

"Infertilità maschile: quali esami genetici richiedere e quando?"

Fattori genetici sono implicati in tutte le categorie eziologiche dell'infertilità maschile (pre-testicolare, testicolare e post-testicolare). La più alta incidenza di anomalie genetiche (20-25%) si riscontra in pazienti con azoospermia o grave oligozoospermia. Le linee guida Europee (EAU per l'Infertilità maschile e l'EAA/EMQN per lo screening delle microdelezioni del cromosoma Y) riportano le indicazioni per l'esecuzione dei vari test genetici. Di seguito verranno discusse brevemente le indicazioni e il significato clinico di quegli esami genetici che fanno parte integrante del percorso diagnostico del maschio infertile e sono pertanto di pertinenza di un andrologo clinico. Le indicazioni per eseguire i test genetici variano secondo il fenotipo e sono riportati nella tabella 1. L'anamnesi, i parametri ormonali, il volume testicolare ed i parametri seminali possono orientare verso forme distinte di alterazioni genetiche.

I. L'analisi del cariotipo è indicata in base alla conta spermatica e la sua incidenza massima si riscontra nei pazienti con azoospermia non ostruttiva (circa il 16%) con una frequenza decrescente con il migliorare del quadro seminale. Il *cut-off* arbitrario per l'esecuzione del test è tutt'ora discusso, tuttavia l'incidenza di anomalie cromosomiche risulta 10 volte maggiore nel gruppo di soggetti con 5-10 milioni spermatozoi/ml rispetto alla popolazione generale (4% vs 0,4%) il che rende accettabile utilizzare questo valore soglia dal punto di vista costo-efficacia. Ulteriori indicazioni per lo studio del cariotipo sono la familiarità per anomalie cromosomiche, malformazioni e aborti ricorrenti.

Alcuni esempi di alterazioni del cariotipo e il loro significato clinico:

- 1) *Sdr di Klinefelter, KS* (47,XXY o mosaico 46,XY/47,XXY): causa genetica più frequente dell'azoospermia con ipergonadotropismo. Oltre ad alterazioni della funzione testicolare sia riproduttiva che endocrina, si associa anche ad una serie di patologie in parte dipendenti dall'ipoandrogenismo ed in parte legate all'aneuploidia (alterato dosaggio genico legato al cromosoma X in eccesso). La presenza di condizioni patologiche anche non-riproduttive implica un *follow-up* per l'intera durata della vita del paziente. Per queste ragioni si rende spesso necessaria la terapia sostitutiva con testosterone e molto frequentemente anche la contemporanea somministrazione di eventuali altri farmaci a scopo preventivo/curativo per la salute generale. La paternità biologica è raramente possibile utilizzando spermatozoi eiaculati (circa 10% dei soggetti KS), ma più frequentemente ricorrendo a tecniche chirurgiche di recupero degli spermatozoi a livello testicolare (Testicular Sperm Extraction, TESE o micro-TESE: rate di recupero intorno al 50%) seguite da ICSI. Sebbene un aumento significativo delle anomalie dei cromosomi sessuali e autosomici sia stato riscontrato con la diagnosi pre-impianto negli embrioni derivanti da TESE/ICSI di pazienti con KS, i dati riportati in letteratura sui figli nati da padre KS sono rassicuranti, senza evidenza di maggiore incidenza di malformazioni o alterazioni cromosomiche rispetto alla popolazione generale.
- 2) *46, XX male (sindrome de la Chapelle)* è una patologia molto rara (1 su 20.000 neonati maschi) che causa azoospermia con assenza di spermatozoi nel testicolo (in questo caso la TESE non è consigliata).
- 3) *Anomalie strutturali del cromosoma Y* includono il cromosoma Y isodentrico e il cromosoma Y ad anello e rappresentano le cause più frequenti di anomalie cariotipiche negli azoospermici non ostruttivi dopo la KS. In genere queste anomalie strutturali del cromosoma Y non si associano a problemi di ipoandrogenismo o di salute generale. La TESE può essere eseguita per il recupero di spermatozoi. È importante effettuare un'attenta valutazione della quantità di cellule 45,X, poiché il mosaicismo si riscontra frequentemente e rappresenta una prognosi infausta per il recupero di spermatozoi dal testicolo.
- 4) *Anomalie strutturali degli autosomi*: gli uomini oligozoospermici sono a più alto rischio di aberrazioni autosomiche, quali traslocazioni Robertsoniane, traslocazioni reciproche, inversioni paracentriche e markers cromosomici. L'importanza di determinare queste alterazioni strutturali dei cromosomi è associata all'incrementato rischio di aneuploidie o traslocazioni non bilanciate nel feto. Utili analisi FISH negli spermatozoi ed eventuale PGD (diagnosi genetica pre-impianto).

