

ABERRAZIONI CROMOSOMICHE (FISH)

Gli spermatozoi umani sono cellule con corredo cromosomico aploide, contenenti 22 autosomi e 1 cromosoma sessuale, X o Y. Una variazione del numero di cromosomi è chiamata aneuploidia, condizione in cui una cellula ha uno o più cromosomi soprannumerari oppure in difetto rispetto all'assetto di base. L'aneuploidia può essere causata da una mancata disgiunzione dei cromosomi omologhi alla meiosi o dei cromatidi fratelli durante la mitosi. La produzione di gameti aneuploidi rappresenta un fattore di rischio molto importante per l'infertilità, ma anche per l'insorgenza di patologie come ritardo mentale, mortalità perinatale e aborti; infatti solamente pochi feti aneuploidi sopravvivono alla nascita (1) ed il 50% degli aborti spontanei nel primo trimestre è dovuto ad anomalie cromosomiche.

Il test della FISH, *fluorescence in-situ hybridization*, ha permesso lo studio della percentuale delle aneuploidie in spermatozoi umani di uomini infertili (2,3). Tale tecnica permette di localizzare specifiche sequenze di acido nucleico, tramite l'utilizzo di sequenze nucleotidiche complementari chiamate sonde (4).

Questa procedura è particolarmente indicata nei casi di ripetuti fallimenti riproduttivi, ma le sue applicazioni sono molteplici:

- test prenatali, postnatali e di preimpianto per predire l'esito della gravidanza e la futura qualità della vita del nascituro;
- determinazione di aberrazioni cromosomiche nei tumori solidi come il cancro al polmone, alla prostata e alla vescica;
- nei disordini del sistema ematopoietico come la leucemia mielogenosa cronica e acuta, la leucemia linfocitica cronica e acuta ed il mieloma multiplo, per determinare traslocazioni, delezioni e rotture cromosomiche.

L'ibridazione in situ consiste nel far avvenire la denaturazione del bersaglio e della sonda utilizzata, in modo che le rispettive regioni complementari si rinaturino tra loro. La sequenza verrà poi identificata in base al tipo di sonda usata: originariamente erano impiegati metodi isotopici, sensibili, ma poco pratici per i lunghi tempi di analisi ed i segnali generati spesso indistinti; attualmente vengono utilizzati metodi non isotopici, tra cui la FISH, che utilizza la marcatura con fluorocromi, tecnica vantaggiosa per la rapidità di esecuzione e per il contrasto (5). La marcatura con fluorocromi può avvenire con metodo diretto e indiretto.

Nel metodo diretto il fluorocromo viene incorporato direttamente nella sonda durante la sintesi, oppure si attacca covalentemente, in modo da permettere la visualizzazione del complesso DNA-sonda attraverso un microscopio a fluorescenza. L'unico svantaggio di questa tecnica è la ridotta sensibilità (6), sebbene questo non sia di solito una seria limitazione.

Nel metodo indiretto si utilizzano sonde di DNA che contengono un marcatore come la digossigenina o la biotina; dopo l'ibridazione, per identificare il DNA, il marcatore viene usato per riconoscere una proteina coniugata al fluorocromo oppure si procede con l'utilizzo di un anticorpo. I vantaggi di questa tecnica sono l'elevata sensibilità, la capacità di intensificare il segnale e la possibilità di avere un range di riconoscimento dei reagenti esteso; gli svantaggi sono i costi elevati e i tempi di marcatura del DNA lunghi (7,8).

Le sonde di DNA proposte per la FISH sono centromeriche, in grado cioè di riconoscere sequenze ripetitive di DNA localizzate nella regione centromerica, e sono state messe a punto per ogni cromosoma umano. Queste sonde producono un piccolo segnale nel centromero e sono usate di routine nella ricerca di aneuploidie (Fig. 1), e in minima parte anche per riconoscere la presenza di traslocazioni Robertsoniane.

Altri tipi di sonde sono quelle telomeriche, più adatte per la ricerca di anomalie strutturali dei cromosomi, come delezioni e riarrangiamenti che interessano i bracci dei cromosomi.

Esistono inoltre le sonde sito specifiche, che invece riconoscono determinate sequenze che sono poste all'interno dei cromosomi.

