



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
FIRENZE

DOTTORATO DI RICERCA IN  
Scienze biomediche

XXX ciclo

COORDINATORE Prof. Persio Dello Sbarba

**Tumore testicolare: dai fattori di rischio  
agli effetti della terapia sull'integrità  
genomica spermatica**

Settore Scientifico Disciplinare MED/13

**Dottorando**

Dott.ssa Elena Casamonti

*Elena Casamonti*

(firma)

**Tutore**

Prof.ssa Csilla Krausz

*Csilla Krausz*

(firma)

**Coordinatore**

Prof. Persio Dello Sbarba

(firma)

Anni 2014/2017



# INDICE

SOMMARIO .....	5
<b>1. INTRODUZIONE .....</b>	<b>9</b>
<b>1.I. NEOPLASIE DEL TESTICOLO .....</b>	<b>9</b>
1.I.1. Epidemiologia e classificazione.....	9
1.I.2. Clinica e Diagnosi .....	11
1.I.3. Stadiazione clinica .....	11
1.I.4. Trattamento della malattia .....	12
1.I.4.1. <i>TTCG seminomatosi</i> .....	12
1.I.4.2. <i>TTCG non-seminomatosi</i> .....	14
<b>1.II. NEOPLASIE DEL TESTICOLO: FATTORI DI RISCHIO .....</b>	<b>15</b>
<b>1.III. CROMOSOMA Y E LA SUA RELAZIONE CON TTCG .....</b>	<b>20</b>
1.III.1. Struttura.....	20
1.III.1.1. <i>Regione AZFc</i> .....	22
1.III.2. CNVs del cromosoma Y.....	25
1.III.2.1. <i>Definizione</i> .....	25
1.III.2.2. <i>Meccanismo responsabile della formazione di CNVs</i> .....	26
1.III.3. Classificazione e significato clinico delle CNVs sulla regione AZFc.....	28
1.III.3.1. <i>Delezione completa AZFc</i> .....	28
1.III.3.2. <i>Delezioni parziali</i> .....	29
1.III.3.3. <i>Duplicazioni parziali</i> .....	31
<b>1.IV. TOSSICITÀ GONADICA SECONDARIA ALLA TERAPIA ANTIPROLIFERATIVA NEI PAZIENTI CON TUMORE TESTICOLARE .....</b>	<b>32</b>
1.IV.1. Effetti della terapia antiproliferativa sui parametri seminali.....	34
1.IV.2. Effetti della terapia antiproliferativa sull'integrità genomica degli spermatozoi.....	37
1.IV.2.1. <i>Qualità del DNA spermatico pre-trattamento</i> .....	38
1.IV.2.2. <i>Qualità del DNA spermatico post-trattamento</i> .....	39
1.IV.3. Effetti della terapia antiproliferativa sull'instabilità genomica degli spermatozoi.....	39
1.IV.4. Effetti della terapia antiproliferativa sull'epigenoma degli spermatozoi.....	41
<b>2. SCOPO DELLA TESI .....</b>	<b>45</b>

<b>3. MATERIALI E METODI .....</b>	<b>47</b>
<b>3.I. SCOPO 1: RIARRANGIAMENTI AZFc COME FATTORI DI RISCHIO DEI TTCG .....</b>	<b>47</b>
3.I.1. Descrizione della popolazione di studio.....	47
3.I.2. Estrazione del DNA da sangue periferico .....	47
3.I.3. Valutazione quantitativa e qualitativa del DNA estratto .....	49
3.I.4. Ricerca dei riarrangiamenti della regione AZFc sul cromosoma Y.....	49
3.I.4.1. PCR per lo screening delle delezioni complete e parziali.....	49
3.I.4.2. Dosaggio genico di CDY1 e DAZ .....	51
3.I.4.3. Identificazione del tipo di copie geniche di CDY1 e DAZ rimanenti dopo delezione parziale della regione AZFc.....	53
3.I.5. Analisi statistica .....	54
<b>3.II. SCOPO 2: EFFETTI DEL TRATTAMENTO CITOTOSSICO SULLA RIPRESA DELLA SPERMATOGENESI IN PAZIENTI ONCOLOGICI E SUL GENOMA/EPIGENOMA SPERMATICO DI PAZIENTI AFFETTI DA TUMORE TESTICOLARE.....</b>	<b>54</b>
3.II.1. Descrizione della popolazione di studio .....	54
3.II.1.1. Popolazione di studio per l'analisi della ripresa della spermatogenesi .....	54
3.II.1.2. Popolazione di studio per l'analisi del genoma spermatico .....	55
3.II.1.3. Popolazione di studio per l'analisi dell'epigenoma del DNA spermatico .....	55
3.II.2. Analisi della ripresa della spermatogenesi.....	55
3.II.2.1 Spermioγραμμα .....	55
3.II.3. Analisi dell'integrità del genoma spermatico .....	57
3.II.4. Analisi dell'instabilità del genoma spermatico .....	59
3.II.4.1. Estrazione del DNA da sangue e da liquido seminale e sua valutazione quantitativa e qualitativa .....	59
3.II.4.2. PCR per l'amplificazione della regione con il microsatellite .....	59
3.II.4.3. Analisi elettroforetica.....	61
3.II.5. Analisi dell'epigenoma spermatico.....	62
3.II.5.1 Protocolli di separazione nemaspermica .....	62
3.II.5.2 Micro-array.....	63
3.II.6. Analisi statistica.....	67
3.II.6.1. Analisi dei risultati relativi a parametri seminali e frammentazione del DNA spermatico.....	67
3.II.6.2. Analisi dei risultati relativi alla metilazione del DNA degli spermatozoi.....	68
<b>4. RISULTATI .....</b>	<b>71</b>
<b>4.I. SCOPO 1: RIARRANGIAMENTI AZFc COME FATTORI DI RISCHIO DEI TTCG .....</b>	<b>71</b>
4.I.1. Descrizione della popolazione di studio.....	71
4.I.2. Riarrangiamenti AZFc: studio caso/controllo .....	72
4.I.2.1. Confronto della frequenza delle delezioni parziali AZFc tra casi versus controlli.....	72
4.I.2.2. Confronto della frequenza delle duplicazioni parziali AZFc tra casi versus controlli.....	73
4.I.2.3. Confronto delle frequenze dei riarrangiamenti AZFc tra casi versus controlli selezionati sulla base del fenotipo seminale.....	73
4.I.2.4. Confronto delle frequenze dei riarrangiamenti AZFc tra casi selezionati sulla base dell'istologia tumorale versus controlli selezionati sulla base del fenotipo seminale.....	75
<b>4.II. SCOPO 2: EFFETTI DEL TRATTAMENTO CITOTOSSICO SULLA RIPRESA DELLA SPERMATOGENESI IN PAZIENTI ONCOLOGICI E SUL GENOMA/EPIGENOMA SPERMATICO DI PAZIENTI AFFETTI DA TUMORE TESTICOLARE.....</b>	<b>79</b>
4.II.1. Effetti della terapia sulla spermatogenesi di pazienti oncologici.....	79
4.II.1.1 Presentazione generale dei dati .....	79
4.II.1.2. Caratterizzazione pre-terapia della casistica.....	79
4.II.1.3. Follow-up.....	81
4.II.1.4. Identificazione di eventuali fattori correlati a mancato recupero della spermatogenesi post-terapia citostatica.....	84

4.II.2. Effetti della terapia sull'integrità del genoma spermatico di pazienti con tumore testicolare.....	87
4.II.2.1. <i>Studio cross-sectional</i> .....	87
4.II.2.2. <i>Studio longitudinale</i> .....	90
4.II.3. Effetti della terapia sull'instabilità del genoma spermatico di pazienti con tumore testicolare.....	92
4.II.3.1. <i>Presentazione generale dei dati e analisi di instabilità dei microsatelliti (MSI)</i> .....	92
4.II.4. Effetti della terapia sull'epigenoma spermatico di pazienti con tumore testicolare .....	92
4.II.4.1. <i>Presentazione generale dei dati</i> .....	92
4.II.4.2. <i>Analisi del profilo di metilazione del DNA spermatico in pazienti affetti da tumore testicolare in base alla tipologia di trattamento citotossico</i> .....	94
4.II.4.3. <i>Analisi del profilo di metilazione del DNA spermatico in pazienti affetti da tumori ematologici trattati con ABVD in combinazione con radioterapia</i> .....	100
4.II.4.4. <i>Analisi del profilo di metilazione a distanza di sei mesi dalla fine di ciascun tipo di terapia</i> ..	107
<b>5. DISCUSSIONE .....</b>	<b>115</b>
<b>5.I. SCOPO 1: RIARRANGIAMENTI AZFC COME FATTORI DI RISCHIO DEI TTCG .....</b>	<b>115</b>
<b>5.II. SCOPO 2: EFFETTI DEL TRATTAMENTO CITOTOSSICO SULLA RIPRESA DELLA SPERMATOGENESI IN PAZIENTI ONCOLOGICI E SUL GENOMA/EPIGENOMA SPERMATICO DI PAZIENTI AFFETTI DA TUMORE TESTICOLARE.....</b>	<b>120</b>
<b>6. CONCLUSIONI .....</b>	<b>131</b>
<b>6.I. SCOPO 1: RIARRANGIAMENTI AZFC COME FATTORI DI RISCHIO DEI TTCG .....</b>	<b>131</b>
<b>6.II. SCOPO 2: EFFETTI DEL TRATTAMENTO CITOTOSSICO SULLA RIPRESA DELLA SPERMATOGENESI IN PAZIENTI ONCOLOGICI E SUL GENOMA/EPIGENOMA SPERMATICO DI PAZIENTI AFFETTI DA TUMORE TESTICOLARE.....</b>	<b>132</b>
<b>7. APPENDICE .....</b>	<b>135</b>
<b>8. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>137</b>
<b>ANNESI.....</b>	<b>149</b>



# SOMMARIO

L'argomento della mia tesi verte sui tumori testicolari a cellule germinali (TTCG) ed ha come scopi principali la valutazione: i) del ruolo dei riarrangiamenti AZFc del cromosoma Y come fattore di rischio per lo sviluppo di tale patologia; ii) degli effetti del trattamento citotossico sulla ripresa della spermatogenesi e sul genoma/epigenoma spermatico.

Iscopo: il TTCG ha come precursore più probabile una lesione primaria maligna pre-invasiva che originerebbe da gonociti fetali sfuggiti al normale processo di maturazione. Varie evidenze in letteratura, quali differente incidenza dei TTCG in funzione del *background* genetico (etnia) e maggior rischio di svilupparli per i parenti di pazienti affetti, suggeriscono una forte componente genetica nella suscettibilità allo sviluppo dei TTCG. Sono stati identificati una serie di fattori di rischio genetici tra essi la delezione gr/gr della regione AZFc. Nel nostro studio, 400 pazienti con TTCG e 1335 controlli sono stati sottoposti ad un'analisi approfondita del cromosoma Y, basata su 3 steps (PCR *plus/minus*, *Quantitative Fluorescent* PCR, RFLP). In *primis*, abbiamo confermato la delezione gr/gr come fattore di rischio per TTCG, dimostrando che tale ruolo è indipendente da quello ormai convalidato di fattore di suscettibilità per l'alterata spermatogenesi. Tale delezione parziale influenzerebbe la suscettibilità allo sviluppo di TTCG anche in presenza di normozoospermia conferendone un aumentato rischio di circa 4 volte ( $p < 0.01$ , 95% CI 1.3-11.3). Successivamente, anche l'analisi di ulteriori riarrangiamenti AZFc, per la prima volta in letteratura, ha fornito informazioni rilevanti soprattutto per le duplicazioni parziali. Relativamente a queste ultime, infatti, i nostri risultati mostrano associazione con TTCG in alcuni sottogruppi di casi e controlli, suggerendo che una variazione del dosaggio genico anche in eccesso potrebbe essere coinvolto nell'eziopatogenesi del TTCG. Resta da capire se l'eziopatogenesi di questa associazione sia la conseguenza di una instabilità genomica generalizzata oppure sia il risultato di un effetto diretto dei riarrangiamenti sullo sviluppo dei TTCG. In quest'ultimo caso, essi sarebbero responsabili di variazioni nel numero di copie di geni-dosaggio sensibili con conseguente effetto

negativo sulla loro funzione biologica. Poiché tali geni, soprattutto *DAZ*, hanno un ruolo centrale nella maturazione dei gonociti fetali, alterazioni di tale funzione darebbero origine a gonociti anomali che successivamente ad ulteriori insulti, potrebbero generare la lesione primaria e poi, eventualmente, il TTTCG.

Il scopo: il TTTCG è tra le neoplasie maligne più comuni tra i giovani uomini Caucasiche in età riproduttiva (tra i 15 e i 40 anni). Poiché la relativamente bassa gonado-tossicità dei moderni protocolli terapeutici permette un rapido recupero della spermatogenesi (già dopo 2 anni per il 70-80%), una delle principali preoccupazioni è relativa alla genotossicità spermatica e di conseguenza allo stato di salute del futuro figlio. Infatti, il recupero quantitativo della spermatogenesi non esclude la presenza di danni sul genoma spermatico con potenziali ripercussioni sulla progenie. A causa di pochi studi oltretutto inconcludenti e con un *follow-up* limitato (2 anni), rimane ancora oggi la necessità di stabilire i danni genomici ed epigenomici a lungo termine. A tale scopo, la seconda parte dello studio ha come obiettivi specifici: i) valutare il recupero della spermatogenesi di pazienti con TTTCG *versus* pazienti con neoplasie ematologiche (NE) dopo terapia citotossica; ii) determinare gli effetti della suddetta terapia sulla qualità del genoma/epigenoma spermatico. Per il primo punto, sono stati studiati i parametri seminali dopo 1 (T<sub>1</sub>) o 2 (T<sub>2</sub>) o 3 (T<sub>3</sub>) anni dalla fine della terapia per 403 pazienti con TTTCG e 322 con NE. Per il secondo punto, sono stati condotti due disegni di studio, uno *cross-sectional* e uno longitudinale. Lo studio *cross-sectional* ha previsto, per 97 pazienti con TTTCG, l'analisi di: i) integrità genomica (Tunel-*assay*) come indice di frammentazione del DNA spermatico (SDF) a più tempi di *follow-up* (T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub> e/o T<sub>3</sub>) confrontata con quella relativa a 58 controlli; ii) instabilità genomica confrontando il numero di ripetizioni di 7 microsatelliti tra sangue e liquido seminale. Lo studio longitudinale consisteva nella valutazione di: i) SDF per 12 pazienti con TTTCG per i quali erano disponibili i dati al T<sub>0</sub> e ad almeno un tempo di *follow-up* (T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub> e/o T<sub>3</sub>); ii) profilo di metilazione del DNA spermatico relativo a 480,000 siti CpGs (*Infinium Human Methylation Bead Chip 450K*) per 9 pazienti (5 con TTTCG e 4 con NE) con i dati al T<sub>0</sub> e al T<sub>1/2</sub> e/o al T<sub>1</sub>. I nostri risultati confermano come il problema della ripresa quantitativa della spermatogenesi dopo trattamento citotossico assuma proporzioni marginali. Relativamente all'instabilità genomica e al profilo di metilazione del DNA, non abbiamo evidenziato un effetto drastico del trattamento. E' plausibile che eventuali mutazioni/epimutazioni non avvengano nella maggior parte delle cellule staminali che ripopoleranno i tubuli seminiferi, pertanto sarebbero necessarie delle metodiche altamente sensibili capaci di individuare mosaicismi somatici. Il dato clinicamente più rilevante ottenuto in questa parte della tesi riguarda la frammentazione del DNA spermatico. I nostri risultati, infatti, rilevano che un'alta incidenza di pazienti con valori di SDF patologici permangono anche dopo 3 anni dalla fine del trattamento (prevalentemente pazienti sottoposti alle terapie più aggressive).

In conclusione, questo lavoro di tesi fornisce informazioni aggiuntive in merito ai TTTCG con possibili applicazioni nella pratica clinica. La conferma del ruolo della delezione *gr/gr* nella



suscettibilità allo sviluppo di tale patologia, ha permesso di individuare una categoria di pazienti per i quali sarebbe consigliato un *follow-up* con cadenza periodica. Inoltre, stimola ulteriore ricerca per quanto concerne le duplicazioni parziali AZFc che secondo il nostro lavoro conferiscono un rischio significativo nei soggetti con alterata spermatogenesi. Per tutti coloro che hanno sviluppato TTCG e sono stati trattati, proponiamo l'utilizzo dell'SDF come biomarcatore di danno al DNA spermatico indotto da trattamento citotossico. A tale proposito, è opportuno rivalutare il tempo di attesa oltre il limite temporale di 2 anni che viene attualmente consigliato al paziente oncologico per la ricerca di una gravidanza spontanea. L'introduzione nella pratica clinica di tale biomarcatore permetterebbe, quindi, di monitorare il danno genomico, in modo tale da poter fornire informazioni personalizzate ai pazienti oncologici riguardo la tempistica più appropriata per la ricerca di un concepimento naturale.



# 1. INTRODUZIONE

## 1.I. NEOPLASIE DEL TESTICOLO

### 1.I.1. Epidemiologia e classificazione

Il tumore del testicolo rappresenta circa l'1% di tutte le neoplasie del maschio ed il 5% di quelle del tratto uro-genitale; tuttavia questa patologia costituisce la neoplasia maligna più frequente (11% di tutti i tumori maligni in Italia) negli uomini di età compresa tra i 15 e 40 anni (Parkin et al. 2002; Rosti et al. 2016).

E' stato registrato, negli ultimi 30 anni, un incremento dell'incidenza di questi tumori, con una frequenza di 3-6 nuovi casi all'anno per 100,000 maschi nei paesi Occidentali (Huyghe et al. 2003; Rosti et al. 2016). In Italia, nel 2016, si sono riscontrati circa 2,300 nuovi casi (fonte: Registro tumori AIOM/AIRTUM 2016).

In accordo alle ultime linee guida redatte dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (Moch et al. 2016), i tumori testicolari sono suddivisibili sulla base istologica in sei categorie (Tabella 1).

---

<b>A.</b>	<b>Tumori a cellule germinali derivati da neoplasia a cellule germinali <i>in situ</i></b>
<b>B.</b>	<b>Tumori a cellule germinali non derivati da neoplasia a cellule germinali <i>in situ</i></b>
C.	Tumori non germinali
D.	Tumori sia a cellule germinali sia ad elementi stromali
E.	Tumori del testicolo misti
F.	Tumori del dotto collettore e della rete testicolare

---

**Tabella 1 - Classificazione WHO delle neoplasie del testicolo su base istologica.**

I tumori testicolari a cellule germinali (TTCCG), così chiamati perché derivanti dall'epitelio germinale dei tubuli seminiferi, rappresentano la maggioranza dei tumori del testicolo, circa il 95% (Rosti et al. 2016; Bonadonna et al. 2007). Con la nuova classificazione essi sono stati suddivisi in due diversi

gruppi a seconda se originano o no da una neoplasia a cellule germinali *in situ* (A e B rispettivamente, Tabella 1). Quest'ultima costituisce una lesione primaria maligna pre-invasiva delle cellule germinali a livello del tubulo seminifero, descritta per la prima volta nel 1972 da Skakkebaek (Skakkebaek 1972). Essa è considerata il precursore di questa forma di tumore e prende probabilmente origine da gonociti fetali "sfuggiti" al normale processo di maturazione (Skakkebaek 1972; Oosterhuis et al. 2005). Fattori ambientali e genetici sarebbero responsabili di un'alterazione della funzione delle cellule di Sertoli e di Leydig determinando una stimolazione insufficiente del gonocita per un adeguato sviluppo delle cellule germinali. Questo causerebbe quindi un arresto della differenziazione delle cellule germinali primordiali allo stadio di gonocita fetale. Tali gonociti fetali alterati rappresenterebbero quindi la lesione primaria che originerebbe prima della nascita, per rimanere quiescente durante l'infanzia e diventare TTCCG durante il periodo post-puberale (Rajpert-De Meyts et al. 2003). L'ipotesi dell'origine fetale, e quindi non adulta, della neoplasia a cellule germinali *in situ*, è oggi supportata da diversi studi che mostrano similarità di struttura (Kanetsky et al. 2009), del profilo di espressione di geni come c-KIT, OCT4, AP-2 $\gamma$ , NANOG e LIN28 (Almstrup et al. 2004; Rajpert-De Meyts 2006; Rajpert-De Meyts et al. 2015), dell'attività telomerasica (Albanell et al. 2009) e del *pattern* di *imprinting* genomico (van Gurp et al. 1994), tra le cellule che vanno a costituire i TTCCG e i gonociti fetali.

In precedenza, ci si riferiva a tale lesione primaria con i termini di Carcinoma *In Situ* (CIS) o di Neoplasia Intratubulare delle Cellule Germinali Non Classificata (ITGCNU), con una predilezione

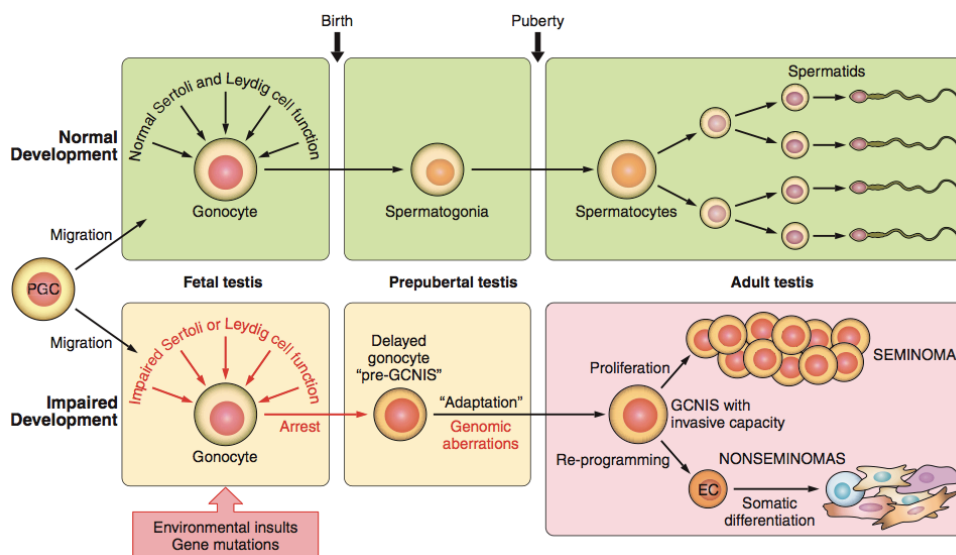


Figura 1 - Modello per la patogenesi dei tumori testicolari a cellule germinali derivati da GCNIS. L'inadeguata stimolazione, da parte delle cellule di Sertoli e di Leydig, dei gonociti ne determina un arresto maturativo e quindi l'incapacità di proseguire nella spermatogenesi. Tali cellule trasformate (GCNIS) rimarranno in uno stato quiescente per tutta la fase pre-puberale, fino al momento in cui l'acquisizione di alterazioni genomiche secondarie ne aumenterà la capacità proliferativa e invasiva determinando così lo sviluppo di un TTCCG seminomatoso o non-seminomatoso (Figura di Skakkebaek et al. 2016). PGC= cellula germinale primordiale; EC= carcinoma embrionale.

nell'uso di uno e dell'altro, rispettivamente, in Europa e in America del Nord (Moch et al. 2016). Poiché l'uso di due differenti nomi per indicare la medesima lesione ha portato spesso confusione nel mondo scientifico, essi sono stati sostituiti dall'Organizzazione Mondiale della Sanità, nel 2016, con il termine GCNIS.

Il gruppo di tumori a cellule germinali derivanti da GCNIS, subisce a sua volta una classificazione sulla base dell'istologia (Bonadonna et al. 2007; Moch et al. 2016; Oosterhuis et al. 2005). La neoplasia a cellule germinali *in situ* non regredisce spontaneamente, bensì evolve verso la forma invasiva seminomatosa o non-seminomatosa (Figura 1). Questo, nel 50% dei casi, si verifica nell'arco di 5 anni e nel 70% dei casi nell'arco di 7 anni (Bonadonna et al. 2007; Oosterhuis et al. 2005). Il Seminoma è il tipo più frequente tra questi tumori (circa il 60%) e consiste in cellule germinali maligne che mantengono un fenotipo simile a quelle del GCNIS. Il Non-seminoma è, invece, caratterizzato da un'istologia estremamente eterogenea. Esso, infatti, si presenta come un mix di più componenti quali carcinoma embrionale, teratoma, coriocarcinoma e tumore del sacco vitellino. Raramente, tali componenti si ritrovano come forme pure.

### **1.I.2. Clinica e Diagnosi**

La sintomatologia con cui si presenta il tumore testicolare è rappresentata, nel 75-90% dei casi, da una tumefazione non dolente a livello gonadico. I pazienti possono accusare senso di peso al testicolo e raramente modificazione della normale sensibilità. In una minoranza di casi (10%) è presente dolore testicolare acuto. In circa il 10% dei pazienti compaiono manifestazioni sistemiche legate alla presenza di metastasi: dolore lombare (metastasi a linfonodi retro peritoneali), tosse, dispnea (metastasi polmonari), manifestazioni a carico del sistema nervoso centrale o periferico (metastasi al sistema nervoso) ed edemi agli arti inferiori (ostruzione o trombosi della vena cava o dell'iliaca). La ginecomastia è un evento che si presenta nel 5% dei pazienti con tumore testicolare dovuto alla produzione da parte del tumore di  $\beta$ -Gonadotropina Corionica Umana ( $\beta$ HCG) che altera il rapporto tra estrogeni ed androgeni (Bonadonna et al. 2007).

La diagnosi di tumore del testicolo si basa sull'anamnesi, l'esame clinico, il dosaggio dei marcatori tumorali come  $\beta$ HCG,  $\alpha$ -feto proteina (AFP) ed LDH, e successivamente su esami strumentali, come l'approfondimento ecografico. La rilevazione dell'istotipo sarà eseguita dopo orchietomia/orchifunicolectomia tramite esame istologico della lesione neoplastica (Bonadonna et al. 2007).

### **1.I.3. Stadiazione clinica**

Lo stadio clinico, utilizzato per indirizzare le prime scelte terapeutiche, integra le informazioni dell'esame clinico con quelle provenienti da: esami radiologici (tomografia assiale computerizzata, TAC o risonanza magnetica, RMN), esami di medicina nucleare (PET-FDG) e analisi istologica del

prelievo bioptico (Bonadonna et al. 2007). Per determinare la stadiazione dei tumori del testicolo è necessario quindi seguire: una TAC toraco-addomino-pelvica con mezzi di contrasto e dosaggio ematico dei marcatori tumorali ( $\beta$ HCG, AFP, LDH) sia prima dell'intervento chirurgico di orchifunicolectomia che nel tempo per seguirne l'andamento (Bianco 1999).

Ad oggi, non esiste ancora una classificazione universalmente accettata dello stadio clinico dei TTCCG; le più seguite sono quelle dell'Istituto Nazionale per lo studio e la cura dei Tumori di Milano, del Royal Mardsen Hospital e dell'American Joint Committee on Cancer (Bonadonna et al. 2007). Da quest'ultimo ne deriva la classificazione TNM che si basa su: istologia, marcatori tumorali, sede primitiva e secondaria, includendo anche i TTCCG primitivi extragonadici (Rosti et al. 2016) (Tabella 2).

<b>Stadio I</b>	Nessuna evidenza clinica, radiologica o biomorale di malattia al di fuori del testicolo dopo orchietomia radicale. Sono inclusi pazienti con tumore testicolare senza evidenza clinica e radiologica di malattia al di fuori del testicolo, ma con persistenza di marcatori tumorali elevati (AFP e/o $\beta$ HCG) dopo intervento radicale di orchietomia (nel Seminoma puro deve essere valutata solo la $\beta$ -HCG).
<b>Stadio IIA</b>	Evidenza radiologica di linfonodi retroperitoneali e/o pelvici con diametro trasverso massimo inferiore a 2 cm.
<b>Stadio IIB</b>	Evidenza radiologica di linfonodi retroperitoneali e/o pelvici con diametro trasverso massimo compreso tra 2 e 5 cm.
<b>Stadio IIC/III</b>	È definito dalla presenza di sole metastasi linfonodali retroperitoneali e/o pelviche con diametro trasverso massimo superiore a 5 cm. Nei pazienti con malattia metastatica nella pratica clinica è usata la classificazione dell'IGCCCG ( <i>International Germ Cell Cancer Cooperative Group</i> ).

**Tabella 2 - Classificazione TNM dello stadio clinico dei TTCCG.**

#### **1.1.4. Trattamento della malattia**

Il tumore testicolare a cellule germinali è una condizione patologica caratterizzata da un tasso di guarigione molto alto. La chiave del successo del trattamento dipende sia dal corretto uso dei mezzi diagnostici, sia dall'integrazione dei diversi mezzi terapeutici a disposizione: chemioterapia, chirurgia e radioterapia (Rosti et al. 2016). Le possibilità terapeutiche variano in base all'istologia, alla stadiazione della malattia e ai fattori prognostici. La descrizione dei diversi approcci di trattamento saranno di seguito riportati per TTCCG seminomatosi e non-seminomatosi in funzione a dei livelli di stadiazione specifici.

##### **1.1.4.1. TTCCG seminomatosi**

**Stadio I:** la malattia è limitata al testicolo. La prognosi è ottima, con tasso di sopravvivenza vicino al 100%. Nella scelta terapeutica, i vantaggi e gli svantaggi degli approcci utilizzabili devono essere discussi con ogni paziente, considerando l'accessibilità al centro per il trattamento, la possibilità di avere un'adeguata strategia di *follow-up*, senza dimenticare gli aspetti psicologici correlati. Le opzioni

terapeutiche a disposizione successive all'orchietomia sono rappresentate da: radioterapia, sorveglianza attiva e chemioterapia (Rosti et al. 2016).

**Radioterapia:** la radioterapia adiuvante-precauzionale sulle stazioni linfonodali para-aortiche (PA) ed iliache omolaterali (DL) è stata la terapia standard negli ultimi 60 anni. Con questa tecnica il rischio di ripresa di malattia è dell'1-3% e il tasso di sopravvivenza globale è del 99-100%. Questo trattamento è tuttavia associato a tossicità gonadica e al rischio di sviluppare neoplasie secondarie non germinali. Grazie alla notevole evoluzione che ha coinvolto le tecniche di radioterapia negli ultimi 20 anni, tale da ridurre la dose totale e i volumi di irradiazione, è possibile sperare, in futuro, in una netta diminuzione della tossicità tardiva.

**Sorveglianza attiva:** la sola orchietomia, seguita da attenta sorveglianza ed eventuale trattamento alla ripresa della malattia, può costituire una valida alternativa alla radioterapia precauzionale, poiché solo il 15-20% dei pazienti presenta delle metastasi subcliniche, generalmente localizzate a livello retroperitoneale. Un approccio clinico di sola osservazione, ci permette di evitare un sovra-trattamento nell'80% dei casi. Tuttavia è necessario un *follow-up* molto lungo, impegnativo per il paziente e dal costo non contenuto.

**Chemioterapia:** l'impiego della chemioterapia, in genere 1 ciclo di Carboplatino, come alternativa alle prime due opzioni va considerato solo in casi particolari in cui si presentano fattori di rischio di recidiva (tumore > 4cm, invasione della rete-testis).

**Stadio IIA:** il trattamento standard del Seminoma in stadio IIA è la radioterapia (20Gy sulle stazioni linfonodali delle stazioni para-aortiche ed iliache omolaterali). Essa determina una sopravvivenza libera da malattia a 6 anni pari al 95% ed una sopravvivenza globale vicina al 100% (Classen et al. 2003).

**Stadio IIB:** anche in tale caso la terapia standard è rappresentata dalla radioterapia (30Gy sulle iliache omolaterali con *boost* fino a 36-38Gy) la quale determina un tasso di sopravvivenza libero da malattia a 6 anni dell'89% (Chung et al. 2004). Soprattutto nei pazienti con pacchetti linfonodali patologici localizzati in vicinanza del rene, una valida alternativa al suddetto trattamento è rappresentata da 3 cicli di Cisplatino, Etoposide e Bleomicina (PEB) o 4 cicli di Cisplatino e Etoposide (PE). Il protocollo chemioterapico potrebbe però essere responsabile di una peggiore tossicità acuta rispetto a quella indotta da radioterapia (Garcia del Muro et al. 2008).

**Stadio IIC/III:** tutti i pazienti con malattia metastatica possono essere classificati in base ai criteri dell'IGCCCG (International Germ Cell Cancer Cooperative Group) basati su istologia, marcatori tumorali, sede primitiva e secondaria/e includendo anche i tumori a cellule germinali primitivi extragonadici. Tali fattori prognostici permettono di individuare due categorie IGCCCG per il Seminoma: prognosi "buona" o "intermedia". La chemioterapia rappresenta il trattamento di scelta per la malattia avanzata a causa dell'elevato rischio di ricaduta (20-30%) dopo la sola applicazione della radioterapia. Nello specifico, con prognosi "buona" o "intermedia" la terapia standard consiste, rispettivamente, in 3 o 4 cicli di PEB. Il numero di cicli di chemioterapia è sempre stabilito

prima dell'inizio della stessa (esclusi aggiustamenti di dose per tossicità), ma in ogni caso non sono mai giustificati più di 4 cicli. È opportuno precisare che nei casi in cui la bleomicina fosse controindicata, è possibile rimuoverla dal protocollo (4 cicli di PE) nel caso di prognosi "buona". In presenza di prognosi "intermedia", essa è sostituita da ifosfamide (4 cicli di PEI). È da tenere presente che quest'ultimo protocollo di trattamento, pur mantenendo la medesima efficacia della terapia standard (4 cicli di PEB), ha una maggiore tossicità, tanto da indurre sterilità definitiva. Per tali pazienti, assume ulteriormente importanza la necessità di crioconservare il proprio liquido seminale. Successivamente al trattamento chemioterapico, le masse residue saranno esportate chirurgicamente.

#### **1.I.4.2. TTCC non-seminomatosi**

**Stadio I:** la prognosi è eccellente con una sopravvivenza globale di circa il 99%. In questi casi la tollerabilità e gli effetti collaterali delle terapie sono i principali argomenti d'interesse. L'identificazione di fattori prognostici ha permesso di sviluppare trattamenti selettivi in accordo con le classi di rischio: la sorveglianza è la principale scelta nei pazienti a basso rischio di sviluppare metastasi, mentre la chirurgia e la chemioterapia sono prese in considerazione nei pazienti per i quali tale rischio è considerato alto. Uno dei principali fattori predittivi di malattia metastatica occulta è la presenza di invasione vascolare (sia linfatica che venosa) (Bonadonna et al. 2007).

Stadio I a basso rischio (assenza invasione vascolare): la sorveglianza attiva è considerata la scelta di riferimento. Con tale approccio circa l'85% dei pazienti non richiede un ulteriore trattamento dopo l'orchietomia. Se un paziente in sorveglianza ricade, la chemioterapia ha un tasso di guarigione che tende al 100%. In alternativa, può essere suggerita chemioterapia adiuvante con PEB per 1 ciclo (Tandstad et al. 2009) mentre la linfadenectomia retroperitoneale (RPLND) è un'alternativa da considerare in casi selezionati in centri con elevata esperienza.

Stadio I ad alto rischio (presenza d'invasione vascolare): la chemioterapia adiuvante con uno o due cicli di PEB o la RPLND, in casi selezionati in centri con elevata esperienza, dovrebbero essere considerate come scelte di riferimento. La sorveglianza ne rappresenta un'alternativa. Nel caso della chemioterapia è atteso un 2-3% di ricadute, nel caso della chirurgia le metastasi linfonodali sono attese nel 35% dei casi e un ulteriore 15% può manifestare metastasi a distanza (oltre la regione addominale) al *follow-up*.

**Stadio IIA/IIB:** la prognosi è molto buona con una guarigione attesa del 98% (Rosti et al. 2016).

Stadio IIA con marcatori negativi: due sono le possibili opzioni terapeutiche: i) RPLND e ii) rivalutazione a breve termine. i) Quando il paziente (10-40% dei casi) mostra linfonodi negativi alla chirurgia (RPLND), è consigliato evitare qualsiasi altra terapia; in presenza invece di adenopatia retroperitoneale si suggerisce la somministrazione di 2 cicli di chemioterapia adiuvante. ii) Poiché può non essere sempre possibile individuare metastasi, è stato raccomandato un periodo di 6 settimane di attesa prima di ripetere la stadiazione (rivalutazione a breve termine). Nel caso di



positivizzazione dei marcatori o di aumento volumetrico dei linfonodi, deve essere intrapresa una terapia sistemica; in caso contrario, i pazienti possono essere assimilati a quelli dello stadio clinico I. Stadio IIA con marcatori positivi e stadio IIB: questi pazienti dopo l'orchietomia sono candidati a 3 o 4 cicli di PEB, al termine del quale, è eseguita una ri-stadiazione completa con dosaggio di AFP,  $\beta$ HCG e LDH e con TAC del torace e dell'addome (Rosti et al. 2016). Nei rari casi in cui i marcatori rimangono elevati, deve essere somministrato una chemioterapia di salvataggio. Nei pazienti con massa residua e marcatori normalizzati è obbligatoria l'asportazione chirurgica con RPLND.

**Stadio IIC/III:** i criteri dell'IGCCCG permettono di individuare tre categorie per il Non-seminoma metastatico quali prognosi "buona", "intermedia" o "sfavorevole". Anche in tale caso, così come per il Seminoma di stadio IIC/III, il trattamento di scelta è rappresentato dalla chemioterapia. In caso di prognosi "buona" la terapia prevede 3 cicli di PEB o 4 di PE. Con prognosi "intermedia" o "sfavorevole" il trattamento consiste di 4 cicli PEB o 4 cicli di PEI. La rimozione chirurgica delle masse residue sarà applicata successivamente al trattamento chemioterapico.

## 1.II. NEOPLASIE DEL TESTICOLO: FATTORI DI RISCHIO

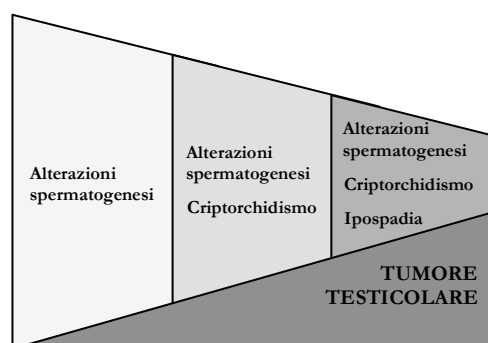
Ad oggi, sono stati individuati numerosi fattori di rischio che aumentano la suscettibilità allo sviluppo di tumori testicolari a cellule germinali derivati da neoplasia a cellule germinali *in situ*.

Tra questi fattori è necessario ricordare: la familiarità, la Sindrome della Disgenesia Testicolare (SDT), fattori ambientali, la microlitiasi testicolare, il precedente tumore controlaterale e i fattori genetici.

**Familiarità:** la familiarità rappresenta il fattore di rischio più importante per lo sviluppo dei TTCCG. È oggi noto come sia nettamente superiore il rischio di sviluppare la patologia per i familiari di soggetti affetti (Dong e Hemminki 2001; Hemminki e Li 2004). I figli e i fratelli di uomini con TTCCG hanno un rischio di sviluppare la patologia, rispettivamente, pari a 4-6 volte e 8-10 volte superiore rispetto alla popolazione generale. Un valore di rischio maggiore per il fratello rispetto a padre-figlio potrebbe riflettere un effetto combinato di fattori genetici e fattori ambientali condivisi, oppure un effetto legato ad elementi recessivi autosomici o *X-linked* che sono stati ereditati (Pyle and Nathanson 2016). A conferma di ciò vi è l'evidenza secondo cui tale rischio aumenta fino a 75 e 35 volte rispetto alla popolazione generale nei gemelli monozigotici e dizigotici (Swerdlow et al. 1997). È opportuno precisare che tutti questi valori di rischio si differenziano molto da quelli relativi a tante altre forme di tumori in cui il rischio, per esempio, per figli e fratelli è aumentato, rispettivamente, di 3 e 6 volte (Hemminki et al. 2004).

**Sindrome della Disgenesia Testicolare (SDT):** comprende quattro diverse patologie ovvero cancro al testicolo, alterazione della spermatogenesi, ipospadia (incompleto sviluppo della parte

distale dell'uretra) e criptorchidismo (mancata discesa unilaterale o bilaterale del testicolo nello scroto durante la vita fetale). Esistono in letteratura più evidenze secondo cui avere una di queste patologie comporti un aumento del rischio di sviluppo di tutte le altre (Skakkebaek 2016). Tra queste condizioni patologiche, il criptorchidismo è ritenuto uno dei più importanti fattori di rischio per il tumore testicolare (Moller e Skakkebaek 1997, Piltoft et al. 2017). I disordini dell'apparato riproduttivo maschile, alla base della SDT, possono manifestarsi singolarmente ma anche coesistere in uno stesso paziente secondo diverse combinazioni. La presenza di più sintomi è indice di un'espressione più severa della SDT (Figura 2): i casi meno gravi manifestano uno o due sintomi, quelli più gravi tre o quattro (più rari).



**Figura 2 - Rappresentazione schematica dell'incidenza del tumore testicolare in funzione del numero dei componenti della SDT. Maggiore è il numero dei componenti che coesistono e maggiore è l'incidenza del tumore testicolare.**

L'ipotesi dell'esistenza di tale sindrome è stata suggerita per la prima volta da Skakkebaek (2001). Costui, infatti, ritenendo che tali patologie avessero, almeno in parte, un'eziopatogenesi comune, propose di considerarle come sintomi di un'unica sindrome. Nello specifico la combinazione di fattori che determina un errore nel differenziamento/funzionalità delle cellule di Sertoli e/o di Leydig, e quindi un'alterazione della programmazione embrionale e dello sviluppo delle gonadi durante le prime fasi della vita fetale, è responsabile della compromissione della proliferazione delle cellule germinali e della produzione di testosterone e INSL-3. Dato che tali processi sono necessari per la discesa testicolare e per il corretto sviluppo/funzionamento dei genitali (esterni), questo meccanismo di patogenesi della SDT è una logica spiegazione alla coesistenza delle quattro diverse patologie in un singolo paziente. La TSD, infatti, può manifestarsi con malformazioni dei genitali (come nel caso dell'ipospadia e del criptorchidismo) e/o disturbi della spermatogenesi e tumore al testicolo (Figura 3).

**Fattori ambientali:** ad oggi, nonostante siano stati analizzati più fattori ambientali con lo scopo di valutarne il ruolo nella suscettibilità allo sviluppo dei TTCG, solo l'esposizione prenatale/perinatale a inquinanti ambientali, in particolare a xenoestrogeni o a sostanze chimiche che interferiscono con



Figura 3 - Rappresentazione schematica del collegamento patogenetico tra le diverse manifestazioni cliniche della SDT.

il sistema endocrino, è risultata strettamente correlata con un aumentato rischio di sviluppare tumori testicolari a cellule germinali (Skakkebaek 2016 e *references* in esso contenute; Pyle and Nathanson 2016). Tuttavia varie sono le evidenze secondo cui i fattori ambientali influenzano la suscettibilità ai TTTCG. Tra queste si annovera uno studio epidemiologico in cui sono state prese in considerazione tre diverse popolazioni: Svedesi, Finlandesi e Danesi (Hemminki e Li 2002). Più precisamente è stato rilevato come popolazioni emigrate in Svezia da paesi con un'alta incidenza di sviluppo della SDT (Danimarca) e quindi di TTTCG e da paesi in cui l'incidenza risultava essere nettamente inferiore (Finlandia), erano caratterizzate da una prima generazione (coloro che erano emigrati) che manteneva l'incidenza del proprio paese d'origine, mentre la seconda generazione (nata in Svezia) presentava un rischio di sviluppo molto simile a quello degli Svedesi. Tuttavia, è opportuno precisare che nonostante tali risultati dimostrino l'esistenza di un importante ruolo dei fattori ambientali, che agiscono nella fase intrauterina, sulla genesi dei tumori testicolari a cellule germinali, è comunque necessario tenere presente che essi agiscono su un *background* genetico diverso tra le varie etnie. Infatti, alcuni studi hanno dimostrato che uomini di discendenza Asiatica o Africana mantengono un basso rischio di sviluppo dei tumori testicolari, benché siano nati in paesi con alto livello di incidenza (Gajendran et al. 2005).