II. L'analisi delle microdelezioni del cromosoma Y (comunemente definite come delezioni *AZF_a*, *AZF_b*, *AZF_{b+c}* e *AZF_c*) è indicata in pazienti con concentrazione di spermatozoi < 5 milioni/ml da testicolopatia primaria. La rimozione in blocco dei geni AZF provoca sempre alterazione della spermatogenesi (relazione causa-effetto). Le delezioni isolate di geni AZF sono rarissime pertanto nella routine non è consigliata la loro analisi. La frequenza di delezioni AZF è maggiore negli azoospermici (8-10%) rispetto agli oligozoospermici (2-5%). La delezione più frequente è a carico della regione *AZF_c* (oltre 65% di tutte le delezioni).

Significato clinico: oltre al significato diagnostico presenta anche un valore prognostico in termini di ritrovamento di spermatozoi testicolari. Infatti, la delezione completa *AZF_a* o *AZF_b* è un fattore prognostico negativo per il recupero degli spermatozoi tramite TESE/mTESE. Le microdelezioni della regione *AZF_c* e le rarissime delezioni parziali *AZF_a* e *AZF_b* (compatibili con oligozoospermia o con la presenza di spermatozoi nel testicolo nel 50% dei casi) verranno obbligatoriamente trasmesse ai figli maschi. È da ricordare l'importanza di richiedere un'analisi di cariotipo con la ricerca di mosaicismo 46, XY/45,X0 (con numero di mitosi analizzati superiori alla routine) che conferisce un valore prognostico negativo per TESE (specialmente per le delezioni *AZF_c* terminali).

La delezione gr/gr: è un fattore di rischio per alterata spermatogenesi, confermato da 5 meta-analisi. Secondo le linee Guida EAA/EMQN, lo screening è consigliato in quelle popolazioni ove esistono dati robusti su casistiche ampie. I dati nella popolazione Italiana, aggiornati a 2017, mostrano che i portatori di tale anomalia hanno un rischio di circa 4 volte per l'oligozoospermia, anche se può essere riscontrata più raramente anche in soggetti normozoospermici. Tale anomalia viene trasmessa obbligatoriamente al figlio maschio ed è possibile una sua espansione ad una delezione completa *AZF_c* (b2/b4) nelle successive generazioni.

III. Analisi mutazionali in geni coinvolti in patologie specifiche

Assenza congenita dei vasi deferenti (CAVD): è una patologia che può interessare uno (CUAVD) o entrambi (CBAVD) i vasi deferenti ed è spesso associata ad agenesia delle vescichette seminali e a malformazioni dell'epididimo. Nella forma monolaterale possono essere presenti spermatozoi nell'eiaculato e addirittura normozoospermia se il testicolo ha una normale funzione. La CBAVD può essere sospettata dall'esame obiettivo scrotale (testicolo normotrofici, assenza dei deferenti) e dall'analisi del liquido seminale: volume <1.0 ml, pH acido (<7), assenza di spermatozoi e di cellule germinali immature nello striscio. Dato che alcune forme di CAVD sono associate ad aplasia unilaterale renale, si consiglia anche l'ecografia pelvica. La CAVD senza alterazioni renali, è considerata una forma lieve della fibrosi cistica (CF) trasmessa in modo autosomico recessivo, dovuta a mutazioni del gene *CFTR* (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator). Lo screening mutazionale consiste in due livelli: i) ricerca di mutazioni frequenti (pannello mutazionale); ii) sequenziamento dell'intero gene (quando non si identificano le due mutazioni). Data l'alta incidenza di portatori sani di mutazione nella popolazione generale (circa 1:25), prima di intraprendere una tecnica di riproduzione assistita (TESE+ICSI) occorre effettuare lo screening mutazionale anche nella partner. La partner va indagata comunque nel caso si riscontri una mutazione nel soggetto CAVD.

