumento delle sue concentrazioni intracellulari si associa ad un aumento di motilità, mentre un eccesso di ioni calcio nel mezzo di incubazione sembra inibirla. Infatti, a livello fisiologico, il passaggio dalla regione della testa a quella della coda dell'epididimo è caratterizzato da una diminuzione dei livelli extracellulari di calcio che si associa ad un aumento dei livelli di fosforilazione tirosinica di alcune proteine spermatiche. Questi stessi fattori contribuiscono allo sviluppo di un pattern particolare di motilità che gli spermatozoi acquisiscono in associazione al processo di capacitazione, sia che tale processo avvenga durante la risalita del tratto genitale femminile sia in vitro mediante incubazione in appropriati mezzi di coltura. Questa particolare motilità detta anche iperattiva, è caratterizzata da movimenti vigorosi del flagello e un aumento dell'escursione laterale della testa dello spermatozoo nelle tre dimensioni. L'iperattivazione sembra importante sia per la progressione attraverso le vie genitali femminili, che per la penetrazione nel cumulo ooforo che circonda

l'ovocita. Altri fattori quali l'ossido nitrico e l'ATP influenzano positivamente l'iperattivazione (Espino et al., 2009).

### *Alterazioni biochimiche*

- *Sistema cAMP/PKA.* Un ruolo chiave nella regolazione della motilità spermatica è svolto dalle protein chinasi e fosfatasi (Lecler et al., 1996) in particolare dal sistema adenilatociclastasi/cAMP/PKA durante la capacitazione. Analoghi del cAMP e agenti capaci di aumentarne le sue concentrazioni intracellulari stimolano sia la motilità che la fosforilazione tirosinica di alcune proteine della coda dello spermatozoo mediante attivazione della protein chinasi A. L'attivazione delle chinasi serino-treoniniche in seguito all'aumento dei livelli di cAMP sembra convergere nella fosforilazione tirosinica di substrati proteici che svolgono un ruolo importante nello sviluppo della motilità. In particolare, l'inibizione delle fosfatasi sia serino-treoniniche che tirosiniche, quali la calcineurina, la PP2A e la PP1, mediante agenti bloccanti quali acido ocadaico, calliculina A e ortovanado, regolano positivamente la motilità degli spermatozoi (Smith et al., 1996). L'esposizione in vitro di spermatozoi a pentossifillina, un farmaco che blocca l'attività delle fosfodiesterasi con conseguente aumento dei livelli di cAMP intracellulare, induce

un aumento della motilità spermatica in soggetti normozoospermici (Calogero et al., 1998).

- *Sistema fosfatidilinositolo-3 chinasi (PI3K)*. Le PI3K sono una famiglia di enzimi che catalizzano la fosforilazione del fosfatidilinositolo e dei suoi derivati in posizione 3 determinando la loro traslocazione alla membrana e l'attivazione di numerosi altri enzimi coinvolti in diversi processi intracellulari come: la chemiotassi, il riarrangiamento di proteine del citoscheletro, la proliferazione ed il differenziamento. Studi recenti, condotti su spermatozoi recuperati mediante swim-up, attraverso l'uso di inibitori della PI3K, hanno messo in evidenza un significativo aumento della motilità progressiva e dei parametri di iperattivazione nemaspermica. Questo suggerisce una possibile applicazione terapeutica degli inibitori di questo enzima per incrementare la motilità ed il recupero di spermatozoi mobili nei campioni di pazienti che vengono sottoposti a programmi di fertilizzazione in vitro (IVF) (Luconi et al., 2001).

#### *Alterazioni del DNA mitocondriale (mtDNA)*

La motilità dello spermatozoo si realizza grazie al processo di fosforilazione ossidativa che produce le molecole di ATP necessarie al movimento nemaspermico. La membrana interna mitocondriale presenta 5 sistemi enzimatici ossidativi che generando un potenziale di membrana,

permettono la produzione di molecole di ATP. Le proteine del complesso enzimatico sono codificate da geni presenti nel mtDNA. Da questo ne consegue che difetti nella catena respiratoria mitocondriale potrebbero causare una riduzione della motilità e quindi della fertilità. Qualsiasi mutazione genica si associa ad una ridotta disponibilità energetica, ovvero, ad una riduzione del potenziale di membrana (MMP), con alterazioni più o meno gravi della motilità (Marchetti et al., 2002). Precedenti studi hanno riportato la presenza di delezioni multiple del DNA mitocondriale in spermatozoi con un basso tasso di motilità (Kao et al., 1995, Kao et al., 1998). Recentemente, è stato dimostrato che pazienti con alterazioni dei parametri del liquido seminale (in particolare quelli con astenozoospermia grave) sottoposti a PMA hanno un aumento significativo del numero di copie del mtDNA e una riduzione significativa della sua integrità rispetto a soggetti con parametri spermatici normali (Song & Lewis, 2008). Precedentemente studi condotti da Kao e collaboratori hanno dimostrato un'associazione tra la delezione 4977 bp del mtDNA e ridotta motilità degli spermatozoi umani (Kao et al., 1995). Un successivo studio degli stessi autori ha identificato due nuove delezioni del mtDNA (7345 e 7599) in spermatozoi con scarsa motilità.

Inoltre, i mitocondri possono regolare l'apoptosi cellulare mediante il rilascio del citocromo C e di altri fattori che inducono apoptosi, influenzando

nel processo di spermatogenesi e causando la frammentazione del DNA nucleare dei soggetti infertili (Zanzami et al., 1996).

### *Cause immunologiche*

Le cause immunologiche di astenozoospermia sono dovute alla presenza di anticorpi anti-spermatozoo (ASA), che causando agglutinazione nemaspermica, danneggiano la motilità, la capacità di penetrazione nel muco cervicale, la capacitazione o la reazione acrosomiale. Possono inoltre provocare l'attivazione della cascata del complemento portando alla lisi dello spermatozoo. La comprensione del meccanismo che sta dietro all'infertilità immunologica, così come una migliore diagnosi ed il trattamento, dipendono dalla conoscenza degli antigeni dello spermatozoo capaci di stimolare la produzione di anticorpi contro lo spermatozoo. Gli antigeni dello spermatozoo presenti nei pazienti non fertili sono stati identificati escludendo gli antigeni riconosciuti dai campioni di siero dei soggetti fertili usando una comparazione computerizzata degli immunoblotting.

### **Astenozoospermia e apoptosi**

Le tecniche di PMA rappresentano una soluzione terapeutica per il trattamento dell'infertilità maschile quando il paziente non ha patologie trattabili oppure quando i trattamenti effettuati risultano inefficaci. Molto spesso accade che nei casi in cui vengono utilizzate queste tecniche per

superare i problemi di infertilità, la percentuale di fertilizzazione è scarsa, e ciò potrebbe essere dovuto, ad esempio, ad un danneggiamento del DNA genomico spermatico. Inoltre, nella ICSI la massima attenzione risiede nella scelta di uno spermatozoo che risulti sufficientemente normale, ma ciò non consente un'analisi approfondita della qualità dello spermatozoo.

Attualmente, la qualità del liquido seminale, come precedentemente detto, è valutata mediante lo spermogramma convenzionale che utilizza un microscopio ottico per determinare la concentrazione, la motilità e la morfologia degli spermatozoi, secondo i criteri della WHO.

Lo spermogramma ha un limitato valore clinico per predire il successo nelle tecniche di PMA, in quanto il 50% delle coppie con fallimenti di fertilizzazione ha un esame del liquido seminale pre-IVF normale (Liu et al., 2000). Inoltre, l'analisi del liquido seminale, non valuta la presenza di spermatozoi apoptotici che possono essere parzialmente responsabili del basso tasso di fertilizzazione e di impianto nella PMA.