**Microlitiasi testicolare:** tale termine indica la presenza di calcificazioni intratesticolari di piccole dimensioni rilevabili all'esame ecografico. Dalla letteratura si evince che nei pazienti affetti da tumore testicolare a cellule germinali la frequenza di tali calcificazioni è maggiore rispetto alla popolazione generale indicando una possibile associazione tra microlitiasi testicolare e TTTCG (Coffey et al. 2007; Parenti et al. 2007; Tan et al. 2010). Tuttavia, recentemente è stato proposto che la microlitiasi testicolare determini un aumento della suscettibilità allo sviluppo dei TTTCG non come fattore indipendente ma come fattore associato ad altre condizioni come per esempio infertilità, criptorchidismo e predisposizione familiare al cancro testicolare. Per tale aspetto, la microlitiasi testicolare potrebbe essere introdotta nel gruppo delle condizioni patologiche che caratterizzano la SDT (Pedersen et al. 2016).

**Precedente tumore controlaterale:** la prima evidenza, confermata nel corso del tempo, di un'associazione tra un aumentato rischio di sviluppare TTTCG per quei pazienti con precedente tumore controlaterale, risale al 1997 (Wanderås et al. 1997). Lo studio, svolto sulla popolazione maschile norvegese, dimostra che essere stati portatori di un TTTCG significa presentare un rischio relativo di sviluppo di un secondo tumore testicolare a cellule germinali pari a 27.6 (95% C.I. 21.1-35.6). È stato però rilevato come tale rischio muti in funzione di più variabili come il fenotipo del precedente tumore testicolare o l'età in cui il tumore è insorto. La possibilità di sviluppare un secondo tumore testicolare a cellule germinali è maggiore: nei soggetti che hanno precedentemente sviluppato un non-seminoma rispetto a coloro che hanno avuto un seminoma (rischio rispettivamente pari a 32.8, 95% C.I. 19.7-51.2 e 18.8, 95% C.I. 9.7-32.8) e nei pazienti con età inferiore a 30 anni rispetto a coloro che hanno età superiore a 30 anni (rischio rispettivamente pari a 35.6, 95% C.I. 25.1-49.0 e 20.5, 95% C.I. 13.0-31.4).

**Fattori genetici:** dalla letteratura, pur non trovando delle chiare evidenze di fattori genetici coinvolti nella patogenesi dei TTTCG, è comunque possibile rilevare sempre più informazioni su alterazioni genomiche che non ne sono causa diretta ma che ne aumentano il rischio di sviluppo. Più precisamente, gli iniziali studi su geni candidati fallirono nell'identificazione di fattori coinvolti nella suscettibilità allo sviluppo di TTTCG (Pyle and Nathanson 2016). Tra questi geni mancanti di associazione si annovera il gene *AR* (recettore androgenico) e nello specifico il microsatellite polimorfico, CAG, situato a livello del suo esone 1 (Garolla et al. 2005; Giwercman et al. 2004; Rajpert-De Meyts et al. 2002). Era stato ipotizzato: poiché l'insensibilità agli androgeni, responsabile della Sindrome da Resistenza agli androgeni, era considerata un fattore di rischio per lo sviluppo dei TTTCG, avere un incremento del segnale androgenico durante lo sviluppo fetale poteva risultare un fattore che riduceva tale rischio (Rajpert-De Meyts e Skakkebaek 1993). Pertanto, poiché le variazioni della lunghezza del microsatellite CAG influenzano la capacità transattivante del recettore determinando una maggiore o minore sensibilità agli androgeni, è stato possibile supporre che avere variazioni nella lunghezza del sito polimorfico CAG potesse comportare un aumento o una riduzione del rischio di sviluppo dei TTTCG. Nonostante tale ipotesi, per quanto riguarda l'effetto del CAG, questa associazione non è stata confermata (Garolla et al. 2005; Giwercman et al. 2004; Rajpert-De Meyts et al. 2002).

L'identificazione di fattori genetici di suscettibilità allo sviluppo dei TTTCG è stata resa possibile con l'avvento di nuove piattaforme tecnologiche, come per esempio lo SNP-array. Queste hanno permesso la diffusione di un nuovo approccio, definito *genome-wide*, tramite il quale è stata possibile eseguire l'analisi completa delle variazioni di sequenza dell'intero genoma in popolazioni di studio estremamente ampie (*Genome Wide Association Study*, GWAS). Dieci studi di associazione *genome-wide* sui TTTCG hanno identificato 27 loci o regioni genomiche indipendenti con alleli specifici associati a questa forma di tumore (Rajpert-De Meyts et al. 2016; Pyle and Nathanson 2016 e *references* in essi contenute). Tra questi il locus che conferiva maggior rischio di sviluppare TTTCG era rappresentato

da *KITLG* (OR maggiore di 2.5). Due studi di associazione indipendenti individuaronο marcatori associati a tali neoplasie che mappavano all'interno o nelle vicinanze dei geni: *KITLG*, *SPRY4* e *BAK1* (Rapley et al. 2009 e Kanetsky et al. 2009). *KITLG* è un gene localizzato a livello del cromosoma 12 e codifica per una molecola che interagisce con il recettore di membrana tirosin-chinasico (quest'ultimo prende il nome di KIT), e che è definita, per le sue funzioni, "fattore delle cellule staminali". *KITLG* costituisce, insieme al proprio recettore, il complesso c-KIT-KITLG che ha un ruolo centrale nel regolare aspetti multipli delle cellule germinali primordiali (Rapley et al. 2009 e Kanetsky et al. 2009). Esperimenti su topi hanno, infatti, dimostrato come topi omozigoti ed eterozigoti per la delezione germinale dei geni *KITLG* e *c-KIT* risultano essere rispettivamente infertili e con una probabilità di sviluppare i TTCG due volte maggiore rispetto ai non deleti (Roskoski 2005; Heaney et al. 2008). *SPRY4* è un gene situato sul cromosoma 5 e codifica un membro di una famiglia composta da 4 geni, implicato nella regolazione negativa di RAS-ERK-MAPK in risposta a fattori di crescita. Il gene *BAK1* (BCL2- Antagonist/Killer1), sul cromosoma 6, codifica una proteina che promuove l'apoptosi legandosi e antagonizzando l'attività del repressore apoptotico BCL2 e di altre proteine antiapoptotiche. La scoperta contemporanea di un ruolo di *KITLG*, *SPRY4* e *BAK1* nello sviluppo dei TTCG potrebbe non essere casuale, infatti, studi sui tumori hanno rilevato una stretta correlazione tra le proteine KIT e SPRY4 (Kanetsky et al. 2009). Questo è vero anche per *BAK1* la cui espressione, nelle cellule germinali testicolari, risulta essere inibita dal complesso c-KIT-KITLG (Rapley et al. 2009). A conferma del ruolo di *KITLG*, *SPRY4* e *BAK1* nella suscettibilità allo sviluppo di TTCG, recenti studi hanno individuato un rischio di sviluppare tale forma di tumore aumentato fino a cinque volte con la presenza contemporanea dell'allele minore relativo a cinque polimorfismi presenti su tali geni (*KITLG*: rs995030, rs1508595, *SPRY4*: rs4624820, rs6897876, *BAK1*: rs210138; Nemtsova et al. 2016, 2017, Grasso et al. 2016). Infine, data la stretta correlazione, descritta precedentemente, tra TTCG e infertilità e il ruolo del cromosoma Y in quest'ultima condizione patologica, sono state studiate anche le alterazioni strutturali a carico di tale cromosoma sessuale al fine di individuarne un eventuale contributo al rischio di sviluppo dei TTCG. Recentemente è stato attribuito un rischio aumentato di 0.34 volte in presenza di mosaicismo relativo alla perdita del cromosoma Y (Machiela et al. 2017), ma tale rischio raggiunge un valore nettamente più alto con la delezione gr/gr (pari a 2 e a 3 volte rispettivamente per le forme sporadiche e familiari dei TTCG). La delezione gr/gr continua ad essere, ad oggi, l'unico riarrangiamento del cromosoma Y per il quale è stato ben confermato il suo ruolo nell'aumento della suscettibilità ai TTCG. L'ipotesi di studiare la delezione gr/gr in relazione a questa forma di tumore, è derivata dalla avvalorata esistenza del ruolo di tale riarrangiamento nell'alterazione della spermatogenesi a sua volta ipotizzata avere un'eziopatogenesi comune con i tumori testicolari a cellule germinali (Nathanson et al. 2005). Durante lo studio svolto da Nathanson e collaboratori (2005), la delezione gr/gr fu ricercata in 1.376 pazienti affetti da TTCG sporadico e 2.599 controlli rilevandola rispettivamente in 28 (2%) e 33 (1.3%) soggetti. Quindi

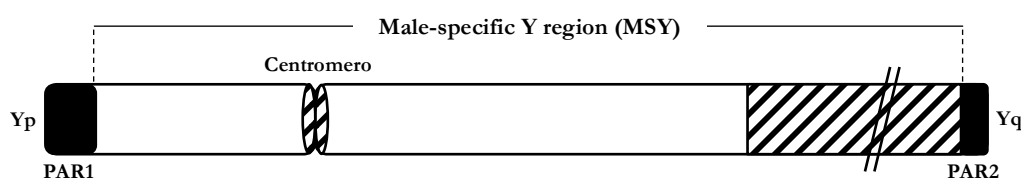
avere questa delezione comporterebbe un aumento del rischio di sviluppare i TTTCG sporadici di due volte maggiore (O.R. 2.1, 95% C.I. 1.3-3.6) rispetto alla popolazione sana. Poiché la delezione gr/gr è associata ad un fenotipo seminale variabile (da azoospermia a normozoospermia), i soggetti portatori di tale riarrangiamento e non-azoospermici possono trasmettere, ai propri figli maschi, tale delezione e quindi l'aumentata suscettibilità allo sviluppo del tumore testicolare. Da questo stesso lavoro si rileva, infatti, che la delezione gr/gr ricercata anche in 431 pazienti affetti da TTTCG familiare è responsabile di un aumento di tre volte del rischio di sviluppare questa forma di tumore testicolare (O.R. 3.2, 95% C.I. 1.5-6.7) (Nathanson et al. 2005). Tuttavia, in contrasto a ciò che potremmo aspettarci, gli stessi autori hanno trovato che i probandi con TTTCG familiare della linea materna mostravano un rischio di sviluppare tale condizione patologica in presenza di delezione gr/gr marcatamente maggiore rispetto a coloro con TTTCG familiare della linea paterna (OR 9.8; 95% CI 3.5–27 *versus* OR 1.6; 95% CI 0.52–4.8, rispettivamente). Comunque, essere portatori di tale delezione parziale non significa comunque sviluppare necessariamente il tumore, in quanto questa alterazione cromosomica si presenta sia nei soggetti affetti che nei non affetti con una frequenza molto bassa (2% e 1.3% rispettivamente), sottolineando come non sia direttamente coinvolta nello sviluppo della malattia, ma che bensì costituisca solamente un fattore di rischio. L'associazione tra delezione gr/gr e TTTCG sporadici però, non è stata confermata da studi sulla popolazione Italiana e Inglese (Ferlin et al. 2007; Linger et al. 2007). La discrepanza tra questi lavori potrebbe dipendere sia dalla differente quantità numerica della popolazione di studio sia dall'aver o meno selezionato adeguatamente i “casi” e i “controlli”. È, infatti, opportuno precisare che per determinare il ruolo, nella suscettibilità ad una condizione patologica, di fattori genetici a bassa penetranza, come la delezione gr/gr, sarebbe opportuno preferire casistiche molto ampie. Questo, però, è reso più difficoltoso per lo studio del cromosoma Y rispetto al resto del genoma poiché è fondamentale valutare i possibili *bias* come la stratificazione della popolazione. Infatti, per eseguire un corretto studio sui fattori legati al cromosoma Y è necessario tenere in considerazione l'origine etnico-geografica dei “casi” e dei “controlli” che vengono studiati (Krausz e Looijenga 2008). Dato che tale delezione rimuove metà del contenuto genico della regione AZFc, rimane da stabilire se altri tipi di riarrangiamenti (delezioni e duplicazioni) con conseguente variazione del dosaggio genico possono avere effetto simile alle delezioni gr/gr.

### **1.III. CROMOSOMA Y E LA SUA RELAZIONE CON TTTCG**

#### **1.III.1. Struttura**

Il cromosoma Y umano rappresenta il cromosoma sessuale responsabile della differenziazione e determinazione dei caratteri maschili nella specie umana. Esso differisce marcatamente dall'altro cromosoma sessuale X e dai cromosomi autosomici in termini di dimensione, struttura genomica, contenuto ed evoluzione nel corso dei secoli (Navarro-Costa 2012; Krausz e Casamonti 2017).

Il cromosoma Y è acrocentrico, caratterizzato da due regioni pseudoautosomiche (PAR1 e PAR2) e dall'MSY (*Male Specific Y region*). Le PARs, presenti alle estremità del cromosoma, sono le uniche regioni dello stesso che mostrano omologia con le corrispondenti regioni sul cromosoma X e pertanto sono le sole porzioni cromatiniche dell'Y che ricombinano con l'X durante il processo di *crossing-over*. Esse contengono 27 geni che codificano proteine con differenti funzioni biologiche (Mang and Morris 2007). L'MSY rappresenta circa il 95% dell'intera lunghezza del cromosoma Y e a differenza delle PAR, tale porzione non ricombina con il cromosoma X nonostante in essa siano collocati tutti i geni essenziali per il sesso maschile (tra questi l'SRY ovvero il gene fondamentale per la differenziazione del sesso maschile). L'MSY è costituita da eucromatina, e quindi soggetta in parte a trascrizione, ed eterocromatina la cui espressione risulta invece assente (Figura 4).



**Figura 4 - Rappresentazione schematica del cromosoma Y sul quale si individuano le regioni pseudoautosomiche (PAR1 e PAR2) e la *Male-specific Y region* (MSY). Quest'ultima è a sua volta distinta in eucromatina (trascrizione attiva) ed eterocromatina (trascrizione inibita). Yp= braccio corto; Yq= braccio lungo.**

A livello dell'MSY è possibile individuare tre diverse sequenze eucromatiche (Skaletsky et al. 2003): *X-transposed*, *X-degenerate* e gli ampliconi. Le *X-transposed* sono presenti solo a livello del braccio corto del cromosoma Y e derivano dalla trasposizione di specifiche sequenze presenti sul cromosoma X con le quali presentano un'omologia di circa il 99%. Le *X-degenerate* sono rappresentate da geni a singola copia o da pseudogeni omologhi a geni sul cromosoma X, rilevando l'esistenza di un cromosoma ancestrale dal quale si sono poi evoluti i due cromosomi sessuali. Infine con il termine amplicone si indica una sequenze che presenta identità nucleotidica quasi totale (più del 99,9%) con una o più regioni sull'MSY. Gli ampliconi costituiscono circa il 30% dell'eucromatina dell'intero cromosoma Y e dato che possono essere costituiti sia da sequenze dirette che invertite, è possibile individuare otto palindromi nell'intera regione MSY.

Ad oggi è noto che, in accordo alla sequenza di riferimento del cromosoma Y appartenente ad un singolo individuo riconducibile all'aplogruppo R1, l'MSY contiene 156 unità trascrizionali che includono 78 unità codificanti proteine (27 geni che codificano per proteine). La sequenza, la struttura e il numero di copia dei geni in multicopia può variare tra differenti cromosomi Y (Repping et al. 2006). Il numero dei geni estremamente ridotto rispetto a quello dei geni presenti sul cromosoma X (circa 700 codificanti proteine) è il risultato di eventi di rimozione genica subita dal cromosoma Y durante il corso dell'evoluzione. Tuttavia i geni mantenuti hanno subito una

specializzazione in funzioni selettivamente vantaggiose per il maschio (Navarro-Costa 2012; Bellott et al. 2014). La spermatogenesi è un processo con molte caratteristiche uniche rilevabili prevalentemente durante le fasi meiotica e post-meiotica (Hecht 1998) e molti dei geni dell'MSY partecipano, infatti, in tali processi. La maggioranza dei geni con un ruolo nella spermatogenesi sono locati nelle sequenze amplicomiche delle quali ne è molto ricca la regione AZFc.

### 1.III.1.1. Regione AZFc

Nel 1976, Tiepolo e Zuffardi dimostrarono, per la prima volta, l'esistenza di un'associazione tra azoospermia (assenza di spermatozoi nell'eiaculato) e delezione rilevabile microscopicamente di una regione sul braccio lungo del cromosoma Y. A tale regione fu, pertanto, assegnato il nome di *Azoospermia Factor Region* (AZF). Venti anni più tardi, Vogt e collaboratori (1996) suddivisero la regione AZF in tre sottoregioni: prossimale, mediana e distale alle quali fu attribuito il nome rispettivamente di regione AZFa, AZFb e AZFc (Figura 5A). La regione AZFc, che si sovrappone in parte con la porzione terminale della regione AZFb, è particolarmente ricca di ampliconi tanto da costituirla quasi interamente. Questo spiega il motivo per cui a livello di tale regione si ritrovano prevalentemente geni in multicopia (Figura 5B), i quali sono coinvolti in diversi processi biologici, con un ruolo nella spermatogenesi, come: modificazione della cromatina, trascrizione, metabolismo dell'RNA (*splicing* e trasporto), traduzione e ubiquitinazione.

Il metabolismo dell'RNA e la regolazione della traduzione sono eventi particolarmente rilevanti nel processo di gametogenesi maschile data la graduale riduzione della sintesi di mRNA che caratterizza la fase post-meiotica della spermatogenesi. *DAZ* e *RBMY* sono due geni in multicopia che codificano proteine capaci di legare l'mRNA regolandone il trasporto e la traduzione (Vogt and Fernandes 2003).

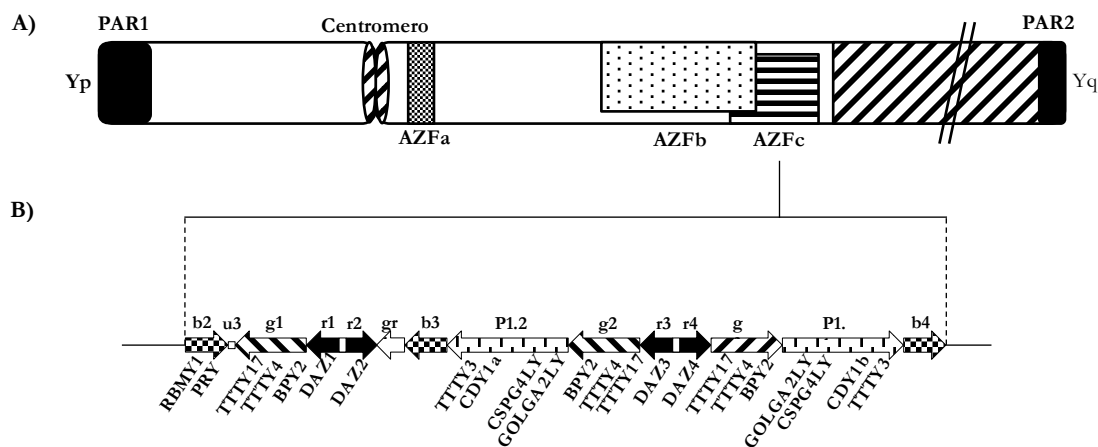


Figura 5 - Rappresentazione schematica del cromosoma Y e dei geni collocati a livello della regione AZFc. (A) *Azoospermia factor regions* (AZFa, b, and c) presenti sul braccio lungo del cromosoma Y (Yq) con la sovrapposizione tra le regioni AZFb e c. (B) La sequenza di riferimento mostra la presenza di geni in multicopia e di unità trascrizionali nella regione AZFc. Le frecce con il solito motivo rappresentano le sequenze omologhe ripetute.



*DAZ*, gene caratteristico dei primati, si ritrova sulla sequenza di riferimento del cromosoma Y in 4 copie raggruppate a due a due: *DAZ1/DAZ2* e *DAZ3/DAZ4*. Il gene presenta un omologo autosomico umano *DAZL* (*DAZ-like autosomal*; Saxena et al. 1996; Yen et al. 1996) con il quale condivide un dominio di riconoscimento dell'RNA (RRM) altamente conservato e almeno una sequenza di 24 aminoacidi. L'analisi dell'omologo autosomico di altre specie e studi *in vitro* su cellule staminali embrionali umane (hESCs), hanno permesso di dedurre la probabile funzione di *DAZ* (Fu et al. 2015 e *references* in esso contenute). Nello specifico, l'assenza del gene *Da $\zeta$ l* nei topi è responsabile di una mancanza completa della produzione dei gameti sia nel testicolo che nell'ovaio, dimostrando un ruolo essenziale di *Da $\zeta$ l* nello sviluppo e nella sopravvivenza delle cellule germinali (Ruggiu et al. 1997). Mutazioni del gene *BOULE*, analogo di *DAZ* nella *Drosophila*, determinano un arresto spermatocitario in fase G2/M e quindi azoospermia completa (Castrillon et al. 1993; Eberhart et al. 1996). Nelle cellule staminali embrionali (ES) umane e nelle cellule staminali pluripotenti (iPS), un'overespressione di *Da $\zeta$ l*, *BOULE* e *DAZ* induce una loro differenziazione in cellule-simili a cellule germinali primordiali (PGCLCs) migliorandone la successiva maturazione e progressione attraverso la meiosi (Kee et al. 2009; Medrano et al. 2012). Questi studi, quindi, forniscono evidenze di un coinvolgimento del *DAZL* umano nella formazione delle cellule germinali primordiali e di un ruolo di *DAZ* e *BOULE* nel promuovere invece le fasi tardive della meiosi e lo sviluppo dei gameti aploidi (Kee et al. 2009). Nonostante ancora oggi siano sconosciuti i *targets* a valle della famiglia *DAZ*, è stato dimostrato che *DAZ* e *DAZL* interagiscono con altre proteine coinvolte nel trasporto e localizzazione di mRNA come quelle di *DAZAP1*, *DAZAP2* e *PUMILIO-2* (Fu et al. 2015 e *references* in esso contenute; Tsui et al. 2000).

RBMV contiene un motivo *RNA-binding* a livello dell'N-terminale e quattro box SRGY (serina, arginina, glicina, tirosina) al C-terminale. Il gene codificante tale proteina deriva da un'amplificazione del gene *X-degenerate*, *RBMV1.1-6* (Chai et al. 1998, Skaletsky et al. 2003). Esso è altamente espresso nelle cellule germinali post-meiotiche e nello spermatozoo trascrizionalmente quiescente, sottolineando l'importanza di RBMY in una serie di funzioni biologiche correlate al metabolismo dell'RNA come, per esempio, regolazione del processo di *splicing* e traduzione (Elliott 2004 e *references* in esso contenute). Tale proteina interagisce, infatti, in modo specifico e dinamico con alcune componenti del complesso *exon-junction* e con i fattori di *splicing* (Dreumont et al. 2010). Il gene murino *Rbmy1a1* a livello del cromosoma Y è altamente metilato nello spermatozoo maturo e resiste all'ondata di demetilazione dopo la fecondazione dell'ovocita grazie all'azione della proteina materna Trim28 (Sampath Kumar et al. 2017). Nel modello di topo caratterizzato dall'assenza della proteina materna Trim28, è stata osservata un'attivazione anomala di *Rbmy1a1*, che per l'accumulo di varianti di *splicing* anomale, determina letalità specifica maschile prima dell'impianto embrionale. RBMY potrebbe quindi agire nelle cellule germinali come un co-regolatore di specifici eventi di *splicing* alternativo. Questo sarebbe possibile tramite la sua interazione con SAM68 e T-STAR, due proteine della famiglia STAR (*Signal Transduction And RNA*

*processing*) implicate nei *pathways* di segnalazione cellulare, nel processamento di pre-mRNA e nel controllo del ciclo cellulare (Elliott 2004). Infine, è stato ipotizzato che, similmente a DAZ, anche RBMY sia coinvolta nel controllo del processo di traduzione dell'mRNA (Navarro-Costa et al. 2010a e *references* in esso contenute; Vogt et al. 2008).

Nella regolazione della struttura cromatinica e quindi del processo trascrizionale, la famiglia genica *CDY* assume un ruolo di rilevanza. *CDY1* e *CDY2* hanno origine dalla retrotrasposizione sul cromosoma Y dell'mRNA poliadenilato dei loci *CDYL1* e *CDYL2* localizzati rispettivamente sul cromosoma 6 e 16. Il gene *CDY1* è espresso solo a livello del testicolo e locato, nella sequenza di riferimento, in due copie a livello della regione AZFc (*CDY1a* e *CDY1b*), mentre *CDY2* è espresso ubiquitariamente e posizionato, nella sequenza di riferimento, in due copie a cavallo delle regioni AZFa e AZFb (Lahn and Page 1999). I geni *CDY* contengono due motivi funzionali: un cromodominio implicato nel legame con la cromatina e un dominio catalitico coinvolto nelle reazioni di acetilazione. È stato, infatti, dimostrato che *CDY1* e *CDY2* sono coinvolti nella iperacetilazione degli istoni durante la maturazione degli spermatidi (Lahn et al. 2002; Lahn and Page 1997, 1999), determinando la sostituzione degli istoni con le protamine (proteine di condensazione del DNA specifiche dello spermatozoo) che rappresenta uno degli *step* fondamentali della fase finale della spermatogenesi (Meistrich et al. 1992).

*PRY* e *BPY2* sono geni multicopia espressi esclusivamente nel testicolo.

*PRY* codifica per una proteina omologa alla tirosina fosfatasi PTPN13 che è coinvolta nella regolazione di vari processi cellulari tra cui la morte programmata (Dromard et al. 2007). Sulla base del profilo di espressione del gene negli spermatozoi (è incrementato negli spermatozoi di uomini con parametri seminali alterati), è stato suggerito il coinvolgimento di *PRY* nel processo apoptotico degli spermatidi/spermatozoi (Stouffs et al. 2004).

La famiglia genica *BPY2* (alias *VCY2*) è generata dalla trasposizione di segmenti autosomici non codificanti proteine e nella sequenza di riferimento si presenta in tre copie (Cao et al. 2015). È sconosciuto il suo ruolo nella spermatogenesi e informazioni sulla sua funzione derivano da studi di espressione e dall'analisi delle proteine con cui interagisce tra le quali si annoverano UBE3A e VCY2IP-1 (Wong et al. 2002, 2004). La prima è una ubiquitina ligasi espressa specificatamente a livello testicolare e membro del sistema di degradazione proteica ubiquitina dipendente, la seconda è una proteina che mostra omologia con la proteina 1S associata ai microtubuli (MAP1S). È stato proposto che l'interazione tra *BPY2* e VCY2IP-1 a livello della rete citoscheletrica dei microtubuli potrebbe essere regolata da UBE3A attraverso l'interazione con la stessa *BPY2* e altre proteine nei microtubuli.

A livello degli ampliconi della regione AZFc si collocano altre tre famiglie geniche con espressione testicolare specifica: *TTY* (geni non codificanti), *CSPG4LY* e *GOLGA2LY*. Tuttavia in letteratura le informazioni che li riguardano sono scarse tanto che la loro funzione resta ancora oggi sconosciuta (Navarro-Costa 2012; Skaletsky et al. 2003).

## 1.III.2. CNVs del cromosoma Y

### 1.III.2.1. Definizione

Tra le variazioni a carico del genoma umano si annoverano quelle strutturali che coinvolgono segmenti di DNA microscopici o submicroscopici i quali, rispetto alla sequenza di riferimento, modificano la posizione (in seguito a traslocazione), l'orientamento (in seguito ad inversione) o la quantità (in seguito a delezione o duplicazione). In quest'ultimo caso si parla di *Copy Number Variations* (CNVs).

Le CNVs sono, quindi, variazioni non bilanciate che interessano segmenti di DNA che si presentano in tutto il genoma umano con un numero di copie variabile rispetto al genoma di riferimento (Feuk et al. 2006). Classicamente, la lunghezza minima dei segmenti di DNA alla base dei CNVs è stata definita ad 1 Kb (Feuk et al. 2006). In seguito, con l'avvento di sequenziamento ed *array* di nuova generazione, vari studi hanno fissato il valore minimo di tale lunghezza a 500 bp (Valsesia et al. 2013). Molte di esse mostrano un'architettura complessa, probabilmente generata nel corso di diverse generazioni a seguito di eventi multipli di riarrangiamento, ma, in generale, possono essere classificate in due gruppi principali (Figura 6):

- “*losses*”: minor numero o assenza di copie di un dato segmento di DNA rispetto al genoma di riferimento come conseguenza di eventi di delezione;
- “*gains*”: aumento del numero di copie di un dato segmento di DNA rispetto al genoma di riferimento come conseguenza di uno o più eventi di duplicazione. Il frammento di DNA duplicato può essere inserito, rispetto alla regione di origine, nella regione adiacente (duplicazione in tandem) o in regioni molto distanti dalla regione di origine e perfino su altri cromosomi (duplicazione non contigua). Quando un CNV è il risultato di più eventi di duplicazione, si parla di duplicazione multi-allelica.

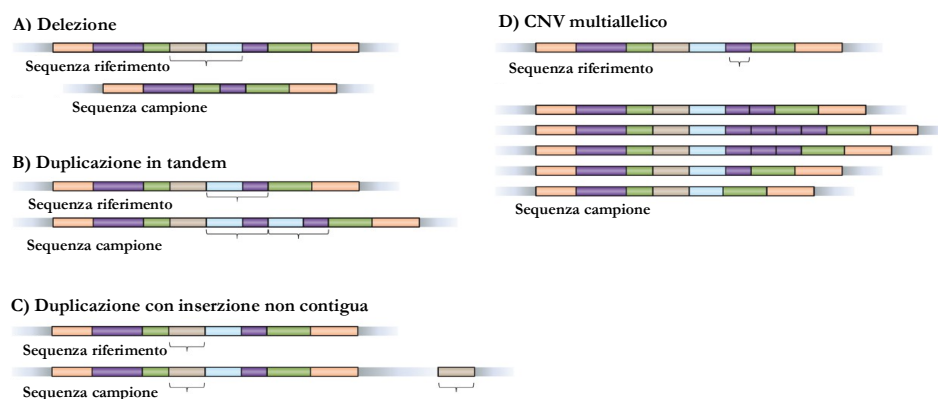


Figura 6 - Illustrazione schematiche delle diverse forme di CNVs. Le CNVs sono definite sempre per confronto con un genoma di riferimento. I colori rappresentano le diverse sequenze di DNA, tale che blocchi con lo stesso colore contengono sequenze identiche. (A) Delezione di due frammenti omologhi contigui. (B) Duplicazione in tandem. (C) Duplicazione in cui la regione duplicata si inserisce lontano rispetto alla sequenza di origine. (D) CNV multiallelico, derivato da più eventi di duplicazione (Figura di Lee and Scherer 2010).

Nel 2006, Redon e collaboratori, studiando un totale di 270 individui sani, costruirono la prima mappa completa delle CNVs presenti nel genoma umano. È stato possibile così dedurre che oltre il 12% del genoma è interessato da questa categoria di riarrangiamenti (circa 360 Mb), con una prevalenza di CNVs che coinvolgono segmenti di DNA di piccole dimensioni (<20 Kb). Nel corso degli anni, con l'aumentare progressivo delle informazioni relative alle CNVs del genoma umano, si è verificata una esigenza crescente di disporre di sistemi di annotazione sempre più sofisticati, tra cui il più importante è il *database* delle varianti genomiche (*Database Genome Variants*, DGVs) che raccoglie tutte le variazioni strutturali (incluse le CNVs) identificate fino ad oggi in popolazioni di controllo, ovvero in soggetti apparentemente sani (<http://projects.tcag.ca/variation>). Per ciascuna CNV sono annotate diverse informazioni: se sono *losses* o *gains*, la posizione esatta nel genoma, la frequenza e le referenze bibliografiche per poter rintracciare gli studi che hanno condotto alla loro identificazione. Ad oggi (ottobre 2017) sono stati registrate 552,586 CNVs.

I CNVs a livello del genoma umano possono presentare geni al loro interno o altri elementi funzionali e alcuni di essi mostrare una frequenza nella popolazione superiore all'1% parlando in tale caso di *Copy Number Polymorphisms* (CNPs). Queste osservazioni, insieme alla variabilità inter-individuale del numero di copie geniche (Redon et al. 2006; Jakobsson et al. 2008), hanno permesso di ipotizzare l'importanza delle CNVs nel processo evolutivo, nell'adattamento alle diverse condizioni ambientali e nella diversità fenotipica inter-individuale. Infatti, una CNV è responsabile del cambiamento nel dosaggio dei geni in essa contenuti, determinando, così, una possibile ridondanza di copie geniche alcune delle quali potrebbero subire delle variazioni di sequenza e quindi sviluppare una funzione diversa da quella originale. Inoltre, le delezioni o le inserzioni dei segmenti duplicati potrebbero generare nuove combinazioni di esoni, anche tra geni differenti, producendo proteine che potrebbero acquisire nuovi domini e funzionalità (Redon et al. 2006; Wong et al. 2007; Jakobsson et al. 2008).

Tuttavia, tali delezioni o inserzioni di segmenti duplicati potrebbero anche provocare un'amplificazione/perdita aberrante di geni o un'alterazione del pattern epigenetico, attribuendo alle CNVs un ruolo nella suscettibilità alle malattie (Conrad e Hurler, 2007; Ionita-Laza et al. 2009; Yang et al. 2016; Krausz e Casamonti 2017). Di conseguenza, la loro individuazione e associazione con il fenotipo clinico rappresentano passi importanti per una migliore comprensione dell'eziologia della malattia (Valsesia et al. 2013). Ad oggi, è stato ben documentato il contributo di specifiche CNVs in alcune malattie; per esempio alle CNVs del cromosoma Y è stato attribuito un ruolo nell'eziologia dell'infertilità maschile come descritto nei paragrafi successivi.

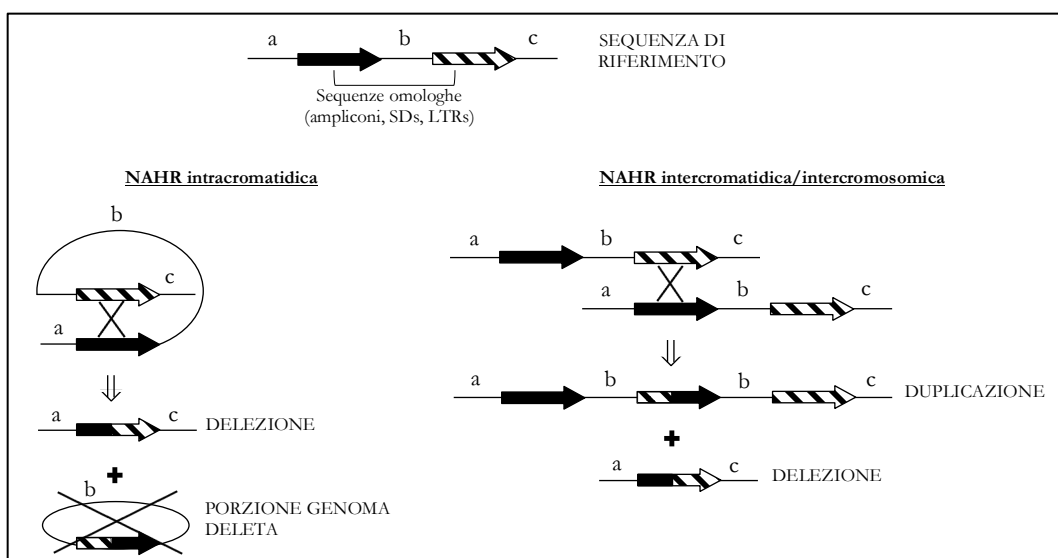
### ***1.III.2.2. Meccanismo responsabile della formazione di CNVs***

La base molecolare del meccanismo responsabile della formazione di CNVs a livello del cromosoma Y è rappresentata dalle regioni ampliconiche. Queste, oltre che fornire un aspetto caratteristico al cromosoma Y, sono anche responsabili di due meccanismi con effetti opposti: la

*gene conversion* (conversione genica) e la *Non-Allelic Homologous Recombination* (NAHR: ricombinazione omologa non allelica).

Il primo meccanismo è necessario per preservare i geni presenti a livello del cromosoma sessuale maschile dall'accumulo graduale di mutazioni deleterie (Rozen et al. 2003). È in seguito al sequenziamento completo del cromosoma Y, nel 2003, che è stato possibile comprendere che la *gene conversion* si può verificare anche a livello di tale cromosoma sessuale. Questa scoperta ha permesso di ritenere non vera l'ipotesi secondo cui, durante la meiosi, l'assenza di un possibile scambio genetico (*crossing-over*) della regione MSY con un cromosoma omologo potesse essere la causa di accumulo di mutazioni a livello dell'Y. Veniva asserito che tali mutazioni, sarebbero state anche motivo della progressiva riduzione delle dimensioni del cromosoma Y e della sua futura scomparsa determinando quindi la perdita del sesso maschile in pochi milioni di anni (Wilson and Makova 2009).

La *Non-Allelic Homologous Recombination*, che avviene tra due ampliconi che sono orientati nella stessa direzione, è responsabile della perdita della regione cromosomica e quindi del materiale genetico in essa contenuto, interposta tra i due ampliconi che ricombinano a livello del cromosoma Y (Figura 7). Tale perdita, chiamata delezione, può interessare regioni più o meno ampie del cromosoma e può determinare quadri patologici più o meno gravi correlati non solo con la quantità di materiale genetico deletato, ma anche con il tipo di regione, e quindi di gene, che sono stati rimossi. In realtà questo secondo meccanismo è responsabile anche di eventuali duplicazioni di specifiche regioni del



**Figura 7 - Meccanismi di ricombinazione omologa non allelica (NAHR).** Il substrato di ricombinazione sono due duplicazioni segmentali, nella figura rappresentate dalle due frecce (nera e striata), orientate nella stessa direzione. (A) NARH intracromatidica: avviene tra sequenze omologhe poste sullo stesso filamento di DNA (cromatide), e determina la delezione dalla regione interposta tra i due ampliconi che ricombinano. (B) NAHR intercromatidica o intercromosomica: avviene tra sequenze omologhe localizzate sui cromatidi o cromosomi fratelli, e può avere come conseguenza un filamento di DNA con la delezione e l'altro con la duplicazione reciproca.

cromosoma Y. NAHR può generarsi per appaiamento di ampliconi omologhi all'interno dello stesso cromosoma (intracromatidica) o per ricombinazione tra ampliconi omologhi dei due cromatidi fratelli una volta che il cromosoma Y si è duplicato (intercromatidica). In quest'ultimo caso la delezione su un cromatide è accompagnata dalla duplicazione della regione interposta tra gli ampliconi appaiati sull'altro cromatide.

### **1.III.3. Classificazione e significato clinico delle CNVs sulla regione AZFc**

Il cromosoma Y è considerato un cromosoma geneticamente dinamico, pronò a notevoli cambiamenti per l'alta frequenza di segmenti duplicati (ampliconi) che, come descritto precedentemente, sono i responsabili strutturali della generazione dei CNVs.

I CNVs a carico della regione AZFc del cromosoma Y possono essere suddivisi in tre principali categorie: i) delezione completa o microdelezione; ii) delezioni parziali; iii) duplicazioni. Ognuna delle quali con uno specifico significato clinico.

#### ***1.III.3.1. Delezione completa AZFc***

La delezione completa AZFc si origina per ricombinazione omologa tra gli ampliconi b2 e b4 collocati rispettivamente nei palindromi P3 e P1 (Kuroda-Kawaguchi et al. 2001). Poiché questi ampliconi hanno una lunghezza maggiore rispetto a quelli responsabili delle microdelezioni delle altre regioni AZF, essi sono maggiormente predisposti a NAHR. Questa spiega il motivo per cui la delezione completa della regione AZFc rappresenta la microdelezione più frequente (circa 80%) seguita da quella dell'AZFa (0.5-4%), AZFb (1-5%) ed infine AZFbc (1-3%).

La rimozione della regione compresa tra gli ampliconi b2/b4 determina l'eliminazione di 3.5 Mb in cui sono compresi 23 geni ed unità trascrizionali che possono essere raggruppati, in base alla loro omologia, in 8 famiglie geniche: *RBMY1*, *PRY*, *TTY*, *BPY2*, *DAZ*, *CDY1*, *CSPG4LY* e *GOLGA2LY*.

Dato il ruolo dei suddetti geni nel processo di formazione dello spermatozoo (vedi paragrafo 1.III.1.1.), la rimozione dell'intero contenuto genico della regione AZFc e quindi la delezione completa di tale regione non è mai stata ritrovata in un soggetto normozoospermico mostrando così una relazione causa-effetto con l'alterazione severa della spermatogenesi. Essa è, infatti, associata ad un fenotipo variabile da oligozoospermia (prevalentemente caratterizzata da una concentrazione di spermatozoi inferiore a 2 milioni di spermatozoi/ml), ad azoospermia. Poiché quest'ultima condizione seminale può essere il risultato della Sindrome a Sole Cellule di Sertoli (SCOS) e dell'ipospermatogenesi, i pazienti azoospermici portatori della delezione completa AZFc hanno il 50% di possibilità di avere spermatozoi a livello testicolare. Tali pazienti, se in cerca di gravidanza, possono pertanto essere indirizzati alle tecniche di estrazione testicolare dello spermatozoo (TESE) in modo tale da poterlo utilizzare nella tecnica d'iniezione intracitoplasmatica (ICSI) (Hopps et al. 2003; Kleiman et al. 2011; Krausz et al. 2000). Anche i pazienti

oligozoospermici portatori della microdelezione AZFc potrebbero essere costretti a ricercare una gravidanza tramite le tecniche di fecondazione medicalmente assistita (ART). È oggi noto, infatti, che tali pazienti abbiano un rischio di progressivo decremento nel tempo della concentrazione spermatica, inducendoli a crioconservare il loro liquido seminale come trattamento preventivo (McElreavey and Krausz 1999; Krausz and Degl'Innocenti 2006 e *references* in esso contenute). È comunque necessario precisare che a prescindere dalla presenza di spermatozoi nell'eiaculato o nel testicolo e dalla possibilità di procreare naturalmente o tramite ART, la delezione sarà obbligatoriamente trasmessa al figlio maschio. Nonostante la grande maggioranza delle delezioni sia *de novo*, sono stati descritti alcuni casi di trasmissione della delezione completa AZFc da padre a figlio (Kühnert et al. 2004 e *references* in esso contenute). La prole avrà un fenotipo seminale variabile da oligo ad azoospermia. Infatti, poiché il *background* genetico e l'esposizione a fattori ambientali sono capaci di modulare l'espressione fenotipica della delezione completa AZFc, non è possibile determinare a priori il fenotipo seminale del figlio.

La delezione completa della regione AZFc del cromosoma Y è stata studiata anche al fine di attribuirne un possibile ruolo nella patogenesi dei tumori testicolari a cellule germinali. Poiché tale riarrangiamento non è mai stato individuato in un totale di 575 pazienti affetti da tumore, ad oggi è possibile affermare l'assenza di associazione tra delezione completa AZFc e TCG (Frydelund-Larsen et al. 2003; Lutke Holzik et al. 2005; Bor et al. 2006; Ferlin et al. 2007).