Ipogonadismo ipogonadotropo congenito (CHH): lo screening genetico è limitato ai pazienti a cui è stata posta diagnosi di CHH con esclusione di tutte le forme secondarie. Il test genetico considerato gold standard consiste nello screening di un pannello di geni candidati (si conoscono circa 35 geni) e dovrebbe essere effettuato pertanto mediante tecniche di *Next-Generation Sequencing* (NGS). La presenza/assenza di anosmia divide il CHH in due distinte entità cliniche (sindrome di Kallmann, forma normosmica), mentre da un punto di vista genetico non sempre è possibile fare una distinzione netta tra le due forme dal momento che lo stesso gene può essere coinvolto in entrambe (ad esempio *FGFR1*, *FGF8*, *PROKR2*). Il CHH presenta 2 caratteristiche peculiari: la prima è che non segue i classici meccanismi di ereditarietà Mendeliana e di fatto in circa il 19% dei casi si ha una condizione di digenicità/oligogenicità (presenza di mutazioni in eterozigosi in 2 o più geni candidati). La seconda è rappresentata dai casi di "reversal phenotype" (10-15%), ovvero di pazienti che possono riprendere spontaneamente la funzione dell'asse riproduttivo in seguito al trattamento sostitutivo con testosterone. La gravidanza può essere ottenuta nella maggiore parte dei soggetti in seguito

alla stimolazione gonadotropinica, pertanto è importante lo studio genetico per valutare i potenziali rischi di trasmissione (anche di eventuali anomalie non-riproduttive e non-olfattive).

Mutazioni del gene del recettore androgenico (AR): il gene AR è situato sul cromosoma X e la sua analisi nell'ambito dell'infertilità andrebbe effettuata solo in caso di azoospermia o grave oligozoospermia con sospetta lieve forma di Parziale Insensibilità agli Androgeni (PAIS). Questa condizione può essere sospettata in base al profilo ormonale specialmente se è presente un alto Indice di Sensibilità agli Androgeni (ASI) (ottenuto dal prodotto di LH x testosterone) e una ipoandrogenizzazione. La frequenza delle mutazioni in maschi infertili non selezionati varia dallo 0 al 1,7%.

Mutazioni del gene *TEX11*: questa condizione è stata riportata in due studi in soggetti affetti da azoospermia non-ostruttiva con arresto completo della spermatogenesi a livello spermatocitico. Lo screening mutazionale potrebbe essere pertanto proposto in pazienti selezionati dopo aver escluso le altre forme genetiche come per esempio la delezione della regione *AZFb*.

Teratozoospermie monomorfe: le forme complete di globozoospermia o macrocefalia spermatica sono legate a mutazioni recessive e pertanto sono più frequenti nei soggetti con genitori consanguinei. Il gene più frequentemente mutato nella **globozoospermia** è il *DPY19L2c* che oltre a poter subire mutazioni puntiformi è anche suscettibile alla delezione dell'intero gene (per motivi strutturali). Questo implica che lo status di portatore è relativamente alto nella popolazione generale (è utile l'analisi del gene nella partner prima della ICSI). Sebbene la ICSI risolva il problema della mancanza di acrosoma, il successo della tecnica risulta basso a causa di un'alterata attivazione ovocitaria e un difetto di compattazione della cromatina accompagnata da alta frammentazione del DNA spermatico. Il gene da analizzare nel caso di **macrocefalia spermatica** è l'*AURKC* (esistono degli hot-spot mutazionali che ne semplificano l'accessibilità all'esame genetico). In questa patologia non è consigliata la ICSI in quanto la mutazione di questo gene è associata ad una frequenza eccezionalmente alta di aneuploidie (tra le quali si segnalano in particolare le tetraploidie).