Caratteristiche tipiche di un eiaculato con spermatozoi apoptotici sono il decremento dell'MMP, l'esternalizzazione della fosfatidilserina (PS), l'attivazione delle caspasi, la frammentazione del DNA (Glander et al., 1999; Weng et al., 2002) e le alterazioni qualitative e quantitative dell'mtDNA.

I mitocondri sono degli organelli molto importanti per la funzione spermatica. Nell'uomo esiste una correlazione tra funzione mitocondriale

spermatica alterata determinata da un ridotto MMP con la diminuzione della motilità e riduzione della fertilità (Marchetti et al., 2002). L'analisi della funzione mitocondriale rappresenta un modo per valutare la motilità spermatica.

I mitocondri sono i coordinatori di apoptosi in vari sistemi cellulari perché essi sono coinvolti in molti processi apoptotici, compresa l'attivazione delle caspasi, il decremento dell'MMP e alterazioni ossidative del potenziale di membrana intracellulare (Green et al., 1998).

Anche la membrana plasmatica è una struttura chiave per la funzione spermatica. Il successo della fecondazione ha come requisito una membrana spermatica con normale integrità e funzione. L'apoptosi precoce è caratterizzata dalla perdita dell'asimmetria dei fosfolipidi, con una traslocazione della PS da dentro a fuori la membrana. La colorazione con annessina V e ioduro di propidio (PI) permette di identificare gli spermatozoi con esternalizzazione della PS.

L'abbassamento dell'MMP e l'esternalizzazione della PS sono due caratteristiche dello stadio precoce dell'apoptosi che determinano un'alterazione dei principali parametri seminali, in particolare modo la motilità nemespermaica (Zhang et al., 2008). Questi cambiamenti precedono altri eventi che si verificano ad uno stadio più avanzato di morte cellulare programmata, come la frammentazione del DNA (Gandini et al., 2000).

## **Scopo dello studio**

Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare le cause della riduzione della motilità nemaspermica. Per raggiungere questo obiettivo, sono stati arruolati pazienti astenozoospermici con motilità progressiva (gradi a+b) 20% e motilità non progressiva (grado c) >50%, indipendentemente dalla presenza di eventuali patologie andrologiche. Nel caso specifico abbiamo arruolato fumatori e pazienti con varicocele in atto o pregresso, flogosi delle vie genitourinarie e pazienti con astenozoospermia idiopatica. Un gruppo di soggetti sani con normali parametri del liquido seminale sono stati selezionati come controlli dopo accurato e approfondito iter diagnostico andrologico volto ad escludere la presenza di ogni causa di alterazione dei parametri spermatici convenzionali e biofunzionali.

I parametri studiati sono stati: a) la produzione di ROS da parte del liquido seminale; b) la funzione mitocondriale; c) l'esternalizzazione della PS; d) l'integrità della cromatina nemaspermica; e) la frammentazione del DNA genomico degli spermatozoi; ed f) l'integrità e il numero di copie del mtDNA sia nei pazienti con astenozoospermia che nei controlli.

## **Materiali e metodi**

### **Selezione della casistica**

Per questo studio sono stati selezionati 24 pazienti la cui motilità nemaspermica aveva le seguenti caratteristiche: motilità progressiva (a+b) 20% e motilità non progressiva (c) >50%, indipendentemente dalla presenza di eventuali patologie andrologiche.

Come gruppo di controllo, sono stati arruolati 11 soggetti sani con parametri normali del liquido seminale (secondo i criteri della WHO, 1999) e senza nessuno dei seguenti criteri di esclusione:

- Fumo di sigaretta;
- Criptorchidismo in atto o pregresso;
- Varicocele (tutti i gradi);
- Infezioni delle ghiandole accessorie maschili;
- Esposizione a sostanze tossiche occupazionali;
- Presenza di ASA.

### **Preparazione dei campioni del liquido seminale**

I campioni di liquido seminale sono ottenuti mediante masturbazione dopo un'astinenza sessuale di 3-5 giorni dai pazienti con astenozoospermia e dai controlli. Dopo liquefazione a temperatura ambiente per trenta minuti, sono state valutate le caratteristiche macroscopiche (volume, viscosità,

liquefazione, pH) ed i parametri microscopici (densità, motilità, morfologia e vitalità) di ogni campione secondo i criteri della WHO (1999).

Gli spermatozoi sono stati separati mediante gradiente discontinuo di Percoll (Codisan S.p.A., Catania) utilizzando le concentrazioni 45/90%. I campioni di liquido seminale sono stati centrifugati a 2800 rpm per 20 minuti e il pellet al fondo della provetta è stato ripreso e risospeso in medium Biggers-Whitten-Whittingham (BWW). Gli spermatozoi sono stati centrifugati a 1800 rpm per 10 min e il pellet risospeso in 1 ml di BWW per la valutazione della concentrazione e della motilità. Dopo separazione, i campioni con acinesia (d) >15% sono stati esclusi.

### **Valutazione della produzione spermatica di radicali liberi dell'ossigeno**

La valutazione della produzione di ROS è stata eseguita in chemiluminescenza utilizzando il Luminometer LB9505 (Berthold, Milano). Un'aliquota di liquido seminale contenente  $10 \times 10^6$  spermatozoi son stati risospesi in 500  $\mu$ l di BWW (Sigma, Milano) e centrifugati a 6000 rpm per 5 minuti. Il pellet così ottenuto è stato risospeso in 200  $\mu$ l di BWW deposto in lumivial (Berthold, Milano) per l'analisi che è stata eseguita al buio.

Alla sospensione sono stati aggiunti 4  $\mu$ l di Luminol (Sigma, Milano) e 8  $\mu$ l di horseradish peroxidase (Sigma, Milano); il segnale chemiluminescente è stato monitorato a 37° C per almeno un paio di

minuti fino a stabilizzazione. A questo punto, sono stati aggiunti 2 µl della sonda leucocita-specifica formil-metionil-leucil-fenilalanina (FMLP) (Sigma, Milano) per stimolare il segnale chemioluminescente di ciascun polimorfo nucleato presente nel lumivial.

Dopo che il segnale chemioluminescente indotto dall'FMLP si è abbassato, la sospensione cellulare è stata stimolata con 4 µl di sorbolo 12-miristato 13-acetato (PMA) (VWR International, Milano) che dà un'indicazione sulla capacità dei leucociti e degli spermatozoi di produrre ROS. Quando non c'è contaminazione leucocitaria, non si ha risposta dopo esposizione ad FMLP, mentre l'esposizione a PMA produce un marcato aumento del segnale chemioluminescente che, quindi, indica la produzione di ROS da parte degli spermatozoi.

### **Analisi citofluorimetrica**

L'analisi citofluorimetrica, condotta sugli spermatozoi separati mediante gradiente di Percoll, si è avvalsa del citofluorimetro EPICS XL (Coulter Electronics, IL, Milano) dotato di un unico laser ad argon a 488 nm. Per ogni campione sono stati misurati 10.000 eventi ad un flow rate di 200/300 eventi/sec ed analizzati mediante il software SISTEM II<sup>TM</sup> versione 3.0.

I seguenti parametri biofunzionali sono stati valutati sia su spermatozoi dei pazienti con astenozoospermia che dei controlli:

- potenziale di membrana mitocondriale (MMP);
- valutazione del grado di compattazione della cromatina;
- esternalizzazione della fosfatidilserina (PS);
- frammentazione del DNA.