### ***1.III.3.2. Delezioni parziali***

**Delezione gr/gr:** è la delezione parziale AZFc più rilevante da un punto di vista clinico. Essa è così chiamata dal colore delle sonde fluorescenti (verdi, "g"= *green* e rosse, "r"=*red*) che furono utilizzate da Repping e collaboratori per definire gli ampliconi coinvolti nel meccanismo di NAHR responsabile dell'alterazione specifica (Repping et al. 2003). La delezione gr/gr può generarsi per ricombinazione di g1 con g2, r1 con r3 e r2 con r4 oppure in seguito ad un'iniziale inversione della regione compresa tra gli ampliconi b3 e b4 della regione AZFc e successiva ricombinazione di g1 con g3, r1 con r4 e r2 con r3. In seguito a NAHR dovuto all'appaiamento di uno delle suddette coppie di ampliconi, è rimosso approssimativamente metà del contenuto genico della regione AZFc. Nello specifico, sono eliminate 1,6 Mb che comprendono 9 copie geniche e unità trascrizionali tra cui due copie di *DAZ* e una copia di *CDY1* con possibili conseguenze sul normale andamento della spermatogenesi. Questa delezione è, infatti, considerata uno dei più importanti fattori di rischio per l'alterata spermatogenesi conferendo, in accordo a cinque meta-analisi e ad un ampio studio multietnico, un aumento del rischio di ridotta qualità spermatica di 2-2.5 volte (Tüttelmann et al. 2007; Visser et al. 2009; Navarro-Costa et al. 2010b; Stouffs et al. 2011; Rozen et al. 2012; Bansal et al. 2016). L'entità del rischio varia tra le diverse popolazioni mostrando valori più elevati nell'area Mediterranea. Infatti, il rischio più alto (con valore pari a circa 8) è stato ritrovato nella popolazione Italiana (Ferlin et al. 2005; Giachini et al. 2005, 2008). La delezione gr/gr è

associata ad un fenotipo seminale altamente variabile: da azoospermia a normozoospermia, con una frequenza significativamente più alta nei soggetti oligozoospermici. A lungo sono state ricercate motivazioni che potessero spiegare tale variabilità fenotipica, ma sfortunatamente, ancora oggi, non si dispone di elementi molecolari adeguatamente esplicativi. Dalla lettura si evince, comunque, come il *background* del cromosoma Y, il tipo di copia genica rimasta e il dosaggio genico siano stati particolarmente oggetti di studio in tal senso.

Sembra che la struttura del cromosoma Y giochi un ruolo importante nella manifestazione clinica della delezione gr/gr in alcune popolazioni Asiatiche. In Corea la delezione gr/gr è associata ad alterata spermatogenesi solo nei pazienti appartenenti all'aplogruppo YAP- (Choi et al. 2012). La delezione gr/gr non sembra invece influenzare negativamente la fertilità maschile in quei soggetti il cui cromosoma Y appartiene all'aplogruppo D2b1 o Q1, comuni in Giappone e in alcune aree della Cina (de Carvalho et al. 2006; Sin et al. 2010; Bansal et al. 2016 e *references* in esso contenuto). Entrambi gli aplogruppi hanno tale delezione parziale fissata in modo costitutivo inducendo vari autori a sostenere la possibilità della presenza di fattori compensatori specifici dei suddetti aplogruppi (Wu et al. 2007; Sin et al. 2010; Yang et al. 2008a, b, 2010; Navarro-Costa et al. 2010b). Anche se la delezione rimuove metà del contenuto genico AZFc, la delezione gr/gr può avere più punti di rottura per il coinvolgimento nella NAHR di coppie ampliconiche diverse. Pertanto, la rimozione di copie geniche differenti ha reso possibile ipotizzare che la variabilità fenotipica seminale legata alla delezione gr/gr potesse dipendere dalle copie geniche rimaste a livello della regione AZFc. Infatti, vari studi hanno riportato che la coppia *DAZ1/DAZ2* (e in alcuni articoli *CDY1a*) sono specificatamente o prevalentemente rimossi nei pazienti con alterata spermatogenesi rispetto ai pazienti normozoospermici (Fernandes et al. 2002; Ferlin et al. 2005; Giachini et al. 2005, 2008; Yang et al. 2008a, 2010; Li et al. 2013; Wang et al. 2016). Tuttavia, tali risultati sono discordanti con quelli ottenuti, nel 2009, sulla più ampia coorte di soggetti provenienti dall'Europa Occidentale in cui una simile distribuzione delle varie copie di *DAZ* e *CDY1* delete è stata ritrovata tra i soggetti con normale e alterata spermatogenesi, entrambi con delezione gr/gr (Krausz et al. 2009).

Infine, poiché alcune delezioni gr/gr sono seguite da una o più duplicazioni, è stato proposto che il numero di copie geniche ottenute in seguito a tale combinazione di riarrangiamenti potrebbero essere un altro fattore che modula il fenotipo seminale della delezione gr/gr. Anche in tale caso, i risultati riscontrati in letteratura sono contrastanti: la delezione gr/gr, seguita da un evento di duplicazione che ripristina il normale dosaggio genico, è associata al raggiungimento del valore fisiologico della conta totale degli spermatozoi mobili o a una riduzione della produzione di spermatozoi rispettivamente nella popolazione Olandese o Europea (Noordam et al. 2011; Krausz et al. 2009). In linea con il risultato ottenuto dal lavoro svolto da Krausz e collaboratori secondo i quali il singolo evento di duplicazione che segue la delezione gr/gr ha un effetto negativo sulla spermatogenesi, è stato pubblicato un recente studio. Da questo è stato possibile rilevare che se alla



delezione gr/gr fanno seguito duplicazioni multiple, il rischio di alterazione della conta spermatica è più alto rispetto a quello indotto dalla delezione gr/gr isolata (rispettivamente. OR 2.596, 95% CI 1.107- 6.085 e OR 1.699, 95% CI 1.315-2.194). I risultati suggeriscono quindi che molteplici duplicazioni in seguito a delezione parziale possono produrre un effetto negativo sulla spermatogenesi più forte rispetto alla sola delezione gr/gr (Yang et al. 2015).

A questo tipo di delezione parziale è inoltre attribuito il ruolo di fattore di rischio per la patogenesi dei TTCG, come descritto nel paragrafo 1.II..

**Delezioni b2/b3 e b1/b3:** oltre alla delezione gr/gr, altre due delezioni parziali, b2/b3 e b1/b3, sono state oggetto di numerosi studi. La prima rimuove 1.8 Mb in seguito ad inversione della regione compresa tra gli ampliconi b2 e b3 e successivo appaiamento di g1 e g3 oppure in seguito ad inversione della regione gr/gr con conseguente appaiamento degli ampliconi b2 e b3. La delezione b1/b3 rimuove 1.6 Mb in seguito a ricombinazione degli ampliconi b1 e b3. Entrambe le delezioni comportano la rimozione di 12 copie geniche e unità trascrizionali (una copia *CDY1* e due copie *DAZ* per b2/b3 e nessuna copia *CDY1* e due copie *DAZ* per b1/b3) e sembrano non avere un effetto significativo sulla spermatogenesi (Repping et al. 2004; Bansal et al. 2016 e *references* in esso contenute; Rozen et al. 2012). Fanno eccezione le popolazioni Cinese, Marocchina e sud Indiana dove la delezione b2/b3 mostra una forte associazione con l'infertilità maschile (Wu et al. 2007; Lu et al. 2009, 2014; Eloualid et al. 2012; Vijesh et al. 2015). Poco è noto dell'effetto della delezione b1/b3 a causa della sua bassa frequenza. Tuttavia l'analisi di 20,000 cromosomi Y rilevò che essere portatori di tale delezione parziale, comporterebbe un aumento del rischio di sviluppare una severa alterazione della spermatogenesi di 2.5 volte (Rozen et al. 2012).

### ***1.III.3.3. Duplicazioni parziali***

Il NAHR intercromatidico, contemporaneamente alla perdita di materiale genetico a livello di uno dei due cromatidi fratelli, può determinare l'acquisto dello stesso materiale deleto da parte dell'altro cromatide. Ogni tipo di delezione può avere, quindi, la sua controparte di duplicazione che sarà della stessa lunghezza della delezione.

Le domande su un potenziale effetto deleterio sulla spermatogenesi di un aumentato dosaggio genico AZFc, sono state proposte sulla base del fatto che il numero di copie dei geni a livello di tale regione mostra una limitata variabilità inter-individuale. Questo indicherebbe una selezione naturale volta a conservare il numero di copie ottimale mediante la rimozione, dalla popolazione, di un numero di copie geniche estremamente alto o basso (Repping et al. 2006). Studi nelle popolazioni cinesi Han e Yu, hanno riportato un'associazione tra l'incremento del dosaggio genico della regione AZFc e infertilità (Lin et al. 2007; Ye et al. 2013; Yang et al. 2015). Allo stesso modo, Noordam e collaboratori (2011), studiando una coorte multi-etnica di pazienti Olandesi, hanno suggerito che un dosaggio più alto di *DAZ* potrebbe essere deleterio per la spermatogenesi. Questa associazione non è stata riscontrata nelle popolazioni Italiana e Spagnola dove la frequenza delle duplicazioni in

pazienti con alterata spermatogenesi e controlli normozoospermici era simile (Giachini et al. 2008; Lo Giacco et al. 2014). Rimane da chiarire se questa differenza abbia delle spiegazioni biologiche/molecolari.

#### **1.IV. TOSSICITÀ GONADICA SECONDARIA ALLA TERAPIA ANTIPROLIFERATIVA NEI PAZIENTI CON TUMORE TESTICOLARE**

I trattamenti antiproliferativi (chemioterapia e radioterapia), utilizzati nella terapia del paziente neoplastico, causano molto spesso danni iatrogeni e tossicità a carico di diversi organi e apparati (Bonadonna et al. 2007). La disfunzione gonadica è una delle conseguenze più comuni del trattamento antitumorale ed è caratterizzata principalmente da alterazione della funzione riproduttiva, la quale si manifesta con un temporaneo o permanente danneggiamento della spermatogenesi (Bonadonna et al. 2007; Suzuki et al. 2013).

La tossicità chemio/radioterapica a livello della gonade maschile è spiegabile dal meccanismo di azione di questi trattamenti. Il termine stesso “antiproliferativo” indica uno stretto rapporto tra ciclo cellulare e azione citotossica (Bonadonna et al. 2007), infatti, la quasi totalità dei farmaci utilizzati è tossica su cellule in ciclo mitotico. Gli spermatogoni e gli spermatociti (cellule pre-meiotiche) sono i più sensibili al danno indotto dal trattamento (Gandini et al. 2006), in quanto sono cellule ad alto indice mitotico. Quando queste subiscono un danno nucleare, vanno incontro ad apoptosi con conseguente blocco della cascata spermatogenetica (Gandini et al. 2006). L’arresto della spermatogenesi spiega l’assenza o la riduzione degli spermatozoi, evidenziabile attraverso l’analisi del liquido seminale non prima di tre mesi dalla fine della terapia. Tre mesi sono, infatti, necessari per il completamento di un ciclo spermatogenetico (72 giorni) e per la maturazione degli spermatozoi nell’epididimo (12 giorni) (Bujan et al. 2013).

Vari sono i fattori che possono influenzare la tossicità gonadica (Tabella 3). In relazione al trattamento chemioterapico, la somministrazione di agenti alchilanti o di derivati del platino è associata ad un maggior rischio di indurre alterazione della spermatogenesi (Longhi et al. 2003; Simon et al. 2005). Inoltre, è noto che la dose cumulativa del farmaco ha un effetto nocivo maggiore rispetto alla dose singola ed è importante considerare l’effetto additivo dei singoli farmaci, siano essi impiegati in regimi combinati o associati a radioterapia. In questi ultimi casi, una dose inferiore dello stesso farmaco può determinare tossicità analoga a quella raggiungibile in monoterapia (Bonadonna et al. 2007). In generale, se la dose cumulativa citostatica non supera un determinato livello, oltre il quale l’azoospermia si manifesterebbe in modo permanente, è possibile il recupero della spermatogenesi. In tal senso, è di centrale importanza il numero di spermatogoni sopravvissuti al trattamento e la loro capacità proliferativa e differenziativa (Trottmann et al. 2007). Per quanto riguarda la terapia radiante, le variabili capaci di condizionare la gonadotossicità sono

GRUPPO	AGENTI (dose cumulativa chemioterapico per avere l'effetto o dose radioterapia)	MODALITÀ D'AZIONE	GRADO DI GONADOTOSSICITÀ
Agenti alchilanti	Clorambucil (1.4 g/m <sup>2</sup> )	Aggiungono gruppi alchilici al DNA che ne alterano la struttura e la funzione	Azoospermia prolungata
	Ciclofosfamide (19 g/m <sup>2</sup> )		Azoospermia nell'età adulta dopo trattamento in età prepuberale
	Procarbazine (4 g/m <sup>2</sup> )		
	Melphalan (140 mg/m <sup>2</sup> )		
	BCNU (carmustina) (1 g/m <sup>2</sup> )		
CCNU (lomustina) (500 mg/m <sup>2</sup> )	Busulfano (600 mg/m <sup>2</sup> )	Azoospermia probabile, in genere data da altri agenti altamente sterilizzanti associati	
Ifosfamide (42 g/m <sup>2</sup> )			
Complessi di coordinazione del platino	Cisplatino (500 mg/m <sup>2</sup> )	Formano ponti intra- e interfilamento al DNA, con conseguente rottura dell'acido nucleico	Azoospermia prolungata
	Carboplatino (2 g/m <sup>2</sup> )		Azoospermia prolungata non sempre osservata a questa dose
Miscellanei	Prednisone	Inibiscono la sintesi di RNA	Improbabile che riduca la produzione spermatica
	Interferone $\alpha$	Stimola i macrofagi e le cellule NK	Nessun effetto sulla produzione spermatica
Antibiotici	Actinomicina D	Lega il DNA inibendo la sintesi di RNA	Azoospermia probabile, in genere data da altri agenti altamente sterilizzanti associati
	Doxorubicina (adriamicina) (700 mg/m <sup>2</sup> )	Interferisce con la topoisomerasi II	Tossicità additiva con i farmaci sopra nel determinare azoospermia prolungata; se non combinati con i farmaci sopra, causano solo una riduzione della conta spermatica
	Bleomicina	Provoca rottura del DNA a singolo e doppio filamento	Riduzione temporanea nella conta spermatica alla dose usata negli schemi convenzionali, ma sono possibili effetti additivi
Antimetaboliti	Fluorouracile	Analogo delle pirimidine	Riduzione temporanea nella conta spermatica alla dose usata negli schemi convenzionali, ma sono possibili effetti additivi
	6-mercaptipurina	Analogo delle purine	
	Tioguanina	Analogo delle purine	
	Metotrexate	Antifolato	
Derivati di origine vegetale	Vincristina (8 g/m <sup>2</sup> )	Inibiscono la formazione di microtubuli	Tossicità additiva con i farmaci sopra nel determinare azoospermia prolungata; se non combinati con i farmaci sopra, causano solo una riduzione della conta spermatica
	Vinblastina (50 g/m <sup>2</sup> )		
	Etoposide	Inibisce l'attività della topoisomerasi II	Riduzione temporanea nella conta spermatica alla dose usata negli schemi convenzionali, ma sono possibili effetti additivi
Radioterapia (irradiazione diretta)	0.15-0.35Gy	Danni a livello del DNA	Oligozoospermia
	0.35-0.5Gy		Azoospermia reversibile
	≥ 1.2Gy		Ridotto recupero della spermatogenesi
	> 6Gy		Azoospermia irreversibile

Tabella 3 - Effetto dei differenti trattamenti chemio e radioterapici sulla produzione spermatica (Del Mastro et al. 2016; Sabanegh et al. 2009).

rappresentate da: la fonte radioattiva utilizzata, l'irradiazione diretta o diffusa, la dose totale applicata, il numero e la durata del frazionamento oltre che dalle variabili individuali (Trottmann et al. 2007; Del Mastro et al. 2016). Diversamente da altri organi, infatti, dove il frazionamento della radiazione riduce il danno collaterale, nell'epitelio germinale del testicolo la radiazione frazionata in 3-7 settimane causa un danno gonadico maggiore rispetto alla somministrazione di una singoladose. Danni irreversibili possono presentarsi già a una dose maggiore di 2.5Gy se la radioterapia è frazionata (Trottmann et al. 2007).

Ad oggi, predire quale sia l'effetto del singolo trattamento sulla fertilità del singolo paziente comporta ampie aree di incertezza dovute, oltre che dalla dose e posologia del trattamento impiegato anche da una elevata variabilità individuale (Del Mastro et al. 2016). Dato questo, e dato che più del 50% degli uomini con cancro esprime il desiderio di preservare la propria fertilità in futuro (Sabanegh et al. 2009), la crioconservazione del seme rappresenta, ad oggi, una strategia efficace di preservazione della fertilità. Essa dovrebbe pertanto essere offerta a tutti gli uomini prima di iniziare i trattamenti potenzialmente gonadotossici.

Diversi studi scientifici hanno analizzato gli effetti del trattamento chemio- e radioterapico sui parametri seminali di uomini colpiti da tumore del testicolo che rappresenta il primo tipo di tumore più comune negli uomini in età riproduttiva (Sabanegh et al. 2009).

#### **1.IV.1. Effetti della terapia antiproliferativa sui parametri seminali**

In letteratura si annoverano circa 20 pubblicazioni in cui è stato analizzato l'effetto delle terapie citostatiche sulla qualità del liquido seminale in pazienti con tumore testicolare. Il quadro che emerge dai vari lavori è sostanzialmente concorde nel ritenere che già prima della terapia citostatica i parametri seminali dei pazienti con questa tipologia di tumore risultino in media ridotti rispetto a quelli della popolazione generale. Ad esempio, i lavori svolti da Di Bisceglie, Karpman e Bahadur con i corrispettivi gruppi di ricerca, sottolineano come in fase pre-trattamento nei tumori testicolari la concentrazione di spermatozoi nell'eiaculato risulti inferiore rispetto a quella riscontrabile sia in individui sani che in pazienti con neoplasie ematologiche (Di Bisceglie et al. 2013; Karpman et al. 2009; Bahadur et al. 2005). Un lavoro del 2016 mostra invece come i parametri seminali siano ridotti rispetto alla norma sia nei tumori testicolari che negli ematologici (Caponecchia et al. 2016). Anche nello studio di Bujan e collaboratori, la qualità seminale pre-trattamento ( $T_0$ ) del gruppo TTCG risultava significativamente ridotta rispetto ai valori di normalità (in particolare del volume dell'eiaculato, della concentrazione e del numero totale di spermatozoi) (Bujan et al. 2013). Diversi fattori sono stati proposti come possibile causa di tale alterazione pre-trattamento: storia positiva di criptorchidismo (Virtanen et al. 2007), orchietomia (Rives et al. 2012) e sindrome di disgenesia testicolare (Skakkebaek et al. 2001).

Relativamente all'orchietomia, però, la letteratura riporta anche evidenze secondo cui non vi siano delle differenze significative della qualità spermatica prima e dopo l'operazione (Fraietta et al. 2010). In merito alla disgenesia testicolare essa è una sindrome definita dalla presenza contemporanea di almeno due delle seguenti caratteristiche: alterazione dei parametri seminali, criptorchidismo, ipospadia e tumore del testicolo. Pertanto, essa è stata considerata la causa più strettamente correlata all'alterazione seminale antecedente il trattamento nei pazienti con tumore del testicolo.

È noto come le terapie citostatiche impiegate in campo oncologico risultino tossiche a livello gonadico. Diversi autori concordano nel ritenere che le variabili più importanti, per il recupero della spermatogenesi, siano il tipo di trattamento e la dose cumulativa chemioterapica o radioterapica

utilizzata, seguendo l'intuitivo ragionamento che più alta è la dose e meno probabile sarà il recupero (Drasga et al. 1983). Come detto in precedenza, il maggior rischio di effetti gonadotossici è associato agli agenti alchilanti e ai derivati del platino (Del Mastro et al. 2016).

Drasga e collaboratori (1983) riportano che un danneggiamento irreversibile della spermatogenesi si verifica con una dose cumulativa di cisplatino maggiore di 400 mg/m<sup>2</sup>. Hansen (1990) e Petersen (1994) con i rispettivi gruppi di ricerca ritengono, invece, che il rischio di azoospermia post-terapia aumenta quando la dose cumulativa di cisplatino è maggiore di 600mg/m<sup>2</sup>.

Un altro studio ha indagato sul recupero della spermatogenesi in 49 pazienti affetti da tumore del testicolo, trattati tutti con almeno un ciclo di PEB (Suzuki et al. 2013). Quarantacinque individui hanno ricevuto solamente lo schema terapeutico PEB (17 pazienti 1-2 cicli, 10 pazienti 3 cicli, 12 pazienti 4 cicli, 6 pazienti 5-6 cicli), mentre 4 pazienti sono andati incontro anche ad una chemioterapia ad alte dosi (HDC) in una fase successiva. In 25 pazienti è stata eseguita l'analisi di controllo dopo un anno dalla conclusione della terapia (T<sub>1</sub>). Tutti i pazienti trattati con 1-2 cicli di PEB mostravano un pieno recupero della spermatogenesi, mentre nei pazienti trattati con più cicli si assisteva ad una minore percentuale di recupero, che raggiungeva lo 0% in quelli trattati con 5-6 cicli. Dopo 2 anni (T<sub>2</sub>) il tasso di recupero della spermatogenesi era dell'83.3%, dell'80% e del 66.7% e dello 0% nei pazienti rispettivamente sottoposti a 1-2, 3, 4 e 5-6 cicli di PEB. Al termine del *follow-up*, durato 7 anni, un solo soggetto dei 45 pazienti trattati con solo regime PEB non ha recuperato la spermatogenesi. L'individuo in questione, normozoospermico al T<sub>0</sub>, ha ricevuto 6 cicli di PEB, con una dose totale di cisplatino di 559 mg/m<sup>2</sup>.

In conclusione, anche questo studio conferma che più è alta la dose di chemioterapico, in particolare del cisplatino, maggiore è l'intervallo di tempo necessario per recuperare la spermatogenesi dal termine della terapia.

In quest'ambito si pone inoltre nuovamente il lavoro che Bujan e collaboratori hanno pubblicato nel 2013: si tratta di uno studio prospettico su 129 pazienti con tumore testicolare a cellule germinali (ITCG) che hanno crioconservato il seme prima dell'inizio della terapia adiuvante (T<sub>0</sub>). In esso vengono valutate le differenze a carico dei parametri seminali ai vari tempi di *follow-up*: a 3 (T<sub>3</sub>), 6 (T<sub>6</sub>), 12 (T<sub>12</sub>) e 24 (T<sub>24</sub>) mesi dalla fine della terapia. Su 129 soggetti reclutati, 67 pazienti con Seminoma puro sono stati trattati con radioterapia adiuvante. I rimanenti 62, di cui 3 con Seminoma puro e 59 con Seminoma misto o Non-seminoma, sono stati sottoposti a chemioterapia con protocollo PEB: 17 pazienti ne hanno ricevuto 1 o 2 cicli (gruppo < 2 cicli), mentre 45 pazienti 3-4 cicli (gruppo > 2 cicli).

A distanza di tre mesi dal trattamento (T<sub>3</sub>) tutti i 3 gruppi di pazienti (< 2, > 2 cicli, radioterapia) presentano una riduzione significativa dei principali parametri seminali (concentrazione, numero totale e motilità): il calo permane anche al tempo T<sub>6</sub> nel gruppo trattato con radioterapia. Le caratteristiche del seme tornavano a valori pre-trattamento dopo 12 mesi (T<sub>12</sub>) dalla fine della terapia solamente nel gruppo < 2 cicli, mentre erano necessari 24 mesi (T<sub>24</sub>) negli altri due gruppi.

In particolare, il recupero della normozoospermia è stato ottenuto, dopo due anni dalla fine del trattamento, nel 92% dei pazienti sottoposti a 1-2 cicli di PEB, nel 63% dei pazienti con 3-4 cicli e nell'86% di soggetti trattati con radioterapia.

Anche il lavoro di Gandini e collaboratori del 2006 riscontrava un calo della produzione spermatica di più lunga durata (6 mesi) nel gruppo di pazienti con T<sub>0</sub>TCG trattato con radioterapia, rispetto a quello sottoposto a regime chemioterapico (ripresa parziale della spermatogenesi dopo 6 mesi dalla fine del trattamento) (Gandini et al. 2006). Le ragioni di questo decadimento graduale non sono bene conosciute, ma è stato ipotizzato che gli spermatogoni che non si trovano in ciclo cellulare durante l'irradiazione, esprimano il danno subito solamente a posteriori, quando effettivamente iniziano a proliferare (Meistrich et al. 2013).

Oltre alla tipologia di trattamento, non vi è ad oggi certezza in letteratura se vi siano fattori predittivi per il recupero della spermatogenesi post-terapia. Relativamente alla correlazione fra qualità seminale pre-trattamento e recupero dell'attività spermatogenetica, gli studi scientifici forniscono, infatti, risultati contrastanti. Tra questi si colloca il sopracitato studio di Bujan e collaboratori, che si proponeva anche di individuare quali parametri a T<sub>0</sub> potessero essere predittivi per un recupero post-trattamento della spermatogenesi (indipendentemente dalla terapia). A tale scopo, i pazienti sono stati classificati in base ai valori spermatici al T<sub>0</sub> ( $\geq 39 \times 10^6$  spermatozoi/eiaculato *versus*  $\leq 39 \times 10^6$  spermatozoi/eiaculato). Fu osservato che, indipendentemente dalla terapia, coloro che avevano valori di spermatozoi/eiaculato maggiori (primo gruppo) presentavano un 89% di probabilità di recupero della spermatogenesi, contro il 61% del secondo gruppo.

In conclusione, quindi, lo studio di Bujan, oltre a sottolineare la stretta dipendenza vigente tra il recupero della produzione spermatica e il tempo trascorso dalla fine del trattamento, evidenzia come sia il tipo di terapia che la qualità del liquido seminale al T<sub>0</sub> possano essere considerati fattori predittivi per il recupero della spermatogenesi. Il lavoro di Lampe e collaboratori sembrerebbe andare nella stessa direzione, evidenziando come essere normozoospermici al T<sub>0</sub> aumenti la probabilità di recuperare la spermatogenesi dopo la terapia. Di contro, dai risultati di Gandini e del suo gruppo di ricerca non è emersa alcuna correlazione fra parametri seminali pre-trattamento e il recupero della spermatogenesi.

In generale, è quindi capibile come sia difficile poter stabilire a priori quali pazienti diventeranno azoospermici e quali invece, recupereranno la spermatogenesi dopo il trattamento, pur essendo nota la qualità seminale di partenza dei pazienti (Ishikawa et al. 2004). Questo parametro dipende, infatti, da una larga variabilità interindividuale e, per molti pazienti, si presenta compromesso già al T<sub>0</sub> (Ishikawa et al. 2004).

### **1.IV.2. Effetti della terapia antiproliferativa sull'integrità genomica degli spermatozoi**

Ad oggi, rimane ancora una questione dibattuta, se il DNA degli spermatozoi di uomini sopravvissuti al cancro sia maggiormente portatore di anomalie strutturali responsabili di un aumento del rischio di malattie genetiche o di anomalie cromosomiche nella progenie. Numerosi studi (Kenney et al. 1996; Martin et al. 1997; Meistrich et al. 2002; Winther et al. 2004), escludono una tale prospettiva, anche se è doveroso tener presente che molti di questi lavori coinvolgevano un numero di campioni piuttosto scarso, se non addirittura singoli casi (Tempest et al. 2008). Di contro, lo studio di Ståhl e collaboratori ha riscontrato una maggiore suscettibilità ad anomalie congenite nella progenie di uomini sopravvissuti al cancro (Ståhl et al. 2011). In tale lavoro sono stati inclusi 8.670 figli di padri con storia di tumore, dei quali 8.162 sono stati concepiti naturalmente, mentre 508 tramite ART. La popolazione di controllo era invece costituita da 17.690.795 figli senza una storia paterna di tumore, 25.926 di essi sono stati concepiti utilizzando tecniche di fecondazione medicalmente assistita. Venne osservato che i figli di uomini sopravvissuti al tumore, avevano un rischio di sviluppare anomalie congenite di una volta superiore rispetto ai figli appartenenti al gruppo di controllo (OR 1.17, 95% CI 1.05-1.31). Inoltre, poiché la modalità di fecondazione (naturale o tramite ART) non modificava l'associazione tra storia paterna di cancro e rischio di anomalie congenite, gli autori conclusero che un significativo, ma modesto incremento del rischio di anomalie congenite era attribuibile ai figli di uomini sopravvissuti al cancro indipendentemente dal modo del loro concepimento (Ståhl et al. 2011).

Da questo risultato ne deriva, quindi, la necessità di stabilire quali siano i danni a lungo termine indotti dai trattamenti citotossici al DNA degli spermatozoi che potrebbero essere trasmessi alla progenie e per quanto tali danni perdurano nel tempo. Questo darebbe la speranza di poter fornire al paziente la certezza di concepire un figlio che non risenta delle alterazioni indotte dalle terapie utilizzate contro il tumore. Pertanto, recuperare la fertilità maschile in seguito al trattamento antiproliferativo, significa non solo ripristinare i parametri seminali, ma anche riacquisire un'adeguata qualità spermatica. Quest'ultima si traduce, prevalentemente, in termini d'integrità nucleare degli spermatozoi (Virro et al. 2004; Evenson et al. 1999; Spano et al. 2000; O'flaherty et al. 2008, 2010).

L'integrità nucleare è considerata, infatti, uno dei requisiti necessari per determinare una corretta capacità fertilizzante maschile (Delbès et al. 2010). Il rischio paventato è che lo spermatozoo con DNA danneggiato, pur riuscendo in alcuni casi a fertilizzare l'ovocita (Ahmadi et al. 1999), non sia in grado di supportare l'impianto, il mantenimento, il corretto sviluppo embrionale e la nascita di progenie sana (Zini et al. 2008). Alcuni studi condotti su modelli animali confermano la maggior probabilità di perdere la gravidanza, se le femmine sane di ratto sono fatte accoppiare con ratti maschi, precedentemente trattati con agenti chemioterapici (Bieber et al. 2006; Vaisheva et al. 2007; Marcon et al. 2008).

Tra i danni nucleari indotti dai trattamenti antiproliferativi si annoverano le aneuploidie, le alterazioni strutturali cromosomiche, le anomalie nella struttura cromatinica e la frammentazione del DNA. Quest'ultima si presenta come rottura di un singolo o di entrambi i filamenti della doppia elica e può verificarsi nella cellula germinale in diverse fasi maturative: dagli spermatogoni mitotici agli spermatidi post-meiotici, fino agli spermatozoi durante il processo maturativo nell'epididimo (Delbès et al. 2010).

Numerose sono le tecniche, sviluppate nelle ultime due decadi, in grado di determinare l'integrità genomica come ad esempio la metodica FISH (*Fluorescent in situ hybridization*) per valutare le aberrazioni cromosomiche, i saggi Tunel (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling*) e Comet (*Single-cell gel electrophoresis assay*) per determinare le rotture dei filamenti di DNA, l'analisi citofluorimetrica SCSA (*Sperm chromatin structure assay*), che valuta in modo indiretto la struttura della cromatina ed infine i saggi CMA3 (*Chromomycin A3 staining*) e mBBr (*Monobromobimane*) che misurano la protaminazione e la compattazione cromatinica (Delbès et al. 2010). È proprio attraverso l'utilizzo di queste metodiche, che alcuni autori hanno potuto determinare nei loro studi, seppure con esiti differenti, la qualità del genoma spermatico sia prima che dopo l'inizio del trattamento antitumorale.

#### ***1.IV.2.1. Qualità del DNA spermatico pre-trattamento***

In letteratura i lavori che hanno valutato la qualità del DNA spermatico nei pazienti con T<sup>T</sup>TCG prima di iniziare la terapia si dividono in due correnti di pensiero opposte: alcuni ritengono, infatti, che la presenza di T<sup>T</sup>TCG già determini alterazioni dell'integrità genomica, indipendentemente dalla somministrazione del trattamento; altri, sostengono, invece, di non aver riscontrato tale associazione nella propria popolazione di studio.

Nello specifico, lavori che hanno utilizzato l'analisi citofluorimetrica SCSA o il saggio Tunel al fine di valutare il parametro DFI (*DNA Fragmentation Index*) in pazienti affetti da T<sup>T</sup>TCG prima dell'inizio della terapia antitumorale, non hanno individuato una percentuale di spermatozoi suscettibile a denaturazione (indice di moderata e alta frammentazione del DNA) significativamente maggiore rispetto ad una popolazione di controllo (Smith et al. 2010; Ribeiro et al. 2008). Di contro, altri lavori non hanno confermato tale risultato. Quest'ultimi, infatti, individuarono tramite saggio Comet, nei pazienti con T<sup>T</sup>TCG rispetto alla popolazione di controllo, un aumento delle rotture del DNA a singolo/doppio filamento e dei valori medi del parametro DFI e DFI+HDS (*High DNA Stainability*, percentuale di spermatozoi con cromatina immatura) e una diminuzione nei livelli di protaminazione e di compattazione della cromatina determinate rispettivamente con analisi CMA3 e mBBr (O'flaherty et al. 2008; Bujan et al. 2013).

Nonostante i risultati di non univoca interpretazione, numerosi autori ritengono che i meccanismi che generano alterazioni nucleari pre-trattamento, siano gli stessi che determinano la diminuzione dei parametri seminali come: febbre (Marmor et al. 1986; Evenson et al. 2000), stress (Fenster et al.



1997; Zorn et al. 2008), endocrinopatie e meccanismi infiammatori immuno-mediati (Barr et al. 1993; Costabile et al. 1998).

#### **1.IV.2.2. Qualità del DNA spermatico post-trattamento**

Anche i dati relativi alla presenza di eventuali danni al DNA spermatico indotti dal trattamento citotossico sono, tuttora, fonte di ampio dibattito.

Per quanto concerne le alterazioni cromosomiche, il confronto, tra prima e dopo la terapia, della frequenza di aneuploidie individuate tramite FISH negli spermatozoi di pazienti affetti da tumore testicolare, ha permesso di individuare un aumento di tale frequenza per i cromosomi 13, 16, 18, 21, X e Y a seguito di chemioterapia (PEB). Il valore risultava particolarmente aumentato al T<sub>6</sub>, con una graduale riduzione intorno al T<sub>18</sub> (De Mas et al. 2001; Tempest et al. 2008). Questo risultato non è in accordo con quello di altri studi che negano l'esistenza di una maggiore frequenza di aneuploidie in seguito a trattamento citostatico (Martin et al. 1997; Thomas et al. 2004).

Relativamente al livello di frammentazione del DNA spermatico di pazienti affetti da tumore testicolare a cellule germinali, dalla letteratura si evince che, dopo 6 mesi dalla fine della terapia, il danno al DNA risultava significativamente più elevato rispetto al valore di partenza (O'flaherty et al. 2010; Bujan et al. 2013). Tale danno permaneva elevato nella finestra di tempo 18-24 mesi (O'flaherty et al. 2010). Gli studi che non confermavano l'associazione tra somministrazione della terapia citostatica e riduzione statisticamente significativa dell'integrità cromatinica di tale categoria di pazienti, individuarono comunque che il trattamento con radioterapia o con combinazione radio-chemioterapia determinavano un danno spermatico maggiore rispetto al singolo protocollo chemioterapico PEB (Smith et al. 2010; Bujan et al. 2013). Tale danno raggiungeva il valore massimo a 6 mesi, ma si manteneva comunque alto ai vari tempi di *follow-up* (3, 6, 12 e 24 mesi) (Bujan et al. 2013).

Le discrepanze che si osservano negli studi sopracitati potrebbero essere riconducibili a differenze: nei trattamenti terapeutici, nei protocolli di *follow-up*, nei metodi utilizzati per la ricerca dei parametri oltre che dal relativo basso numero di pazienti studiati.

È inoltre opportuno notare che purtroppo, la letteratura fornisce dati relativi agli effetti sul DNA spermatico indotti dal trattamento citotossico fino a due anni di *follow-up*. Sarebbe pertanto necessario allungare tale periodo di controllo al fine di poter determinare il momento in cui gli spermatozoi ritorneranno liberi dai danni indotti dai trattamenti contro il tumore.

#### **1.IV.3. Effetti della terapia antiproliferativa sull'instabilità genomica degli spermatozoi**

Il genoma umano è costituito, per circa il 3%, da sequenze di 1-6 paia di basi ripetute in tandem per decine o anche centinaia di volte, chiamate microsatelliti o STR (*Short Tandem Repeat*), distribuite omogeneamente su tutti i cromosomi. L'uno per cento della sua lunghezza è, invece, occupata da

circa 30,000 minisatelliti, altrimenti detti VNRT (*Variable Number of Tandem Repeats*), la cui unità ripetuta è compresa fra 10 e 100bp, concentrati prevalentemente nelle regioni subtelomeriche.

I micro- e i minisatelliti sono relativamente stabili nella trasmissione intergenerazionale ma rappresentano polimorfismi di lunghezza per quanto riguarda la popolazione generale. La loro variabilità di lunghezza deriva da errori nella replicazione del DNA, attraverso un meccanismo definito *replication slippage*, che determina l'aggiunta o la perdita di alcune unità dall'insieme di ripetizioni in tandem (Neri and Genuardi 2010). Quando il numero di ripetizioni varia rispetto al valore di riferimento a causa della mancata riparazione degli errori che avvengono durante la replicazione del DNA da parte del sistema *mismatchrepair* (MMR), si parla d'instabilità dei micro- e minisatelliti.

È stato ipotizzato che tale instabilità potesse essere il risultato di eventi perturbanti come i trattamenti antitumorali e che pertanto l'analisi della variazione del numero di unità ripetute in tandem potesse essere un possibile approccio per lo studio degli effetti di tali trattamenti sull'instabilità genomica degli spermatozoi. La valutazione dell'instabilità dei microsatelliti (MSI) rappresenta il metodo di elezione, poiché questa classe di sequenze ripetute è frequente nel genoma di molti eucarioti, presenta il grosso vantaggio di essere distribuita uniformemente nell'intero genoma ed è costituita da unità di piccole dimensioni. Tuttavia abbiamo a disposizione pochi studi in tal senso, tutti su modelli animali. Il più recente tra questi ha stabilito l'utilità di un microsatellite per studiare le mutazioni che insorgono in seguito all'esposizione a sostanze chimiche nelle cellule germinali di topo (Beal et al. 2015). Sono stati screenati 24 microsatelliti, individuando il locus Mm2.2.1 come uno dei microsatelliti più polimorfico. Al fine di determinare se questo locus potesse essere utile per identificare le mutazioni germinali indotte da sostanze chimiche, i topi maschi sono stati trattati o con una singola dose orale di 100 mg/kg di N-etil-N-nitrosourea (ENU), un prototipo di mutageno delle cellule germinali, o con 100 mg/kg di benzo(a)pirene (BaP), un inquinante ambientale, per 28 giorni. Lo studio rilevava una frequenza di mutazione aumentata di 2.3 volte negli spermatozoni dei topi esposti a BaP e di 2.4 volte negli animali esposti ad ENU, rispetto al gruppo di controllo. Fu, così, dimostrata l'utilità dell'analisi dei microsatelliti per determinare, nei topi, i cambiamenti nella frequenza di mutazione germinale che si manifesta negli spermatozoni dopo esposizione a sostanze chimiche.

Questi risultati hanno quindi gettato le basi per un possibile utilizzo della valutazione dell'instabilità dei microsatelliti allo scopo di determinare l'effetto del trattamento citotossico, diretto verso varie forme di tumore, sulla stabilità del genoma germinale anche di altri organismi come per esempio l'uomo sul quale, tuttora, non esistono studi a tale riguardo.

A sostegno della possibilità che le terapie antiproliferative potrebbero avere un effetto negativo sulla stabilità genomica nell'uomo, la letteratura riporta più lavori che hanno riscontrato un aumento di due volte del *rate* di mutazione dei minisatelliti nelle cellule germinali di uomini che sono stati esposti alle radiazioni del disastro di Chernobyl e dei loro figli nati in tale area (Dubrova

et al. 1996, 1997, 2003). Con queste evidenze, avvalorate da un lavoro su topi, è stato possibile attribuire ai minisatelliti un'elevata tendenza a mutare in risposta all'irradiazione (Jeffreys 1997) conferendo loro il titolo di possibile approccio per monitorare efficacemente le mutazioni e quindi l'instabilità genomica delle cellule germinali umane (Dubrova et al. 1998). Questo ci permetterebbe quindi di ipotizzare che così come i minisatelliti, anche i microsatelliti siano caratterizzati da una propensione a mutare in seguito a qualche evento capace di perturbare la fisiologia umana come la chemio- o la radioterapia.

#### **1.IV.4. Effetti della terapia antiproliferativa sull'epigenoma degli spermatozoi**

Ad oggi, i lavori che hanno focalizzato la loro attenzione sulle possibili alterazioni epigenetiche del genoma spermatico indotte da trattamento antitumorale, sono purtroppo pochi e oltretutto inconcludenti.

Il termine epigenoma definisce l'insieme di modifiche del materiale genetico, che avvengono senza cambiamenti della sequenza del DNA, che sono ereditabili e modulano l'espressione genica. Il meccanismo epigenetico più studiato è la metilazione del DNA, che consiste nell'aggiunta covalente di un gruppo metile alla quinta posizione dell'anello di citosina. Nel genoma dei mammiferi avviene nel 60-80% dei casi sui dinucleotidici CpG. Un *pattern* di metilazione del DNA corretto è un presupposto importante per diversi processi cellulari, tra i quali la repressione della trascrizione, l'inattivazione del cromosoma X e la stabilità cromatinica. Al contrario, una metilazione deregolata può indurre disordini dello sviluppo, d'*imprinting* e maggior rischio di insorgenza di tumore (Feinberg and Tycko 2004; Paulsen and Ferguson-Smith 2001).

Nelle cellule germinali, la metilazione del DNA è acquisita durante la vita fetale e si completa nel corso della spermatogenesi nella vita adulta (Oakes et al. 2007b). Alcuni studi, in modelli animali, mostrano l'importanza di un corretto pattern di metilazione del DNA per lo sviluppo delle cellule germinali maschili. Quando i geni codificanti gli enzimi DNA-metiltransferasi (DNMTs), la classe enzimatica in grado di aggiungere il gruppo metile al DNA, subiscono una modifica nella loro espressione, le cellule germinali perdono la corretta metilazione che si riflette, poi, in un fallimento della meiosi e della capacità fertilizzante (Kaneda et al. 2004; Webster et al. 2005; Yaman et al. 2006). Infatti, un anormale *pattern* di metilazione negli spermatozoi umani è stato riscontrato in uomini infertili e con bassa conta spermatica (Hammoud et al. 2010; Kobayashi et al. 2007).

I pochi studi, presenti in letteratura che hanno associato alla terapia antitumorale un effetto sulla metilazione del DNA nelle cellule germinali maschili, sono stati tutti condotti su modelli animali.

Il trattamento di ratti con ciclofosfamide o 5-Aza-2'-Deossicitidina (5-azadC) sarebbero responsabili, rispettivamente, di una deregolazione della programmazione epigenetica nelle prime fasi embrionali, che colpisce entrambi i pronuclei parentali, nella progenie dei ratti maschi trattati e di uno stato ipometilato di siti CpGs che, in condizioni fisiologiche, sono metilati tramite un meccanismo *de novo* durante la spermatogenesi (Barton et al. 2005; Oakes et al. 2007).

Il farmaco 5-azadC, infatti, pur non avendo effetti sull'enzima DNMT1, rende impossibile l'attivazione dei meccanismi responsabili della metilazione *de novo* (Oakes et al. 2007).