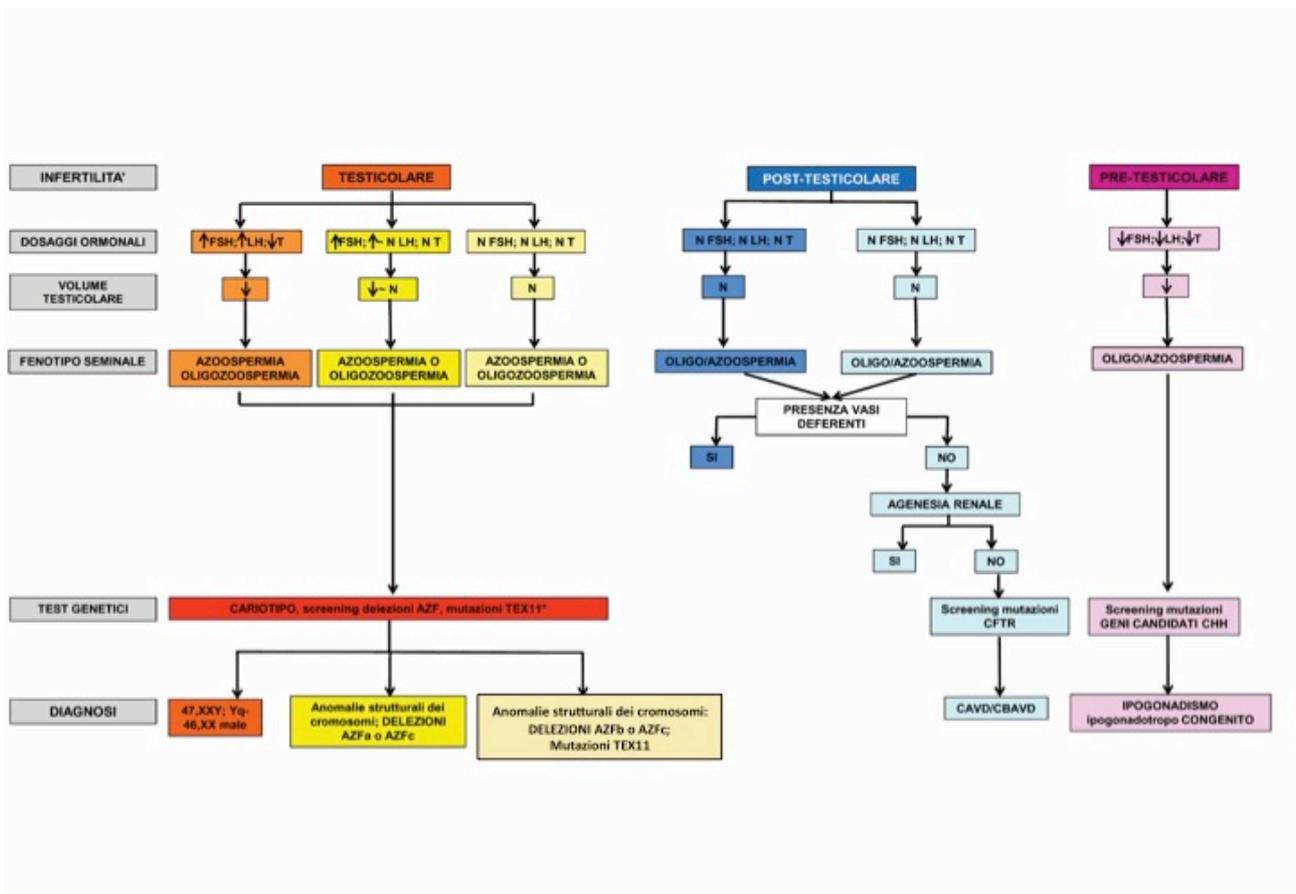
Tabella 1. Test genetici diagnostici nell'infertilità maschile con le loro indicazioni.