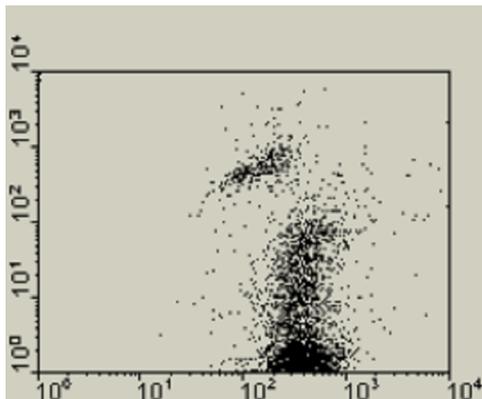
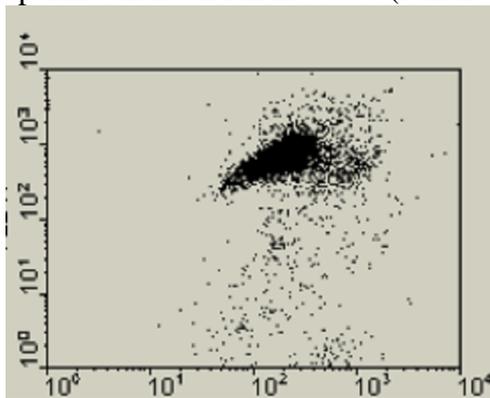
### *Valutazione del potenziale di membrana mitocondriale*

L'MMP, un indicatore dello stato di funzionalità mitocondriale della cellula, può essere usato per valutare l'attività della catena respiratoria e il sistema di trasporto degli elettroni. È stato studiato utilizzando il fluorocromo JC-1, 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenimidazolyl carbocyanine iodide (Space Import-Export s.r.l., Milano), che è capace di penetrare in modo selettivo nei mitocondri. Il JC-1 forma aggregati (J aggregati) nei mitocondri con alto potenziale di membrana; questi aggregati emettono ad una lunghezza d'onda di 590 nm (arancio) se eccitate a 480 nm in FL1. Nei mitocondri con basso potenziale di membrana, invece, il JC-1 si presenta in forma monomerica ed emette nel range del verde (da 525 a 535 nm) se eccitato a 488 nm in FL2.

Il JC-1 è stato sciolto in dimetilsolfossido (DMSO) in modo da ottenere una soluzione madre di 1 mg/ml. Venti µl di JC-1 sono prima stati diluiti in 480 µl di tampone fosfato (PBS) e successivamente aggiunti a  $1 \times 10^6$  spermatozoi sospesi in 500 µl di PBS per 10 minuti, al buio, a temperatura ambiente.

Il risultato di questo studio è rivelato dalla valutazione dell'MMP definita su un dot-plot FL1/FL2. Gli spermatozoi con alto MMP si dispongono in alto a destra del dot-plot, mentre quelli con basso MMP si ritrovano in basso a destra (Fig. 1).

**Figura 1.** Il grafico in alto rappresenta una popolazione di spermatozoi con un MMP elevato (spermatozoi normali), mentre il grafico in basso riporta spermatozoi con MMP basso (cellule alterate).



### *Valutazione dell'esternalizzazione della fosfatidilserina*

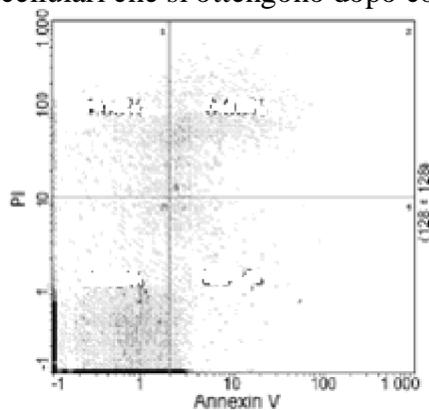
Lo studio dell'esternalizzazione della PS è stato effettuato mediante colorazione con annessina V, marcata con FITC, e PI (IL, Milano).

L'utilizzo della doppia marcatura permette di distinguere gli spermatozoi esaminati in: a) cellule vive (annessina V negative, PI negative); b) cellule in fase precoce di apoptosi (esternalizzazione della PS) (annessina V positive, PI negative); c) cellule necrotiche (annessina V negative, PI positive); e d) cellule in fase tardiva di apoptosi (annessina V positive, PI positive) (Fig. 2).

Con questa metodica viene determinata l'esternalizzazione della PS misurando il legame dell'annessina V ai residui di PS, un aminofosfolipide che normalmente si trova nello strato interno della membrana citoplasmatica ma che durante il processo apoptotico si sposta all'esterno (Fadok et al., 1992; Koopman et al., 1994; Homburg et al., 1995).

Circa  $1 \times 10^6$  di spermatozoi sono stati risospesi in 500  $\mu$ l e incubati con 1  $\mu$ l di annessina V-FITC e 5  $\mu$ l di PI, al buio per 10 minuti.

**Figura 2.** Rappresentazione al citofluorimetro delle quattro diverse popolazioni cellulari che si ottengono dopo colorazione con annessina V e ioduro di propidio.



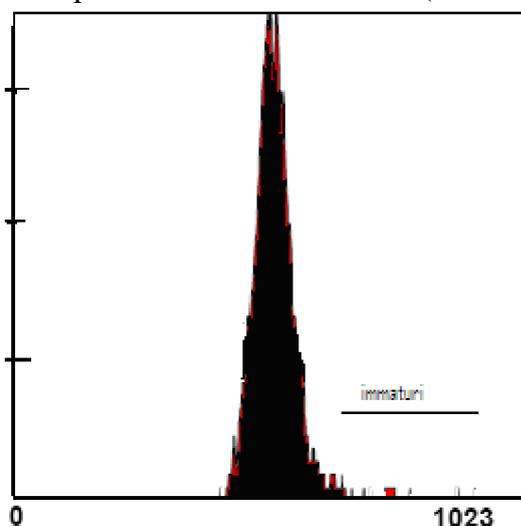
### *Valutazione del grado di condensazione della cromatina*

Il grado di compattazione della cromatina è stata valutato utilizzando il kit DNA-Prep Reagent (IL, Milano) per permeabilizzare gli spermatozoi e permettere l'accesso del PI nel nucleo, tra le coppie di basi del DNA a doppia elica.

Gli spermatozoi sono stati incubati con 100 µl di Lysing and Permeabilizing Reagent (LPR) al buio. Dopo 10 minuti di incubazione, 500 µl di Stain Reagent sono stati aggiunti e la sospensione nemaspermica è stata lasciata ad incubare al buio, per 30 minuti.

Gli spermatozoi con normale impacchettamento della cromatina emettono una bassa fluorescenza in quanto poco PI è penetrato all'interno del DNA (Fig. 3).