Di maggiore interesse scientifico è l'evidenza secondo cui, nel ratto, il regime chemioterapico combinato PEB alla dose di somministrazione simile a quella utilizzata nel trattamento del tumore del testicolo umano (1X), induce un *pattern* di metilazione del DNA germinale alterato (Chan et al. 2012). Tali alterazioni della metilazione del DNA sono state riscontrate in numerosi loci, sparsi in tutto il genoma, sia allo stadio maturativo di spermatidi rotondi, che di spermatozoi. Poiché alcuni dei loci che erano alterati a dose elevata, risultavano tali anche a dose di PEB più bassa, è stato suggerito che alcuni loci genici potrebbero essere maggiormente suscettibili al danno epigenetico rispetto ad altri. L'alterazione predominante indotta da PEB consisteva nell'ipermetilazione, anche se alcuni loci erano invece ipometilati. La prevalenza dell'ipermetilazione potrebbe essere spiegata come segue: l'esposizione al trattamento PEB danneggia i filamenti di DNA, il danno richiama diversi enzimi deputati alla sua riparazione, tra i quali anche l'enzima DNA-metiltransferasi 1 (DNMT1), che iniziano a riparare il danno. DNMT1 ripara l'informazione epigenetica danneggiata, ma la sua regolazione potrebbe essere meno precisa ed organizzata rispetto al processo di metilazione *de novo*, portando così ad una ipermetilazione anomala sui siti presenti nel DNA danneggiato (Chan et al. 2012; Delbes et al. 2007; Mortusewicz et al. 2005; La Salle et al. 2004). Per chiarire, invece, la presenza di ipometilazione su alcuni loci genici, gli autori del lavoro hanno suggerito che il trattamento chemioterapico PEB potrebbe alterare il normale processo di completamento della metilazione che avviene durante la spermatogenesi. Infatti, la maggior parte delle metilazioni *de novo* nelle cellule germinali maschili in via di sviluppo avviene nella gonade fetale. Nel processo spermatogenetico post-natale, nella fase in cui gli spermatogoni si sviluppano a spermatociti pachitene, il *pattern* di metilazione pre-natale è mantenuto, ma si completano i restanti eventi di iper- e ipometilazione. Attraverso il suo effetto sul DNA, PEB potrebbe interferire con questo normale processo epigenetico. È interessante notare, che il *pattern* di metilazione dei geni *imprinted* non era modificato dopo la somministrazione del chemioterapico, facendo ipotizzare la presenza di un meccanismo che aiuta il mantenimento della metilazione corretta in queste sequenze. Nonostante tali dati indichino l'esistenza di un ruolo dei diversi trattamenti citotossici sul profilo di metilazione (epimutazioni) degli spermatozoi dei roditori, rimane ancora oggi da chiarire se tale effetto sia riscontrabile anche nell'uomo e se presenta un'ereditabilità transgenerazionale.

Un recente lavoro ha indagato gli effetti secondari ad esposizione chemioterapica in età adolescenziale, in soggetti ormai adulti (Shnorhavorian et al. 2017). Sono stati arruolati 9 individui che durante la fascia di età 14-20 anni risultavano affetti da osteosarcoma e che erano stati trattati o solamente con cisplatino o con cisplatino più ifosfamide. Il gruppo di controllo, era formato da 9 individui che non presentavano alcuna storia di cancro. Approssimativamente una decade è passata dalla fine della terapia, e sul liquido seminale dei due gruppi di studio (pazienti e controlli) sono state eseguite analisi delle regioni differenzialmente metilate (DMRs). I risultati del lavoro,

mostravano la presenza di DMRs, quindi di epimutazioni, su tutti i cromosomi nel liquido seminale del gruppo di pazienti rispetto al gruppo di controllo. L'epimutazioni individuate misuravano circa 1Kb di lunghezza (un piccolo gruppo di esse superava i 6 Kb) e si presentavano solo in zone del genoma definite "deserti CpG", ovvero al di fuori delle isole CpG. Circa la metà delle DMRs trovate, risiedevano in zone intergeniche, principalmente nei promotori, suggerendo che la chemioterapia può effettivamente indurre un'alterata attività genica.

La presenza di epimutazioni, dopo molti anni dalla conclusione del trattamento chemioterapico, potrebbe essere dovuta ad alterazioni epigenetiche avvenute a livello delle cellule staminali spermatogoniali, in grado quindi di permanere per tutto il corso della vita adulta. Nonostante questo studio abbia previsto l'arruolamento di soli individui esposti ad agenti chemioterapici in età adolescenziale, è possibile immaginare che queste alterazioni a livello dell'epigenoma spermatico possano formarsi anche in individui esposti a trattamento antitumorale in età adulta.

Tutta la serie di studi riportati in questo capitolo, da quelli che analizzano le alterazioni genetiche ed epigenetiche a quelli relativi ai difetti dei parametri seminali, confermano l'importanza della crioconservazione dei gameti prima dell'inizio della terapia, e consigliano l'uso di contraccettivi per almeno i due anni successivi alla fine del trattamento antiproliferativo nel caso di pazienti affetti da tumore del testicolo (Bujan et al. 2013).



## 2. SCOPO DELLA TESI

Questa tesi prevede due **scopi principali**:

- i) valutare il ruolo dei riarrangiamenti AZFc del cromosoma Y come fattore di rischio per lo sviluppo del tumore testicolare a cellule germinali (TTCG);
- ii) valutare gli effetti del trattamento citotossico sulla ripresa della spermatogenesi in pazienti oncologici e sul genoma/epigenoma spermatico di pazienti affetti da TTCG.

In particolare, gli **obiettivi specifici** di questa tesi consistono nel:

- i) confronto della frequenza delle delezioni e duplicazioni parziali e totali della regione AZFc nei TTCG *versus* controlli;
- ii) valutare l'effetto del trattamento anti-proliferativo fino a 3 anni di *follow-up* post-terapia su:
  - parametri seminali quantitativi e qualitativi di pazienti affetti da TTCG o neoplasie ematologiche e la loro capacità di recupero dell'attività spermatogenetica in seguito alla terapia;
  - integrità genomica, in termini di frammentazione e di instabilità dei microsatelliti a carico del DNA spermatico di pazienti affetti da TTCG;
  - profilo di metilazione del DNA spermatico di pazienti affetti da TTCG.





## **3. MATERIALI E METODI**

### **3.I. SCOPO 1: RIARRANGIAMENTI AZFc COME FATTORI DI RISCHIO DEI TTCG**

#### **3.I.1. Descrizione della popolazione di studio**

Al fine di determinare il ruolo dei riarrangiamenti della regione AZFc del cromosoma Y sulla suscettibilità a sviluppare il tumore testicolare a cellule germinali, abbiamo studiato un vasto gruppo di casi e di controlli tutti di origine italiana (centro Italia).

Il primo gruppo si compone di soggetti affetti da tumore testicolare a cellule germinali afferenti sia alla SOD di Andrologia e Medicina della Sessualità e di Fisiopatologia della Riproduzione Umana dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Careggi (Firenze), sia all'Università La Sapienza di Roma.

Il gruppo dei controlli è invece costituito da soggetti privi di TTCG indipendentemente dal loro fenotipo seminale. Essi derivano dalla suddetta SOD dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Careggi (Firenze) e dall'Unità Endocrinologica dell'Università di Ancona. I soggetti infertili inclusi nel gruppo dei controlli, sono stati scelti sulla base della storia anamnestica, dell'esame obiettivo, del dosaggio ormonale, dello spermogramma, dell'analisi del cariotipo e analisi del cromosoma Y. Sono stati, quindi, esclusi soggetti con: criptorchidismo mono o bilaterale, varicocele di secondo o terzo grado, azoospermia ostruttiva, infezioni ricorrenti, infertilità iatrogena, ipogonadismo ipogonadotropo, anomalie del cariotipo, microdelezioni del cromosoma Y.

La maggioranza dei controlli, era stata precedentemente analizzata per uno studio caso/controllo sull'infertilità maschile nel laboratorio di Andrologia e Medicina della Sessualità e di Fisiopatologia della Riproduzione Umana (AOUC-Firenze) (Giachini et al. 2008).

#### **3.I.2. Estrazione del DNA da sangue periferico**

Il DNA genomico utilizzato per valutare i riarrangiamenti della regione AZFc sul cromosoma Y è stato estratto da sangue periferico prelevato da ogni soggetto della nostra casistica in presenza

dell'anticoagulante acido etilendiamminotetracetico (EDTA) e immediatamente congelato a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Dopo almeno 12 ore di congelamento, circa 5-10ml di sangue sono stati scongelati a temperatura ambiente o in bagnetto a  $37^{\circ}\text{C}$  in modo tale da poter iniziare il processo di estrazione del DNA. Tale processo si basa sulla tecnica del *Salting-out* la quale prevede l'aggiunta di sale al fine di ridurre la solubilità delle proteine del campione che tenderanno così ad aggregarsi (attraverso l'interazione delle loro catene laterali idrofobiche) e quindi a precipitare. Successivamente allo scongelamento, il sangue è stato sottoposto a più lavaggi, il primo con la soluzione fisiologica NaCl 0.9% e i successivi con una soluzione di lisi degli eritrociti a base di Tris-HCl 20mM e di  $\text{MgCl}_2$  5mM. La soluzione di lisi degli eritrociti può essere arbitrariamente sostituita dal TED (soluzione fisiologica NaCl 0.9% e TRIZMA). In entrambi in casi è opportuno non lasciare a lungo i linfociti a contatto con le soluzioni di lisi sopra citate poiché questo potrebbe indurre la lisi anche delle cellule di nostro interesse. Il tutto è stato ripetuto fino al momento in cui il *pellet* era privo di globuli rossi o detriti cellulari i quali, andando invece a costituire il sovrnatante, sono stati facilmente eliminati. Il *pellet* costituito quindi solo da globuli bianchi, è stato incubato *overnight* a  $37^{\circ}\text{C}$  dopo l'aggiunta di:

- soluzione lisante i leucociti (Tris-HCl 0.01M, NaCl 0.4M, EDTA 2mM; è una soluzione molto più potente della soluzione di lisi degli eritrociti o del TED tanto da andare a rompere i linfociti permettendo così il rilascio del DNA in soluzione);
- sodio-dodecil-solfato 10% (SDS è un detergente anionico che solubilizza i lipidi delle membrane e lega le proteine alterandone la struttura secondaria);
- proteinasi K 2mg/ml (serino-proteasi che digerisce le proteine cellulari ed in particolare le DNAsi che danneggerebbero gli acidi nucleici che stiamo estraendo).

Trascorso il tempo necessario per la lisi cellulare, ai campioni è stato aggiunto NaCl 5.5M. Una serie di centrifugazioni hanno permesso al sale di precipitare insieme alle proteine che sono quindi state allontanate dal sovrnatante dove sono invece sospesi gli acidi nucleici. Per una corretta eliminazione dei lipidi e dei detriti cellulari, è stato aggiunto cloroformio (volume-volume) creando così un'emulsione data la sua insolubilità in acqua. Con un'ulteriore centrifuga, sono state ottenute tre fasi. Solo la prima fase è stata recuperata e addizionata con due volumi di etanolo al 100% al fine di favorire l'aggregazione del DNA. Il DNA ora visibile sotto forma di "nuvola", è stato recuperato mediante un'ancorina alla quale vi si lega per attrazione elettrostatica (l'ancorina si forma passando un'estremità della pipetta Pasteur di vetro alla fiamma del becco Bunsen). In tal modo è stato possibile lavare il DNA immergendo più volte l'ancorina in etanolo al 70% (permette di eliminare i sali sul DNA che potrebbero poi portare ad un deterioramento dell'acido nucleico nel corso del tempo). Il DNA è stato lasciato asciugare per far evaporare l'etanolo. Passato il tempo adeguato, il DNA è stato risospeso in TE (Tris-EDTA) ruotando vigorosamente l'ancorina per facilitarne il distacco (il volume di TE in cui il DNA è stato sospeso, è dipeso dalla grandezza della "nuvola"). Le ditte dove sono stati acquistati i suddetti reagenti sono riportate in Tabella 1 dell'Appendice.

### 3.I.3. Valutazione quantitativa e qualitativa del DNA estratto

Questo tipo di valutazione è stato eseguito tramite lo strumento Nanodrop® ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Stati Uniti) ovvero uno spettrofotometro in grado di misurare l'assorbanza del campione a determinate lunghezze d'onda.

La determinazione dell'assorbanza del campione a 260nm, che corrisponde alla lunghezza d'onda a cui assorbono gli acidi nucleici, ne fornisce la concentrazione mediante la legge di Lambert-Beer ( $A = C \times b \times \epsilon$ ). Questa correla la quantità di luce assorbita dal materiale (assorbanza, A), la concentrazione di questo (C), lo spessore del mezzo attraversato (b) e un coefficiente di proporzionalità detto assorbività molare ( $\epsilon$ ).

La misurazione dell'assorbanza del campione a 280 nm, che corrisponde alla lunghezza d'onda a cui si ha assorbimento massimo delle proteine e a 230 nm che corrisponde invece alla lunghezza d'onda a cui assorbono carboidrati, fenoli, composti aromatici ecc, ci permette di ottenere informazioni qualitative sul campione stesso. Quando i valori ottenuti dal rapporto di tali assorbanze con quella a 260 nm ( $A_{260}/A_{280}$  e  $A_{260}/A_{230}$ ) sono compresi tra 1.8 e 2, il campione è definito sufficientemente puro. L'allontanamento da questi valori indicano, invece, la presenza di impurità che potrebbero per esempio causare inibizione della Taq polimerasi (enzima utilizzato per la reazione di PCR).

La soluzione madre è stata congelata a  $-20^{\circ}\text{C}$ , mentre un'aliquota con concentrazione di circa 100 ng/ $\mu\text{l}$ , è stata conservata a  $+4^{\circ}\text{C}$  per l'impiego da parte dell'operatore.

### 3.I.4. Ricerca dei riarrangiamenti della regione AZFc sul cromosoma Y

#### 3.I.4.1. PCR per lo screening delle delezioni complete e parziali

Lo screening di tali riarrangiamenti consiste nell'amplificazione mediante PCR *plus/minus* di un set di otto STSs (*Sequenze-Tagged Sites*) specifici per la regione AZFc (Repping et al. 2003) (Figura 8).

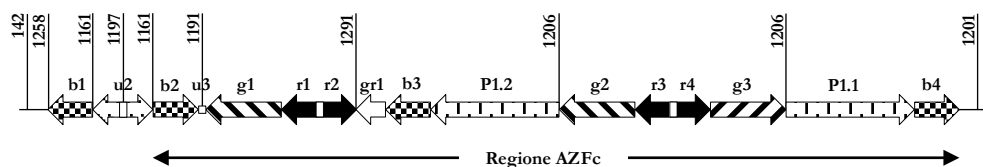


Figura 8 - Localizzazione dei STS nella regione AZFc. sY1206 e sY1161 sono ripetuti due volte.

Per rendere lo screening più rapido e a minor costo, è stato ideato un metodo di analisi basato su due *steps*. Il primo, illustrato nella Tabella 4, consiste nell'amplificazione (con PCR *simplex*) di sY1291 e sY1191, permettendo l'orientamento verso quattro possibili esiti: i) nessuna delezione; ii) delezione gr/gr; iii) delezione b2/b3; iv) delezione b1/b3.

		sY1291	
		+	-
sY1191	+	Nessuna delezione	Delezione gr/gr
	-	Delezione b2/b3	Delezione b2/b4 Delezione b1/b3

**Tabella 4 - Rappresentazione delle possibili combinazioni che si possono ottenere al termine del primo *step* di analisi. Prendendo in considerazione solo due STSs ovvero sY1291 e sY1191, quattro sono i possibili esiti. I simboli “+” e “-” indicano rispettivamente la presenza e l’assenza di amplificato per i due STSs.**

Nel caso in cui dal primo *step* il campione sia risultato portatore di una delezione, esso verrà sottoposto al secondo *step*. Questo, illustrato nella Tabella 5, si avvale dell’amplificazione dei rimanenti STSs ed oltre che permettere di confermare i risultati del primo *step* e di determinare i punti di rottura (confini prossimali e distali), consente anche di discriminare tra delezione b1/b3 e delezione completa. Anche questi STSs sono stati analizzati in *multiplex*: una triplex che includeva sY1197-sY1161-sY142 e un’altra triplex per sY1258-sY1201-sY1206.

	sY1258	sY1161 (x2)	sY1197	sY1191	sY1291	sY1206 (x2)	sY1201
Delezione b2/b4	+	+	+	-	-	-	+
Delezione b2/b3	+	+	+	-	+	+	+
Delezione gr/gr	+	+	+	+	-	+	+
Delezione b1/b3	+	-	-	-	-	+	+

**Tabella 5 - Secondo *step* di analisi. E’ necessario per confermare i risultati ottenuti dal primo *step* e per identificare i confini prossimali e distali della delezione. I simboli “+” e “-” indicano rispettivamente la presenza e l’assenza di amplificato per i due STS. In grigio più scuro sono evidenziati, per ciascuna delezione, i due STSs (distale e prossimale) più vicini alla regione deleta. Sono questi gli STSs più significativi per l’identificazione dei punti di rottura. Gli altri STSs, evidenziati in grigio progressivamente più chiaro con l’allontanarsi dalla regione rimossa, sono stati amplificati per confermare ulteriormente i risultati. È possibile notare che gli STSs sY1161 e sY1206 sono ripetuti due volte (x2) sulla regione AZFc.**

Il protocollo di PCR per il primo *step* ha previsto, per entrambi gli STSs, un volume finale di 15µl costituito da 3µl di Buffer Go-Taq 5X, 1.5µl per ogni *primer* 10µM, 1.2µl di dNTPs 2.5mM, 0.2µl di Go-Taq 5U/µl e 1µl di DNA 100ng/µl. Per il secondo *step*, per entrambe le *triplex*, la mix di reazione (20µl come volume finale) era formata da: 2µl di Buffer AB-Taq 5X, 1µl per ogni *primer* 20µM, 1.6µl di dNTPs 2.5mM, 0.16µl di AB-Taq 5U/µl e 2µl di DNA 100ng/µl. Le ditte in cui sono stati acquistati i singoli reagenti e le sequenze dei *primers* utilizzati per tale PCR sono specificate, rispettivamente, in Tabella 1 e 2 dell’Appendice. Il programma di amplificazione era standard per tutti gli STSs: denaturazione iniziale di 6 minuti (95°C), 1 minuto di denaturazione (95°C), *annealing* (temperatura dipendente dalla coppia di *primers*, Tabella 2 dell’Appendice) ed estensione (72°C) entrambe per un minuto, ripetuti per 35 cicli, ed infine una fase di estensione terminale di 10 minuti (72°C). Al termine di ogni *step*, i prodotti di PCR sono stati sottoposti ad elettroforesi su gel di agarosio al 2% marcato con bromuro di etidio e visualizzati mediante

esposizione ai raggi UV (la lunghezza degli ampliconi è riportata in Tabella 2 dell'Appendice). In caso di assenza del frammento amplificato è stata ripetuta la PCR abbassando o meno la temperatura di *annealing* per confermare il risultato. Assieme ai campioni sono stati analizzati anche un controllo positivo (DNA di un soggetto maschile di cui era stata già saggiata la presenza del frammento) e due controlli negativi (DNA di un soggetto femminile e bianco). Data la possibilità di falsi positivi (false delezioni), i campioni che dallo screening con PCR *plus/minus* sopra descritto erano portatori di delezione sono stati sottoposti a dosaggio genico per *DAZ* e *CDY1* ed infine ad analisi RFLP. Questi ulteriori *step* di indagine permettevano di confermare il risultato ottenuto e di caratterizzare la delezione dal punto di vista molecolare. Il dosaggio genico di *DAZ* e *CDY1* rappresenta inoltre il metodo per individuare le duplicazioni parziali della regione AZFc poiché l'amplificazione delle suddette STSs non è identificativa.

#### **3.I.4.2. Dosaggio genico di *CDY1* e *DAZ***

Con dosaggio genico si intende la valutazione del numero di copie di un dato gene presenti a livello di un genoma grazie all'utilizzo di una tecnica semi-quantitativa chiamata QF-PCR (*Quantitative Fluorescent PCR*). Essa si basa sul principio secondo cui durante la fase esponenziale dell'amplificazione con PCR, la quantità di amplificato prodotto è proporzionale alla quantità di DNA *target* di partenza, che a sua volta riflette il numero di copie del *target* stesso.

In questa tesi la QF-PCR è stata usata: i. per determinare il numero di copie geniche di *CDY1* e di *DAZ* rimanenti successivamente a delezione della regione AZFc; ii. per individuare le duplicazioni della regione AZFc la quale, dall'analisi degli STSs, si presentava integra.

La tecnica consisteva nell'amplificazione simultanea mediante PCR, nello stesso tubo di reazione e con un'unica coppia di *primers* (oMJ953/o1023 per *CDY1* e o1130/o1313 per *DAZ*), del *locus* della regione AZFc su cui è presente la copia genica da quantificare (*DAZ* o *CDY1*) e del suo gene omologo. Quest'ultimo funzionava da controllo interno dato che è locato al di fuori della regione AZFc e che è noto il numero esatto di copie. Nello specifico, per il dosaggio delle copie geniche di *CDY1* è stato utilizzato il suo omologo autosomico *CDY2* presente in due copie all'interno della regione AZFb; per quanto riguarda *DAZ*, il suo controllo interno era *DAZL*, presente stabilmente in due copie sul cromosoma 3 (una per ciascun allele).

Il protocollo di PCR, sia per l'analisi di *CDY1/CDY2* sia di *DAZ/DAZL*, è stato eseguito in una mix di reazione di 15µl costituita da 3µl di Buffer Go-Taq 5X, 1.5µl per ogni *primer* 10µM, 1.2µl di dNTPs 2.5mM, 0.12µl di Go-Taq 5U/µl e 1.2µl di DNA 100ng/µl. Le ditte in cui sono stati acquistati i singoli reagenti sono riportati in Tabella 1 dell'Appendice. Il programma di amplificazione era identico a quello utilizzato per lo *screening* degli STS della regione AZFc descritto nel paragrafo precedente 3.I.4.1.. Fanno eccezione l'estensione finale di 7 minuti invece di 10 e il numero di cicli della reazione di PCR, che in questo caso era 28 invece di 35. Quest'ultima differenza permetteva alla reazione stessa di terminare durante la fase esponenziale (prima del

raggiungimento del *plateau*) così che il DNA prodotto per amplificazione risultasse proporzionale alla quantità di DNA *target* di partenza. Il prodotto di amplificazione del controllo interno differiva in lunghezza di 3 nucleotidi da quello del *locus* in esame. Alcuni soggetti potevano presentare un polimorfismo a livello dell'introne 10 di *DAZL* che può essere in eterozigosi e più raramente in omozigosi e che consiste in un'inserzione di 40 pb. In ogni caso è comunque assicurata la stessa efficienza nell'amplificazione del frammento del *locus* da studiare e di quello del controllo interno, condizione necessaria per l'analisi semi-quantitativa. Infatti, se l'efficienza di amplificazione è la stessa, una differenza nella quantità dei prodotti di amplificazione riflette inequivocabilmente una differenza nella quantità dei rispettivi *target* (e quindi un diverso numero di copie). Le sequenze dei *primers forward* e *reverse* (Machev et al. 2004), le rispettive temperature di *annealing* e la lunghezza dei frammenti amplificati sono indicati nella Tabella 2 in Appendice.

La differenza in termini nucleotidici tra i due frammenti associata all'utilizzo del *forward* o del *reverse* di ciascuna coppia di *primers* marcato con un fluorocromo (FAM), hanno reso possibile la separazione dei frammenti stessi mediante elettroforesi capillare. Come standard di peso molecolare è stato usato il *GeneScan*® 400HD ROX, ideato per identificare frammenti con un *range* di lunghezza variabile da 50bp a 400bp. Quindi la preparazione dei campioni per l'elettroforesi capillare consisteva nel sospendere in Formamide *ABI Prism*®, 0.25 ng di amplificato e 0.25 µl di *GeneScan*® 400HD ROX Size Standard (la ditta di provenienza di ogni reagente è riportata in Tabella 1 dell'appendice). Successivamente è stata effettuata una denaturazione a 95°C per 5 minuti.

I campioni sono stati quindi sottoposti a separazione elettroforetica capillare con sequenziatore automatico *ABI Prism*® 310 PE ed i segnali relativi ai diversi frammenti sono stati elaborati dal software *GeneScan* e visualizzati sull'elettroferogramma sotto forma di picchi. La posizione del picco rispetto all'asse delle ascisse era indicativa della lunghezza del frammento amplificato, mentre l'area sottostante al picco (intensità del segnale) rifletteva la quantità di amplificato, che era direttamente proporzionale al numero di copie geniche presenti nel DNA genomico in analisi.

Dal rapporto tra l'area dei due picchi, corrispondenti rispettivamente al gene in analisi ed a quello di controllo, è stato possibile risalire al numero di copie del gene oggetto di studio presente sulla regione AZFc (Tabella 6).

	n° copie <i>CDY1</i>	n° copie <i>CDY2</i>	Rapporto <i>CDY1/CDY2</i>	n° copie <i>DAZ</i>	n° copie <i>DAZL</i>	Rapporto <i>DAZ/DAZL</i>
Nessuna del.	2	2	1	4	2	2
Del. b2/b4	0	2	0	0	2	0
Del. gr/gr+b2/b3	1	2	0.5	2	2	1
Del. b1/b3	2	2	1	2	2	1
Dupl. parziale	3	2	1.5	6	2	3

**Tabella 6 - Numero di copie geniche di *CDY1* e di *DAZ* in assenza di delezione, in presenza di delezione completa (b2/b4) e parziale (gr/gr, b2/b3 e b1/b3) e di duplicazione parziale dell'AZFc. Sono inoltre mostrati i rapporti tra le aree *CDY1/CDY2* e *DAZ/DAZL* generati in seguito a delezione o duplicazione. Del.=delezione; dupl.=duplicazione.**

### 3.I.4.3. Identificazione del tipo di copie geniche di *CDY1* e *DAZ* rimanenti dopo delezione parziale della regione *AZFc*

Al fine di identificare le copie geniche di *CDY1* (*CDY1a* o *CDY1b*) e di *DAZ* (*DAZ1/2* o *DAZ3/4*) rimaste in seguito a delezione parziale *AZFc*, è stato sfruttato un *Sequence Family Variant* (SFV). Tale variante di sequenza puntiforme determinando la comparsa o la scomparsa di un sito di restrizione consente, mediante analisi RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), di discriminare specificamente le diverse copie geniche di *CDY1* e *DAZ* (Machev et al. 2004). Per il gene *CDY1* la SFV è situata a 7,750 pb a monte del codone di inizio della traduzione ed è in grado di distinguere la copia *CDY1a* dalla copia *CDY1b* in quanto la prima non viene digerita al contrario della seconda. Per quanto concerne il gene *DAZ*, la SFV si trova nell'introne 10 e permette di discriminare la copie geniche *DAZ1/2*, che saranno digerite dall'enzima, da quelle *DAZ3/4* che invece non saranno digerite. Questa analisi prevede una prima fase di amplificazione mediante PCR che prevede l'utilizzo di una coppia di *primers* che amplifica tutte le copie, rispettivamente, di *CDY1* (o1025/o1026) e di *DAZ* (o912/o913) indipendentemente dal genotipo del soggetto che deve essere analizzato. Il protocollo di PCR prevede, per entrambi i geni, in un volume finale di 15µl costituito da 3µl di Buffer Go-Taq 5X, 1.5µl per ogni *primer* 10µM, 1.2µl di dNTPs 2.5mM, 0.2µl di Go-Taq 5U/µl e 1µl di DNA 100ng/µl. I parametri di PCR sono gli stessi descritti per l'analisi degli STSs (vedi paragrafo 3.I.4.1.), ad eccezione che la fase di estensione terminale era di 7 minuti invece di 10. Alla conferma dell'avvenuta reazione di amplificazione del prodotto mediante corsa elettroforetica su gel d'agarosio al 2% marcato con bromuro di etidio farà seguito la digestione enzimatica. Questa consisteva nell'incubazione, a 37°C per 5 ore, dell'amplificato con BSA ed appropriati enzimi di restrizione (PvuII per *CDY1* e DraI per *DAZ*), la cui sequenza consenso comprende il SFV.

Le ditte in cui sono stati acquistati i reagenti e le sequenze dei *primers forward* e *reverse* con le rispettive temperature di *annealing* sono indicate, rispettivamente, nella Tabella 1 e 2 dell'Appendice, mentre le lunghezze dei frammenti amplificati sono pari a 200 bp per *CDY1a* e *CDY1b* e 250 bp per *DAZ1/2* e *DAZ3/4*.

I possibili esiti della digestione enzimatica per entrambi i geni *AZFc* (osservati su gel di agarosio al 4% marcato con bromuro di etidio), con la lunghezza dei frammenti ottenuti, sono mostrati nella tabella che segue (Tabella 7).

RFLP	Frammenti	Interpretazione del risultato (copie geniche presenti)
<i>CDY1</i> con PvuII	200+120+80	<i>CDY1a</i> e <i>CDY1b</i>
	200	<i>CDY1a</i>
	120+80	<i>CDY1b</i>
<i>DAZ</i> con DraIII	250+180+70	<i>DAZ 1/2</i> e <i>DAZ 3/4</i>
	250	<i>DAZ 3/4</i>
	180+70	<i>DAZ 1/2</i>

Tabella 7 - Possibili esiti della digestione enzimatica di *CDY1* (PvuII) e *DAZ* (DraI). Sono mostrati i frammenti ottenuti sia in caso di regione *AZFc* integra (presenza di tutte le copie geniche *CDY1* e *DAZ*) che nei due casi alternativi di delezione parziale *AZFc*.

### **3.I.5. Analisi statistica**

Una volta ottenuti tutti i risultati, questi sono stati sottoposti ad indagine statistica con l'ausilio del programma IBM SPSS *Statistics* per Windows (versione 24, SPSS Inc. Chicago, IL, USA). È stato quindi possibile valutare, tramite il test del chi-quadrato (o test esatto di Fisher), l'eventuale presenza di una differenza statisticamente significativa dell'incidenza dei vari tipi di riarrangiamenti della regione AZFc del cromosoma Y nei due gruppi di studio (casi e controlli).

Tale valutazione è stata effettuata anche in seguito a stratificazione della popolazione di studio sulla base dei parametri seminale e/o del gruppo dei casi sulla base dell'istologia del tumore testicolare a cellule germinali.

La nostra ipotesi nulla corrispondeva all'assenza di una differenza di frequenza dei vari riarrangiamenti nei vari gruppi in analisi. Poiché è stato considerato, come indice di significatività statistica, un valore di "p" inferiore a 0.05, l'ipotesi nulla era o no accettata a seconda se tale valore era, rispettivamente, maggiore o minore di 0.05.

## **3.II. SCOPO 2: EFFETTI DEL TRATTAMENTO CITOTOSSICO SULLA RIPRESA DELLA SPERMATOGENESI IN PAZIENTI ONCOLOGICI E SUL GENOMA/EPIGENOMA SPERMATICO DI PAZIENTI AFFETTI DA TUMORE TESTICOLARE**

### **3.II.1. Descrizione della popolazione di studio**

#### ***3.II.1.1. Popolazione di studio per l'analisi della ripresa della spermatogenesi***

I pazienti oncologici oggetto di studio sono stati reclutati dal Laboratorio di Crioconservazione della S.O.D. di Medicina della Sessualità e Andrologia dell'Azienda Ospedaliera Universitaria di Careggi (Firenze). I dati relativi a questa parte della tesi si riferiscono ai pazienti afferenti al centro a partire dal 2007, da quando la visita andrologica è concomitante alla crioconservazione del liquido seminale. Ad oggi, i pazienti oncologici che vogliono preservare la propria fertilità, devono infatti seguire un percorso clinico strutturato che prevede la raccolta di liquido seminale, la compilazione di una cartella clinica dedicata, la rilevazione dell'anamnesi (mediante apposito questionario), l'esame fisico e la valutazione dello stato di salute generale. È richiesto anche il prelievo di sangue per i dosaggi ormonali, tra i quali: FSH, LH e Testosterone.

Per poter partecipare allo studio il paziente deve aver firmato il consenso informato, deve sottoporsi a terapia citotossica e deve inoltre avere eseguito una raccolta di liquido seminale ad almeno uno dei tre tempi di *follow-up* previsti dallo studio (dopo 1 anno: T<sub>1</sub>; dopo 2 anni: T<sub>2</sub>; dopo 3 anni: T<sub>3</sub>). Per ogni paziente incluso nella casistica erano quindi note le informazioni relative ai parametri seminali prima di iniziare la terapia (T<sub>0</sub>) e ad almeno uno dei tre tempi di controllo post-terapia.



### ***3.II.1.2. Popolazione di studio per l'analisi del genoma spermatico***

I pazienti sono soggetti affetti da TTCG con la necessità di sottoporsi a terapia citostatica per il trattamento della patologia neoplastica. Tutti sono stati reclutati dal Laboratorio di Seminologia della SOD di Medicina della Sessualità e Andrologia dell'Azienda Ospedaliera Universitaria di Careggi (Firenze). Tutti i pazienti hanno firmato un consenso informato.

#### **Analisi dell'integrità del genoma spermatico (SDF)**

Per l'analisi della frammentazione del DNA spermatico, sono stati condotti due studi, uno *cross-sectional* ed uno longitudinale.

Studio *cross-sectional*: al paziente è richiesta la raccolta del liquido seminale ad almeno un tempo di *follow-up* eseguito con cadenza annuale per i 3 anni successivi al termine della terapia oncologica (T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub> e T<sub>3</sub>). L'inclusione nello studio prevede che durante tali *follow-up*, il paziente abbia spermatozoi sufficienti affinché sia possibile eseguire l'analisi di nostro interesse.

Studio longitudinale: al paziente è richiesta la raccolta del liquido seminale al T<sub>0</sub> e ad almeno un tempo di *follow-up* che è stato eseguito con cadenza annuale per i 3 anni successivi al termine della terapia oncologica (T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub> e T<sub>3</sub>). L'inclusione nello studio prevede che sia prima del trattamento che almeno durante uno dei tre *follow-up*, il paziente abbia un numero di spermatozoi sufficiente per eseguire la suddetta analisi.

#### **Analisi dell'instabilità dei microsatelliti**

Tali pazienti hanno eseguito: i) prelievo di sangue prima di iniziare la terapia (T<sub>0</sub>); ii) raccolta del liquido seminale ad almeno un tempo di *follow-up* eseguito con cadenza annuale per i 3 anni successivi al termine della terapia oncologica (T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub> e T<sub>3</sub>). Per poter essere inclusi nello studio, i pazienti dovevano avere sufficienti spermatozoi ai vari tempi di *follow-up*.

### ***3.II.1.3. Popolazione di studio per l'analisi dell'epigenoma del DNA spermatico***

Anche per tale analisi la popolazione utilizzata è stata reclutata dal Laboratorio di Seminologia della SOD di Medicina della Sessualità e Andrologia dell'Azienda Ospedaliera Universitaria di Careggi (Firenze). Essa si compone di soggetti con TTCG e anche con neoplasie ematologiche, tutti con la necessità di sottoporsi a terapia citostatica. Per poter essere inclusi in tale parte dello studio, i pazienti, oltre a firmare il consenso informato, dovevano sottoporsi alla raccolta del liquido seminale con spermatozoi sufficienti per l'analisi al T<sub>0</sub> e ad almeno un tempo di *follow-up* eseguito dopo 6 mesi (T<sub>1/2</sub>) o ad un anno (T<sub>1</sub>) dal termine della terapia.

## **3.II.2. Analisi della ripresa della spermatogenesi**

### ***3.II.2.1 Spermiogramma***

Lo spermiogramma rappresenta il caposaldo del laboratorio di andrologia, risultato del progressivo aumento della richiesta d'intervento medico nel campo dell'infertilità di coppia. Esso è il punto di partenza dello studio della capacità fecondante di un uomo, ma può anche comparire a diversi livelli

durante l'iter diagnostico e terapeutico dell'infertilità maschile. Lo spermioγραμμα, infatti, è utilizzato come strumento di valutazione dell'efficacia di un trattamento terapeutico, ma anche per ottenere informazioni per indagini più specifiche e approfondite o addirittura per interventi chirurgici. Di conseguenza la complessità dello spermioγραμμα è cresciuta a tal punto da indurre la World Health Organization (WHO) nel 1980 a promuovere alcune linee guida per la standardizzazione delle indagini volte a studiare il liquido seminale e per la descrizione ed interpretazione dei risultati ottenuti. Questa standardizzazione permette di confrontare successivi esami di un paziente, anche eseguiti in laboratori diversi. Oggi, lo spermioγραμμα è eseguito attenendosi all'ultimo aggiornamento delle linee guida della WHO (2010).

Il primo *step* consiste nella raccolta del campione di liquido seminale la quale deve avvenire per masturbazione dopo un periodo di astinenza sessuale di almeno 48 ore e non più di 7 giorni. Tale raccolta deve avvenire preferibilmente in una stanza nei pressi del laboratorio, in caso contrario il campione deve essere consegnato al laboratorio entro 1 ora dalla raccolta (durante il trasporto tale campione dovrà essere protetto dalle basse ed alte temperature, rispettivamente inferiori ai 20°C e superiori ai 40°C). Una volta che il campione è in laboratorio, sarà sottoposto prima ad un'analisi macroscopica e successivamente ad un'analisi microscopica.

L'esame macroscopico consiste nella valutazione della liquefazione, dell'aspetto, del volume, della viscosità e del pH del liquido seminale. Un campione normale si liquefa entro 60 minuti, sebbene generalmente questo avvenga entro 15 minuti. L'aspetto del campione è valutato mediante un'osservazione a temperatura ambiente immediatamente dopo la liquefazione o dopo 1 ora dall'eiaculazione. Il liquido seminale normale ha un aspetto grigio opalescente. Colorazioni che si discostano da questa possono essere sintomo di uno specifico aspetto patologico. Il volume dell'eiaculato è misurato pesando contenitori *standard* con e senza liquido seminale. La viscosità del campione liquefatto è valutata aspirando tale campione con una pipetta e lasciandolo gocciolare per gravità. Un campione normale lascia la pipetta come piccole gocce distinte, in caso contrario la goccia formerà un filamento di lunghezza superiore ai 2 cm. Infine, per quanto riguarda il pH, la misurazione deve essere effettuata entro 1 ora dall'eiaculazione mediante l'ausilio di una cartina indicatrice precedentemente testata con *standard* a pH noti.

Con lo svolgimento dell'esame microscopico del liquido seminale, si ottiene invece informazioni sulla concentrazione, numero totale, motilità e morfologia degli spermatozoi, sulla presenza di agglutinati o di cellule diverse dagli spermatozoi e sulla presenza di anticorpi anti-spermatozoo.

Mediante l'ausilio di una camera contaglobuli si ottiene una stima approssimativa della concentrazione degli spermatozoi in milioni/ml, la quale sarà fondamentale per decidere la diluizione necessaria per la determinazione della concentrazione esatta mediante l'emocitometro di Neubauer. Per tutti quei campioni nei quali non sono rinvenuti spermatozoi al microscopio, è necessario centrifugarli per rilevarli nel sedimento. Dalla concentrazione degli spermatozoi e dal volume del liquido seminale, si ricava il numero totale degli spermatozoi.

La valutazione della motilità può essere eseguita utilizzando un sistema di classificazione. La motilità di ogni spermatozoo è, infatti, indicata come “a+b” Progressiva Rapida, “c” Non Progressiva e “d” Immobile. Quando la percentuale di spermatozoi immobili supera il 50%, è opportuno valutarne la vitalità mediante test di *swelling* (rigonfiamento) iposmotico o mediante la capacità di trattenere o meno colorante (le cellule morte, avendo la membrana danneggiata, riescono a far entrare il colorante contrariamente alle cellule vive).

La morfologia degli spermatozoi è valutata mediante tecniche di colorazione degli spermatozoi stessi. Una goccia di liquido seminale è posizionata su vetrino, strisciata, lasciata asciugare e poi fissata. Si procede quindi con la colorazione. La tecnica utilizzata è la colorazione di Diff Quick la quale fornisce una buona colorazione degli spermatozoi e delle altre cellule (permette la colorazione della regione acrosomiale e di quella postacrosomiale della testa, dei residui citoplasmatici, del tratto intermedio e del flagello). Perché uno spermatozoo possa essere considerato normale è necessario che siano normali la testa, il collo, il tratto intermedio e la coda dello spermatozoo.

Inoltre lo spermiogramma consiste anche nella conta della componente non nemaspermica. L'eiaculato, infatti, oltre agli spermatozoi contiene normalmente altre cellule, comunemente definite *round cells* (cellule rotonde). Queste includono le cellule epiteliali del tratto genito-urinario, dell'epitelio prostatico, della spermatogenesi ed i leucociti. Un eiaculato non deve contenere più di  $5 \times 10^6$  cellule rotonde/ml. Esistono varie tecniche che ne permettono la quantizzazione.

Infine sono ricercati nel liquido seminale gli anticorpi anti-spermatozoo (appartengono quasi esclusivamente a due classi immunologiche: IgA e IgG). Tale ricerca può essere fatta mediante o l'*Immunobead-test* o il *MAR-test (Mixed Antiglobulin Reaction)*.

Nel nostro studio, in seguito a spermiogramma, 2ml di liquido seminale fresco è stato utilizzato per l'applicazione dei protocolli di separazione nemaspermica, un massimo di  $10 \times 10^6$  spermatozoi sono stati utilizzati, a fresco, per il *Tunel-assay*. Il quantitativo restante è stato congelato a  $-20^{\circ}\text{C}$  in attesa di estrazione del DNA.

### **3.II.3. Analisi dell'integrità del genoma spermatico**

La frammentazione del DNA rappresenta un danno genomico che consiste nella presenza di tagli a singolo e a doppio filamento nell'elica del DNA. In tale studio abbiamo valutato l'integrità del genoma degli spermatozoi tramite le tecniche *Tunel-assay*. I reagenti utilizzati sono stati acquistati da specifiche ditte elencate in Tabella 1 dell'Appendice.

In seguito all'esecuzione dello spermiogramma come descritto nel sottoparagrafo 3.II.2.1, dal campione di liquido seminale di partenza sono state recuperate un massimo di  $10 \times 10^6$ /ml di spermatozoi. A tali cellule, nel corso del protocollo, sono stati aggiunti più reagenti ai quali ha fatto seguito una centrifugazione di 2000 rpm per 5 minuti e l'eliminazione del sovrantante. Nello specifico, gli spermatozoi sono stati, per due volte, risospesi con HTF (precedentemente riscaldato in incubatore). Al *pellet* formato è stata aggiunta Paraformaldeide 4% al fine di fissare le cellule. Il

tutto è stato incubato a temperatura ambiente per 30 minuti, al termine dei quali al *pellet* è stato addizionato *Bovine Serum Albumin* (BSA) 1%. Quest'ultimo passaggio è stato ripetuto e al *pellet* ottenuto è stato aggiunto citrato-triton 0,1% per permeabilizzare la membrana degli spermatozoi. L'aliquota è stata trasferita in ghiaccio per 4 minuti allo scadere dei quali è stata aggiunta BSA. Successivamente il *pellet* è stato risospeso con BSA e suddiviso in due aliquote di uguale volume (campione positivo e negativo). Ad entrambi i *pellet* è stato aggiunto un buffer, ma solo in uno dei due (campione positivo) è stato addizionato l'enzima Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT). Questo catalizza l'aggiunta di desossiUracile trifosfato marcato con FITC (FITC-dUTPs) alle estremità 3'-OH del DNA che hanno subito rotture rendendole visibili. I campioni avvolti da carta argentata sono stati incubati a 37°C per 1 ora. Dopodiché sono stati eseguiti due lavaggi con BSA ed infine mantenuti a +4°C con PBS fino al momento in cui non sono stati trasferiti nei tubini per il citofluorimetro a flusso (Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, Stati Uniti).

Dopo la necessaria compensazione effettuata al citofluorimetro, sia il campione positivo sia quello negativo sono stati nuovamente riportati a volume iniziale con PBS (una parte del campione è stato consumato per la compensazione) e ad entrambi è stato aggiunto Ioduro di Propidio (PI). PI è un intercalante del DNA che, entrando nel nucleo, consente di distinguere tra *Bodies540*, che non possiedono il nucleo e gli spermatozoi. Il tutto è stato incubato a temperatura ambiente per 10 minuti al termine dei quali è stata effettuata la lettura del livello di frammentazione del paziente al citofluorimetro (Figura 9).

Tale lettura è stata eseguita su circa 8,000 cellule, come descritto da Muratori et al. (2010). Dopo l'analisi al citofluorimetro, sono ottenuti due *plots*, uno relativo al campione negativo in cui non è stato aggiunto l'enzima TdT (Figura 9A) ed uno relativo al campione positivo in cui l'enzima TdT è presente (Figura 9B).