Test genetici	Indicazioni per l'analisi
Cariotipo	Azoo o <10 milioni spermatozoi/ml da testicolopatia primaria; aborti ricorrenti; familiarità per aborti, malformazioni, malattie cromosomiche
Screening microdelezioni del cromosoma Y (<i>AZF</i> a, <i>AZF</i> b, <i>AZF</i> c)	Azoo- o <5 milioni spermatozoi/ml da testicolopatia primaria
Screening delezione gr/gr	Oligozoospermia (< 39 milioni spermatozoi totali)
Geni candidati CHH (pannello più ampio possibile di geni)	Sindrome di Kallmann o CHH normosmico
<i>CFTR</i>	Assenza congenita di vasi deferenti (uni/bilaterale)
Recettore Androgenico (AR)	Azoo- o <5 milioni spermatozoi/ml con segni di insensibilità agli androgeni
<i>TEX11</i> *	Azoospermia idiopatica (da arresto spermatocitico)
<i>AURKC</i>	Macrocefalia spermatica
<i>DPYL2</i>	Globozoospermia

CHH: ipogonadismo ipogonadotropo congenito; *potenzialmente inseribile nella diagnostica genetica.

Figura 1: Test genetici nelle tre classi eziologiche. Nella forme “testicolari” (alterazioni primitive testicolari) i tre colori indicano tre condizioni distinte secondo il dosaggio ormonale e il volume testicolare. Per esempio, in giallo chiaro il volume testicolare normale con FSH normale sono indicative di un arresto della spermatogenesi (fase spermatocitica o spermatidica), pertanto le cause genetiche potrebbe essere: anomalie strutturali cromosomiche o delezioni AZFb o AZFc o mutazioni del gene *TEX11*.

**TEX11* lo screening per questo gene non è ancora indicato a livello routinario.



Lecture consigliate:

Boehm U, Bouloux PM, Dattani MT, de Roux N, Dodé C, Dunkel L, Dwyer AA, Giacobini P, Hardelin JP, Juul A, Maghnie M, Pitteloud N, Prevot V, Raivio T, Tena-Sempere M, Quinton R, Young J. Expert consensus document: European Consensus Statement on congenital hypogonadotropic hypogonadism-pathogenesis, diagnosis and treatment. *Nat Rev Endocrinol.* 2015 Sep;11(9):547-64.

Coutton C, Escoffier J, Martinez G, Arnoult C, Ray PF. Teratozoospermia: spotlight on the main genetic actors in the human. *Hum Reprod Update.* 2015 Jul-Aug;21(4):455-85

Jungwirth A, Giwercman A, Tournaye H, Diemer T, Kopa Z, Dohle G, Krausz C; European Association of Urology Working Group on Male Infertility. European Association of Urology guidelines on Male Infertility: the 2012 update. *Eur Urol.* 2012 Aug;62(2):324-32.

Krausz C, Hoefsloot L, Simoni M, Tüttelmann F; European Academy of Andrology; European Molecular Genetics Quality Network. EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions: state-of-the-art 2013. *Andrology* 2014; 2: 5-19.

Tournaye H, Krausz C, Oates RD. Novel concepts in the aetiology of male reproductive impairment. *Lancet DiabetesEndocrinol.* 2016 Jul 6. pii:S2213-8587(16)30040-7.

Autore: Csilla Krausz (Firenze)

Commissione Linee Guida SIAMS : Elisa Giannetta (Roma) , Sandro La Vignera (Catania), Sara Marchiani (Firenze), Pier Francesco Palego (Padova).