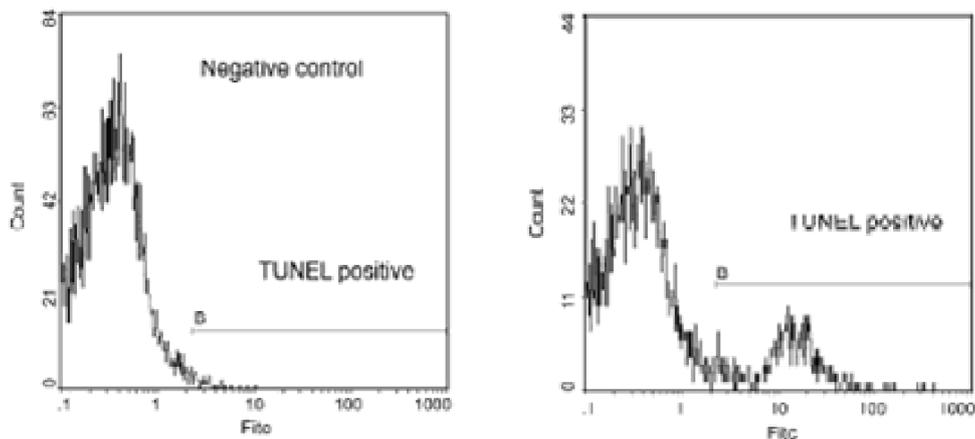
**Figura 3.** La figura riporta i picchi di spermatozoi normali e con alterazione del grado di compattazione della cromatina (in rosso).



### *Valutazione della frammentazione del DNA*

La valutazione della frammentazione del DNA è stata ottenuta mediante la metodica TUNEL utilizzando il kit Apoptosis Mebstain (IL, Milano). Questa tecnica utilizza la TdT (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase), un enzima che polimerizza nucleotidi modificati coniugati con un fluorocromo a livello delle rotture del DNA. Nei controlli negativi la TdT non viene utilizzata. Gli spermatozoi con DNA integro mostrano una bassa fluorescenza (Fig. 4)

**Figura 4.** Percentuale di spermatozoi con frammentazione del DNA nemaspermico (riquadro destro) e controllo negativo, ottenuto senza aggiunta di TdT (riquadro sinistro).



### **Valutazione dell'integrità del DNA mitocondriale (mtDNA)**

Il DNA genomico dei campioni di spermatozoi dei pazienti e dei controlli è stato estratto utilizzando un kit di estrazione prodotto da Gentra Puregene Blood Kit Qiagen (Milano) seguendo le istruzioni fornite dalla

casa produttrice. Il DNA estratto è stato quantificato in triplicato allo spettrofotometro.

L'integrità del mtDNA è stata quindi valutata mediante Longe-range polymerase chain reaction PCR (Long PCR) per amplificare circa la metà del genoma mitocondriale (8.7 kb) utilizzando AccuPrime Pfx DNA polymerase (Invitrogen, Milano), che risulta essere inattivo a temperatura ambiente, ma che reagisce dopo iniziale denaturazione.

La Long PCR è stata eseguita in un volume finale di 50 µl contenente:

- Buffer 1X (contiene i dNTPs);
- Forward primer: 5'-AAGGATCCTCTAGAGCCCACTGTAAAG-3';
- Reverse primer: 5'-TTGGATCCAGTGCATACCGCCAAAAG-3';
- 2,5 U di polimerasi;
- 200 ng del DNA genomico.

Le condizioni di amplificazione sono state: 95° C per 2 min, 25-35 cicli di denaturazione ognuno a 95° C per 15 sec, annealing (62° C per 1 min), e estensione (68° C per 9 min). I prodotti PCR così ottenuti sono stati visualizzati su gel di agarosio 0.8% e l'intensità delle bande di 8.7 kb sono state misurate dopo 30 cicli di reazione (Song & Lewis, 2008).

## **Valutazione del numero di copie mtDNA**

Il numero di copie di mtDNA è stato valutato mediante Real-Time PCR. Per sintetizzare il DNA standard, una regione del gene 16s (presente nel mtDNA) è stata amplificata mediante PCR. Il prodotto ottenuto è stato clonato in pCR 2.1-TOPO vector usando il kit TOPO TA Cloning (Invitrogen, Milano), e sequenziato per confermare la correttezza della sequenza inserita.

Il DNA plasmidico così ottenuto è stato quantificato con il Nanodrop 1000 (EuroClone, Milano) e successivamente diluito per ottenere un range tra  $10^2$  e  $10^6$  copie/ $\mu$ l. Per determinare la quantità di mtDNA relativo al DNA nucleare sono stati selezionati due coppie di primer; una specifica per il gene mitocondriale 16S rRNA (forward primer 5'-ACTTTGCAAGGAGAGCCAAA-3' e reverse primer 5'-TGGACAACCAGCTATCACCA-3') e l'altra per il gene nucleare GAPDH (forward primer 5'-GGATGATGTTCTGGAAGAGCC-3' e reverse primer 5'-AACAGCCTCAAGATCATCAGC-3'). La Real time PCR quantitativa assoluta è stata effettuata sullo strumento ABI 7300 (Applied Biosystems, Milano) utilizzando come chimica di rilevazione il SYBR green.

Il SYBR green dye è un colorante che si lega al DNA a doppio filamento ma non al DNA a singolo filamento è viene frequentemente utilizzato per monitorare la sintesi di DNA durante le reazioni di real-time

PCR. Quando esso si lega al DNA a doppio filamento, la sua fluorescenza è molto brillante.

In ogni reazione sono stati inclusi gli standard in triplicato e il controllo negativo. Il numero di copie del mtDNA per ciascun campione in studio è stato valutato considerando la melting curve ottenuta dagli standard. La misura del numero relativo di mtDNA è stato calcolato con la formula  $(\text{mtDNA copy number})/(\text{GAPDH copy number})$ .

### **Analisi statistica**

Le variabili qualitative sono state descritte tramite numerosità e percentuale, mentre le variabili quantitative sono state descritte tramite mediana e range. Il confronto dei gruppi di pazienti astenozoospermici e controlli è stato effettuato mediante il test di Wilcoxon per campioni indipendenti. Valori di p inferiore a 0.05 sono stati considerati statisticamente significativi e tutti test utilizzati sono bilaterali.

Un'analisi più approfondita del gruppo dei pazienti astenozoospermici è quella che ha correlato i parametri studiati con le varie condizioni dei pazienti mediante il test di Kruskal-Wallis. La frequenza di delezioni del mtDNA nei pazienti e nel gruppo di controllo è stata valutata mediante test Chi quadrato.

Tutte le analisi sono state compilate usando il software SAS versione 9.1 (SAS Institute, Inc., Cary NC, USA).

## Risultati

### Confronto pazienti con astenozoospermia vs. soggetti di controllo

I pazienti avevano un'età mediana di 26.4 anni (range: 22.9-38.1 anni), che non differiva significativamente da quella dei controlli (33.3 anni, range: 20.1-40.7 anni). I principali parametri del liquido seminale dei pazienti e dei controlli sono riportati nella Tab. 1.

**Tabella 1.** Mediana e range dei parametri convenzionali del liquido seminale nei controlli e nei pazienti con astenozoospermia.