La percentuale di frammentazione è stata ottenuta sommando la percentuale della frazione *Upper Right* (UR), *Low Right* (LR) e *Low Left* (LL). La porzione UR è costituita dalla popolazione *Brighter*,

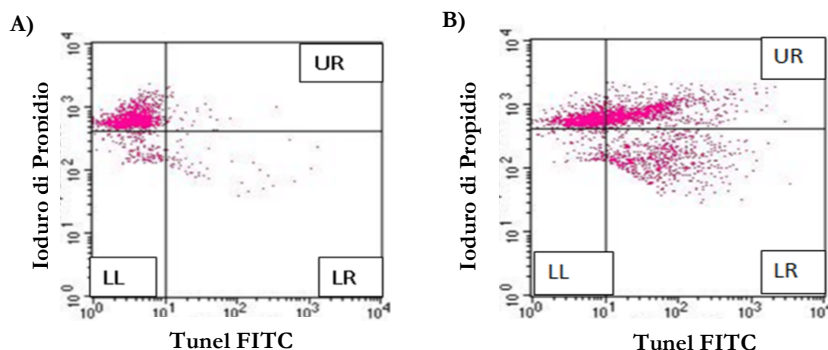


Figura 9 - Esempi di *plots* citofluorimetrici di un paziente per la valutazione dei livelli di frammentazione del DNA degli spermatozoi. (A) *Plot* citofluorimetrico relativo al campione negativo; la parte in alto a sinistra mostra l'autofluorescenza del campione in quanto gli spermatozoi hanno di per sé una fluorescenza dovuta ai mitocondri (l'enzima TdT non è stato aggiunto). (B) *Plot* citofluorimetrico relativo al campione positivo; gli *spots* ottenuti nella parte destra del *plot* sono riconducibili alla presenza degli spermatozoi con DNA frammentato. UR= Upper Right; LL= Low Left; LR= Low Right.

popolazione cellulare con una fluorescenza intensa, formata da spermatozoi sia frammentati che non frammentati, mentre la porzione LR è costituita dalla popolazione *Dimmer*, che ha una fluorescenza meno intensa e che è costituita interamente da spermatozoi frammentati. Anche la porzione LL è stata presa in considerazione, poiché fa parte della popolazione *Dimmer*, interamente frammentata.

### **3.II.4. Analisi dell'instabilità del genoma spermatico**

#### ***3.II.4.1. Estrazione del DNA da sangue e da liquido seminale e sua valutazione quantitativa e qualitativa***

Per estrarre il DNA da sangue periferico prelevato ai pazienti prima che iniziassero la terapia, è stato applicato il protocollo descritto nel paragrafo 3.I.2.

In relazione all'estrazione del DNA da liquido seminale i protocolli utilizzati erano diversi a seconda del quantitativo di spermatozoi disponibile.

Nello specifico, nel caso in cui tale quantitativo era uguale o inferiore a  $1 \times 10^6$  spermatozoi è stato utilizzato il metodo di estrazione che prevedeva l'ausilio di colonna seguendo il protocollo fornito dalla ditta (QIAGEN, Hilden, Germania). Quando il numero di spermatozoi disponibili per l'estrazione era superiore a tale valore, il protocollo utilizzato era il medesimo di quello impiegato per l'estrazione da sangue periferico.

Tuttavia, vi erano alcune differenze quali: i) una volta che i campioni sono stati congelati sono stati sottoposti ad un solo lavaggio con PBS; ii) l'incubazione *overnight* a  $37^\circ\text{C}$  prevedeva l'aggiunta, oltre ai reagenti descritti nel paragrafo 3.I.2., anche del Ditiotreitolo (DTT, 10mg/ml, è un agente riducente in grado di rompere i ponti disolfuro della maggior parte delle proteine, utilizzato in questo caso per favorire il distacco delle protamine che compattano il DNA spermatico rendendone più facile il rilascio in soluzione); iii) quando il numero di spermatozoi di partenza era superiore a  $1 \times 10^6$  ma inferiore a  $20 \times 10^6$ , l'estrazione del DNA è stato eseguito in eppendorf (altrimenti avremmo dovuto usufruire delle falcon) e i volumi dei reagenti utilizzati sono stati dimezzati.

Il DNA estratto da liquido seminale è stato valutato in termini di quantità e qualità mediante l'ausilio dello spettrofotometro come descritto nel paragrafo 3.I.3..

Le ditte nelle quali sono stati acquistati i suddetti reagenti sono elencate in Tabella 1 dell'Appendice.

#### ***3.II.4.2. PCR per l'amplificazione della regione con il microsatellite***

Il DNA estratto da sangue periferico, e quello estratto dal liquido seminale (ai tempi  $T_1$ ,  $T_2$  e  $T_3$ ) è stato utilizzato per valutare la presenza di instabilità del genoma spermatico tramite l'analisi di instabilità dei microsatelliti. Secondo le linee guida sull'analisi dei microsatelliti del *National Cancer Institute Workshop On Microsatellite Instability* (Boland et al. 1998) è raccomandata l'analisi di almeno 5 marcatori per stabilire la presenza di MSI. Si ritiene infatti che la stabilità dei microsatelliti sia mantenuta da una serie di proteine ognuna specifica per un certo tipo di *mismatch* del DNA,

pertanto risulta necessario scegliere diversi *marker* genomici (microsatelliti) per rappresentare tutte le sequenze suscettibili all'instabilità. Noi abbiamo scelto sette microsatelliti localizzati in differenti cromosomi (Tabella 8), cinque dei quali (BAT26, BAT25, D17S250, D2S123, D5S346) facenti parte del pannello di microsatelliti validati da Ruschoff e Fishel, raccomandato per lo studio dell'instabilità dei microsatelliti nel cancro colon-rettale (Dietmaier et al. 1997).

I parametri utilizzati per poter confermare la presenza di MSI sono gli stessi indicati nelle linee guida, secondo le quali l'instabilità dei microsatelliti può essere distinta in due sottotipi: *Low Frequency Microsatellite Instability* (L-MSI), quando uno sul totale dei marcatori testati è instabile, e *High Frequency Microsatellite Instability* (H-MSI), quando il 40% dei loci analizzati risulta instabile (nel nostro caso almeno 3 su 7).

Microsatellite	Unità ripetuta	N° di ripetizioni fisiologiche dell'unità	Localizzazione	Gene associato
AR	Trinucleotidica (CAG)n	6-39*	Xq11.12	Recettore androgenico (esone 1)
ER	Dinucleotidica (TA)n	9-28**	6q25.1	Recettore estrogenico $\alpha$ (promotore)
D17S250	Dinucleotidica (TA)n	Polimorfico	17q11.2-q12	-
D2S123	Dinucleotidica (CA)n	Polimorfico	2p16	-
D5S346	Dinucleotidica (CA)n	Polimorfico	5q21	-
BAT26	Mononucleotidica (A)n	26	2p21	MSH2 (introne 5)
BAT25	Mononucleotidica (T)n	25	4q12	c-Kit (introne 16)

**Tabella 8 - Marcatori selezionati per la valutazione dell'instabilità dei microsatelliti. \*È stato riportato che la normale distribuzione del polimorfismo (CAG)n è variabile da 6 a 39 ripetizioni con una media di 21-22 per i bianchi Caucasic, 19-20 per Africani-Americani, 22-23 per gli Asiatici e pari a 23 per la popolazione Ispanica (Krausz 2012). \*\* Range proprio della popolazione Italiana ed Ispanica (Lo Giacco et al. 2011).**

Tutti i marcatori da noi utilizzati sono stati sottoposti ad amplificazione mediante PCR che prevedeva l'utilizzo di una coppia di *primers* specifica per ogni marcatore in cui il *forward* o il *reverse* era marcato con un fluorocromo. Le sequenze dei *primers* con la lunghezza del frammento amplificato e le ditte in cui sono stati acquistati i reagenti di PCR sono riportate, rispettivamente, in Tabella 1 e 2 dell'Appendice.

Per l'analisi del polimorfismo CAG del recettore androgenico la reazione di amplificazione è stata eseguita in un volume finale di 15 $\mu$ l utilizzando, come reagenti: 3 $\mu$ l di Buffer Go-Taq 5X, 1.5  $\mu$ l per ogni primer 5 $\mu$ M, 1.2 $\mu$ l di dNTPs 2.5mM, 0.12 $\mu$ l di Go-Taq 5U/ $\mu$ l e 1.2 $\mu$ l di DNA 80ng/ $\mu$ l. Il programma di PCR prevedeva una denaturazione iniziale di 5 minuti (94°C), 30 secondi di denaturazione (94°C), *annealing* (60°C) ed estensione (72°C) entrambe per 30 secondi, ripetuti per 35 cicli, ed infine una fase di estensione terminale di 10 minuti (72°C).

Il polimorfismo del recettore estrogenico  $\alpha$  è stato analizzato mediante un protocollo di reazione di PCR che prevedeva un volume finale di 25 $\mu$ l costituito da: 2.5 $\mu$ l di Buffer Fast-Taq 10X, 1 $\mu$ l per

ciascun primer 10 $\mu$ M, 2 $\mu$ l di dNTPs 2.5mM, 0.2 $\mu$ l di Fast-Taq 5U/ $\mu$ l e 1.5 $\mu$ l di DNA 100ng/ $\mu$ l. Il programma di amplificazione consisteva in una denaturazione iniziale di 6 minuti (94°C), 30 secondi di denaturazione (94°C), *annealing* (56°C) per 45 secondi, estensione (72°C) per 1 minuto, ripetuti per 35 cicli, ed infine una fase di estensione terminale di 5 minuti (72°C).

Per i restanti cinque microsatelliti il protocollo di amplificazione prevedeva, in un volume finale di 25 $\mu$ l, l'utilizzo di 2.5 $\mu$ l di Buffer Platinum-Taq 10X, 1 $\mu$ l per ciascun primer 10 $\mu$ M, 2 $\mu$ l di dNTPs 2.5mM, 0.2 $\mu$ l di Platinum-Taq 5U/ $\mu$ l, 1 $\mu$ l di MgCl<sub>2</sub> 2.5mM e 2 $\mu$ l di DNA 80ng/ $\mu$ l. Il programma PCR era il medesimo (compresa la temperatura di *annealing*, unica per tutte e cinque le coppie di *primers*) di quello utilizzato per l'amplificazione del microsatellite ER.

È opportuno specificare che per l'analisi delle ripetizioni (CAG)<sub>n</sub> e (TA)<sub>n</sub> abbiamo amplificato oltre al DNA dei campioni di nostro interesse, anche quello di due soggetti per i quali era noto il numero di ripetizioni (controlli interni).

Nello specifico per il recettore androgenico è stato utilizzato un controllo con 8 ripetizioni CAG (allele relativamente raro), per il recettore estrogenico  $\alpha$  è stato utilizzato controllo eterozigote con, quindi, 14 e 25 ripetizioni TA. In quest'ultimo caso, poiché il numero di ripetizioni è piuttosto frequente nella popolazione generale, il frammento è stato amplificato utilizzando un *primer Forward* marcato in posizione 5' con il fluorocromo HEX al posto del fluorocromo FAM, utilizzato invece per i campioni.

### **3.II.4.3. Analisi elettroforetica**

La valutazione del numero di ripetizioni per ogni microsatellite è stata effettuata attraverso elettroforesi capillare, automatizzata dallo strumento ABI PRISM 310 (Applied Biosystems, Foster City, California) con *software* GeneScan.

Dopo aver amplificato separatamente il DNA estratto da linfociti e quello estratto da spermatozoi per tutti e 7 i marcatori, sono state preparate due miscele di ampliconi. Una contenente il prodotto di amplificazione del recettore androgenico e quella del recettore Estrogenico  $\alpha$  appartenenti sia al DNA linfocitario sia spermatico, l'altra che includeva gli altri 5 marcatori (BAT26, BAT25, DI7S250, D2S123 e D5S346) di entrambi i materiali biologici. Nella prima miscela sono stati inclusi anche gli amplificati per le ripetizioni (CAG)<sub>n</sub> e (TA)<sub>n</sub> dei due controlli interni.

Un  $\mu$ l di ogni miscela, opportunamente diluito, è stato risospeso in formammide *ABI Prism*® insieme a 0,25  $\mu$ l di *GeneScan*® 400HD ROX. Per favorire il processo di analisi al sequenziatore, gli amplificati nella miscela sono stati resi a singolo filamento ponendo la miscela stessa prima a 95°C per 5 minuti e poi in ghiaccio per qualche minuto per bloccare il processo. Per ogni soggetto in studio, è stato confrontato il tracciato elettroforetico dei prodotti PCR ottenuti utilizzando DNA da linfociti e DNA da spermatozoi definendo un microsatellite instabile quando nel DNA dei due campioni biologici di uno stesso soggetto è stata osservata la presenza di alleli di differenti dimensioni.

### 3.II.5. Analisi dell'epigenoma spermatico

#### 3.II.5.1 Protocolli di separazione nemaspermica

Per il nostro studio che riguarda la metilazioni del DNA sono stati utilizzati due diversi protocolli di separazione nemaspermica, su gradiente *PureSperm* e *Swim-up*. Entrambi, applicati dopo l'esecuzione dello spermioγραμμα (vedi paragrafo 3.II.2.1) sono volti a ricavare la frazione di eiaculato contenente gli spermatozoi migliori sui quali si concentrerà la nostra analisi. Le ditte dalle quali abbiamo acquistato i reagenti utilizzati per tali protocolli sono indicati in Tabella 1 dell'Appendice.

#### Protocollo di separazione su gradiente *PureSperm*

Rappresenta uno dei più popolari metodi di lavaggio degli spermatozoi sospesi all'interno del liquido seminale, con lo scopo di separarli dalle cellule morte, dai globuli bianchi e da altri rifiuti contenuti nel campione.

Il *PureSperm* una soluzione colloidale, sterile, salina e isotonica impiegata nelle tecniche di riproduzione assistita (ART), ideale per la creazione di gradienti di densità che utilizzeremo per separare e purificare gli spermatozoi. Esso viene fornito dalle ditte in soluzione madre che sarà poi diluita con terreno (HTF+HSA) alle percentuali utili all'impiego, nel nostro caso pari a: 25%, 45% e 90%. L'HTF o *Human Tubaric Fluid* è un *medium* contenente bicarbonato e gentamicina, utilizzato per la coltura di gameti ed embrioni fino a tre giorni dopo la fecondazione. Per il nostro impiego, l'HTF è stato aggiunto ad HSA (*Human Serum Albumin*) e quindi poi uniti al *PureSperm* in volumi diversi per raggiungere le suddette percentuali. Per il gradiente *PureSperm* è necessario 1 ml di liquido seminale che sarà aggiunto per ultimo alla provetta in cui sono state stratificate le tre diverse percentuali di tale polimero nell'ordine, 90%, 45% e 25%, tutte in un volume pari a 1 ml, formando un gradiente *PureSperm*. È stata effettuata poi una centrifugazione di 30 minuti al termine della quale sono stati recuperati gli spermatozoi attivi sul fondo della provetta, scartando quelli morti e i materiali residui attraverso l'eliminazione dei primi due strati (25% e parte del 45%). Sono stati recuperati 1ml (500 ml 45% + 500 ml 90%) di soluzione ed il *pellet* con il restante 90% in due falcon diverse alle quali è stato aggiunto il *dynabeads* (biglie magnetiche), precedentemente lavato con un *buffer*, per la separazione cellulare. A questo punto le falcon sono state inserite nel magnete per 2 minuti, al termine dei quali è stata recuperata la frazione 90% e la frazione 45% in due eppendorf separate. Per entrambe, valutando, tramite microscopio ottico, la quantità approssimativa di spermatozoi, sono state preparate delle diluizioni aggiungendo, a 10µl di campione, un volume variabile di liquido di conta. Una goccia per ogni diluizione è stata introdotta nella camera di Neubauer formata da quattro quadrati grandi delimitati da linee triple, ognuno dei quali è formato da ulteriori sedici quadrati più piccoli, al fine di determinare il numero di spermatozoi recuperati.

La frazione 90% è stata sottoposta a due lavaggi con *Phosphate buffered saline* (PBS), ciascuno seguito da una centrifugazione di 10 minuti, al termine della quale è stato eliminato il sovrantante. La frazione ottenuta è stata conservata a -20°C fino al momento dell'estrazione del DNA.



### **Protocollo di separazione *Swim-up***

Il protocollo *Swim-up* consisteva nell'utilizzo di 1 ml di liquido seminale a cui è stato aggiunto 1 ml di HTF+HSA in una provetta a fondo conico precedentemente riscaldata nell'incubatore a 37°C. Il campione è stato, quindi, centrifugato per 10 minuti a 2000 rpm al termine dei quali è stato eliminato il sovrantante. Il *pellet* così ricavato è stato risospeso stratificando 1,2 ml di HTF+HSA che sono stati aggiunti lentamente appoggiando la pipetta alla parete della provetta. Il campione è stato poi incubato per un'ora a 37°C, al termine della quale è stato prelevato 1 ml dalla fase più alta, in cui sono sospesi solo gli spermatozoi capacitati. Il processo di capacitazione, infatti, serve a far acquisire un certo grado di motilità agli spermatozoi i quali verranno così resi abili ad attraversare le vie genitali femminili per raggiungere l'ovocita da fecondare. Si è proceduto quindi con la conta e con l'analisi della motilità degli spermatozoi contenuti nella frazione *up* così ricavata. La restante parte del campione rappresentava la frazione *down*, che conteneva solo gli spermatozoi ipomobili o del tutto immobili.

Così come per la frazione 90%, anche la frazione *up* è stata sottoposta a due lavaggi con PBS, centrifugazione di 10 minuti, eliminazione del sovrantante e conservazione della frazione ottenuta a -20°C fino al momento dell'estrazione del DNA.

### **3.II.5.2 *Micro-array***

Nel nostro studio, l'analisi dell'epigenoma spermatico consiste nella valutazione del metiloma ovvero del livello di metilazione del DNA estratto dagli spermatozoi mediante la tecnologia del *micro-array*. In generale, essi consistono di *chips* che includono un insieme di sonde di DNA le quali aderiscono su superfici solide costituite da vetro o plastica, o da una matrice in silicio. Tali *arrays* permettono di esaminare in modo simultaneo moltissimi geni o addirittura interi genomi grazie all'ibridazione dei segmenti di DNA (*probe*) fissati sul supporto con il campione marcato (*target*).

In questo studio è stato utilizzato l'*Infinium Human Methylation Bead Chip 450K* (Illumina) che include sonde per siti CpGs, per RNA non-codificanti (tra cui microRNAs) e per porzioni adiacenti ai siti di inizio della trascrizione (da 200bp a 1,500bp, 5'-UTRs e l'esone 1). Esso nasce per studi in ambito oncologico al fine di rilevare eventuali cambiamenti nel *pattern* di metilazione del DNA, estratto da campioni di sangue periferico, osservabili solo nelle cellule tumorali e non in quelle sane. Tale *array* permette di analizzare, contemporaneamente e in breve tempo, circa 480,000 posizioni genomiche che rappresentano siti citosinici presenti nel genoma umano (siti CpGs), distribuiti in tutti i cromosomi, inclusi quelli sessuali. Più precisamente, l'*array* contiene 485,764 posizioni delle quali 482,421 (99.3%) sono dinucleotidi CpGs, mentre 3,343 (0.3%) rappresentano *targets* dei canali CNG (*cyclic nucleotide-gated channels*). Nel nostro caso, la totalità dei siti analizzabili con l'*array* sono stati considerati come CpGs. Il cromosoma 1 è quello che comprende più posizioni (46,867; 9.6%), mentre il cromosoma Y è quello che ne include meno (416; 0.08%). Descrivendo in maniera più dettagliata la composizione del nostro *array*, si può dire che 361,766 CpGs (74.4%) rappresentano

classici geni che codificano per RNA messaggeri, 4,168 CpGs (0.85%) sono correlati ad RNA non codificanti (3,440 per microRNA e 728 per i lunghi filamenti di RNA non codificanti). Per 119,830 siti CpGs (24.6%), invece, non ci sono trascritti associati. Analizzando il contenuto delle CpGs e le posizioni a loro adiacenti si può dire che:

- 150,254 (30.9%) si trovano a livello delle CpG *islands* (sequenze di DNA con un contenuto in CG superiore al 50%);
- 112,072 (23%) sono localizzate all'interno di CpG *shores* (sequenze di DNA poste fino a 2Kb dall'isola CpG);
- 47,161 (9.7%) si trovano nelle CpGs *shelves* (sequenze di DNA poste a una distanza di 2-4Kb dall'isola CpG);
- 176,277 (36.3%) sono i siti CpGs rimanenti che si trovano isolati nel genoma e che sono definiti "Open Sea".

Se si classificano tutti i siti CpGs in base alla loro distribuzione funzionale sul genoma, possiamo dire che 200,339 (41%) sono localizzati a livello dei promotori prossimali, definiti come la somma dei siti CpGs che si trovano entro 200bp (62,625) o 1,500bp (77,379) a monte del sito di inizio della trascrizione, al 5'-UTR (*untranslated region*) (49,525) e nell'esone 1 (10,810). Inoltre, 15,383 siti

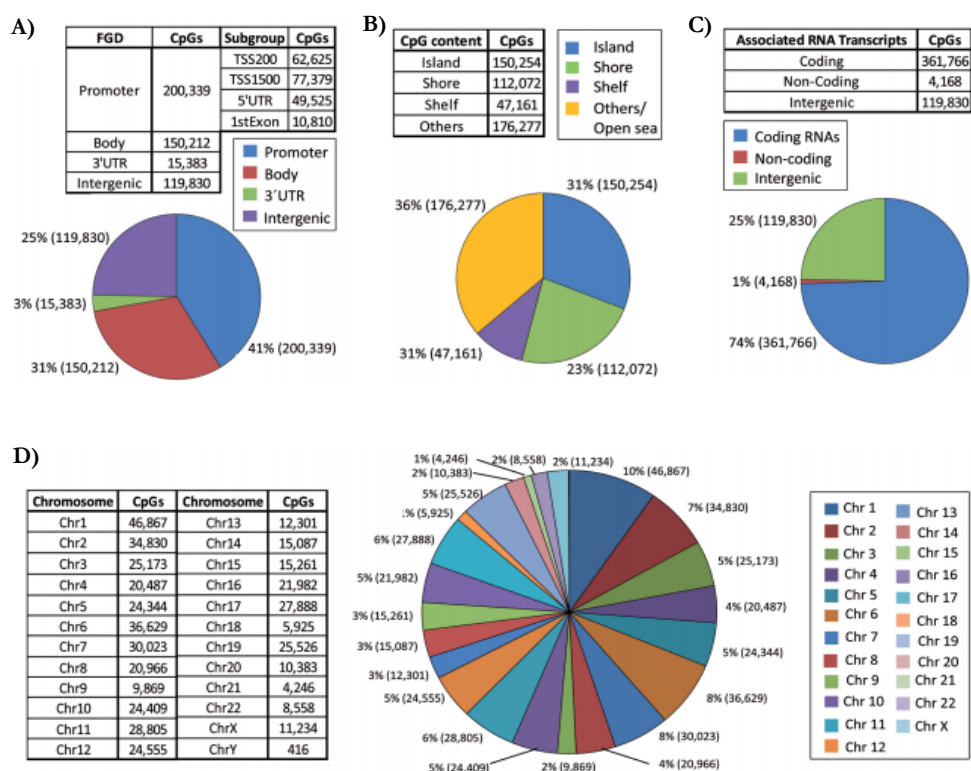


Figura 10 - Descrizione dell'array *Infinium Illumina* 450K. (A) Classificazione in base alla distribuzione genomica funzionale (FGD) che comprende: promotore, *body*, 3'UTR e sequenza intragenica. (B) Contenuto delle CpGs e delle porzioni adiacenti classificate in: *island*, *shore*, *shelf* e altri. (C) Classificazione in base all'associazione con trascritti di RNA in: codificanti, non codificanti e intragenici. (D) Localizzazione cromosomica.

(3.16%) si trovano al 3'-UTR, 119,830 siti (24.6%) sono collocati in sequenze intrageniche (*Open Sea*) e 150,212 (30.9%) fanno parte di un gene (*body*). Se si combinano le classificazioni appena descritte, possiamo dire che per 200,339 CpGs, a livello dei promotori prossimali:

- 92,374 (46.1%) sono all'interno di CpGs *island*;
- 56,672 (28.3%) si trovano in CpGs *shores*;
- 7,548 (3.8%) sono in CpGs *shelves*;

mentre 43,745 (21.8%) si trovano in altre regioni del genoma che abbiamo definito *Open Sea*.

La Figura 10 riassume la disposizione genomica delle 485.764 CpGs analizzate dall'*array*.

### Conversione con bisolfito

In accordo con le istruzioni per l'utilizzo dell'*array Infinium Illumina*, 600ng di ogni campione di DNA sono stati utilizzati per la conversione con bisolfito. Tale protocollo rappresenta il *gold standard* per l'analisi di metilazione del DNA e facilita l'identificazione e la quantificazione dei siti metilati con una risoluzione a singolo nucleotide (Figura 11A). Il trattamento del DNA con sodio bisolfito (NaHSO<sub>3</sub>) rende la citosina non metilata più suscettibile alla deaminazione idrolitica in ambiente alcalino. Ciò permette una conversione selettiva delle citosine prive di gruppo metile in uracile a livello del singolo filamento di DNA, ottenuto tramite un precedente *step* di denaturazione.

La conversione da citosina non metilata ad uracile avviene in seguito a tre fasi (Figura 11B):

1. solfonazione tramite l'aggiunta del bisolfito al doppio legame 5-6 della citosina;
2. deaminazione idrolitica della citosina solfonata a formare uracile-bisolfito;
3. rimozione del gruppo solfonato in ambiente alcalino da cui si ricava l'uracile.

L'effettiva conversione delle citosine con bisolfito è stata confermata mediante l'utilizzo di tre controlli di DNA genomico (totalmente metilato, mediamente metilato, non metilato) i quali sono stati trattati insieme ai campioni di DNA da analizzare.

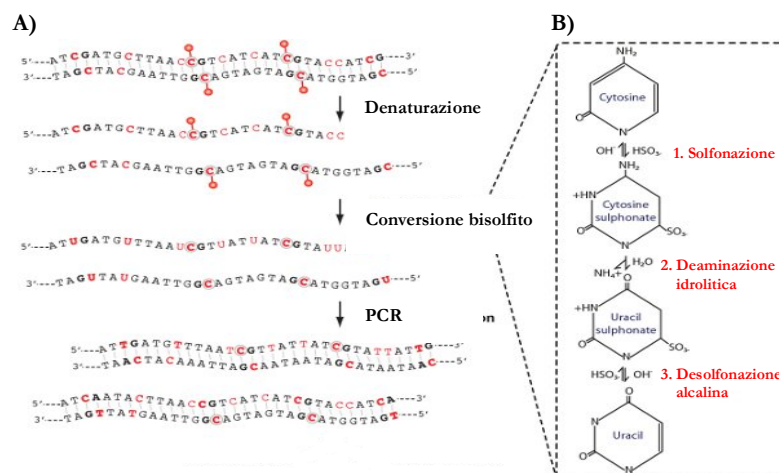


Figura 11 - Trattamento del DNA prima dell'analisi sull'*array*. (A) Steps che costituiscono il protocollo applicato prima di sottoporre il campione all'analisi del metiloma con l'*array*. (B) I tre steps alla base del trattamento con bisolfito che converte la citosina non metilata in uracile.

Il passo successivo consiste nell'amplificazione con PCR del tratto genomico durante la quale le citosine non metilate, diventate uracili in seguito a trattamento con bisolfito, saranno amplificate come timine ("T") mentre le citosine metilate, rimaste tali dopo il suddetto trattamento, continueranno ad essere amplificate come citosine ("C"). Pertanto, con questo meccanismo, è possibile discriminare le citosine dalle 5-metilcitosine che saranno rappresentate rispettivamente da una "T" e da una "C" all'interno della sequenza.

### Saggio di metilazione del DNA

Quattro microlitri di amplificato ottenuto in seguito a conversione con bisolfito, sono stati sottoposti ad amplificazione *whole genome* seguita da frammentazione enzimatica, precipitazione e successiva risospensione. Per favorire l'ibridazione di tale prodotto sull'*Infinium Human Methylation 450 Bead Chip*, il tutto è stato incubato a 48°C per 16 ore. Dopo aver effettuato un lavaggio con lo scopo di eliminare il DNA non ibridato, è stata fatta un'estensione a singolo nucleotide utilizzando il DNA convertito con bisolfito e ibridato come stampo. I nucleotidi incorporati sono marcati con biotina (ddCTP e ddGTP) e con 2,4-dinitrofenolo (DNP) (ddATP e ddTTP) i quali sono legati a fluorocromi diversi che quando eccitati dal laser emettono rispettivamente nel verde e nel rosso. La Figura 12 mostra come avviene l'aggiunta dei nucleotidi marcati, discriminando così i siti metilati da quelli non metilati in base al colore emesso dal fluorocromo.

L'intensità delle immagini è stata ottenuta mediante il *software Genome Studio (2010.3) Methylation Module (1.8.5)* che ha permesso di effettuare la normalizzazione dei dati ottenuti tramite una procedura standard, eliminando così un'eventuale ridondanza che avrebbe potuto influenzare significativamente l'interpretazione dei risultati.

Questo programma utilizza come controlli interni geni *housekeeping* privi di siti CpGs che nel nostro caso sono inclusi nello *Human Methylation 450 K BeadChip*. L'intensità del segnale viene moltiplicata per un fattore di normalizzazione (costante per tutti i campioni) e diviso per la media di tutti i

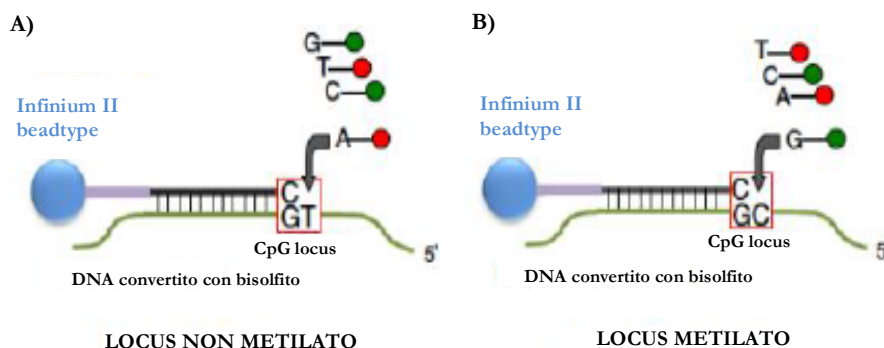


Figura 12 - Principio su cui si basa la discriminazione dei siti metilati rispetto a quelli non metilati effettuata dall'Array Infinium Illumina 450K. (A) Quando il locus CpG non è metilato, esso è costituito da una "T" (o da una adenina "A" nel caso del filamento complementare), pertanto il nucleotide aggiunto alla sonda dell'*array* sarà ddATP (o ddTTP nel caso del filamento complementare). (B) Quando il locus CpG è metilato, esso è costituito da una "C" (o da una guanina "G" nel caso del filamento complementare), pertanto il nucleotide aggiunto alla sonda dell'*array* sarà ddGTP (o ddCTP nel caso del filamento complementare).

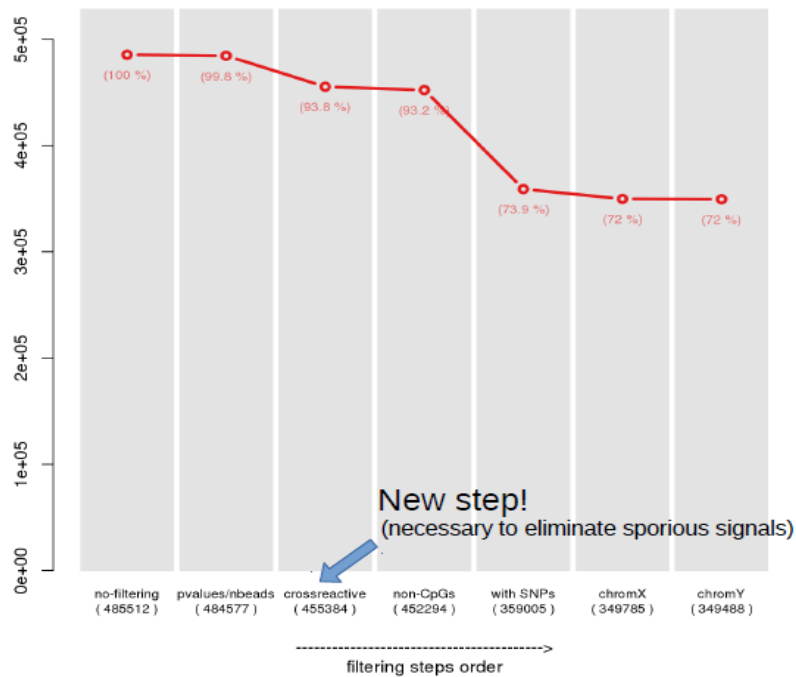


Figura 13 - In seguito ad operazioni di filtraggio, 485,512 posizioni iniziali (100%) sono state ridotte a 349,488 (72%) che rappresenta quindi il numero di posizioni finali analizzate nel nostro studio.

controlli nel canale della sonda del campione in esame. Le 485,512 posizioni iniziali, non includendo quelle per gli SNPs, sono state filtrate in base alla qualità di lettura con lo scopo di eliminare i segnali spuri (Figura 13), ottenendo un numero di posizioni finali pari a 349,488.

In seguito alla normalizzazione ed al filtraggio dei dati, è stato possibile procedere con la rilevazione di regioni differenzialmente metilate (DMRs) statisticamente significative.

### 3.II.6. Analisi statistica

#### 3.II.6.1. Analisi dei risultati relativi a parametri seminali e frammentazione del DNA spermatico

Tutta la statistica descrittiva e i test statistici sono stati eseguiti con il software di analisi statistica IBM SPSS *Statistics* per Windows (versione 24, SPSS Inc. Chicago, IL, USA).

Le medie  $\pm$  l'errore standard ( $\pm$ SE) dei parametri seminali dei pazienti con tumore testicolare sono state calcolate mediante t-test.

I livelli di frammentazione del DNA degli spermatozoi della popolazione tumorale sono stati confrontati con quelli relativi ad un gruppo di controllo senza storia tumorale per valutare l'eventuale presenza di una differenza statisticamente significativa. L'analisi è eseguita con il t-test per campioni dipendenti (studio longitudinale) e indipendenti (studio *cross-sectional*). L'ipotesi nulla corrispondeva all'assenza di tale differenza nei due gruppi di analisi. Come indice di significatività statistica è stato considerato un valore di "p" inferiore a 0.05. Pertanto l'ipotesi nulla è stata o meno accettata a seconda se tale valore era, rispettivamente, maggiore o minore di 0.05.

### 3.II.6.2. *Analisi dei risultati relativi alla metilazione del DNA degli spermatozoi*

Per fare una stima sul livello di metilazione delle varie *probes*, in accordo con l'intensità di fluorescenza rilevata, è stato calcolato il  $\beta$ -value mediante la seguente formula:

$$\beta = \frac{\text{Methylated allele intensity (M)}}{(\text{Unmethylated allele intensity (U)} + \text{Methylated allele intensity (M)} + 100)}$$

Il valore di  $\beta$  può essere compreso tra 0 e 1, dove 0 indica l'assenza di metili, mentre 1 indica la completa metilazione del *locus* in esame.

Le CpGs con  $\beta$ -value minore di 0.2 sono considerate ipometilate, quelle con  $\beta$ -value maggiore di 0.8, invece, sono ipermetilate.

Per rilevare quali siti CpGs presentavano differenze di metilazione statisticamente significative, è stato applicato il Manhattan plot. Si tratta di un tipo di scatter plot utilizzato negli studi di associazione *genome-wide* che presenta le coordinate genomiche (nel nostro caso i cromosomi) sull'asse delle x, mentre sull'asse delle y troviamo il logaritmo negativo in base 10 del *p-value*. Le *probes* analizzate andranno perciò a collocarsi sul plot in base alla loro posizione genomica e alla loro significatività statistica determinata dal *p-value*. I siti CpGs con differenze di metilazione maggiormente significative si troveranno nella parte alta del plot, oltre la soglia definita "*suggestive*", calcolata come il logaritmo negativo in base 10 del *p-value* ( $p\text{-value suggestive} = 2,86 \times 10^{-6}$ ; soglia *suggestive* = 5,54).

A tale distribuzione è stata applicata la correzione di Bonferroni tra confronti multipli con lo scopo di ridurre il numero di falsi positivi (errori di tipo 1) quando eventi statistici, dipendenti o indipendenti, vengono analizzati simultaneamente come singolo set di dati. In questo modo è aumentata la probabilità di ottenere almeno un risultato significativo poiché il numero di test fatti è rapportato al numero di tutti i test possibili. Con la correzione di Bonferroni, è possibile definire una seconda soglia di significatività statistica, maggiore rispetto a quella *suggestive*. Anche la soglia di Bonferroni deriva dal logaritmo negativo in base 10 del *p-value* e dipenderà dal numero di campioni analizzati.

È stato utilizzato un altro tipo di scatter plot, il Volcano plot, allo scopo di identificare rapidamente i cambiamenti in un set di informazioni costituite da dati ripetuti. Si tratta di un diagramma matematico che usa le coordinate cartesiane per mostrare i valori di due variabili per un set di dati. Sull'asse delle y, come per il Manhattan plot, si trova il logaritmo negativo in base 10 del *p-value*, perciò, i punti più significativi si troveranno nella parte superiore del plot. Sull'asse delle x abbiamo invece il logaritmo della condizione variabile rappresentato nel nostro caso dalla differenza di metilazione. Tale logaritmo permette di visualizzare i cambiamenti in entrambe le direzioni che

saranno equidistanti dal centro del grafico. Anche in questo caso i dati più statisticamente significativi sono quelli al di sopra della soglia *suggestive*, ma lo sono ancora di più quelli che raggiungono o che addirittura superano la soglia imposta dalla correzione di Bonferroni.

Infine, è stato applicato il test di permutazione random per la verifica di ipotesi multivariate che consente di valutare la condizione di scambiabilità tra le diverse unità statistiche.





## 4. RISULTATI

### 4.I. SCOPO 1: RIARRANGIAMENTI AZFc COME FATTORI DI RISCHIO DEI TTCG

#### 4.I.1. Descrizione della popolazione di studio

Questa parte della tesi prevede l'analisi di una vasta popolazione di studio costituita da casi e controlli, tutti di origine Italiana.

Il gruppo dei casi è costituito da 400 pazienti affetti da TTCG: 275 provenienti dalla SOD di Andrologia e Medicina della Sessualità e di Fisiopatologia della Riproduzione Umana dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Careggi (Firenze) e 125 dall'Università La Sapienza di Roma. Per tutti i pazienti erano noti i parametri seminali (Tabella 9). Sulla base dei parametri seminali, essi si suddividono in: 224 normozoospermici e 176 non-normozoospermici. L'istologia del tumore testicolare era conosciuta per 392 casi classificabili in: 291 Seminomi e 101 Non-seminomi.

Il gruppo dei controlli è rappresentato da 1335 soggetti non affetti da tumore testicolare, dei quali 696 sono soggetti fertili normozoospermici mentre 639 sono pazienti infertili idiopatici (non-normozoospermici) (Tabella 9). Questi ultimi non devono quindi presentare cause note d'infertilità maschile, pertanto sono stati esclusi anche i pazienti portatori di delezioni complete AZF del cromosoma Y, inclusa la delezione b2/b4 (AZFc completa).

Parametri seminali	Casi (n=400)	Controlli (n=1335)
	Media $\pm$ D.S.	Media $\pm$ D.S.
Concentrazione ( $10^6$ spzoi/ml)	27.78 $\pm$ 35.33	51.92 $\pm$ 66.04
Numero totale ( $10^6$ spzoi/eiaculato)	99.26 $\pm$ 134.96	198.38 $\pm$ 248.83
Motilità (%)	42.14 $\pm$ 22.94	39.40 $\pm$ 25.47
Morfologia (%)	12.46 $\pm$ 11.04	25 $\pm$ 15.07

Tabella 9 - Descrizione dei parametri seminali ottenuti in seguito a spermiogramma nella popolazione di studio formata da casi (pazienti con TTCG) e controlli (soggetti normozoospermici o infertili idiopatici non affetti da TTCG). D.S.= Deviazione Standard; spzoi = spermatozoi.

#### 4.I.2. Riarrangiamenti AZFc: studio caso/controllo

Tutta la popolazione di studio è stata analizzata per le delezioni complete AZF (inclusa la delezione b2/b4) e le delezioni parziali (seguite o meno da uno o più eventi di duplicazione) a livello della regione AZFc del cromosoma Y. La totalità dei casi e circa la metà del gruppo dei controlli è stato valutato anche per le duplicazioni parziali AZFc (coinvolgono sia *CDY1* che *DAZ*).

Attraverso un metodo basato su tre *steps* rappresentati da PCR *plus/minus*, dosaggio genico e RFLP (descritto nel paragrafo 3.I.4.), è stato possibile definire cinque diversi pattern di delezione: i) delezione gr/gr; ii) delezione b2/b3; iii) delezione b2/b4; iv) delezione b1/b3; v) nessuna delezione. Lo studio del dosaggio genico (*CDY1* e *DAZ*) combinato ad RFLP ha permesso inoltre di individuare: i) delezioni seguite da duplicazioni (riarrangiamenti multipli); ii) duplicazioni parziali AZFc.

Sia nei pazienti con TTCG che nei controlli, i riarrangiamenti che si presentavano con la frequenza maggiore erano la delezione gr/gr (rispettivamente, 2.8%, 11/400 e 1.7%, 23/1335) e la duplicazione parziale (rispettivamente, 5.3% , 21/400 e 3.2% , 23/729) (Tabella 10A e B).

##### 4.I.2.1. Confronto della frequenza delle delezioni parziali AZFc tra casi versus controlli

Nel gruppo dei casi (n=400) e in quello dei controlli (n=1335) sono state riscontrate solo due tipologie di delezioni parziali: gr/gr e b2/b3 (Tabella 10A). Le delezioni parziali rilevate sono state confermate con l'analisi del dosaggio genico di *CDY1* e di *DAZ* e con l'analisi RFLP la quale identifica le copie geniche rimosse dalla delezione: stessa *CDY1a/CDY1b* e *DAZ1/2* e *DAZ3/4* (Tabella 11).

Considerando le suddette delezioni parziali singolarmente, non si raggiunge una differenza statisticamente significativa dal confronto delle loro frequenze tra casi *versus* controlli (Tabella 12A). Questa invece viene raggiunta quando tale confronto è effettuato per le delezioni parziali nella loro totalità (gr/gr e b2/b3) ( $p=0.05$ , OR 1.9, 95% CI 1-3.6) (Tabella 12A).

Allo scopo di valutare se il tipo di copia genica rimossa dalla delezione potesse avere un ruolo nell'influenzare la suscettibilità allo sviluppo dei TTCG, i riarrangiamenti parziali sono stati analizzati nei due gruppi di studio in funzione della copia genica mancante (per un soggetto portatore della delezione gr/gr appartenente al gruppo dei controlli non è stato possibile eseguire l'analisi RFLP) (Tabella 11A). Relativamente alla delezione gr/gr, la nostra coorte ha mostrato una maggiore frequenza per la delezione di *CDY1a*, rispetto a *CDY1b*, sia nei casi 73% (8/11) che nei controlli 68% (15/22). La frequenza della delezione di *DAZ1/2* e di *DAZ3/4* è risultata sovrapponibile nel gruppo dei casi (rispettivamente, 45% 5/11 e 55% 6/11) e leggermente più alta per *DAZ3/4* nel gruppo dei controlli (64% 14/22). In merito alla delezione b2/b3, il gruppo dei casi (n=3) presentava una maggiore frequenza della delezione di *CDY1a* rispetto a *CDY1b* (rispettivamente, 67% e 33%), contrariamente a quello dei controlli (n=4) (rispettivamente, 25% e 75%). Tutti i casi e i controlli con delezione b2/b3 avevano una rimozione della coppia *DAZ3/4*.