Numerose osservazioni cliniche indicano che anomalie cromosomiche dei gameti maschili influenzano negativamente il tasso di gravidanza, di impianto e di sopravvivenza fetale (9-11) ed il tasso di successo delle tecniche di fecondazione in vitro (ICSI). In particolare un aumento del tasso di disomie dei cromosomi sessuali è stato osservato nel liquido seminale dei partner maschili di coppie con aborto ricorrente (12). Inoltre i cariotipi prenatali degli embrioni generati mediante ICSI hanno una percentuale di aneuploidie cromosomiche maggiore rispetto a quella riscontrata nella popolazione generale (13-14) (Tabella 1).

Tale fenomeno in parte è spiegato dal fatto che una significativa percentuale dei soggetti sottoposti ad ICSI per grave oligozoospermia o azoospermia è portatore di anomalie genetiche e citogenetiche. Infatti un numero incrementato di aneuploidie cromosomiche è noto nei soggetti portatori di traslocazioni cromosomiche (15-18), poiché i cromosomi traslocati sono più suscettibili ad errori meiotici; nei soggetti affetti da Sindrome di Klinefelter, sia a carico dei cromosomi sessuali sia

degli autosomi, confermando l'ipotesi che cellule germinali geneticamente alterate (47XXY) possano comunque completare i processi meiotici, dando vita a spermatozoi XX o XY; inoltre in soggetti affetti da neoplasia maligna trattati con farmaci chemioterapici, almeno temporaneamente, è stato riportato un aumento delle aneuploidie spermatiche. Studi recenti tuttavia hanno messo in evidenza che anche soggetti sani e con normale corredo cromosomico, ma affetti da oligozoospermia, hanno un numero di spermatozoi aneuploidi maggiore rispetto a soggetti normozoospermici (19), ad indicare che la patologia testicolare responsabile dell'alterazione seminale è in grado di danneggiare anche i meccanismi di segregazione cromosomica durante la mitosi e/o la meiosi delle cellule germinali (20). In particolare è stata dimostrata una relazione inversa tra il tasso di aneuploidie spermatiche ed i tre principali parametri seminali (concentrazione, motilità e morfologia), suggerendo che più grave è il danno spermatogenetico, maggiore è la probabilità di trovare spermatozoi con alterazione del cariotipo (20). L'aumentata percentuale di anomalie cromosomiche spermatiche a sua volta si associa ad un minor tasso di impianto e gravidanza e ad un maggior tasso di aborto (21, 22).

Pur essendo stati definiti dei parametri di normalità nell'interpretazione dell'esame seminale, la scoperta di casi di infertilità maschile causati da anomalie nel potenziale di fertilizzazione dello spermatozoo (fenomeni apoptotici e/o alterazione dell'integrità cromatinica) ha portato alla ribalta nuove problematiche. Infatti, spermatozoi, persino con parametri tradizionali normali, possono presentare frammentazione del DNA, alterazione del potenziale di membrana mitocondriale o incremento delle aneuploidie spermatiche, che in natura difficilmente consentono un normale concepimento. Pertanto il valore dello spermogramma nella diagnosi d'infertilità è relativo e va comunque integrato da esami specifici, che valutino l'integrità genomica della cellula spermatica e quindi la reale funzionalità dello spermatozoo. In particolare le metodiche più utili sono rappresentate dal test di frammentazione del DNA (TUNEL TEST), dallo studio dell'integrità cromatinica (Arancio di acridina), dal test di condensazione nucleare e dalla valutazione delle aneuploidie spermatiche mediante FISH. Tali approfondimenti sono indicati nei maschi con infertilità idiopatica e nelle coppie con storia di aborti ricorrenti o ripetuti fallimenti delle tecniche di riproduzione assistita o con cattiva qualità embrionale.