<b>Parametri seminali</b>	<b>Controlli (n=11)</b>	<b>Pazienti astenozoospermici (n=24)</b>
Volume (ml)	3.5 (1.4-6)	3 (1-6)
Concentrazione ( $10^6$ /ml)	116 (90-160)	70 (20-150)*
Numero totale di spermatozoi ( $10^6$ /eiaculato)	480 (126-750)	222.5 (60-440)*
Motilità progressiva (a+b) (%)	50 (35-68)	12 (2-20)*
Motilità non progressiva (c) (%)	22 (5-46)	62 (52-72)*
Forme normali (%)	20 (10-32)	18 (8-40)
Leucociti ( $10^6$ /ml)	0 (0-0.9)	1 (0.4-7.0)*

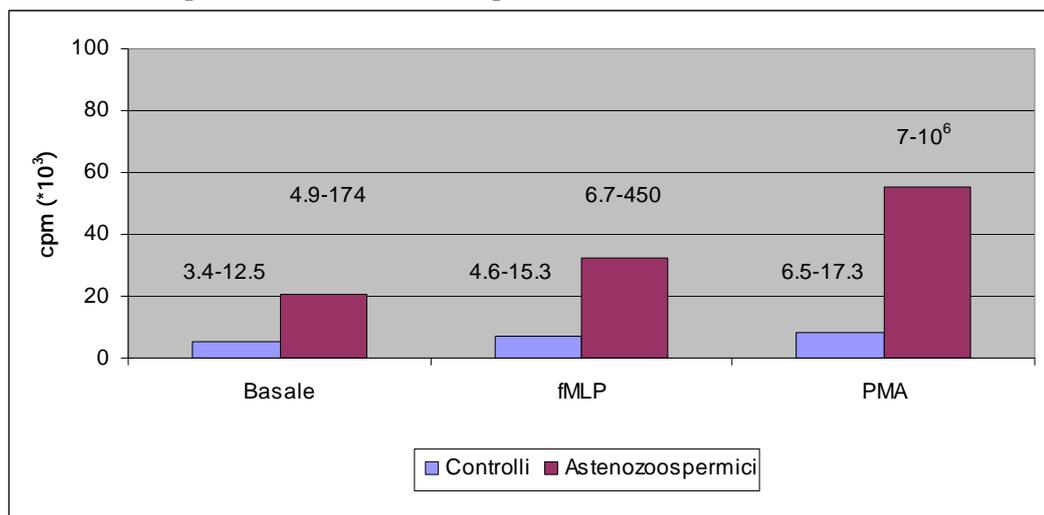
\*p<0.001 vs. Controlli

I risultati dei parametri spermatici convenzionali hanno mostrato differenze statistiche altamente significative tra i due gruppi per quanto attiene alla concentrazione nemaspermica, numero totale di spermatozoi, motilità progressiva e non progressiva e leucociti (Tab. 1).

Riguardo la valutazione della produzione di ROS, i pazienti con astenozoospermia avevano una produzione di ROS significativamente più

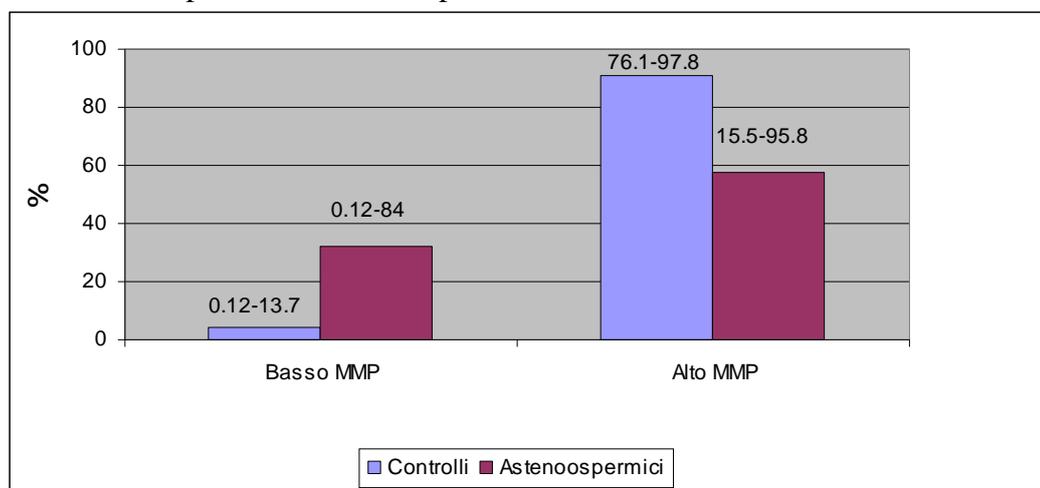
elevata rispetto ai controlli sia in condizione basale ( $p=0.005$ ) che dopo stimolo con fMLP ( $p<0.0001$ ) e soprattutto dopo incubazione con PMA ( $p<0.0001$ ) (Fig. 1).

**Figura 1.** Mediana e range della produzione di radicali liberi dell'ossigeno (ROS) nemaspermica, in condizioni basali (Basal) e dopo stimolo con formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP) o sorbolo 12-miristato 13-acetato (PMA) nei controlli e nei pazienti con astenozoospermia.



Per quanto riguarda la funzione mitocondriale nemaspermica, i risultati ottenuti hanno mostrato che i pazienti con astenozoospermia hanno una percentuale significativamente più elevata di spermatozoi con MMP basso ( $p=0.005$ ) e una percentuale significativamente più bassa di spermatozoi con MMP alto ( $p<0.0001$ ) rispetto ai soggetti di controllo (Fig. 2).

**Figura 2.** Mediana del basso e alto MMP degli spermatozoi nel gruppo dei controlli e nei pazienti astenozoospermici.



Per quanto riguarda gli altri parametri citofluorimetrici studiati, nessuna differenza significativa è stata riscontrata tra pazienti astenozoospermici e controlli (Tab. 2).

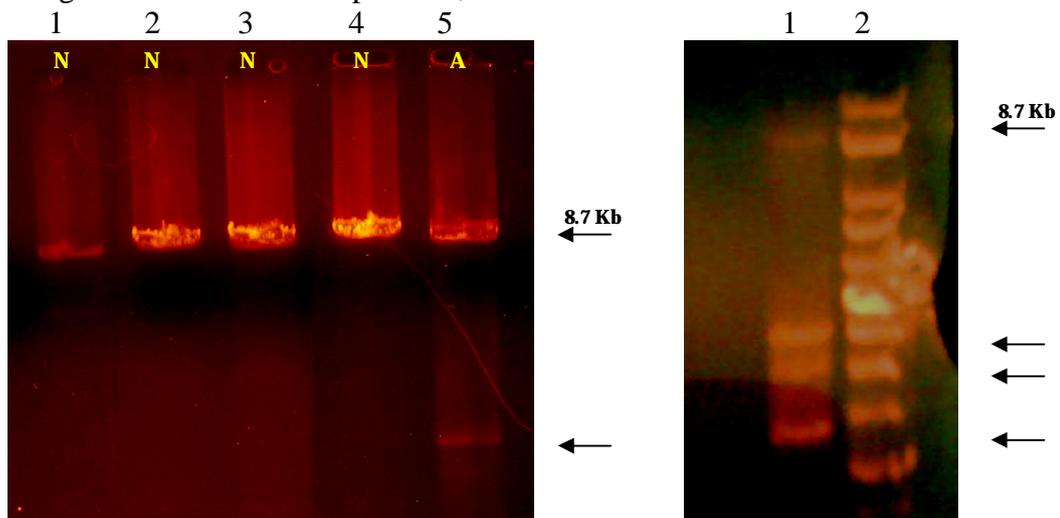
**Tabella 2.** Mediana e range degli spermatozoi con esternalizzazione della fosfatidilserina (PS), cromatina danneggiata o DNA frammentato nei controlli e nei pazienti con astenozoospermia.

<b>Parametri citofluorimetrici</b>	<b>Controlli (n=11)</b>	<b>Pazienti astenozoospermici (n=24)</b>
Esternalizzazione della PS (%)	2.2 (0-13.8)	3.2 (0.1-40.3)
Cromatina danneggiata (%)	11.6 (8.4-18.9)	15.2 (4.3-39.3)
Frammentazione del DNA (%)	2.7 (0.5-4.0)	1.6 (0.6-34.6)

La Long PCR ha mostrato che 22 (91.6%) pazienti astenozoospermici presentavano delezioni multiple del mtDNA, 1 (4.2%) delezioni parziali e 1 (4.2%) aveva il mtDNA integro, mentre 10 (90.9%) soggetti di controllo presentavano un mtDNA integro e solo 1 (9.1%) aveva

un mtDNA delecto (Fig. 3). Il test del chi quadrato è risultato altamente significativo ( $p < 0.0001$ ) esprimendo una differenza di frequenza delle delezioni tra i 2 gruppi.