All'interno della nostra casistica 2 casi e 2 controlli hanno mostrato, successivamente ad una delezione parziale AZFc, uno o più eventi di duplicazione (riarrangiamenti multipli). L'evento di delezione-duplicazione è stato osservato sia in relazione alla delezione gr/gr (3 soggetti) che b2/b3. A conferma della delezione seguita da duplicazione, l'analisi RFLP ha dimostrato la presenza di un solo tipo di copia genica *CDY1* e di un solo tipo di coppia genica di *DAZ*. Tali soggetti, presentavano un normale (la delezione seguita da un solo evento di duplicazione, n=1) oppure un aumentato (delezione seguita da eventi multipli di duplicazione, n=3) dosaggio genico.

#### ***4.I.2.2. Confronto della frequenza delle duplicazioni parziali AZFc tra casi versus controlli***

L'analisi del dosaggio genico non è stata limitata ai portatori di una delezione, ma è stata eseguita anche per valutare le duplicazioni per la totalità dei casi (n=400) e per 729 controlli. Tale analisi ci ha permesso di individuare la presenza di duplicazioni a livello della regione AZFc che interessano sia *CDY1* che *DAZ* (Tabella 10B). Sono stati rilevati sia eventi unici che multipli. Di fatto il numero di copie geniche di *CDY1* variava da 3 a 4, mentre quello per il *DAZ* da 6 a 8, fino ad arrivare a 12 (Tabella 11B). La frequenza di 3 copie di *CDY1* era maggiore rispetto a quella di 4 copie geniche sia nel gruppo dei casi (n=21) (rispettivamente, 81% e 19%) che in quello dei controlli (n=23) (rispettivamente, 74% e 26%). Il numero di copie di *DAZ* che presentava una frequenza maggiore è pari a 6 sia nel gruppo dei casi (6 copie: 67%; 8 copie: 33%) che in quello dei controlli (6 copie: 74%; 8 copie: 22%; 12 copie: 4%)

Le duplicazioni parziali si presentano con una frequenza pari a 5.3% (21/400) e a 3.2% (23/729) rispettivamente nel gruppo dei casi e dei controlli. La differenza tra tali frequenze è prossima al raggiungimento della significatività statistica (p=0.056) (Tabella 12A).

#### ***4.I.2.3. Confronto delle frequenze dei riarrangiamenti AZFc tra casi versus controlli selezionati sulla base del fenotipo seminale***

Come già indicato nel paragrafo 4.I.1., il gruppo di pazienti TTCG possono essere suddivisi in 224 normozoospermici e in 176 pazienti non-normozoospermici. L'intero cohort è stato sottoposto all'analisi sia delle delezioni AZF che alle duplicazioni parziali. Il gruppo dei controlli era pari, rispettivamente, a 696 e 639 per l'analisi delle delezioni parziali e a 396 e 333 per quella delle duplicazioni parziali.

Sia nel sottogruppo dei casi che in quello dei controlli entrambi con normale spermatogenesi i riarrangiamenti che si presentavano con una frequenza maggiore erano la delezione gr/gr (rispettivamente 3.1% e 0.7%) e le duplicazioni parziali (rispettivamente, 3.6%, 8/224 e 3.5%, 14/396) (Tabella 10A e B). Anche in entrambi i sottogruppi di casi e controlli con alterata spermatogenesi, i riarrangiamenti della regione AZFc che si presentavano con maggiore frequenza erano la delezione gr/gr (rispettivamente, 2.3%, 4/176 e 2.8%, 18/639) e le duplicazioni parziali (rispettivamente, 7.4%, e 2.7%, 9/333) (Tabella 10A e B).

### **Confronto tra casi totali e stratificati per fenotipo seminale *versus* controlli con normale spermatogenesi**

È stata messa a confronto la diversa incidenza delle delezioni e delle duplicazioni parziali a livello della regione AZFc tra la totalità dei casi e tra i vari sottogruppi dei casi stratificati sulla base del fenotipo seminale *versus* i controlli senza alterazione del processo spermatogenetico (Tabella 12A).

Mentre il confronto tra casi totali e controlli totali non ha evidenziato differenze significative per nessun riarrangiamento parziale (vedi paragrafo 4.I.2.2. e 4.I.2.3.), la rimozione dei soggetti non-normozoospermici dal gruppo dei controlli ha permesso il raggiungimento della significatività statistica per la delezione gr/gr ( $p < 0.01$ , OR 3.9, 95% CI 1.3-11.3). Da tale confronto, inoltre, le delezioni parziali nella loro totalità hanno raggiunto una significatività statistica più pronunciata rispetto a quello effettuato tra l'intero gruppo dei casi *versus* l'intero gruppo dei controlli ( $p \leq 0.001$ , OR 4.1, 95% CI 1.7-10). Per la delezione b2/b3 e per le duplicazioni parziali, la rimozione del sottogruppo di controlli non-normozoospermici, non ha comunque permesso il raggiungimento della significatività statistica. Il secondo confronto è stato svolto tra i casi e i controlli entrambi normozoospermici. Per la delezione gr/gr e per le delezioni parziali totali si raggiunge una differenza statisticamente significativa delle frequenze tra i due sottogruppi analizzati (rispettivamente,  $p < 0.05$ , OR 4.5, 95% CI 1.4-14.2;  $p < 0.01$ , OR 4.3, 95% CI 1.5-12.4). Questo non si osserva per la delezione b2/b3 e per le duplicazioni parziali.

Il terzo confronto tra casi non-normozoospermici *versus* controlli normozoospermici ha rilevato, nei casi, una frequenza significativamente più alta sia per le delezioni parziali totali ( $p < 0.05$ , OR 4.1, 95% CI 1.3-12.7) che per le duplicazioni parziali ( $p < 0.05$ , OR 2.2, 95% CI 1-4.8). Relativamente alla delezione gr/gr, si osserva una differenza tra i suddetti due sottogruppi prossima alla significatività statistica ( $p = 0.087$ ). Per quanto riguarda la delezione b2/b3 le frequenze sono sovrapponibili tra i due sottogruppi.

### **Confronto casi totali e stratificati per fenotipo seminale *versus* controlli con alterata spermatogenesi**

È stata eseguita un'ulteriore analisi volta a valutare la frequenza delle delezioni e delle duplicazioni parziali a livello della regione AZFc tra la totalità dei casi e tra i vari sottogruppi dei casi stratificati sulla base del fenotipo seminale *versus* controlli con alterata spermatogenesi (oligozoo/criptozoo/azoo/teratozoospermici) (Tabella 12A).

Sia confrontando i casi totali che i casi normozoospermici con i controlli non-normozoospermici, non si osserva il raggiungimento di frequenze statisticamente significative per tutti i riarrangiamenti analizzati (delezioni gr/gr, b2/b3, delezioni parziali totali e duplicazioni parziali). Tuttavia, per le duplicazioni parziali, tale differenza è prossima alla significatività statistica ( $p = 0.057$ ). Confrontando invece il sottogruppo di casi e controlli entrambi non-normozoospermici, si osserva che solo la duplicazione parziale si presenta nei due suddetti gruppi con una differenza statisticamente significativa ( $p < 0.05$ , OR 2.9, 95% CI 1.2-7).

#### **4.I.2.4. Confronto delle frequenze dei riarrangiamenti AZFc tra casi selezionati sulla base dell'istologia tumorale versus controlli selezionati sulla base del fenotipo seminale**

Dei 392 pazienti con TTCG per i quali è stato possibile ricavarne l'istologia tumorale, 291 erano affetti da Seminoma e 101 da Non-seminoma. In entrambi questi due sottogruppi, vi è una frequenza sovrapponibile della delezione gr/gr (rispettivamente 2.7% e 3%) e della duplicazione parziale (rispettivamente 5.5% e 5%) (Tabella 10A e B). Contrariamente, la delezione b2/b3 si riscontra solo nel gruppo dei Seminoma (1%).

#### **Seminoma *versus* controlli con normale e/o alterata spermatogenesi**

Le frequenze dei diversi riarrangiamenti riscontrati nella nostra casistica sono stati confrontati i pazienti affetti da Seminoma *versus* i controlli totali e stratificati per fenotipo seminale (normozoospermia e alterata spermatogenesi) (Tabella 12B).

Per quanto concerne il confronto tra pazienti con Seminoma *versus* i controlli totali e il sottogruppo di soggetti non-normozoospermici, non è stata raggiunta una significatività statistica per nessuno dei riarrangiamenti analizzati (delezioni gr/gr, b2/b3, delezioni parziali totali e duplicazioni parziali) sebbene tutti, ad eccezione delle delezioni gr/gr erano più frequenti nei seminomi. Di fatto, per quanto riguarda le duplicazioni parziali, essi si riscontrano più frequentemente nei Seminomi rispetto ai controlli totali o al sottogruppo di controlli non-normozoospermici con una differenza prossima alla significatività statistica ( $p=0.059$ ;  $p=0.057$ ). Lo stesso si osserva per le delezioni parziali totali tra seminomi e la totalità dei controlli ( $p=0.062$ ).

Una differenza statisticamente significativa delle frequenze relative alla delezione gr/gr e alle delezioni nella loro totalità si raggiunge invece confrontando il gruppo di Seminomi *versus* i controlli normozoospermici (rispettivamente,  $p<0.05$ , OR 3.9, 95% CI 1.3-12;  $p<0.01$ , OR 4.5, 95% CI 1.7-12.3), mentre per la delezione b2/b3, lo stesso confronto mostra una differenza vicina alla significatività statistica ( $p=0.079$ ).

#### **Non-seminoma *versus* controlli con normale e/o alterata spermatogenesi**

Esattamente come nel caso di pazienti con Seminoma, l'analisi prevedeva il confronto delle frequenze delle diverse delezioni e duplicazioni parziali riscontrate nella nostra casistica tra il gruppo di casi affetti da Non-seminoma e quello dei controlli totali, normozoospermici o con alterata spermatogenesi (Tabella 12B).

Nessuna categoria di riarrangiamenti a carico della regione AZFc del cromosoma Y ha raggiunto la significatività statistica quando confrontata tra il gruppo dei pazienti con Non-seminoma e quello dei controlli totali o classificati sulla base del fenotipo seminale. Tuttavia, la delezione gr/gr quando confrontata tra il suddetto sottogruppo di casi e i controlli normozoospermici, mostra una differenza prossima alla significatività statistica ( $p=0.069$ ).

**A)**

		n° soggetti con del. gr/gr/tot (%)	n° soggetti con del. b2/b3/tot (%)	n° soggetti con delezione parziale AZFc*/tot (%)
Casi	Totali	11/400 (2.8%)	3/400 (0.8%)	14/400 (3.5%)
	Normo	7/224 (3.1%)	1/224 (0.4%)	8/224 (3.6%)
	Non normo	4/176 (2.3%)	2/176 (1.1%)	6/176 (3.4%)
	Seminoma	8/291 (2.7%)	3/291 (1%)	11/291 (3.8%)
	Non-seminoma	3/101 (3%)	0/101 (0%)	3/101 (3%)
Controlli	Totali	23/1335 (1.7%)	4/1335 (0.3%)	27/1335 (2%)
	Normo	5/696 (0.7%)	1/696 (0.1%)	6/696 (0.8%)
	Non normo	18/639 (2.8%)	3/639 (0.5%)	21/639 (3.3%)

**B)**

		n° soggetti con duplicazione parziale /tot (%)
Casi	Totali	21/400 (5.3%)
	Normo	8/224 (3.6%)
	Non normo	13/176 (7.4%)
	Seminoma	16/291 (5.5%)
	Non seminoma	5/101 (5%)
Controlli	Totale	23/729 (3.2%)
	Normo	14/396 (3.5%)
	Non normo	9/333 (2.7%)

**Tabella 10 -** Frequenza di ogni alterazione a carico della regione AZFc rilevate nel gruppo dei casi e dei controlli nella loro totalità e nei sottogruppi ottenuti in seguito a classificazione per fenotipo seminale (normozoospermici, non-normozoospermici) e, per i casi, in seguito anche a classificazione istologica (Seminoma, Non-seminoma). (A) Frequenza della delezione gr/gr, b2/b3 e alle delezioni parziali AZFc totali. (B) Frequenza della duplicazione parziale (contemporaneamente *CDY1* e *DAZ*). Del.=delezione; normo.=normozoospermico; dupl.=duplicazione; \* delezioni parziali AZFc=delezione gr/gr + delezione b2/b3.

A)

	Codice campione	Tipo di delezione parziale	Copia deleta <i>CDY1</i>		Coppia deleta <i>DAZ</i>	
			<i>CDY1a</i>	<i>CDY1b</i>	<i>DAZ1/2</i>	<i>DAZ3/4</i>
Casi	KG8	Delezione gr/gr				
	KG62					
	KG162					
	A818					
	A1171					
	A1445					
	A1663					
	A1713					
	A1734					
	A1912					
A2140						
Casi	A1881	Delezione b2/b3				
	KG34					
	KG117					
Controlli	A170	Delezione gr/gr				
	A186					
	A202					
	A234					
	A239					
	A286					
	A322					
	A500					
	A522					
	A624					
	A1564					
	A1928					
	CS111					
	K47					
	MMP55					
	MMP93					
	MMP109					
	MMP179					
	MMP259					
	MMP289					
MMP345						
MMP551						
CS225			nd		nd	
Controlli	A49	Delezione b2/b3				
	A353					
	A590					
	CS64					

B)

	Codice campione	n° copie <i>CDY1</i>		n° copie <i>DAZ</i>		
		3	4	6	8	12
Casi	A1050					
	A1102					
	A1251					
	A1809					
	A1986					
	A1996					
	A2014					
	A2057					
	A2145					
	A2162					
	KG29					
	KG30					
	KG35					
	KG38					
	KG61					
	KG71					
	KG78					
KG115						
KG116						
KG118						
KG146						
Controlli	A395					
	A413					
	A429					
	A535					
	A570					
	A647					
	A2102					
	C74					
	C90					
	CS26					
	CS68					
	CS72					
	CS76					
	CS88					
	CS161					
	CS310					
	MM85					
MM103						
MM106						
MM110						
MMP383						
MMP493						
MMP533						

Tabella 11 - Rappresentazione dei codici dei casi e dei controlli portatori dei riarrangiamenti riscontrati nella nostra casistica. (A) Casi e controlli portatori della delezione gr/gr o b2/b3; per ogni soggetto è indicato (cella colorata in grigio) la copia genica di *CDY1* e di *DAZ* che è stata soggetta a delezione. (B) Casi e controlli portatori delle duplicazioni parziali (contemporaneamente sia *CDY1* che *DAZ*); per ogni soggetto è indicato (cella colorata in grigio) il numero di copie geniche di *CDY1* e di *DAZ* presenti. nd= non determinata la copia/coppia genica deleta.

**A)**

Tipo di riarrangiam.	Casi			Controlli			p value (OR, 95% CI)						
	Tot. (n=400)	Normo. normo. (n=224)	Non-normo. (n=176)	Tot. (n=1335)	Normo. normo. (n=696)	Non-normo. (n=639)	p1	p2	p3	p4	p5	p6	p7
Del. gr/gr	2.8%	3.1%	2.3%	1.7%	0.7%	2.8%	0.138	<b>0.008 (3.9, 1.3-11.3)</b>	<b>0.012 (4.5, 1.4-14.2)</b>	0.087	0.557	0.484	0.467
Del. b2/b3	0.8%	0.4%	1.1%	0.3%	0.1%	0.5%	0.204	0.141	0.428	0.105	0.424	0.722	0.295
Del. tot.	3.5%	3.6%	3.4%	2.0%	0.8%	3.3%	<b>0.050 (1.9, 1.3-6)</b>	<b>0.002 (4.2, 1.6-11)</b>	<b>0.008 (4.3, 1.5-12.4)</b>	<b>0.020 (4.1, 1.3-13)</b>	0.491	0.492	0.546
Dupl. parz.	5.3%	3.6%	7.4%	3.2%	3.5%	2.7%	0.056	0.152	0.573	<b>0.036 (2.2, 1.5)</b>	0.057	0.365	<b>0.013 (2.9, 1.2-7)</b>

p1 = casi totali *versus* controlli totali  
p2 = casi totali *versus* controlli normozoospermici  
p3 = casi normozoospermici *versus* controlli normozoospermici  
p4 = casi non-normozoospermici *versus* controlli normozoospermici  
p5 = casi totali *versus* controlli non-normozoospermici  
p6 = casi normozoospermici *versus* controlli non-normozoospermici  
p7 = casi non-normozoospermici *versus* controlli non-normozoospermici

**B)**

Tipo di riarrangiam.	Casi		Controlli		p value (OR, 95% CI)						
	Seminoma (n=291)	Non-seminoma (n=101)	Tot. (n=1335)	Normo. normo. (n=696)	Non-normo. (n=639)	p1	p2	p3	p4	p5	p6
Del. gr/gr	2.7%	3.0%	1.7%	0.7%	2.8%	0.175	<b>0.016 (3.9, 1.3-12)</b>	0.572	0.275	0.069	0.564
Del. b2/b3	1.0%	0%	0.3%	0.1%	0.5%	0.113	0.079	0.279	0.747	0.873	0.643
Del. tot.	3.8%	3.0%	2.0%	0.8%	3.3%	0.062	<b>0.003 (4.5, 1.7-12.3)</b>	0.417	0.354	0.094	0.501
Dupl. parz.	5.5%	5.0%	3.2%	3.5%	2.7%	0.059	0.144	0.057	0.235	0.325	0.197

p1 = casi con Seminoma *versus* controlli totali  
p2 = casi con Seminoma *versus* controlli normozoospermici  
p3 = casi con Seminoma *versus* controlli non normozoospermici  
p4 = casi con Non-seminoma *versus* controlli totali  
p5 = casi con Non-seminoma *versus* controlli normozoospermici  
p6 = casi con Non-seminoma *versus* controlli non normozoospermici

Tabella 12 - Frequenza e significatività statistica dei riarrangiamenti della regione AZFc tra casi e controlli precedentemente selezionati. (A) Casi e controlli sono stati selezionati sulla base del fenotipo seminale. (B) Casi e controlli selezionati, rispettivamente, sulla base dell'istologia e del fenotipo seminale. Riarrangiam.=riarrangiamento; parz.=parziale; tot.=totali; normo.=normozoospermico; del.=delezione; dupl.= duplicazione.



## 4.II. SCOPO 2: EFFETTI DEL TRATTAMENTO CITOTOSSICO SULLA RIPRESA DELLA SPERMATOGENESI IN PAZIENTI ONCOLOGICI E SUL GENOMA/EPIGENOMA SPERMATICO DI PAZIENTI AFFETTI DA TUMORE TESTICOLARE

### 4.II.1. Effetti della terapia sulla spermatogenesi di pazienti oncologici

#### 4.II.1.1 *Presentazione generale dei dati*

Per lo svolgimento di questa parte del lavoro, sono stati studiati 963 pazienti neoplastici arruolati dal 2007 ad oggi, periodo in cui la visita andrologica è eseguita in concomitanza alla procedura di crioconservazione. Ai pazienti era richiesta un'ulteriore raccolta di liquido seminale ad almeno un tempo di *follow-up* previsto dallo studio (3 anni complessivamente). Per ogni paziente partecipante allo studio erano quindi note le informazioni relative ai parametri seminali prima di iniziare la terapia e ad almeno uno dei tre tempi di controllo post-terapia.

Le neoplasie riscontrate nei pazienti sono state divise in tre gruppi, tumori testicolari (n=403), neoplasie ematologiche (n=322) e tumori vari (n=238). Poiché i primi due gruppi di neoplasie si presentano nella nostra casistica con una frequenza maggiore (rispettivamente, 42% e 33%), abbiamo deciso di incentrare la nostra analisi su di essi. Relativamente all'istologia, è possibile classificare i pazienti con tumore testicolare (TT) in: 186 Seminomi, 130 Non-seminomi, 9 tumori testicolari a cellule somatiche e 78 tumori testicolari di cui non è presente il referto istologico. I pazienti con neoplasie ematologiche (NE) si suddividono in: 185 Linfomi di Hodgkin, 76 Linfomi non-Hodgkin, 50 leucemie e 11 neoplasie ematologiche per le quali non abbiamo a disposizione il referto istologico.

#### 4.II.1.2. *Caratterizzazione pre-terapia della casistica*

Abbiamo rilevato i parametri dello spermioγραμμα effettuato al momento della crioconservazione e prima dell'inizio della terapia (T<sub>0</sub>) in entrambe le categorie di tumori (TT e NE) (Tabella 13). I nostri dati mostrano, in entrambi i gruppi di pazienti, una concentrazione media e un numero totale medio di spermatozoi superiori o uguali al valore di normalità definito dall'OMS, rispettivamente,  $\geq 19$  milioni/ml e  $\geq 39$  milioni/eiaculato. Dal confronto dei dati relativi ai pazienti con TT/CG con

Parametri seminali	TT (n°= 403)	NE (n°= 322)	p value
	Media $\pm$ D.S.	Media $\pm$ D.S.	
Concentrazione (10 <sup>6</sup> spzoi/ml)	28.6 $\pm$ 37.4	67.7 $\pm$ 98.5	< 0.001
Numero totale (10 <sup>6</sup> spzoi/eiaculato)	97.1 $\pm$ 133,2	171.6 $\pm$ 206.9	< 0.001
Motilità (% a+b)	40 $\pm$ 23,9	40.3 $\pm$ 22.9	ns
Morfologia (% forme normali)	6.9 $\pm$ 6.2	7.9 $\pm$ 7.3	0.048

Tabella 13 - Confronto dei parametri seminali nelle due categorie oncologiche, su un totale di 725 pazienti. La tabella mostra i valori medi  $\pm$  deviazione standard dei principali parametri seminali dei pazienti prima della terapia (T<sub>0</sub>): concentrazione, numero totale di spermatozoi, motilità progressiva e morfologia. TT= tumore testicolare; NE= neoplasie ematologiche; D.S.= deviazione standard; spzoi= spermatozoi; a+b= motilità progressiva.

quelli dei pazienti affetti da NE, si evince che sia la concentrazione media che il numero totale medio di spermatozoi dei pazienti affetti da tumore testicolare, risultano significativamente inferiori rispetto al gruppo con NE (Tabella 13). I valori medi di motilità riscontrati sono invece analoghi in entrambe le categorie; è stata invece rilevata una lievissima differenza nei valori di morfologia degli spermatozoi fra i tumori testicolari e gli ematologici.

Data quindi la grande variabilità nei parametri seminali, tra i pazienti affetti da TT e quelli affetti da NE, riconducibile prevalentemente a concentrazione e numero totale entrambi i gruppi sono stati classificati sulla base della diversa diagnosi del fenotipo spermatico (Tabella 14). Questa distribuzione evidenzia nuovamente come i pazienti con tumore testicolare presentino valori seminali peggiori rispetto a coloro che sono affetti da neoplasie ematologiche. L'incidenza di normozoospermia fra i TT risulta infatti significativamente più bassa rispetto agli NE (55% *versus* 67%); contrariamente nel primo gruppo rispetto al secondo si osserva una percentuale significativamente più alta di pazienti sia oligozoospermici (38% *versus* 27%) che azoospermici (7% *versus* 5%).

	TT (n°= 403)	NE (n°= 322)	p value
Normozoospermici	223/403 (55.3%)	217/322 (67.4%)	0.001
Oligozoospermici	152/403 (37.7%)	88/322 (27.3%)	0.003
Azoospermici	28/403 (7%)	17/322 (5.3%)	0.001

**Tabella 14 - Distribuzione dei pazienti delle due categorie oncologiche in base alla diagnosi del fenotipo spermatico (normozoospermici, oligozoospermici, azoospermici) al tempo T<sub>0</sub> su un totale di 725 pazienti. TT= tumore testicolare; NE= neoplasie ematologiche.**

Dal 2015, presso la SOD di Andrologia e Medicina della Sessualità e di Fisiopatologia della Riproduzione Umana dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Careggi (Firenze), è stato attivato un percorso strutturato per tutti i pazienti oncologici che desiderano conservare il proprio seme in previsione di un trattamento antiproliferativo: parte integrante di questo protocollo è il dosaggio ormonale, ottenuto mediante un prelievo ematico nel corso della visita andrologica. I valori di Testosterone, LH ed FSH ad oggi sono disponibili per 124 pazienti di cui 69 TT e 55 NE (Tabella 15). Tutti i pazienti oncologici presentano alla diagnosi valori medi di testosterone e gonadotropine

Dosaggi ormonali	TT (n°= 69)	NE (n°= 55)	p value
	Media ± D.S.	Media ± D.S.	
Testosterone (nmol/l)	13.8 ± 5,8	11.8 ± 6.8	ns
LH (mUI/ml)	4.0 ± 3.4	4.2 ± 2.2	ns
FSH* (mUI/ml)	7.9 ± 6.0	5.1 ± 3.2	0.008

**Tabella 15 - Valutazione ormonale nei pazienti sottoposti a prelievo durante la visita andrologica (totale = 124). Nella tabella sono riportati i valori medi ± Deviazione Standard di Testosterone (nmol/l) e di gonadotropine (LH ed FSH, espressi in mUI/ml). \* esclusi 11 pazienti con livelli elevati di β-hCG; TT= tumore testicolare; NE= neoplasie ematologiche.**

nella norma. I valori di Deviazione Standard evidenziano come all'interno dei singoli gruppi di neoplasie non vi sia un'ampia variabilità nei valori riscontrati. Non vi sono inoltre differenze statisticamente significative per alcun ormone dosato fra i pazienti dei due gruppi, ad eccezione per la gonadotropina FSH. I pazienti affetti da tumore testicolare mostrano, infatti, un livello medio di tale ormone significativamente più alto rispetto a coloro che sono affetti da neoplasie ematologiche ( $7.9 \pm 6.0$  versus  $5.1 \pm 3.2$ ).

#### 4.II.1.3. Follow-up

Per l'analisi dei parametri seminali dopo la fine del trattamento, ci siamo focalizzati sui pazienti affetti da tumore testicolare a cellule germinali (TTCG) oltre che su coloro affetti da neoplasie ematologiche. Inoltre, abbiamo preso in considerazione solo i dati relativi a due e tre anni dalla fine della terapia perché, ad oggi, due sono gli anni che ai paziente viene consigliato di attendere dopo la terapia citostatica prima di ricercare una gravidanza naturale con la propria *partner*.

Il Centro di crioconservazione di Careggi prevede che i pazienti tornino ad effettuare annualmente uno spermioγραμμα per i cinque anni successivi al termine della terapia oncologica.

Tuttavia, non tutti i pazienti sono regolarmente tornati per effettuare lo spermioγραμμα di controllo. Pertanto, per il nostro studio, che prevede un *follow-up* di tre anni, abbiamo a disposizione: 135 e 72 pazienti affetti da TTCG, rispettivamente dopo due ( $T_2$ ) e tre ( $T_3$ ) anni dalla fine della terapia.

#### Valutazione della spermatogenesi a 2 anni dalla fine dei trattamenti oncologici ( $T_2$ )

Dal confronto dei principali parametri seminali ottenuti rispettivamente prima ( $T_0$ ) e dopo due anni ( $T_2$ ) dalla fine della terapia, si osserva come i pazienti affetti da TTCG mostrino in media, al  $T_2$ , un incremento delle caratteristiche seminali (Tabella 16). In particolare, dopo due anni emerge un incremento statisticamente significativo della concentrazione di spermatozoi rispetto al  $T_0$ .

Per quanto concerne la motilità degli spermatozoi non ci sono cambiamenti rilevanti mentre si evince un netto peggioramento della loro morfologia (pur rimanendo in media all'interno di un *range* di normalità). Infatti, circa il 30% dei pazienti con TTCG posseggono valori di forme normali relative alla morfologia degli spermatozoi al di sotto del 4%. Tra questi, circa il 25% mostrano addirittura lo 0% di spermatozoi con morfologia normale.

Parametri seminali	TTCG (n°= 135)			NE (n°= 66)		
	$T_0$		p value	$T_2$		p value
	Media $\pm$ D.S.	Media $\pm$ D.S.		Media $\pm$ D.S.	Media $\pm$ D.S.	
Concentrazione ( $10^6$ spzoi/ml)	30.8 $\pm$ 35.1	42.6 $\pm$ 51.8	0.003	56.6 $\pm$ 60.6	35.5 $\pm$ 42.2	0.009
N° totale ( $10^6$ spzoi/eiaculato)	111.8 $\pm$ 145.9	130.7 $\pm$ 143.8	ns	150.1 $\pm$ 159.6	115 $\pm$ 166.5	ns
Motilità (% a+b)	46 $\pm$ 21.2	48.6 $\pm$ 24.3	ns	44.3 $\pm$ 20.6	42.2 $\pm$ 27	ns
Morfologia (% forme normali)	8.8 $\pm$ 6.6	5.4 $\pm$ 4.9	$\leq$ 0.001	10.8 $\pm$ 9.4	4.8 $\pm$ 4.3	$\leq$ 0.001

Tabella 16 - Confronto dei parametri seminali nelle due diverse categorie oncologiche a  $T_0$  e  $T_2$ . Nella Tabella sono riportati i valori medi  $\pm$  Deviazione Standard dei parametri seminali: concentrazione, numero totale, motilità, morfologia. TTCG= tumore testicolare a cellule germinali; NE= neoplasie ematologiche; D.S.= deviazione standard; Spzoi = spermatozoi; N° totale = numero totale di spermatozoi; a+b = motilità progressiva.

I pazienti con neoplasie ematologiche, a differenza di quanto osservato per i pazienti con TTGG, mostrano, valori di concentrazione del liquido seminale ridotti in modo statisticamente significativo dopo due anni dalla fine della terapia rispetto al T<sub>0</sub> (un calo, seppur non statisticamente rilevante, si osserva anche per il numero totale e la motilità) (Tabella 16). Invece, in analogia con i tumori testicolari, si assiste ad un netto decremento nel numero di spermatozoi morfologicamente normali al T<sub>2</sub>: il 31% dei pazienti presenta una % di forme normali di spermatozoi inferiori al 4%, e il 25% circa di essi mostra addirittura lo 0% di spermatozoi tipici.

Successivamente, abbiamo classificato i pazienti neoplastici sulla base dei valori dei parametri seminale al T<sub>2</sub> (Tabella 17). Dopo due anni dalla fine della terapia, i tumori testicolari presentavano una maggiore e una minore incidenza, rispettivamente, di normozoospermia e di azoospermia rispetto alle neoplasie ematologiche. Questo risultato è opposto a quello riscontrato al T<sub>0</sub>, in cui in pazienti con TTGG mostravano parametri seminali peggiori rispetto ai pazienti con NE.

	TTGG (n° = 135)	NE (n° = 66)	p value
Normozoospermici (n°= 135)	93/135 (68.8%)	34/66 (51.5%)	0.02
Oligozoospermici (n°= 52)	30/135 (22.2%)	20/66 (30.3%)	ns
Azoospermici (n°= 27)	12/135 (8.9%)	12/66 (18.2%)	ns

**Tabella 17 - Distribuzione dei pazienti delle due categorie oncologiche in base alla diagnosi del fenotipo spermatico (normozoospermici, oligozoospermici, azoospermici) a due anni dalla fine della terapia (T<sub>2</sub>) su un totale di 201 pazienti. TTGG = tumore testicolare a cellule germinali; NE = neoplasie ematologiche.**

È interessante rilevare come una buona proporzione (46%) di pazienti con TTGG non-normozoospermici prima dei trattamenti oncologici recuperino al T<sub>2</sub> valori di normozoospermia. Siamo quindi andati a verificare se vi fossero, al momento della crioconservazione, fattori potenzialmente influenti sulla spermatogenesi di questi pazienti: è emerso che la stragrande maggioranza di essi (18/23) avevano effettuato terapie antibiotiche in concomitanza dell'intervento di orchifunicolectomia (eseguito prima della raccolta del liquido seminale).

### **Valutazione della spermatogenesi a 3 anni dalla fine dei trattamenti oncologici (T<sub>3</sub>)**

I dati ottenuti al T<sub>3</sub> mostrano alcune differenze rispetto a quanto visto al T<sub>2</sub>, sia per i tumori testicolari che per le neoplasie ematologiche.

Continua il trend di ripresa nei tumori testicolari anche dopo 3 anni dalla fine della terapia, con un netto miglioramento osservabile nei valori di concentrazione degli spermatozoi (Tabella 18). Anche i valori di motilità presentano un incremento relativo rispetto al T<sub>0</sub>. Relativamente alle neoplasie ematologiche, non si osserva al T<sub>3</sub> rispetto al T<sub>0</sub> un miglioramento statisticamente significativo dei parametri quantitativi della spermatogenesi (Tabella 18).

Purtroppo, il peggioramento della morfologia spermatica osservabile a T<sub>2</sub> resta immutato sia nei

Parametri seminali	TTCG (n°= 72)			NE (n°= 31)		
	T <sub>0</sub>	T <sub>3</sub>	p value	T <sub>0</sub>	T <sub>3</sub>	p value
	Media ± D.S.	Media ± D.S.		Media ± D.S.	Media ± D.S.	
Concentrazione (10 <sup>6</sup> spzoi/ml)	33.8 ± 49.9	48.29 ± 60.2	0.006	60.6 ± 61.4	50.5 ± 76	ns
N° totale (10 <sup>6</sup> spzoi/eiaculato)	118.9 ± 104.9	160.2 ± 202.4	ns	177.1 ± 197.3	145.8 ± 163	ns
Motilità (% a+b)	45.9 ± 20.13	50.9 ± 21.8	0.022	44.7 ± 21.1	41.8 ± 28.9	ns
Morfologia (% forme normali)	8.7 ± 6.4	4.6 ± 4.1	≤ 0.001	11 ± 10.1	4.5 ± 4.3	≤ 0.001

**Tabella 18 - Confronto dei parametri seminali nelle diverse categorie oncologiche a T<sub>0</sub> e T<sub>3</sub>. Nella tabella sono riportati i valori medi ± Deviazione Standard dei seguenti parametri seminali: concentrazione, numero totale spermatozoi, motilità, morfologia. Spzoi= spermatozoi; N° totale= numero totale di spermatozoi; a + b= motilità progressiva**

TTCG che negli NE anche a distanza di tre anni dal trattamento: il 45% dei pazienti con T<sup>o</sup>TTCG e il 32% di quelli con NE presenta valori di morfologia sotto la norma. In entrambe le categorie, inoltre, il 25% circa di pazienti presenta addirittura lo 0% di forme normali.

Analogamente a quanto fatto a T<sub>2</sub>, i pazienti oncologici, distinti per neoplasia, sono stati classificati in 3 gruppi (normo/oligo/azoospermici) in relazione al numero totale di spermatozoi rilevato al T<sub>3</sub> (Tabella 19). I dati evidenziano come non vi sia differenza significativa fra le percentuali di pazienti normozoospermici nelle varie categorie neoplastiche, mentre colpisce l'elevata incidenza di azoospermia rilevabile nelle NE rispetto ai pazienti con T<sup>o</sup>TTCG (23% *versus* 3%).

	TTCG (n° = 72)	NE (n° = 31)	p value
Normozoospermici (n°= 68)	49/72 (68%)	18/31 (58.1%)	ns
Oligozoospermici (n°= 28)	21/72 (29.2%)	6/31 (19.3%)	ns
Azoospermici (n°= 11)	2/72 (2.8%)	7/31 (22.6%)	0.003

**Tabella 19 - Distribuzione dei pazienti delle 3 categorie oncologiche in base alla diagnosi spermatica a tre anni dalla fine della terapia (T<sub>3</sub>), per un totale di 107 pazienti. TTCG = tumore testicolare a cellule germinali; NE = neoplasie ematologiche.**

Dal confronto del numero di pazienti normo e non-normozoospermici al T<sub>0</sub> con quello al T<sub>3</sub>, si rileva che quasi l'84% dei pazienti con T<sup>o</sup>TTCG e normozoospermici al T<sub>0</sub>, risultano tali anche al T<sub>3</sub>. Pertanto, essere normozoospermici sembrerebbe predittivo di rimanere tali anche dopo tre anni dalle terapie. Inoltre una buona porzione (45%) di pazienti con T<sup>o</sup>TTCG non-normozoospermici prima dei trattamenti oncologici recuperano al T<sub>3</sub> valori di normozoospermia. Anche al T<sub>3</sub>, come al T<sub>2</sub>, maggioranza di essi (12/13) aveva effettuato terapie antibiotiche in concomitanza dell'intervento di orchifunicolectomia (eseguito prima della raccolta del liquido seminale). Nelle neoplasie ematologiche non è emersa invece alcuna correlazione fra la normozoospermia pre/post trattamento.

#### 4.II.1.4. Identificazione di eventuali fattori correlati a mancato recupero della spermatogenesi post-terapia citostatica

I nostri dati rilevano che alcuni pazienti con spermatogenesi al T<sub>0</sub> (normozoospermici ed oligozoospermici), diventano azoospermici dopo 2 o 3 anni dalla fine della terapia.

Relativamente ai pazienti con T<sub>1</sub>TCG, 10 pazienti non-azoospermici al T<sub>0</sub>, sono diventati tali al T<sub>2</sub>.

Solo per 8 di questi pazienti disponevamo dei dati in merito alla terapia (Tabella 20). Essi hanno subito: il 50% (4/8) 3 cicli PEB, il 12.5% (1/8) 4 cicli di PEB, il 25% (2/8) radioterapia con dose 36 Gy e 12.5% (1/8) 1 ciclo di Carboplatino.

Per quanto riguarda invece le neoplasie ematologiche, i pazienti diventati azoospermici al T<sub>2</sub> pur non essendo tali al T<sub>0</sub>, sono pari a 12 (Tabella 20). Il trattamento da essi subito è estremamente diversificato. Ciò che si può rilevare fra i pazienti azoospermici a T<sub>2</sub>, però, è la diversità di trattamenti emersi rispetto alle terapie normalmente utilizzati per il trattamento delle NE (principalmente R-CHOP o ABVD o BEACOPP). I regimi utilizzati per tali pazienti risultano mediamente più aggressivi di quelli comunemente impiegati ed anche il numero di cicli è particolarmente elevato ( $\geq 6$ ): la maggior parte di questi pazienti ha infatti subito trattamenti chemioterapici di seconda linea ad alte dosi (HDS-CT oppure schema BEAM) prima di sottoporsi a trapianto autologo di midollo (ABMT).

Codice Paziente	Patologia	Chemioterapia		Radioterapia (Gy)	N° totale (10 <sup>6</sup> spzoi/eiaculato)
		Protocollo	N° cicli		
1016	Seminoma	PEB	3	-	68,250
1139	Seminoma	-	-	36 Gy	6,240
1247	Non-seminoma	nd	-	N.D	113,400
1281	Non-seminoma	PEB	3	-	0.001
1297	Non seminoma	PEB	4	-	351,000
1365	Seminoma	Carboplatino	1	-	0.480
1617	Non-seminoma	PEB	3	-	10,880
1820	Seminoma	-	-	36 Gy	47,150
1979	Seminoma	PEB	3	-	0.300
2071	TTCG*	nd	-	nd	1,400
981	Linfoma HDG	ABVD+DHAP+CTX+HDS/ABMT	7	-	108,100
1056	Linfoma HDG	nd	-	nd	270,000
1087	Linfoma HDG	ABVD+DHAP+HDS/ABMT	11	-	0.001
1089	Linfoma HDG	ABVD+IGEV (HD)	10	30	102,600
1196	Linfoma NHDG	R-CHOP+HDS/ABMT	4	40	505,400
1234	Linfoma HDG	R-CHOP+MTX-HD+R-BEAM	8	-	0.001
1455	Linfoma NHDG	Rituximab+Leukeran (6 mesi)	-	-	282,720
1745	Linfoma HDG	ABVD+IGEV+HDS/ABMT	6	-	47,500
1795	Linfoma HDG	ABVD+BEACOPP+HDS/ABMT	13	-	200,600
1938	Linfoma HDG	R-CHOP	6	30	1,140
2281	Linfoma NHDG	AIEOP LNH-97	6	-	86,800
2533	Leucemia linfobl. T	ABVD + Metotrexato in cronico	8	-	151,640

Tabella 20 - Caratteristiche cliniche dei 22 pazienti non-azoospermici prima della terapia (T<sub>0</sub>) risultati azoospermici dopo due anni dalla fine della terapia (T<sub>2</sub>): patologia, protocollo e cicli chemioterapici, dosaggio radioterapia, numero totale spermatozoi al T<sub>0</sub>. Dei 22 pazienti, 10 sono affetti da TTCG (celle bianche) e 12 da NE (celle grigie). \*Non disponibile (referto istologico o terapia); linfobl.=linfoblastica; N° totale= numero totale di spermatozoi; Spzoi= spermatozoi; nd= non disponibile.

Successivamente abbiamo verificato i pazienti con TTTCG o NE, non-azoospermici al T<sub>0</sub>, che pur subendo le stesse terapie dei suddetti pazienti, non sono diventati azoospermici al T<sub>2</sub> (Tabella 21).

Tra i pazienti con TTTCG, l'86% di coloro che hanno effettuato 3-4 cicli PEB non sono divenuti azoospermici al tempo T<sub>2</sub>, indipendentemente dalla qualità del liquido seminale di partenza (a T<sub>0</sub>, 10 risultavano oligozoospermici e 20 normozoospermici).

Il 94% di coloro trattati con 1 solo ciclo di carboplatino non sono divenuti azoospermici a T<sub>2</sub>. È da notare che l'unico paziente divenuto azoospermico al T<sub>2</sub> a seguito di tale trattamento, aveva al T<sub>0</sub> una spermatogenesi fortemente compromessa (n° totale spermatozoi= 0.48 mln).

Dei 22 pazienti trattati esclusivamente con radioterapia (<36 Gy) nessun paziente è risultato azoospermico al T<sub>2</sub>; differentemente, il 60% di coloro che avevano subito un dosaggio maggiore (>36 Gy) è divenuto azoospermico a T<sub>2</sub>, indipendentemente dalla qualità del liquido seminale pre-trattamento (a T<sub>0</sub> 1/3 erano oligozoospermici e 2/3 normozoospermici).

Per i pazienti con NE, nessuno di coloro trattato con cicli chemioterapici ad alte dosi (associati a trapianto autologo di midollo osseo) presentava spermatozoi nell'eiaculato al T<sub>2</sub> (Tabella 21). Dei 4 pazienti della casistica trattati con regime combinato R-CHOP + RT (≥30 Gy), solo uno risultava azoospermico a T<sub>2</sub>: in questo paziente, peraltro, la spermatogenesi risultava fortemente compromessa già in fase pre-trattamento (n°tot spermatozoi <5 mln); di contro, nessuno fra gli altri trattato con lo stesso schema terapeutico era fortemente oligozoospermico a T<sub>0</sub>. È interessante rilevare come nessun paziente trattato esclusivamente con ABVD (alcuni dei quali sottoposti anche a 10 o 12 cicli) è divenuto azoospermico dopo 2 anni dalla fine della terapia; l'unico paziente andato incontro ad ABVD e in cui non sono stati riscontrati spermatozoi nell'eiaculato al T<sub>2</sub> aveva infatti effettuato una chemioterapia di mantenimento con Metotrexato per 2 anni consecutivi.

Le valutazioni effettuate per il T<sub>2</sub>, sono state eseguite anche per il T<sub>3</sub>.