Bibliografia

1. Egozcue S, Blanco J, Vendrell JM, García F, Veiga A, Aran B, Barri PN, Vidal F, Egozcue J. Human male infertility: chromosome anomalies, meiotic disorders, abnormal spermatozoa and recurrent abortion. *Hum Reprod Update*. 2000; 6 (1): 93-105.
2. Chandley AC. Infertility and chromosome abnormality. *Oxf Rev Reprod Biol*. 1984; 6: 1-46.
3. Martin RH, Rademaker A. The relationship between sperm chromosomal abnormalities and sperm morphology in humans. *Mutat Res*. 1988; 207(3-4): 159-164.
4. Martin RH, Ko E, Chan K. Detection of aneuploidy in human spermatozoa by FISH. *Cytogenet Cell Genet* 1993; 64: 23-26.
5. Spriggs EL, Rademaker AW, Martin RH. Aneuploidy in human sperm: results of two- and three-color fluorescence in situ hybridization using centromeric probes for chromosomes 1, 12, 15, 18, X, and Y. *Cytogenet Cell Genet* 1995; 71(1): 47-53.
6. Ried T, Landes G, Dackowski W, Klinger K, Ward DC. Multicolor fluorescence in situ hybridization for the simultaneous detection of probe sets for chromosome 13, 18, 21, X and Y in uncultured amniotic fluid cells. *Hum Mol Genet* 1992; 1: 307-313.
7. 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*. 1997; 3(9): 815-819.
8. Bischoff FZ, Nguyen D, Burt KJ, Shaffer LG. Estimates aneuploidie using multi-colour FISH on human sperm. *Cytogenet Cell Genet* 1994; 66: 237-243.
9. Calogero AE, De Palma A, Grazioso C, Barone N, Burrello N, Palermo I, Gulisano A, Pafumi C, D'Agata R. High sperm aneuploidy rate in unselected infertile patients and its relationship with intracytoplasmic sperm injection outcome. *Hum Reprod* 2001; 16(7):1433-1439.
10. Burrello N, Vicari E, Shin P, Agarwal A, De Palma A, Grazioso C, D'Agata R, Calogero AE. Lower sperm aneuploidy frequency is associated with high pregnancy rates in ICSI programmes. *Hum Reprod* 2003; 18(7): 1371-1376.
11. Rubio C, Gil-Salom M, Simón C, Vidal F, Rodrigo L, Mínguez Y, Remohí J, Pellicer A. Incidence of sperm chromosomal abnormalities in a risk population: relationship with sperm quality and ICSI outcome. *Hum Reprod*. 2001; 16(10): 2084-2092.

12. Rubio C, Simón C, Blanco J, Vidal F, Mínguez Y, Egozcue J, Crespo J, Remohí J, Pellicer A. Implications of sperm chromosome abnormalities in recurrent miscarriage. *J Assist Reprod Genet.* 1999; 16 (5): 253-258.
13. In't Veld P, Brandenburg H, Verhoeff A, Dhont M, Los F. Sex chromosomal abnormalities and intracytoplasmic sperm injection. *Lancet.* 1995; 346 (8977): 773.
14. Bonduelle M, Aytöz A, Van Assche E, Devroey P, Liebaers I, Van Steirteghem A. Incidence of chromosomal aberrations in children born after assisted reproduction through intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 1998; 13(4): 781-782.
15. Spriggs EL, Martin RH. Analysis of segregation in a human male reciprocal translocation carrier, t(1;11) (p36.3;q13.1), by two-colour fluorescence in situ hybridization. *Mol Reprod Dev;* 38(3): 247-250.
16. Chevret E, Rousseaux S, Monteil M, Pelletier R, Cozzi J, Sèle B. Meiotic segregation of the X and Y chromosomes and chromosome 1 analyzed by three-color FISH in human interphase spermatozoa. *Cytogenet Cell Genet.* 1995; 71(2): 126-130.
17. Rousseaux S, Chevret E, Monteil M, Cozzi J, Pelletier R, Delafontaine D, Sèle B. Sperm nuclei analysis of a Robertsonian t(14q21q) carrier, by FISH, using three plasmids and two YAC probes. *Hum Genet* 1995; 96(6): 655-660.
18. Benet J, Oliver-Bonet M, Cifuentes P, Templado C, Navarro J. Segregation of chromosomes in sperm of reciprocal translocation carriers: a review. *Cytogenet Genome Res* 2005; 111 (3-4): 281-290.
19. Durakbasi-Dursun HG, Zamani AG, Kutlu R, Görkemli H, Bahce M, Acar A. A new approach to chromosomal abnormalities in sperm from patients with oligoasthenoteratozoospermia: detection of double aneuploidy in addition to single aneuploidy and diploidy by five-color fluorescence in situ hybridization using one probe set. *Fertil Steril* 2008; 89(6): 1709-1717.
20. Calogero AE, Burrello N, De Palma A, Barone N, D'Agata R, Vicari E. Sperm aneuploidy in infertile men. *Reprod Biomed Online.* 2003; 6(3): 310-317.
21. Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Fiorentino A, Garrisi J, Munné S. Preimplantation genetic diagnosis increases the implantation rate in human in vitro fertilization by avoiding the transfer of chromosomally abnormal embryos. *Fertil Steril.* 1997; 68 (6): 1128-1131.

22. Rubio C, Pehlivan T, Rodrigo L, Simón C, Remohí J, Pellicer A. Embryo aneuploidy screening for unexplained recurrent miscarriage: a minireview. *Am J Reprod Immunol.* 2005; 53 (4):159-165