**Figura 3.** *Immagine sinistra:* risultati ottenuti dalla Long PCR. Le “lane 1-2-3-4” presentano una banda molto intensa della lunghezza di 8.7 kb che indica la presenza di mtDNA normale ed integro (controlli). La “lane 5” ha una minore intensità della banda principale e presenta delezioni multiple indicando una bassa integrità del mtDNA (paziente astenozoospermico). *Immagine destra:* risultati Long PCR. 1: Astenozoospermico; 2: Marker .



Il numero di copie di mtDNA è risultato essere maggiore nei pazienti con astenozoospermia rispetto ai controlli, ma la differenza ha mostrato solo un trend verso la significatività statistica ( $p = 0.07$ ) (Tab. 3).

**Tabella 3.** Mediana e range del numero di copie di mtDNA riscontrato nei controlli e nei pazienti con astenozoospermia.

	<b>Controlli</b>	<b>Pazienti con astenozoospermia (n=24)</b>	<b>p-value</b>
Numero copie di mtDNA	6.0 (1.1-10.0)	8.8 (1.0-61.0)	0.07

## **Discussione**

Dallo studio è emerso che la produzione di ROS, l'MMP, l'integrità e il numero di copie del mtDNA sono significativamente alterati nei pazienti con astenozoospermia rispetto ai controlli.

Negli ultimi anni, numerosi studi hanno attenzionato l'importanza dei ROS nella fisiopatologia della riproduzione. Piccoli quantitativi di ROS vengono prodotti continuamente negli spermatozoi e giocano un ruolo cruciale nella capacitazione, nella iperattivazione, motilità, reazione acrosomiale e nella normale fertilizzazione. Tali specie radicaliche, allorché i meccanismi di difesa non ne riescono a controbilanciare l'aumentata produzione, determinano un aumento dello stress ossidativo con conseguenti alterazioni nemespermiche: riduzione del numero degli spermatozoi, della motilità, danno perossidativo alla membrana cellulare, danno al DNA cellulare (nucleare e mitocondriale), e riduzione della fertilità (Venkatesh et al., 2009).

I radicali liberi sono generati in molti processi all'interno della cellula. Proteine di membrana, enzimi citosolici (come le ciclossigenasi), metabolismo dei lipidi nei perossisomi producono tutti una piccola quantità di ROS, ma la quota maggiore (stimata intorno al 90%) è prodotta dai mitocondri durante la fosforilazione ossidativa (FO). In generale, essendo i mitocondri la principale fonte di ROS nella cellula sono anche i più colpiti.

I mitocondri sono localizzati nel tratto intermedio degli spermatozoi e hanno la funzione di produrre l'ATP necessario per le funzioni fisiologiche degli spermatozoi (Piasecka et al., 2003). Essi rappresentano la sede di produzione dell'energia cellulare (FO mitocondriale o OXPHOS) (Ford & Harrison, 1981, Ruiz-Pesini et al., 1998) necessaria al movimento flagellare, grazie alla presenza nella loro membrana interna di cinque sistemi enzimatici ossidativi che generando un MMP, producono molecole di ATP. Questo complesso è formato da: attività deidrogenasica NADH (complesso I), succinato deidrogenasi (complesso II), citocromo C reduttasi (complesso I e III), succinato citocromo C reduttasi (complesso II e III), citocromo C ossidasi (complesso IV).

La FO segue un processo di accoppiamento chemiosmotico in cui l'energia derivata dall'ossidazione delle molecole viene utilizzata per attivare pompe protoniche legate alla membrana mitocondriale interna, che genera un gradiente di voltaggio (MMP) (Troiano et al., 1998., Wang et al., 2003). Poiché i mitocondri producono energia per supportare il movimento cellulare, l'analisi della funzione mitocondriale può darci notevoli informazioni relative alla motilità cellulare (St John et al., 2007) e sui fenomeni apoptotici. Infatti, nelle prime fasi dell'apoptosi, l'MMP diminuisce e favorisce il rilascio del citocromo c che fa parte della catena respiratoria; il citocromo c, a livello citosolico, è in grado di attivare le caspasi e quindi l'apoptosi.

Inoltre, i ROS inducono danni perossidativi sia della membrana plasmatica che sul genoma nucleare e mitocondriale dello spermatozoo. Le membrane cellulari ricche di acidi grassi polinsaturi (PUFA), particolarmente C22:6 che contengono più di 2 doppi legami carbonio-carbonio, sono un altro target dei ROS. I ROS attaccano i PUFA della membrana causando una cascata di reazioni chimiche chiamate perossidazione lipidica. Le membrane danneggiate perdono la capacità di trasportare gli ioni, l'ossigeno, i nutrienti, ecc.

L'integrità e l'attività funzionale della membrana plasmatica sono requisiti cruciali per la motilità e per i cambiamenti fisiologici che avvengono sulla superficie dello spermatozoo durante il processo di fecondazione, inclusi la capacitazione, la reazione acrosomiale, il legame alla zona pellucida e infine la fusione con l'oolemma. Per questo motivo, la valutazione dello stato funzionale della membrana plasmatica può essere utilizzata come test predittivo di fertilità. Vermes e colleghi (1998) hanno dimostrato che quando la membrana degli spermatozoi è alterata, la PS trasloca dalla porzione interna a quella esterna della membrana plasmatica; questo è uno dei primi segnali di apoptosi. La percentuale di spermatozoi con esternalizzazione della PS correla in modo negativo con la percentuale di forme normali e con la motilità progressiva, indicando quindi che gli spermatozoi che espongono PS sono danneggiati o immaturi come anche

postulato da molti autori (Shoffner et al., 2001; Shen et al., 2002; Moustafa et al., 2004).

Perossidando i lipidi, i ROS causano inoltre alterazioni strutturali dell'acrosoma, della testa, della regione del collo (Aziz et al., 2004) e, innescando processi apoptotici, inducono la frammentazione del DNA (Sharma et al., 2001). La funzionalità gametica risulta quindi compromessa a causa di una riduzione della motilità e della capacità fecondante dovuta all'inibizione della reazione acrosomiale e della capacità fusigenica (Whittington et al., 1999; Whittington & Harrison et al., 1999; Erenpreiss et al., 2002; Saleh et al., 2002).

Alti livelli di ROS sono associati anche al danno del mtDNA. Il mtDNA è localizzato vicino la membrana mitocondriale interna dove si trovano anche la catena di trasporto degli elettroni e la principale sorgente di produzione dei ROS. Il mtDNA manca di un sistema di riparazione del DNA e di molte DNA-binding protein che hanno il compito di proteggerlo, come gli istoni e le protamine. Questi fattori possono spiegare perché il mtDNA è 10 volte più suscettibile del DNA nucleare al danno indotto dai ROS.

Mutazioni e delezioni del mtDNA sono associati a scarsa motilità e ridotta fertilità spermatica (Poongothai et al., 2009). Il mtDNA, così come il DNA nucleare (nDNA), sono responsabili della corretta funzionalità cellulare spermatica in quanto codificano le proteine responsabili del

movimento flagellare nemaspermico, il sistema OXPHOS, che ha il compito di sintetizzare l'ATP, ovvero, la molecola bio-energetica fondamentale per lo svolgimento di tutti i processi cellulari.