Un paziente affetto da TTTCG e 7 da NE, normozoospermici/oligozoospermici a T<sub>0</sub> sono divenuti

Terapia eseguita	Numero pazienti	Azoospermici T <sub>2</sub> (%)	Non-azoospermici T <sub>2</sub> (%)
PEB (4 cicli)	7	1 (14%)	6 (86%)
PEB (3 cicli)	28	4 (14%)	24 (86%)
Carboplatino (1 ciclo)	16	1 (6%)	15 (94%)
Radioterapia (< 36 Gy)	22	0 (0%)	22 (100%)
Radioterapia (≥ 36 Gy)	5	2 (40%)	3 (60%)
CT prima linea + CT (alte dosi) e ABMT	7	7 (100%)	0 (0%)
R-CHOP + RT (≥30 Gy)	4	1 (25%)	3 (75%)
Rituximab + Leukeran	1	1 (100%)	0 (0%)
AIEOP LNH-97	2	1 (50%)	1 (50%)
ABVD	18	1 (5%)*	17 (95%)

**Tabella 21 - Numero di pazienti con TTTCG (celle bianche) o con NE (celle grigie) non-azoospermici al T<sub>0</sub> per tutte le tipologie di terapia. Relativamente ad ogni terapia, sono indicate le percentuali di pazienti diventati azoospermici al T<sub>2</sub> o che sono rimasti non-azoospermici dopo due anni dalla fine del trattamento. \*=il paziente aveva eseguito 2 anni di terapia di mantenimento con Metotrexato; CT prima linea = chemioterapia di prima linea per linfomi (ABVD o R-CHOP o BEACOPP); ABMT = autologous bone marrow transplantation; RT = radioterapia.**

azoospermici a T<sub>3</sub> (Tabella 22). Molti pazienti divenuti azoospermici al T<sub>3</sub> erano diventati tali già al T<sub>2</sub> (Tabella 20). Pertanto, l'azoospermia si è mantenuta dal tempo di osservazione precedente. Si conferma l'andamento osservato anche a T<sub>2</sub>, cioè come la maggior parte dei pazienti abbia subito trattamenti particolarmente tossici a livello gonadico e come la qualità di partenza del liquido seminale di coloro che a distanza di tre anni dalla fine della terapia restano azoospermici sia spesso bassa (in particolare nell'unico azoospermico affetto da TTCCG).

Codice paziente	Patologia	Chemioterapia		Radioterapia (Gy)	N° totale (10 <sup>6</sup> spzoi/eiaculato)
		Protocollo	N° cicli		
1979	Seminoma	PEB	3	-	0.300
1087	Linfoma HDG	ABVD+DHA+HDS/ABMT	11	-	0.001
1089	Linfoma HDG	GEV-BEAM (HD)	10	30	102.6
1234	Linfoma HDG	R-CHOP+MTX-HD+R-BEAM	8	-	0.001
1246	Linfoma HDG	ABVD+BEACOPP	6	30	88
1745	Linfoma HDG	ABVD+IGEV+HDS/ABMT	6	-	47.5
1795	Linfoma HDG	ABVD+BEACOPP +HDS/ABMT	13	-	200.6
2281	Linfoma NHDG	AIEOP LNH-97	6	-	86.8

**Tabella 22 - Caratteristiche cliniche di 1 e dei 7 pazienti affetti, rispettivamente, da TTCCG (celle bianche) e da NE (celle grigie) non-azoospermici prima della terapia (T<sub>0</sub>) e risultati tali dopo tre anni dalla fine della terapia (T<sub>3</sub>): patologia, protocollo e cicli chemioterapici, dosaggio radioterapia, numero totale spermatozoi al T<sub>0</sub>. N° totale= numero totale di spermatozoi; spzoi= spermatozoi.**

Tra i pazienti affetti da TTCCG che avevano subito 3 cicli di PEB senza diventare azoospermici al T<sub>3</sub>, il 93% mostravano spermatozoi nell'eiaculato, indipendentemente dalla qualità del liquido seminale a T<sub>0</sub> (al momento della crioconservazione 6 erano oligozoospermici, 7 normozoospermici) (Tabella 23).

Per quanto riguarda invece i pazienti con neoplasie ematologiche divenuti azoospermici a T<sub>3</sub>, i dati sono in linea con quanto già osservato al T<sub>2</sub>. Nessun paziente ematologico presentava spermatozoi nell'eiaculato al T<sub>3</sub> se trattato con cicli chemioterapici ad alte dosi (associati a trapianto autologo di midollo osseo) (Tabella 23).

Terapia eseguita	Numero pazienti	Azoospermici T <sub>3</sub>	Non-azoospermici T <sub>3</sub>
PEB (3 cicli)	14	1 (7%)	13 (93%)
CT prima linea + CT (alte dosi) e ABMT	6	6 (100%)	0 (0%)
AIEOP LNH-97	2	1 (50%)	1 (50%)
BEACOPP + ABVD + RT (30 Gy)	1	1 (100%)	0 (0%)

**Tabella 23 - Terapie eseguite da 1 e dai 7 pazienti affetti rispettivamente da TTCCG (celle bianche) e da NE (celle grigie) non-azoospermici a T<sub>0</sub> e diventati tali al T<sub>3</sub>. Sono riportate anche le percentuali dei pazienti che, pur effettuando lo stesso trattamento, non sono divenuti azoospermici dopo tre anni dalla fine del trattamento.**



## 4.II.2. Effetti della terapia sull'integrità del genoma spermatico di pazienti con tumore testicolare

### 4.II.2.1. Studio cross-sectional

#### Presentazione generale dei dati

In questa parte della tesi, sono stati analizzati 97 pazienti affetti da tumori testicolari afferenti agli ambulatori della SOD di Andrologia e Medicina della Sessualità e dell'Andrologia di Careggi (Firenze).

Questi pazienti rappresentano solo una parte dei soggetti affetti da tale condizione patologica che hanno fatto riferimento a tale ambulatorio. Sono stati, infatti, inclusi nel lavoro solo coloro per i quali è stato possibile eseguire l'analisi di frammentazione del DNA spermatico ad almeno un tempo di *follow-up* previsto dallo studio (*follow-up* complessivo di 3 anni).

Nello specifico, dopo un anno dalla fine della terapia (T<sub>1</sub>) abbiamo informazioni relative all'SDF per 59 pazienti, dopo due anni (T<sub>2</sub>) per 66 e dopo tre anni per 50. I diversi *time-points* possono non includere i medesimi pazienti. Classificando la casistica sulla base dell'istologia è possibile individuare: cinquantasette pazienti con Seminomi e quaranta pazienti con Non-seminomi.

Oltre al gruppo di pazienti affetti da TTCG, la popolazione di studio utilizzata per questa parte del lavoro si compone anche di gruppo di controllo. Esso è formato da cinquantotto individui fertili senza precedente esperienza di aborto, selezionati da una popolazione di riferimento per valori di concentrazione totale di spermatozoi superiori al 25° percentile.

#### Confronto del tasso di frammentazione del DNA (SDF) ai vari tempi di osservazione tra il gruppo di pazienti con tumore testicolare *versus* il gruppo di controllo

Per ogni tempo di *follow-up*, i pazienti con tumore testicolare sono stati suddivisi in cinque gruppi sulla base della tipologia di trattamento somministrato:

- 1) 1 o 2 cicli di Carboplatino;
- 2) 1 o 2 cicli di PEB;
- 3) 3 o più cicli di PEB;
- 4) radioterapia;
- 5) radioterapia in combinazione con chemioterapia.

Dopo un anno dal termine del trattamento citotossico (T<sub>1</sub>), i pazienti sono classificabili in: 27 appartenenti al primo gruppo di trattamento, 15 appartenenti al secondo, 9 appartenenti al terzo e 8 al quarto. Dopo due anni (T<sub>2</sub>) la frammentazione del DNA spermatico è stata analizzata in 18 pazienti del primo gruppo, 15 del secondo, 18 del terzo, 13 del quarto e 2 del quinto. Infine, dopo tre anni (T<sub>3</sub>) si contano 13 pazienti del primo gruppo, 12 del secondo, 11 del terzo, 12 del quarto e 2 del quinto.

Il tasso di frammentazione del DNA spermatico di ogni gruppo di trattamento per tutti i tempi di *follow-up*, è stato confrontato con il tasso di frammentazione misurato nella popolazione di controllo. Tali valori di frammentazione, sono espressi sia come SDF totale che come SDF<sup>brighter</sup>.

A tutti e tre i tempi di *follow-up* si osserva, per tutti i sottogruppi di trattamento, un aumento del valore medio di SDF sia totale che *brighter* rispetto a quello relativo ai controlli (Figura 14A e B). Al T<sub>1</sub> la significatività statistica è raggiunta dal gruppo di pazienti trattati con Carboplatino. Al T<sub>2</sub>, una differenza statisticamente significativa è associata al gruppo trattato con 3 o più cicli di PEB, con radioterapia e con radioterapia in combinazione con chemioterapia. Quest'ultimo sottogruppo di pazienti è l'unico a mantenere una differenza statisticamente significativa con i valori relativi al gruppo di controllo anche dopo tre anni dalla fine del trattamento.

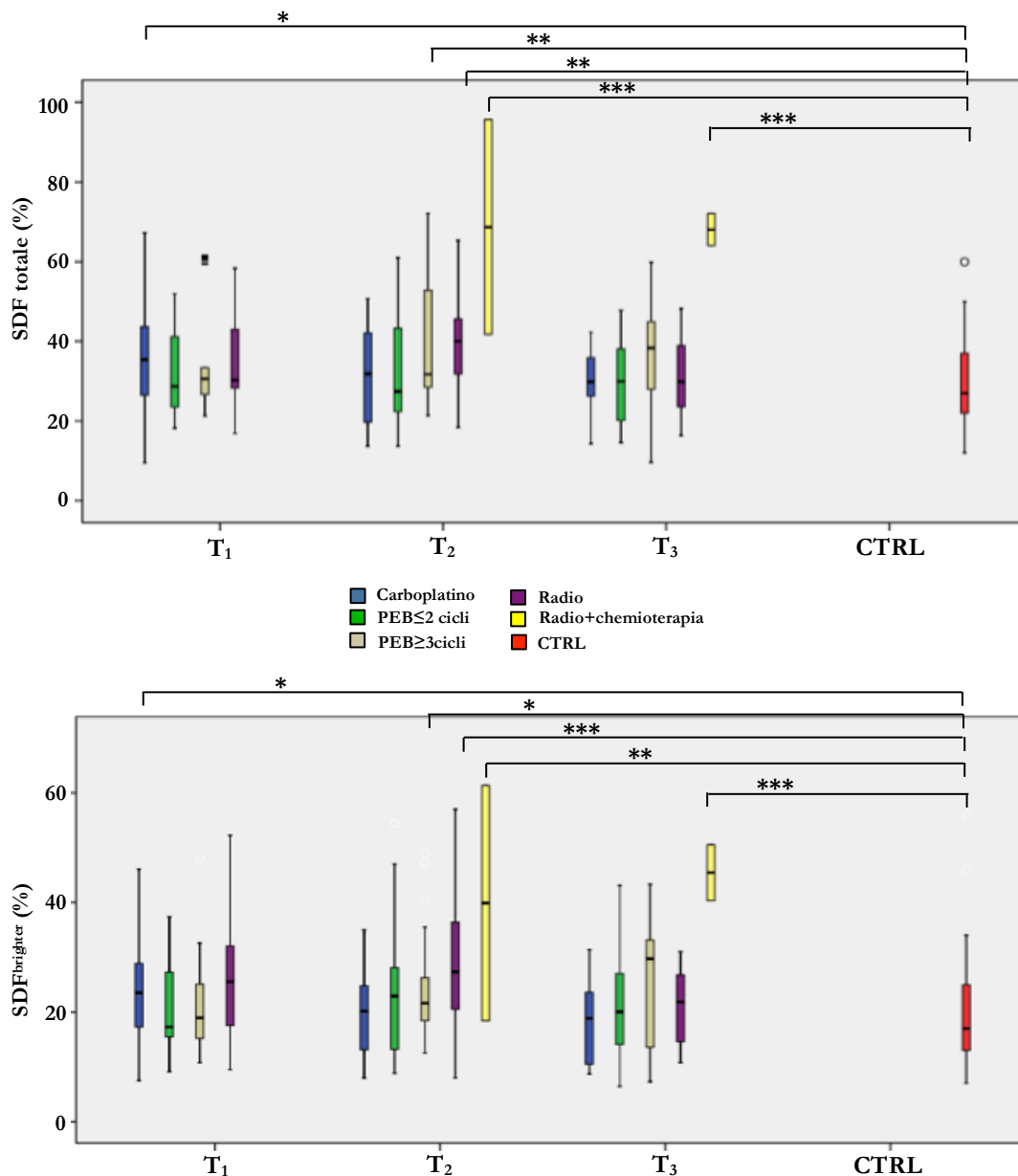


Figura 14 - Confronto del tasso di frammentazione del DNA spermatico totale (A) e *brighter* (B) tra pazienti affetti da tumore del testicolo e gruppo di controllo, a vari tempi di osservazione (T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub> e T<sub>3</sub>). Per ogni tempo sono riportati i *box plot* corrispondenti al gruppo di pazienti trattati con 1 o 2 cicli di Carboplatino (box blu), 1 o 2 cicli di PEB (box verde); 3 o più cicli di PEB (box ocra), radioterapia (box viola) e radioterapia in combinazione con chemioterapia (box giallo). Il box plot relativo ai controlli è di colore rosso. CTRL = gruppo di controllo; \* = p ≤ 0.05; \*\* = p ≤ 0.01; \*\*\* = p ≤ 0.001.

### Valutazione della percentuale di pazienti affetti da tumore testicolare con frammentazione del DNA superiore al 75° percentile

Abbiamo deciso di determinare quanti pazienti presentano, ai vari tempi di *follow-up*, dei valori di  $SDF^{brighter}$  uguali o superiori ad uno specifico valore soglia di normalità corrispondente al 75° percentile calcolato sulla distribuzione dei valori di SDF nella popolazione di controllo ( $SDF^{brighter} \geq 25\%$ ). Tale valore arbitrario è da ritenersi indice di danno severo al DNA.

I nostri dati mostrano che, indipendentemente dal tipo di trattamento subito, al T<sub>1</sub> e al T<sub>2</sub> il 39% dei pazienti (n=23 e n=26, rispettivamente) presenta un valore di  $SDF^{brighter}$  superiore al 75° percentile, mentre al T<sub>3</sub> questa percentuale si riduce leggermente attorno al valore del 36% (n=18). La suddivisione dei pazienti sulla base del protocollo terapeutico effettuato mostra la presenza di tutte le cinque categorie di trattamento per ogni tempo di *follow-up* fatta eccezione per il T<sub>1</sub> che non comprende pazienti sottoposti alla combinazione radioterapia con chemioterapia (Tabella 24A). La tipologia di trattamento più rappresentata consiste al T<sub>1</sub> dal Carboplatino, al T<sub>2</sub> e al T<sub>3</sub> dal PEB e dalla radioterapia.

	n° pazienti con $SDF^{brighter} \geq 25\%$ / tot pazienti con $SDF^{brighter} \geq 25\%$ (%)		
	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>
Carboplatino	12/23 (52%)	4/26 (15%)	2/18 (11%)
PEB ≤ 2 cicli	4/23 (17%)	6/26 (23%)	4/18 (22%)
PEB ≥ 3 cicli	3/23 (13%)	6/26 (23%)	6/18 (33%)
Radioterapia	4/23 (17%)	9/26 (35%)	4/18 (22%)
Chemioterapia + radioterapia	-	1/26 (4%)	2/18 (11%)

	n° pazienti con $SDF^{brighter} \geq 25\%$ / tot pazienti al tempo corrispondente (%)		
	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>
Carboplatino	12/27 (44%)	4/18 (22%)	2/13 (15%)
PEB ≤ 2 cicli	4/15 (27%)	6/15 (40%)	4/12 (33%)
PEB ≥ 3 cicli	3/9 (33%)	6/18 (33%)	6/11 (55%)
Radioterapia	4/8 (50%)	9/13 (69%)	4/12 (33%)
Chemioterapia + radioterapia	-	1/2 (50%)	2/2 (100%)
TOTALE	23/59 (39%)	26/66 (39%)	18/50 (36%)

Tabella 24 - Distribuzione dei pazienti con valori di frammentazione del DNA spermatico superiore al 75° percentile ( $SDF^{brighter} \geq 25\%$ ). (A) Distribuzione ai vari tempi di *follow-up* (T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub> e T<sub>3</sub>) dei pazienti con valore di  $SDF^{brighter} \geq 25\%$  e suddivisi sulla base della terapia ricevuta, sulla totalità dei pazienti che hanno superato tale valore di normalità ad ogni tempo specifico. (B) Distribuzione, per ogni gruppo di trattamento, del numero di pazienti con valore di  $SDF^{brighter} \geq 25\%$ , sulla totalità dei pazienti che sono stati sottoposti allo stesso trattamento in ogni tempo di *follow-up*.

Determinando la quota di pazienti il cui valore di  $SDF^{brighter}$  supera il 25% ai vari tempi di *follow-up*, si rileva che la maggior percentuale di tali pazienti è attribuibile alla somministrazione di radioterapia al T<sub>1</sub> e al T<sub>2</sub> e di terapia combinata al T<sub>3</sub> (Tabella 24B).

#### **4.II.2.2. Studio longitudinale**

##### **Presentazione generale dei dati**

La popolazione utilizzata per questa parte della tesi è costituita da pazienti che hanno partecipato ad uno studio longitudinale della durata di 3 anni (vedi paragrafo 3.II.1.2.). Non tutti i pazienti hanno a disposizione, oltre al T<sub>0</sub>, i valori di frammentazione del DNA per ogni tempo di *follow-up*, principalmente a causa del numero di spermatozoi insufficiente per l'esecuzione dell'analisi SDF. In seguito saranno presentati i dati per quei pazienti che hanno raggiunto il secondo anno di *follow-up* o che hanno terminato il protocollo previsto dallo studio (*follow-up* complessivo di 3 anni). La casistica si compone, pertanto, di 12 pazienti dei quali 10 sono arrivati fino al T<sub>2</sub> e 2 fino al T<sub>3</sub>. Per ognuno di essi erano disponibili i valori di frammentazione ad ogni tempo di osservazione.

Classificando la suddetta casistica da un punto di vista istologico, si individuano 9 pazienti con Seminoma e 3 con Non-seminoma. In funzione al tipo di terapia possono essere suddivisi in sette pazienti che hanno ricevuto Carboplatino (quattro 1 e tre 2 cicli), quattro pazienti che hanno ricevuto PEB (uno 1 ciclo, uno 2 cicli, due 3 cicli) e un paziente che è stato sottoposto a radioterapia 20Gy.

##### **Andamento SDF ai vari tempi di *follow-up***

A causa del ridotto numero di pazienti non è stata possibile eseguire un'analisi statistica di comparazione pertanto i dati riportati sono limitati a fotografare l'andamento dei valori di SDF ai differenti tempi di studio disponibili per il singolo paziente.

Analizzando i 10 pazienti per i quali è stato possibile eseguire la tecnica Tunel fino a due anni di *follow-up*, si osserva che, per la maggioranza di essi, tali valori tendono ad aumentare al T<sub>1</sub> per poi ridursi al T<sub>2</sub> ritornando indicativamente ai valori relativi a prima della terapia (Grafico 1A). Questo incremento e riduzione rispettivamente al T<sub>1</sub> e T<sub>2</sub> è osservata, per gli stessi pazienti, anche in relazione ai valori di  $SDF^{brighter}$  (Grafico 1B). È da notare che alcuni di tali pazienti mostrano valori elevati di SDF sia totale che *brighter* già prima del trattamento. Di fatto, in alcuni casi i valori SDF risultano più bassi al T<sub>2</sub> rispetto al T<sub>0</sub>. Classificando i 10 soggetti qui analizzati sulla base della terapia somministrata, i nostri risultati mostrano l'assenza di un andamento univoco dei valori di SDF, sia totale (Grafico 1 C, D, E) che *brighter* (Grafico 1 F, G, H). Di fatto, coloro che sono stati trattati con Carboplatino mostrano un andamento variabile indipendente dal diverso numero di cicli del trattamento, ovvero in alcuni pazienti si osserva la normalizzazione dell'SDF sia totale che *brighter* dopo 2 anni mentre in altri questo non si verifica. Tuttavia, sottoporsi ad 1 o 2 cicli di Carboplatino non sembra escludere la possibilità di avere livelli di SDF totale elevati al T<sub>2</sub>. Tuttavia, l'unico paziente con valori di  $SDF^{brighter}$  superiore al 25% al T<sub>2</sub> ha effettuato 2 cicli del suddetto

trattamento. Relativamente ai pazienti trattati con PEB, quest'ultimi presentano un aumento dei valori di SDF totali e brighter al T<sub>1</sub> e una riduzione di essi al T<sub>2</sub>, indipendentemente dal numero di cicli di PEB. Fa eccezione un paziente trattato con 3 cicli PEB che mostra un valore di SDF totale elevato ma con SDF brighter che si normalizza.

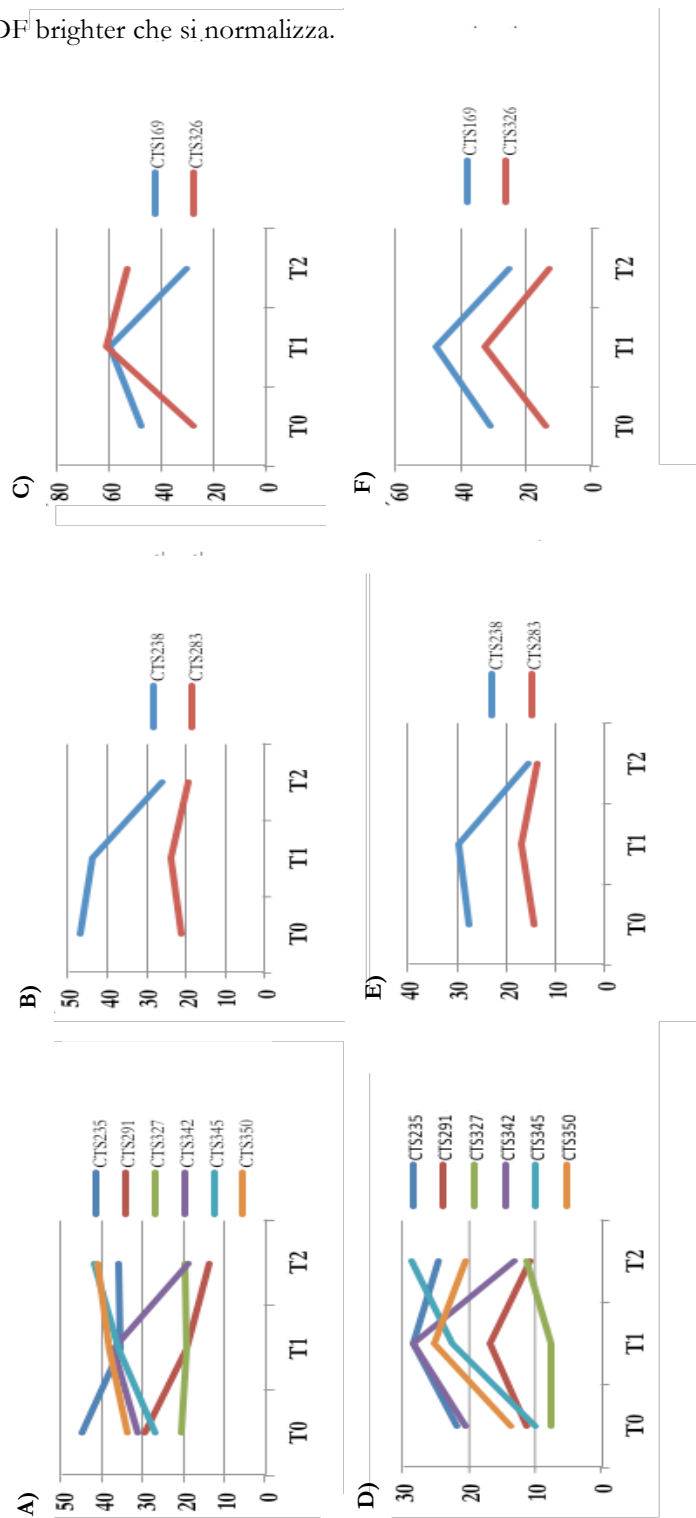


Grafico 1 - Andamento del livello di frammentazione al T<sub>0</sub> e al T<sub>2</sub> per ogni singolo paziente. (A, B, C) SDF totale dei 10 pazienti classificati sulla base della terapia: Carboplatino (A), PEB ≤ 2 cicli (B) e PEB ≥ 3 cicli (C). (D, E, F) SDF *brighter* dei pazienti classificati sulla base della terapia: Carboplatino (D), PEB ≤ 2 cicli (E) e PEB ≥ 3 cicli (F).

Successivamente si è scelto di determinare la percentuale di individui che mostra, dopo due anni di *follow-up*, un valore di frammentazione *brighter* superiore al 75° percentile (25%). Tale percentuale raggiunge il 20% nell'intera casistica e il 17% e il 25% nel gruppo di pazienti trattato, rispettivamente, con Carboplatino e PEB.

Prendendo in analisi i due pazienti per i quali sono disponibili i valori di frammentazione del DNA a tutti i tempi previsti dal protocollo, si osserva come al T3 i valori di frammentazione, sia totale (Grafico 2A) che *brighter* (Grafico 2B), tendono a ridursi rispetto agli altri due tempi di *follow-up*. Analizzando i valori dell'SDF<sup>*brighter*</sup> in termini di superamento o meno del 75° percentile di normalità, solo il paziente trattato con radioterapia ha al T3 un valore maggiore del 25%.

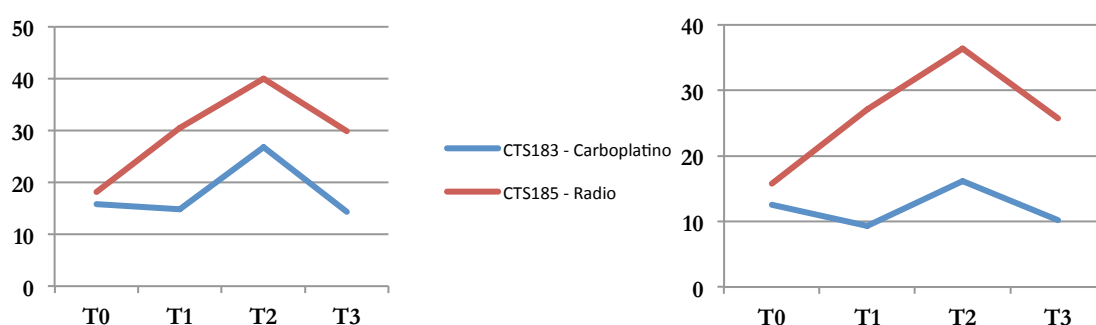


Grafico 2 - Andamento del livello di frammentazione al T0, al T2 e al T3 per ogni singolo paziente. (A) SDF totale relativa a tutti i 2 pazienti. (B) SDF *brighter* relativa a tutti i 2 pazienti.

### 4.II.3. Effetti della terapia sull'instabilità del genoma spermatico di pazienti con tumore testicolare

#### 4.II.3.1. Presentazione generale dei dati e analisi di instabilità dei microsatelliti (MSI)

Per determinare la presenza di instabilità a livello del DNA degli spermatozoi è stata utilizzata la stessa popolazione di studio descritta nel paragrafo 4.II.2.1.. Per ognuno dei 97 pazienti era disponibile, oltre che alla raccolta di liquido seminale ad almeno un tempo di *follow-up*, anche il prelievo di sangue effettuato prima dell'inizio della terapia. Per ogni paziente, è stata confrontata la lunghezza di sette microsatelliti tra il DNA estratto da leucociti al tempo 0 (T<sub>0</sub>) e il DNA estratto da spermatozoi ai tempi di *follow-up* disponibili (T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub> e/o T<sub>3</sub>). Dei 97 pazienti affetti da tumore del testicolo, nessuno ha mostrato instabilità nei microsatelliti analizzati in seguito a trattamento antiproliferativo.

### 4.II.4. Effetti della terapia sull'epigenoma spermatico di pazienti con tumore testicolare

#### 4.II.4.1. Presentazione generale dei dati

La popolazione utilizzata per tale analisi si compone di 9 pazienti. Cinque, compresi nella casistica descritta nel paragrafo 4.II.2.2., sono affetti da tumore testicolare; quattro sono invece affetti da linfoma di Hodgkin. Relativamente ai pazienti affetti da tumore testicolare la casistica era costituita,

sulla base istologica, da tre pazienti affetti da Seminoma e due da Non-seminoma e, sulla base del trattamento chemioterapico, da tre pazienti trattati con 1 o 2 cicli di Carboplatino e due pazienti con 1 o 2 cicli di PEB. I pazienti affetti da linfoma di Hodgkin sono stati invece trattati: due con 2 cicli di ABVD e due tramite ABVD più radioterapia. Con ABVD si intende il trattamento combinato di adriamicina, bleomicina, vinblastina, dacarbazina.

Ad eccezione di un paziente (con codice 3), per ciascun soggetto sono stati analizzati i campioni raccolti sia prima ( $T_0$ ) che dopo la terapia (al  $T_{1/2}$  e/o al  $T_1$ ). Per il paziente con codice 3, era disponibile solo il campione al  $T_0$ . L'appartenenza dei campioni pre- e post-terapia ai corrispettivi pazienti è stata confermata dall'analisi dei 65 SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) inclusi nell'*array*. Infatti, come atteso, solo i campioni appaiati (due e/o tre) appartenenti allo stesso paziente, presentavano profili, relativi a tali SNPs, sovrapponibili.

Nella Tabella 25 è elencato, per ogni paziente, il tipo di tumore, il trattamento eseguito e le caratteristiche seminali pre- e post-terapia.

ID paziente	Tipo di tumore	Terapia (n° di cicli e/o dose)	Nomenclatura utilizzata per i tempi disponibili di ogni paziente	Parametri seminali		
				N° totale spzoi (ml/eiaculato)	Motilità a+b (%)	Morfologia (%)
1	Seminoma	Carboplatino (2)	1A= $T_0$	403	78	8
			1B= $T_1$	413	78	10
2	Non seminoma	PEB (2)	2A= $T_0$	299.2	64	9
			2B= $T_1$	338	69	8
6	Seminoma	Carboplatino (1)	6A= $T_0$	414	62	7
			6B= $T_1$	475.2	78	9
10	Seminoma	Carboplatino (2)	10A= $T_0$	91	63	2
			10B= $T_{1/2}$	108.8	64	6
11	Non seminoma	PEB (1)	11A= $T_0$	184.8	83	10
			11B= $T_{1/2}$	170.2	74	7
3	Linfoma di Hodgkin	ABVD (6)	3A= $T_0$	96.9	25	0
5	Linfoma di Hodgkin	ABVD + radio (4 + 30Gy)	5A= $T_0$	287	38	2
			5B= $T_1$	39	72	5
7	Linfoma di Hodgkin	ABVD (6)	7A= $T_0$	34.5	42	5
			7B= $T_1$	70.4	64	7
8	Linfoma di Hodgkin	ABVD + radio (4 + 76Gy)	8A= $T_0$	961.4	62	15
			8B= $T_{1/1}$	378	17	3
			8C= $T_1$	313.2	64	13

Tabella 25 - Elenco dei campioni appartenenti ai pazienti arruolati nel nostro studio. Le tabelle forniscono informazioni che includono il codice (ID) di ogni campione, il tipo di tumore, il tipo di trattamento citotossico con il numero di cicli (in combinazione o meno con la dose di radioterapia) a cui è stato sottoposto ciascun paziente, la nomenclatura che si riferisce ai diversi tempi di raccolta ( $T_0$ ,  $T_{1/2}$ ,  $T_1$ ) utilizzata per ogni paziente (codice ID del paziente seguito da una lettera A, B o C) e i parametri seminali relativi ai tempi di raccolta. Spzoi= spermatozoi.

#### 4.II.4.2. *Analisi del profilo di metilazione del DNA spermatico in pazienti affetti da tumore testicolare in base alla tipologia di trattamento citotossico*

Al fine di individuare eventuali differenze nel profilo di metilazione del DNA dello spermatozoo, in seguito alla terapia antitumorale, è stata eseguita un'analisi del metiloma sia globale sia su specifici loci. La prima è basata sullo studio di tutti i siti d'interesse analizzati dall'*array* dopo selezione in base alla qualità di lettura (numero delle sonde pari a 349,488); la seconda si concentra sui 100 loci più vicini a raggiungere una differenza di metilazione statisticamente significativa tra prima e dopo il trattamento. Questa seconda analisi è stata condotta poiché regioni differenzialmente metilate (DMR) potrebbero non essere visibili tramite uno studio ad ampio spettro, ma potrebbero essere identificate restringendo il campo d'indagine.

#### **Carboplatino**

I pazienti trattati con Carboplatino, sono identificati con il codice: 1, 6 e 10. L'analisi del *pattern* di metilazione, oltre al T<sub>0</sub> (1A, 6A, 10A), è stata eseguita al T<sub>1</sub> per i pazienti 1 (1B) e 6 (6B) e al T<sub>1/2</sub> per il paziente con codice 10 (10B) (Tabella 25). Per il paziente 1, entrambi i campioni utilizzati corrispondono alla frazione *up* ottenuta tramite tecnica di separazione *Swim-Up*; mentre per i pazienti con codice 6 e 10, la frazione impiegata corrisponde al 90% ricavata dalla protocolli di separazione nemaspermica.

#### Analisi globale della metilazione del DNA spermatico

Non è stata riscontrata una differenza statisticamente significativa nella metilazione di tutti i loci analizzati a livello del DNA spermatico tra prima e dopo la terapia confrontando sia contemporaneamente (T<sub>0</sub> *versus* T<sub>X</sub>) che singolarmente (T<sub>0</sub> *versus* corrispettivo T<sub>1/2</sub> o T<sub>1</sub>) i tre pazienti (Figura 15A e B). Ciò si evince dai valori di media dei *b-values*, calcolati sia prima che dopo la terapia (media  $\pm$  deviazione standard:  $0.458 \pm 0.411$  e  $0.46 \pm 0.409$  rispettivamente) (Figura 15A). Attraverso il *Manhattan* ed il *Volcano plots* sono state identificate 29 CpGs con differenze di metilazione statisticamente significative tra prima e dopo il trattamento caratterizzate da un *p-value* superiore a quello della soglia *suggestive* (*p-value suggestive* =  $2.86 \times 10^{-6}$ ). Applicando la correzione di Bonferroni, che alza la soglia di significatività statistica, 5 loci su 29 sono risultati i più significativi (Figura 16A; Figura 17A), con una differenza di metilazione che però non supera mai il 10% (soglia di risoluzione del *chip*). Tali loci cadono su cinque differenti geni identificati tramite l'analisi bioinformatica la quale ha anche permesso di ricavare la posizione genomica dei 5 siti rilevati (Figura 16C; Tabella 26A).

La mancanza di loci con una differenza del livello di metilazione realmente attribuibile al trattamento chemioterapico, è stata confermata dal test di permutazione che non ha identificato siti con una differenza tra pre e post-terapia superiore al 10%.

#### Analisi della metilazione del DNA spermatico su 100 loci

Restringendo il campo di analisi ai 100 loci più vicini a raggiungere una differenza di metilazione statisticamente significativa, è stato individuato un leggero aumento del livello di metilazione del



DNA dopo il trattamento con Carboplatino rispetto al T<sub>0</sub>. Infatti, il valore della media dei *b-values* al T<sub>0</sub> è pari a  $0.324 \pm 0.419$  (media  $\pm$  deviazione standard) e risulta leggermente inferiore a quella dei *b-values* calcolati per i campioni post-terapia (media  $\pm$  deviazione standard:  $0.328 \pm 0.414$ ) (Figura 18A). Anche in questo caso non è stata raggiunta una differenza statisticamente significativa (superiore al 10%) sia considerando i pazienti nel loro insieme che singolarmente (Figura 18A e B).

### **PEB**

I pazienti della nostra casistica trattati con PEB corrispondono al codice 2 e 11. Per il paziente 2 abbiamo a disposizione la frazione *mp* al T<sub>0</sub> (2A) ed al T<sub>1</sub> (2B), per il paziente 11 è stata utilizzata la frazione 90% al T<sub>0</sub> (11A) ed al T<sub>1/2</sub> (11B) (Tabella 25).

#### Analisi globale della metilazione del DNA spermatico

In seguito all'analisi globale del DNA spermatico, non è stata riscontrata una differenza dei livelli di metilazione statisticamente significativa tra prima e dopo la terapia confrontando sia contemporaneamente (T<sub>0</sub> *versus* T<sub>x</sub>) che singolarmente (T<sub>0</sub> *versus* corrispettivo T<sub>1/2</sub> o T<sub>1</sub>) i due pazienti (Figura 15C e D). Tale risultato è stato dedotto dai valori di media calcolati per i campioni pre e post-terapia (media  $\pm$  deviazione standard:  $0.457 \pm 0.411$ ;  $0.459 \pm 0.409$ , rispettivamente). Attraverso il *Manhattan* ed il *Volcano plots* sono state identificate 12 CpGs con differenze di metilazione tra pre e post-terapia il cui *p-value* raggiungeva o superava la soglia di significatività statistica fissata a 5.54 (Figura 16B e D). Tra le 12 CpGs, 4 hanno mostrato una più evidente differenza dei livelli di metilazione tra prima e dopo il trattamento che però non supera mai la soglia di risoluzione del chip (10%) (Figura 17B). Tramite analisi bioinformatica è stato possibile ricavare la posizione genomica di tali loci e le informazioni sul ruolo degli eventuali geni che li contengono (Tabella 26B). La mancanza di loci con differenza del livello di metilazione realmente attribuibile al trattamento chemioterapico, è stata confermata dal *test di permutazione* che non ha identificato siti con una differenza superiore al 10%.

#### Analisi della metilazione del DNA spermatico sui 100 loci

Limitando l'analisi ai 100 loci più vicini a raggiungere una differenza di metilazione statisticamente significativa, è stato individuato un aumento del livello di metilazione del DNA tra prima e dopo il trattamento con PEB, rappresentato da un leggero aumento del valore di media dei *b-values* calcolati per il gruppo T<sub>x</sub> (media  $\pm$  deviazione standard:  $0.165 \pm 0.343$ ) rispetto al T<sub>0</sub> (media  $\pm$  deviazione standard:  $0.158 \pm 0.348$ ). Tale differenza non raggiunge però una significatività statistica sia considerando i pazienti nel loro insieme che singolarmente poiché non supera la soglia di risoluzione del *chip* fissata al 10% (Figura 18C e D).

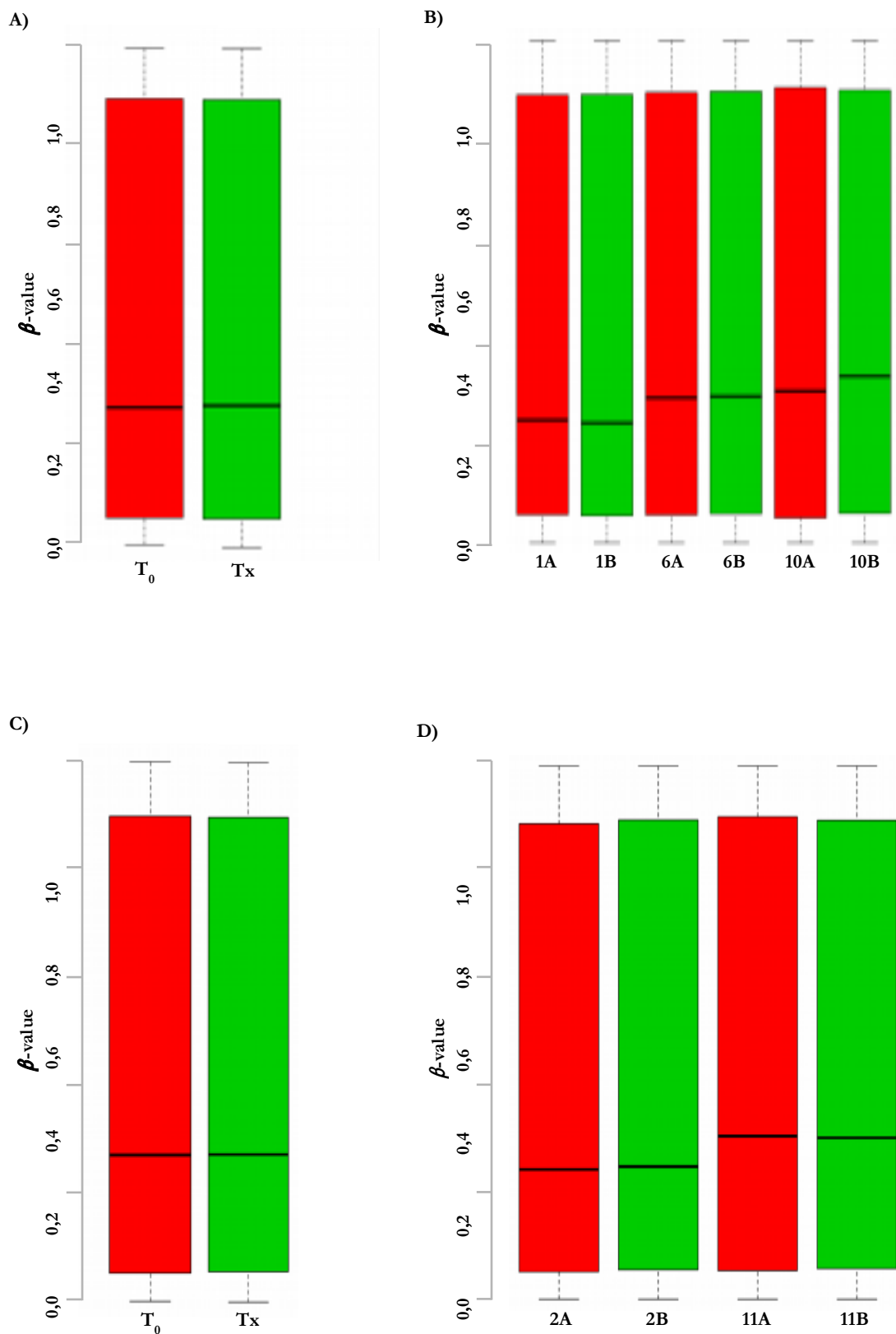


Figura 15 - Analisi globale della metilazione del DNA prima e dopo la terapia con carboplatino o PEB. **Carboplatino:** (A) per i due gruppi  $T_0$  *versus*  $T_X$ ; (B) per tutti i singoli campioni pre e post-terapia (1A *versus* 1B; 5A *versus* 5B; 10A *versus* 10B). **PEB:** (C) per i due gruppi  $T_0$  *versus*  $T_X$ ; (D) per tutti i singoli campioni pre e post-terapia (2A *versus* 2B; 1car1A *versus* 11B).