Il funzionamento della catena respiratoria mitocondriale dipende dalla coordinata espressione genica di entrambi i genomi mitocondriale e nucleare. Una mutazione in entrambi i genomi può portare ad un difetto nella funzione respiratoria dei mitocondri.

Diversi autori affermano che alterazioni del metabolismo mitocondriale sono possibili fattori di infertilità e che esiste una correlazione tra mtDNA ed infertilità maschile. Partendo dal presupposto che i mitocondri nemaspermici giocano un ruolo importante nella funzionalità degli spermatozoi a causa dell'elevata richiesta di ATP da parte di queste cellule, recenti studi hanno dimostrato che alterazioni genetiche del mtDNA possono direttamente influenzare la motilità e la vitalità degli spermatozoi con conseguenze sulla normale fertilizzazione.

Inoltre, recenti studi hanno riportato che gli spermatozoi con motilità ridotta hanno un numero di copie di mtDNA più alto rispetto a spermatozoi mobili progressivi, mentre l'integrità dello stesso DNA diminuisce in questi pazienti (Song & Lewis, 2008).

Durante la spermatogenesi, i mitocondri subiscono drastici cambiamenti morfologici e riorganizzazioni subcellulari (Seitz et al., 1995).

Una riduzione del numero dei mitocondri e delle copie di mtDNA è stata osservata negli spermatozoi maturi (Hechet et al., 1984). Poiché la funzione bioenergetica dei mitocondri è cruciale per la motilità degli spermatozoi, le aberrazioni quantitative o qualitative del mtDNA alterano il funzionamento cellulare degli spermatozoi.

Le cellule somatiche di mammifero contengono circa 100-10.000 copie di mtDNA, mentre gli ovociti una media di 200.000 (Reynier et al., 2001). Gli spermatozoi hanno 22-75 mitocondri localizzati nel tratto intermedio; usando diverse metodiche, è stato riportato che il numero di copie di mtDNA oscilla tra 10 e circa 1.500 (Hecht et al., 1984; Shitara et al., 2000). Song e Lewis, utilizzando la Real time PCR, hanno riportato che il numero di copie di mtDNA è di circa 34 copie per spermatozoo, con un range compreso tra 2.8 e 226 (Song & Lewis, 2008). L'aumento delle copie potrebbe essere dovuto a:

1. gli spermatozoi anormali di pazienti infertili producono eccessivi livelli di ROS che alterano il numero di copie;
2. l'aumento è dovuto ad una sorta di meccanismo di compensazione per mitocondri danneggiati che hanno mtDNA con mutazioni o frammentazioni;
3. il numero di copie è normalmente ridotto durante la spermatogenesi;

l'apoptosi abortiva oppure spermatogenesi alterate possono aumentare il numero di copie di mtDNA negli spermatozoi di uomini infertili.

Molte proteine mitocondriali sono codificate dal DNA nucleare per cui l'integrità di questo è molto importante per la funzione mitocondriale e per la sua integrità. Per esempio, mutazioni della DNA polimerasi mitocondriale (POLG), codificata dal DNA nucleare, sono associate ad infertilità maschile (Rovio et al., 2001).

In conclusione, i risultati di questo studio hanno dimostrato che i pazienti con astenozoospermia, indipendentemente dalla causa che può averla determinata, hanno una maggiore produzione di ROS, un aumento della percentuale di spermatozoi con funzione mitocondriale danneggiata e danno del mtDNA. Questi dati suggeriscono che il mitocondrio è il sito principalmente alterato nei pazienti con astenozoospermia. Esso quindi potrebbe rappresentare il bersaglio di varie patologie che riducono la motilità nemespermica. Ulteriori studi sono tuttavia necessari per chiarire i percorsi biochimici che regolano la motilità nemespermica. Chiarire i meccanismi molecolari coinvolti nell'insorgenza dell'astenozoospermia può essere di grande aiuto per lo sviluppo di possibili strategie terapeutiche e, allo stesso tempo, per scopi contraccettivi.

## **Bibliografia**

Aitken RJ, Clarkson JS, Fishel S (1989) Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation and human sperm function. *Biol Reprod* 41:183-197.

Agarwal A, Makker K, Sharma R (2008) Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. *Am J Reprod Immunol* 59:2-11.

Auroux MR, Jacques L, Mathieu D, Auer J (1991) Is the sperm bacterial ratio a determining factor in impairment of sperm motility: an in-vitro study in man with *Escherichia coli*. *Int J Androl* 14:264-70.

Aziz N, Saleh RA, Sharma RK, Lewis-Jones I, Esfandiari N, Thomas AJ Jr (2004) Novel association between sperm reactive oxygen species production, sperm morphological defects, and the sperm deformity index. *Fertil Steril* 81:349-54.

Burkman LJ (1990) Hyperactivated motility of human spermatozoa during in vitro capacitation and implications for fertility. In: *Controls of Sperm Motility: Biological and Clinical Aspects*. Claude Gagnon(Ed.), CRC Press, Boca Raton, Fl.

Calogero A, Fishel S, Hall J, Ferrara E, Vicari E, Green S, Hunter A, Burrello N, Thornton S, D'Agata R (1998) Correlation between intracellular cAMP content, kinematic parameters and hyperactivation of human spermatozoa after incubation with pentoxifylline. *Hum Reprod* 13:911-915.

Cocuzza M, Sikka SC, Athayde KS, Agarwal A (2007) Clinical relevance of oxidative stress and sperm chromatin damage in male infertility :an evidence based analysis. *Int Braz J Urol* 33:603-621.

Erenpreiss J, Hlevicka S, Zalkalns J, Erenpreisa J (2002) Effect of leukocytospermia on sperm DNA integrity: a negative effect in abnormal semen samples. *J Androl* 23:717-23.

Escalier D & David G (1984) Pathology of the cytoskeleton of the human sperm flagellum: axonemal and peri-axonemal anomalies. *Biol Cell* 50:37-52.

Espino J, Mediero M, Lozano GM, Bejarano I, Ortiz A, García JF, Pariente JA, Rodríguez AB (2009) Reduced levels of intracellular calcium releasing in spermatozoa from asthenozoospermic patients. *Reprod Biol Endocrinol* 6:7-11.

Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM (1992) Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* 148:2207-16.

Ford WC & Harrison A (1981) The role of oxidative phosphorylation in the generation of ATP in human spermatozoa. *J Reprod Fertil* 63:271-8.

Gandini L, Lombardo F, Paoli D, Caponecchia L, Familiari G, Verlengia C, Dondero F, Lenzi A (2000) Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod* 15:830-9.

Glander HJ & Schaller J (1999) Binding of annexin V to plasma membranes of human spermatozoa: a rapid assay for detection of membrane changes after cryostorage. *Mol Hum Reprod* 5:109-15.

Green, DR & Reed JC (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science* 281:1309-1312.

Hecht NB, Liem H, Kleene KC, Distel RJ, Ho SM (1984) Maternal inheritance of the mouse mitochondrial genome is not mediated by a loss or gross alteration of the paternal mitochondrial DNA or by methylation of the oocyte mitochondrial DNA. *Develop Biol* 102:452-61.

Homberg CH, de Haas M, von dem Borne AE, Verhoeven AJ, Reutelingsperger CP, Roos D (1995) Human Neutrophils Lose their surface Fc RIII and Acquire Annexin V Binding Sites During Apoptosis in Vitro. *Blood* 85:532-540.

Kao S, Chao HT, Wei YH (1995) Mitochondrial deoxyribonucleic acid 4977-bp deletion is associated with diminished fertility and motility of human sperm. *Biol Reprod* 52:729-36.

Kao SH, Chao HT, Wei YH (1998) Multiple deletions of mitochondrial DNA are associated with the decline of motility and fertility of human spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 4:657-66.

Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH (1994) Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 84:1415-20.

Leclerc P, de Lamirande E, Gagnon C (1996) Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent regulation of protein tyrosine phosphorylation in relation to human sperm capacitation and motility. *Biol Reprod* 55:684-92.

Liu DY & Baker HW (2000) Defective sperm-zona pellucida interaction: a major cause of failure of fertilization in clinical in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 15:702-8.

Liu Z & Foote RH (1998) Osmotic effects on volume and motility of bull sperm exposed to membrane permeable and nonpermeable agents. *Cryobiology* 37:207-218.

Luconi M, Forti G, Baldi E (2001) Signal transduction pathways in human spermatozoa. *J Reprod Immunol* 53: 121-131.

Luconi M, Marra F, Gandini L, Filimberti E, Lenzi A, Forti G, Baldi E (2001) Phosphatidylinositol 3-kinase inhibition enhances human sperm motility. *Hum Reprod* 16:1931-1937.

Marchetti C, Obert G, Deffosez A, Formstecher P, Marchetti P (2002) Study of mitochondrial membrane potential, reactive oxygen species, DNA

fragmentation and cell viability by flow cytometry in human sperm. *Hum Reprod* 17:1257-1265.

Moustafa MH, Sharma RK, Thornton J, Mascha E, Abdel-Hafez MA, Thomas AJ Jr, Agarwal A (2004) Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. *Hum Reprod* 19:129-38.

Murray SC & Smith TT (1997) Sperm interaction with fallopian tube apical membrane enhances sperm motility and delays capacitation. *Fertil Steril* 68:351-356.

Piasecka M, Kawiak J (2003) Sperm mitochondria of patient with normal sperm motility and with asthenozoospermia : morphological and functional study. *Folia Histochem Cytobiol* 41:125-139.

Poongothai J, Gopenath TS, Manonayaki S (2009) Genetics of human male infertility. *Singapore Med J* 50:336.

Reynier P, May-Panloup P, Chretien MF, Morgan CJ, Jean M, Savagner F (2001) Mitochondrial DNA content affects the fertilizability of human oocytes. *Mol Hum Reprod* 7:425-9.

Robertson L, Eolf D, Tash JS (1998) Temporal changes in motility parameters related to acrosomal status: identification and characterization of populations of hyperactivated human sperm. *Biol Reprod* 39:797-805.

Rovio AT, Marchington DR, Donat S, Schuppe HC, Abel J, Fritsche E (2001) Mutations at the mitochondrial DNA polymerase (POLG) locus associated with male infertility. *Nat Genet* 29:261-2.

Ruiz-Pesini E, Díez-Sánchez C, Lapena AC, Pérez-Martos A, Montoya J, Alvarez E, Lopez-Pérez MJ (1998) Correlation of sperm motility with mitochondrial enzymatic activities. *Clinical Chemistry* 44:1616-1620.

Saleh R & Agarwal A (2002) Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. *J Androl* 23:737-52.

Seitz J, Mobius J, Bergmann M, Meinhardt A (1995) Mitochondrial differentiation during meiosis of male germ cells. *Int J Androl* 18:7-11.

Sharma RK, Pasqualotto AE, Nelson DR, Thomas AJ Jr, Agarwal A (2001) Relationship between seminal white blood cell counts and oxidative stress in men treated at an infertility clinic. *J Androl* 22:575-83.

Shen HM, Dai J, Chia SE, Lim A, Ong CN (2002) Detection of apoptotic alterations in sperm in subfertile patients and their correlations with sperm quality. *Hum Reprod* 17:1266-73.

Shitara H, Kaneda H, Sato A, Inoue K, Ogura A, Yonekawa H (2000) Selective and continuous elimination of mitochondria microinjected into mouse eggs from spermatids, but microinjected into mouse eggs from spermatids, but not from liver cells, occurs throughout embryogenesis. *Genetics* 156:1277-84.

Shoffner JM (2001) An introduction: oxidative phosphorylation diseases. *Semin Neurol* 21:235-50.

Smith (1996) Primate sperm contain protein phosphatase 1, a bio-chemical mediator of motility. *Biol Reprod* 54:719-727.

Song GJ & Lewis V (2008) Mitochondrial DNA integrity and copy number in sperm from infertile men. *Fertil Steril* 90:2238-2244.

St John JC, Bowles EJ, Amaral A (2007) Sperm mitochondria and fertilisation. *Reprod Suppl Fertil* 65:399-416.

Troiano L, Granata AR, Cossarizza A, Kalashnikova G, Bianchi R, Pini G, Tropea F, Carani C, Franceschi C (1998) Mitochondrial membrane potential and DNA stainability in human sperm cells: a flow cytometry analysis with implications for male infertility. *Exp Cell Res* 241:384-93.

Turner RM (2006) Moving to the beat: a review of mammalian sperm motility regulation. *Reprod Fertil Dev* 18:25-38.

Venkatesh S, Deecaraman M, Kumar R, Shamsi MB, Dada R (2009) Role of reactive oxygen species in the pathogenesis of mitochondrial DNA (mtDNA) mutations in male infertility. *Indian J Med Res* 29:127-37.

Vermes I & Haanen C (1998) A novel assay for apoptosis: flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescence labelled annexin V. *J Immunol Methods* 180:39-52.

Wang X, Sharma RK, Gupta A, George V, Thomas AJ, Falcone T, Agarwal A. (2003) Alterations in mitochondria membrane potential and oxidative stress in infertile men: a prospective observational study. *Fertil Steril* 80:844-50.

Wang X, Sharma RK, Sikka SC, Thomas AJ Jr, Falcone T, Agarwal A (2003) Oxidative stress is associated with increased apoptosis leading to spermatozoa DNA damage in patients with male factor infertility. *Fertil Steril* 80:531-5.

Weng SL, Taylor SL, Morshedi M, Schuffner A, Duran EH, Beebe S (2002) Caspase activity and apoptotic markers in ejaculated human sperm. *Mol Hum Reprod* 8: 984-91.

Whittington K, Ford WC (1999) Relative contribution of leukocytes and of spermatozoa to reactive oxygen species production in human sperm suspensions. *Int J Androl* 22:229-35.

Whittington K, Harrison SC, Williams KM, Day JL, McLaughlin EA, Hull MG (1999) Reactive oxygen species (ROS) production and the outcome of diagnostic tests of sperm function. *Int J Androl* 22:236-42.

Wilton LJ, Teichtahl H, Temple-Smith PD, Johnson JL, Southwick GJ, Burger HG, de Kretser DM (1991) Young's syndrome (obstructive

azoospermia and chronic sinobronchial infection): a quantitative study of axonemal ultrastructure and function. *Fertil Steril* 55:144-51.

Yanagimachi R (1994) Mammalian fertilization. In: *Physiology of Reproduction*. Knobil E, Neill J, (Eds.), Raven Press, New York 189-317.

Zanzami N, Susin SA, Marchetti P, Hirsch T, Gómez-Monterrey I, Castedo M, Kroemer G (1996) Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J Exp Med* 183:1533-1544.

Zhang HB, Lu SM, MaCY, Wang L, Li X, Chen ZJ (2008) Early apoptotic changes in human spermatozoa and their relationships with conventional semen parameters and sperm DNA fragmentation. *Asian J Androl* 10:227-235.