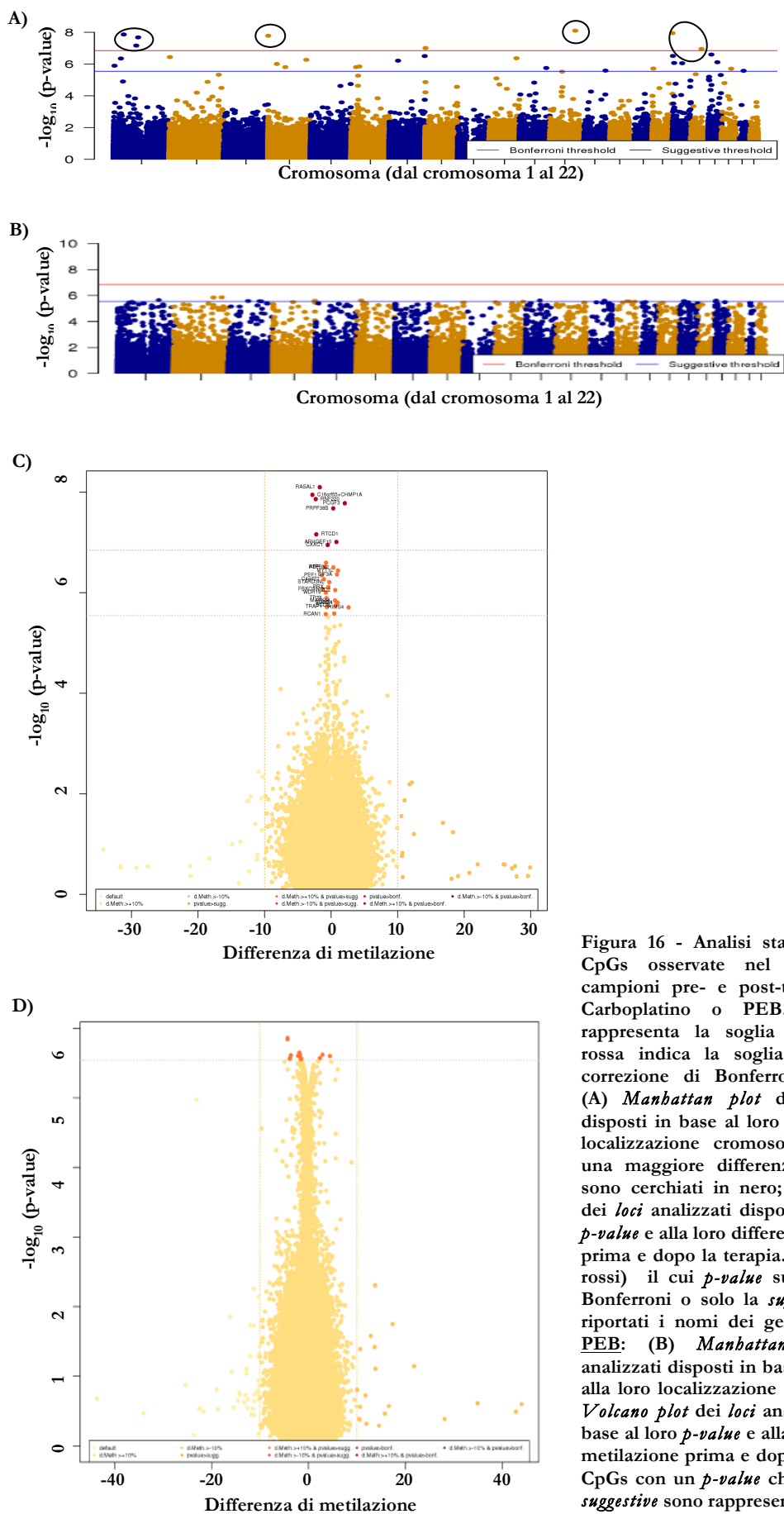


Figura 16 - Analisi statistica di tutte le CpGs osservate nel confronto tra i campioni pre- e post-terapia a base di Carboplatino o PEB. La linea blu rappresenta la soglia *suggestive*, quella rossa indica la soglia imposta con la correzione di Bonferroni. **Carboplatino:** (A) *Manhattan plot* dei loci analizzati disposti in base al loro *p-value* e alla loro localizzazione cromosomica. I loci con una maggiore differenza di metilazione sono cerchiati in nero; (C) *Volcano plot* dei loci analizzati disposti in base al loro *p-value* e alla loro differenza di metilazione prima e dopo la terapia. Per i 29 siti (spot rossi) il cui *p-value* supera la soglia di Bonferroni o solo la *suggestive* sono stati riportati i nomi dei geni in cui cadono. **PEB:** (B) *Manhattan plot* dei loci analizzati disposti in base al loro *p-value* e alla loro localizzazione cromosomica; (D) *Volcano plot* dei loci analizzati disposti in base al loro *p-value* e alla loro differenza di metilazione prima e dopo la terapia. Le 12 CpGs con un *p-value* che supera la soglia *suggestive* sono rappresentate da spot rossi.

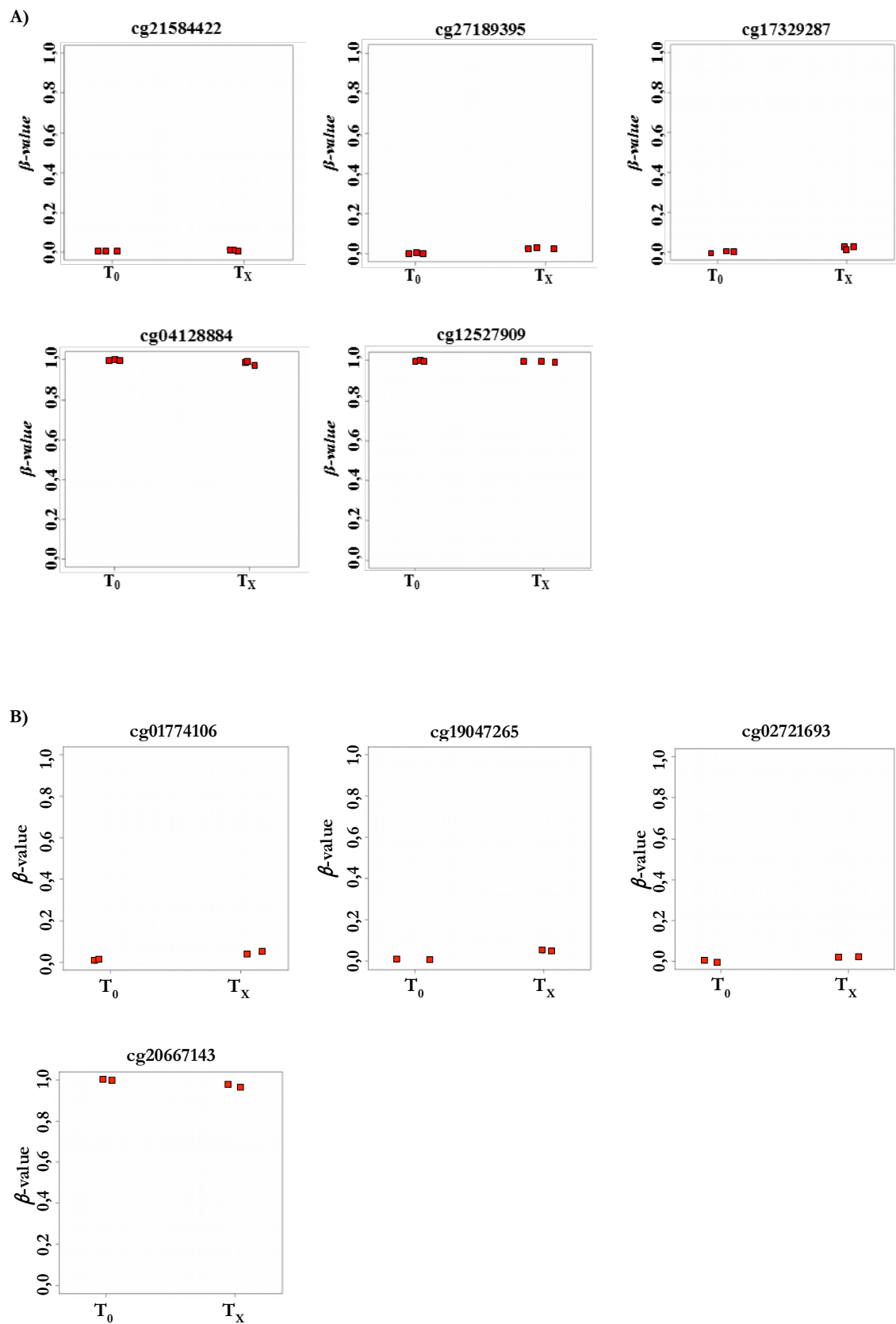


Figura 17 - Variazione assoluta del  $\beta$ -value riferita ai 5 e 4 loci con differenze di metilazione statisticamente significative tra pre e post-terapia, rispettivamente con Carboplatino (A) o con PEB (B), rilevati dall'analisi  $T_0$  versus  $T_X$ .

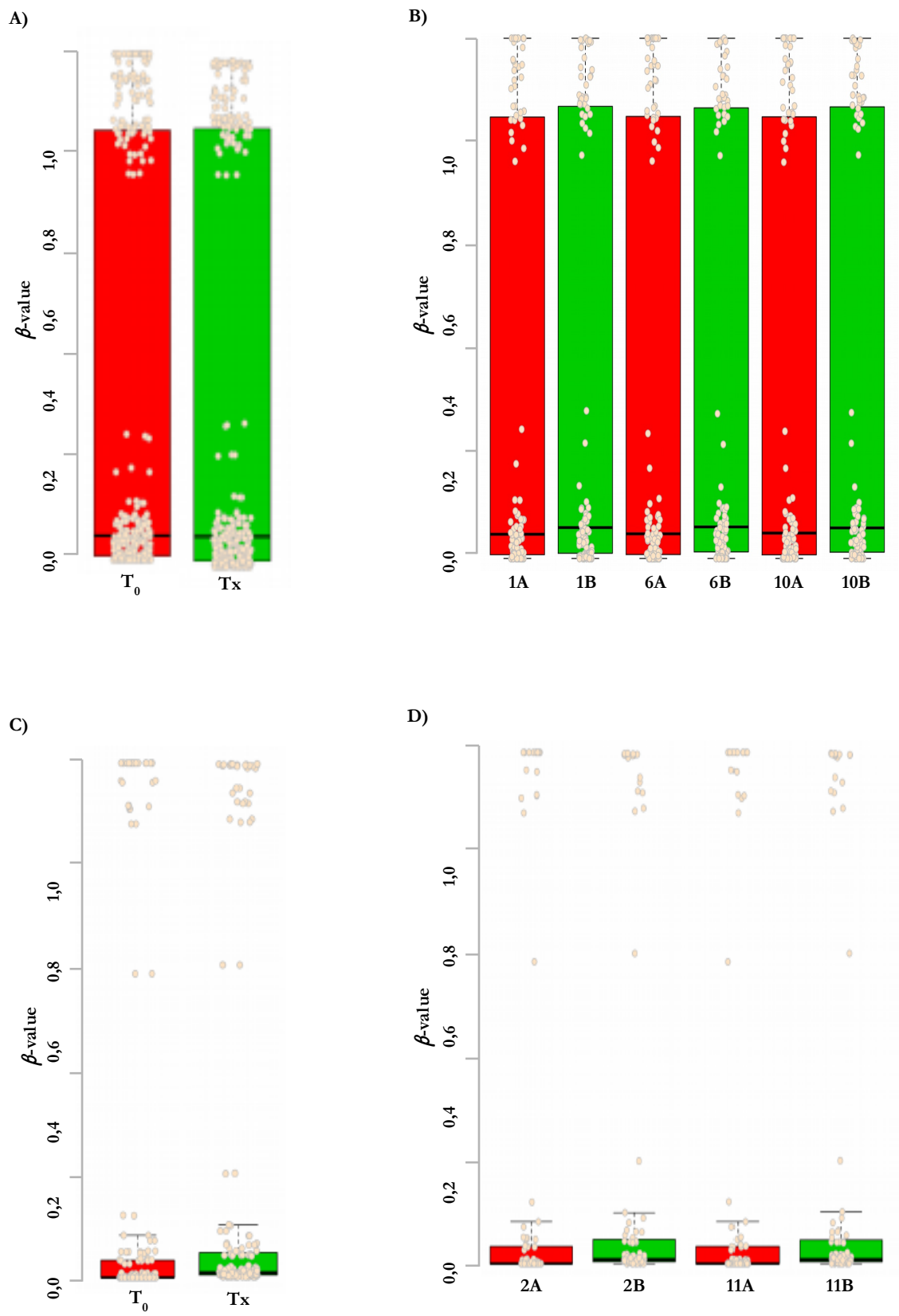


Figura 18 - Analisi della metilazione del DNA sui 100 loci prima e dopo la terapia con Carboplatino o PEB. Carboplatino: (A) per il gruppo  $T_0$  versus il gruppo  $T_x$ ; (B) per tutti i singoli campioni pre e post-terapia (1A versus 1B; 5A versus 5B; 10A versus 10B). PEB: (C) per i gruppi  $T_0$  versus il gruppo  $T_x$ ; (D) per tutti i singoli campioni pre e post-terapia (2A versus 2B; 11A versus 11B).

A)

Probe ID	Cromosoma	Posizione genomica	Gene	Relazione con le CpGs Island	Differenza di metilazione	p-values
cg21584422	12q24.13	113573942	RASAL1	<i>Shore</i>	1,7%	7,97x10 <sup>-9</sup>
cg27189395	16q24.3	89725071	C16orf55 + CHMP1A	<i>Shore</i>	2,8%	1,13x10 <sup>-8</sup>
cg17329287	1p34.1	44870688	RNF220	<i>Shore</i>	2,3%	1,38x10 <sup>-8</sup>
cg04128884	4p16.3	714516	PCGF3	<i>Island</i>	2,1%	1,66x10 <sup>-8</sup>
cg12527909	1p13.3	109241986	PRPF38B	<i>Open Sea</i>	0,3%	2,1x10 <sup>-8</sup>

B)

Probe ID	Cromosoma	Posizione genomica	Gene	Relazione con le CpGs Island	Differenza di metilazione	p-values
cg01774108	2q34	214016113	IKZF2	<i>Shore</i>	4,3%	1,38x10 <sup>-6</sup>
cg19047265	2	177025998	assente	<i>Shore</i>	4,3%	1,43x10 <sup>-6</sup>
cg02721693	1q25.3	182922705	C1orf14	<i>Shore</i>	1,9%	2,24x10 <sup>-6</sup>
cg20667143	6p22.3	21679975	FLJ22536	<i>Open Sea</i>	2,9%	2,39x10 <sup>-6</sup>

Tabella 26 - Descrizione delle caratteristiche relative ai 5 e 4 siti con *p-value* superiore alla soglia *suggestive*, derivanti dall'analisi dei campioni pre e post-terapia (T<sub>0</sub> *versus* T<sub>x</sub>), rispettivamente, con Carboplatino (A) e con PEB (B).

#### 4.II.4.3. Analisi del profilo di metilazione del DNA spermatico in pazienti affetti da tumori ematologici trattati con ABVD in combinazione con radioterapia

Anche per i pazienti affetti da tumori ematologici, nello specifico rappresentati dal linfoma di Hodgkin, sono state effettuate le due analisi mirate allo studio del metiloma spermatico, quella globale (su 349,488 loci) e quella sui 100 loci più vicini a raggiungere una differenza di metilazione statisticamente significativa. Nella nostra casistica, due pazienti (codice 5 e 8) sono stati sottoposti al trattamento citotossico composto da ABVD e radioterapia. Per il paziente con codice 5 è stato possibile ottenere il DNA spermatico al T<sub>0</sub> (5A) ed al T<sub>1</sub> (5B), mentre per il paziente con codice 8 i campioni a disposizione sono stati ottenuti al T<sub>0</sub> (8A), al T<sub>1/2</sub> (8B) ed al T<sub>1</sub> (8C) (Tabella 25). Pertanto le analisi sul metiloma sono state eseguite considerando i campioni 5A/B prima in associazione con 8A/B (gruppo 1), poi con 8A/C (gruppo 2). Per entrambi i pazienti, tutti i campioni utilizzati corrispondono alla frazione 90% derivata da protocolli di separazione nemaspermica. Poiché la nostra casistica generale comprende un solo paziente affetto da linfoma di Hodgkin (codice 7) con campioni appaiati (T<sub>0</sub> e T<sub>1</sub>) trattato esclusivamente con ABVD, non è stato possibile fare un confronto sul metiloma spermatico tra prima e dopo la somministrazione del solo chemioterapico.

### Analisi globale della metilazione del DNA spermatico

Così come per le tipologie di trattamento analizzate in precedenza, anche in questo caso la differenza di metilazione del DNA spermatico, a livello dei loci analizzati, tra prima e dopo la terapia, non ha raggiunto una significatività statistica nonostante una leggera riduzione dei livelli di metilazione rilevata nel gruppo T<sub>X</sub> rispetto al gruppo T<sub>0</sub> (media ± deviazione standard: 0.458 ± 0.407 e 0.457 ± 0.41 rispettivamente). La significatività statistica non è mai stata raggiunta in entrambi i gruppi di campioni considerando i pazienti sia insieme (T<sub>0</sub> *versus* T<sub>X</sub>) che singolarmente (T<sub>0</sub> *versus* corrispettivo T<sub>1/2</sub> o T<sub>1</sub>) (Figura 19A e B; Figura 20A e B).

Il *Manhattan* ed il *Volcano plots* hanno identificato 13 e 21 CpGs, rispettivamente nel gruppo 1 e gruppo 2, che presentavano una differenza di metilazione statisticamente significativa, superiore alla soglia *suggestive*, tra prima e dopo il trattamento (Figura 7A e B; Figura 8A e B). Nessuno di questi siti raggiungeva o superava la soglia di Bonferroni. L'esclusione dei loci con differenze di metilazione inferiori alla soglia di risoluzione del chip (10%), ha individuato 2 CpGs nel primo gruppo e 3 nel secondo con differenze di metilazione tra pre e post-terapia superiori al 10% (Figura 21C; Figura 22C; Figura 23). Due delle tre CpGs individuate nel secondo gruppo corrispondono a quelle identificate nel primo (cg04955116 e cg25855592). Tramite l'utilizzo di *tools* bioinformatici è stato possibile ricavare la posizione genomica di tali loci e le informazioni sul ruolo degli eventuali geni che li contengono (Tabella 27).

Tuttavia, come è possibile osservare nei 4 *plots* mostrati in Figura 21A e C e 22A e C, nessuno dei loci raggiungeva e/o superava la significatività statistica in termini di differenza di metilazione, imposta con la correzione di Bonferroni, tra prima e dopo il trattamento combinato.

Il test di permutazione ha identificato diversi loci con differenze del *pattern* di metilazione del DNA spermatico superiori al 10%.

### Analisi della metilazione del DNA spermatico sui 100 loci

Analizzando i 100 loci più vicini a raggiungere una differenza di metilazione statisticamente significativa, in entrambi i gruppi è stato osservato un leggero aumento dei livelli di metilazione dopo il trattamento con ABVD in combinazione alla radioterapia. Ciò è dimostrato dai valori di media dei *b-values* ottenuti al T<sub>X</sub> e al T<sub>1</sub> rispetto a quelli ottenuti al T<sub>0</sub>. Nel primo caso, infatti, si passa da 0.216 ± 0.403 a 0.222 ± 0.407 (media ± deviazione standard); nella seconda analisi, la media aumenta da 0.216 ± 0.4 a 0.224 ± 0.408 (media ± deviazione standard). In entrambi i casi non è stata individuata una differenza statisticamente significativa tra livelli di metilazione pre e post-terapia, sia considerando i pazienti nel loro insieme che singolarmente. (Figura 24A e B; Figura 25A e B).

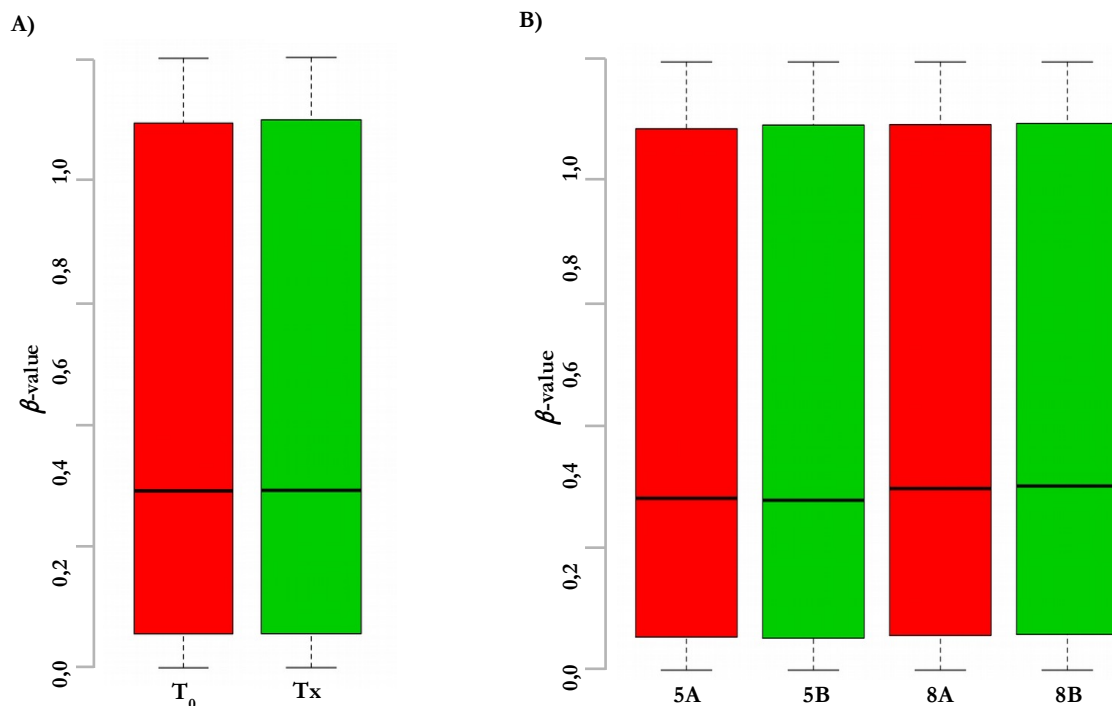


Figura 19 - Analisi globale della metilazione del DNA prima e dopo il trattamento con ABVD in combinazione con radioterapia (A) per i due gruppi T<sub>0</sub> *versus* T<sub>x</sub>; (B) per tutti i singoli campioni pre e post-terapia (5A *versus* 5B; 8A *versus* 8B).

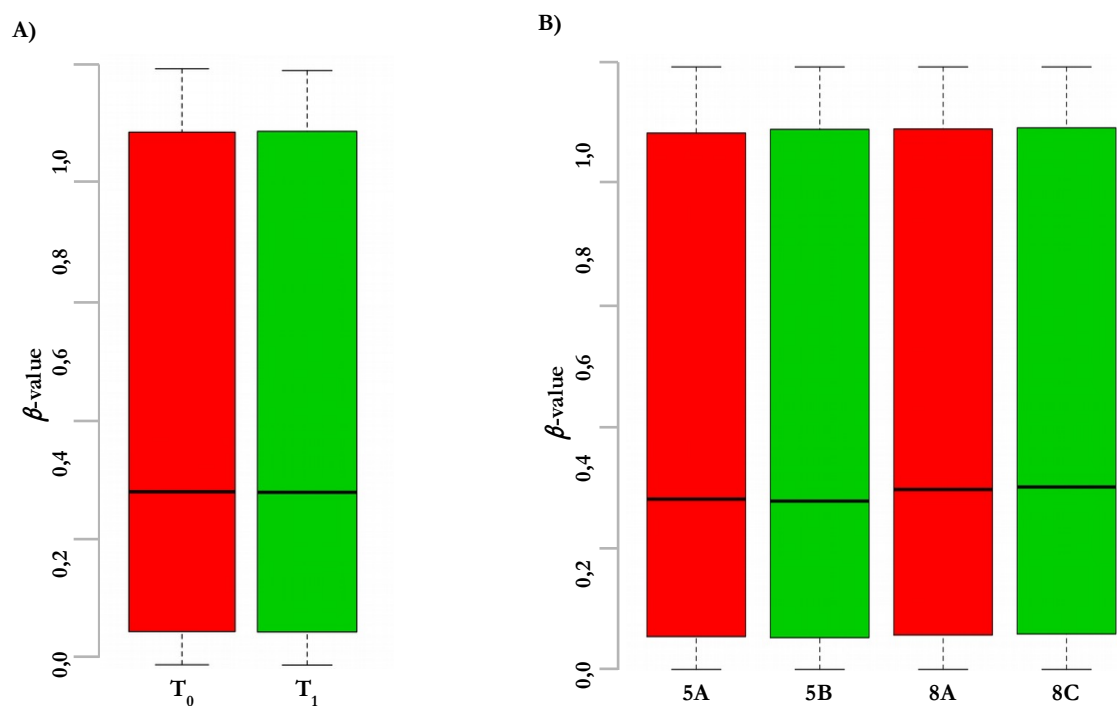


Figura 20 - Analisi globale della metilazione del DNA prima e dopo un anno dal termine della terapia a base di ABVD in combinazione con radioterapia (A) per i due gruppi T<sub>0</sub> *versus* T<sub>1</sub>; (B) per tutti i singoli campioni pre e post-terapia (5A *versus* 5B; 8A *versus* 8C).



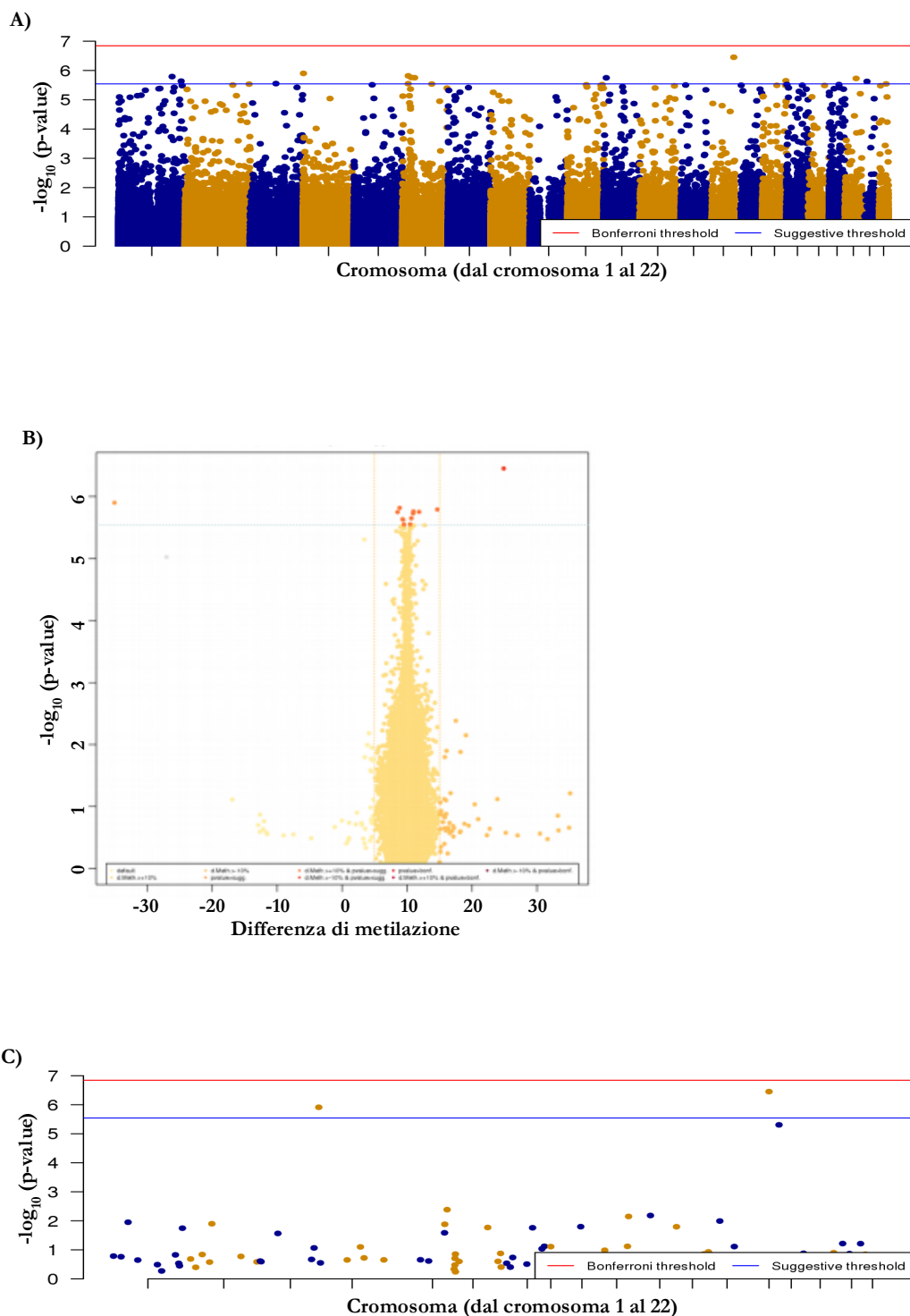


Figura 21 - Analisi dei campioni appaiati pre e post-trattamento con ABVD in combinazione alla radioterapia ( $T_0$  versus Tx). La linea blu rappresenta la soglia *suggestive*, quella rossa indica la soglia imposta dalla correzione di Bonferroni. (A) *Manhattan plot* delle CpGs analizzate disposte in base al loro valore di *p-value* e alla loro localizzazione cromosomica. (B) *Volcano plot* dei loci analizzati disposti in base al loro *p-value* e alla loro differenza di metilazione prima e dopo la terapia. Le 13 CpGs con un *p-value* che supera la soglia *suggestive* sono rappresentate da spot rossi. (C) *Manhattan plot* delle CpGs che presentano differenze di metilazione maggiori rispetto alla soglia di risoluzione del chip (10%). Due siti CpGs hanno un *p-value* superiore alla soglia *suggestive* (linea blu) ma nessuno di questi supera la soglia di Bonferroni (linea rossa).

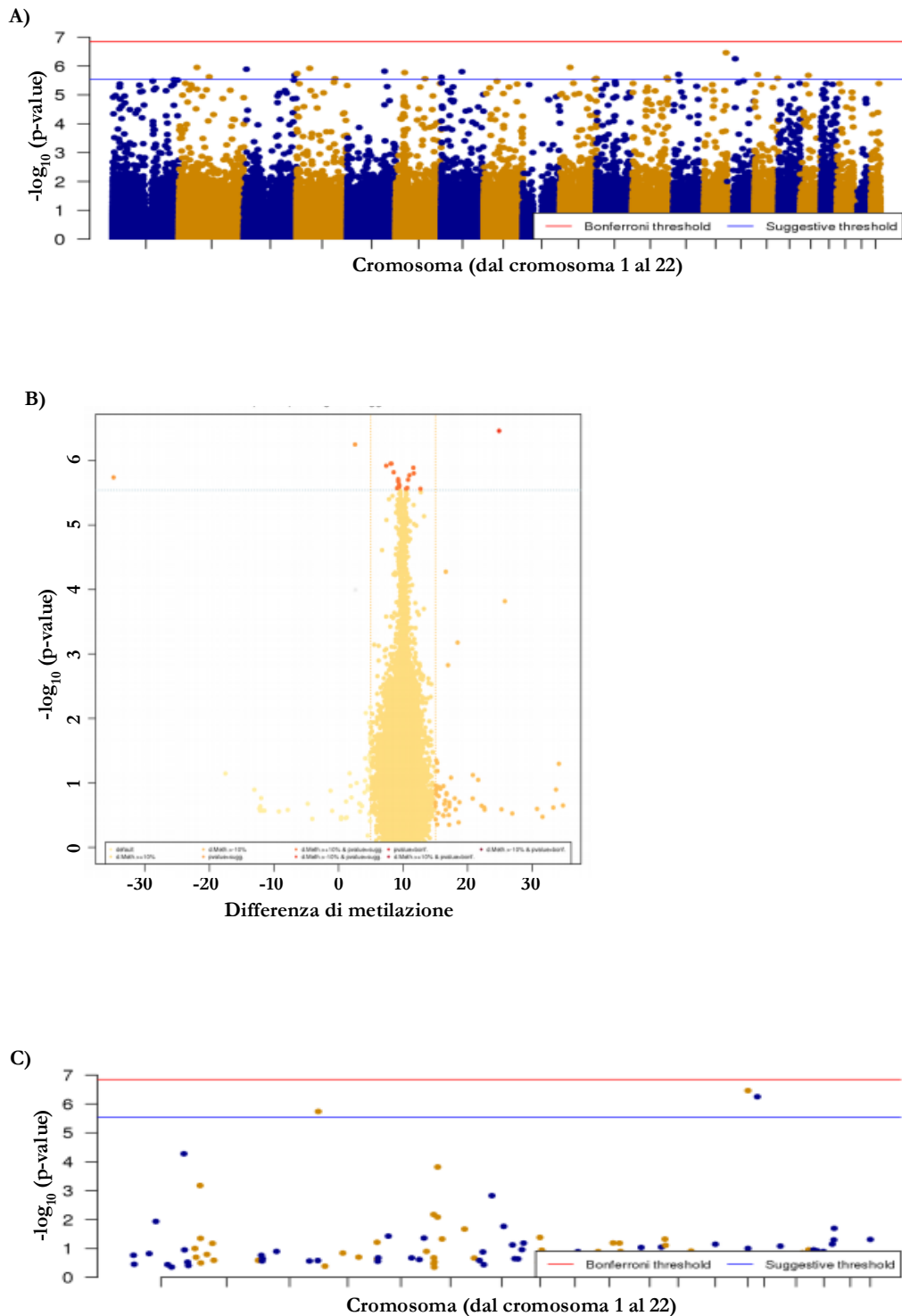


Figura 22 - Analisi dei campioni appaiati  $T_0$  versus  $T_1$ . La linea blu rappresenta la soglia *suggestive*, quella rossa indica la soglia imposta con la correzione di Bonferroni. (A) *Manhattan plot* delle CpGs analizzate disposte in base al loro valore di *p-value* e alla loro localizzazione cromosomica. (B) *Volcano plot* dei loci analizzati disposti in base al loro *p-value* e alla loro differenza di metilazione prima e dopo la terapia. Le 21 CpGs con un *p-value* che supera la soglia *suggestive* sono rappresentate da spot rossi. (C) *Manhattan plot* delle CpGs che presentano differenze di metilazione maggiori rispetto alla soglia di risoluzione del chip (10%). Tre siti CpGs hanno un *p-value* superiore alla soglia *suggestive* (linea blu) ma nessuno di questi supera la soglia di Bonferroni (linea rossa).

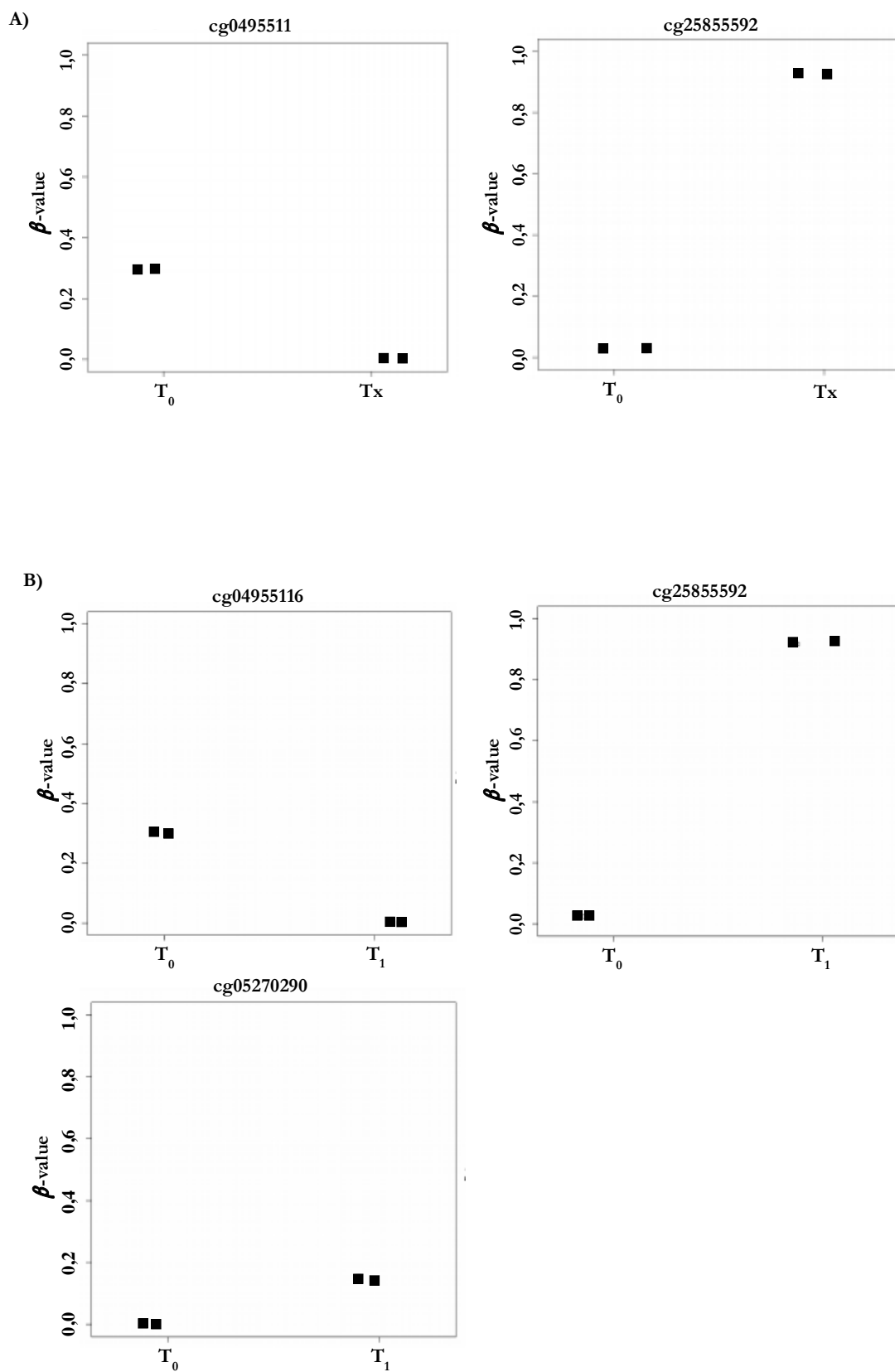


Figura 23 - Variazione assoluta del *b-value* riferita ai loci più significativi nell'analisi prima e dopo il trattamento a base di ABVD in combinazione alla radioterapia (A) gruppo T<sub>0</sub> *versus* gruppo T<sub>x</sub> (5B e 8B); (B) gruppo T<sub>0</sub> *versus* gruppo T<sub>1</sub> (5B e 8C), in cui 2 dei 3 loci individuati sono comuni a quelli identificati nell'analisi T<sub>0</sub> *versus* T<sub>x</sub>.

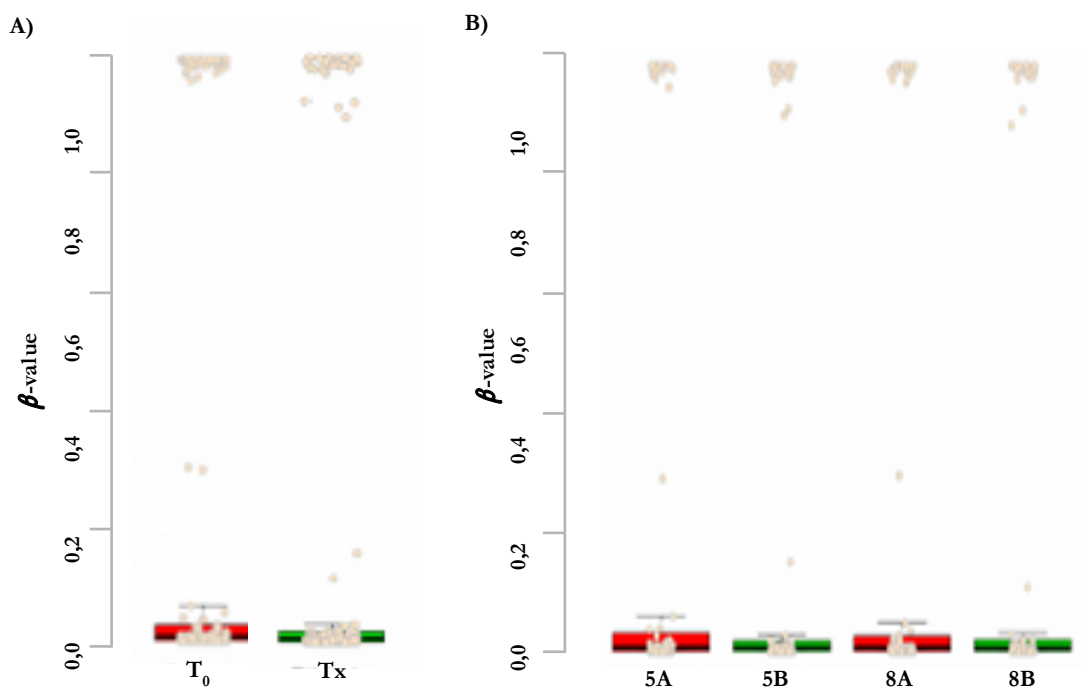


Figura 24 - Analisi della metilazione del DNA a livello dei 100 loci prima e dopo un anno dal termine della terapia a base di ABVD in combinazione alla radioterapia (A) per i due gruppi ( $T_0$  versus  $T_x$ ); (B) per ciascuno dei campioni pre e post-terapia (5A versus 5B; 8A versus 8B).

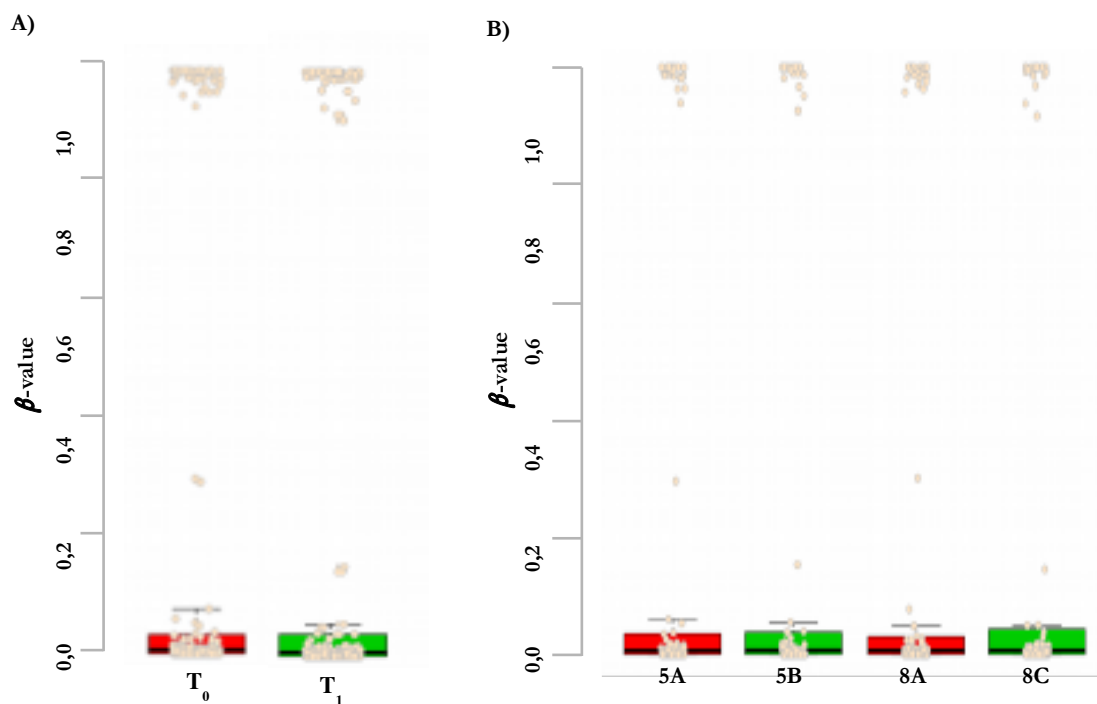


Figura 25 - Analisi della metilazione del DNA a livello dei 100 loci prima e dopo un anno dal termine della terapia a base di ABVD in combinazione alla radioterapia (A) per i due gruppi ( $T_0$  versus  $T_1$ ); (B) per ciascuno dei campioni pre e post-terapia (5A versus 5B; 8A versus 8C).

Probe ID	Cromosoma	Posizione genomica	Gene	Relazione con le CpGs Island	Differenza di metilazione	p-values
cg04955116	14	102415401	assente	Shore	29.76%	3.53x10 <sup>-7</sup> /3.45x10 <sup>-7*</sup>
cg2585559 2	4	1496293	assente	Shore	90.04/89.7*	1.26x10 <sup>-6</sup> /1.82x10 <sup>-6*</sup>
cg05270290*	15*	29562120*	NDNL2* + FAM189A1	Island*	14.88*	5.62x10 <sup>-7*</sup>

Tabella 27 - Descrizione dei loci con *p-value* superiore alla soglia *suggestive* rilevati dall'analisi T<sub>0</sub> versus T<sub>x</sub>. Entrambi i loci sono comuni a quelli identificati dall'analisi T<sub>0</sub> versus T<sub>1</sub> tramite la quale è stato identificato un terzo sito. \* si riferiscono alle informazioni relative al tale locus (cg05270290).

#### 4.II.4.4. Analisi del profilo di metilazione a distanza di sei mesi dalla fine di ciascun tipo di terapia

Non osservando cambiamenti significativi del *pattern* di metilazione del DNA spermatico tra pre e post-terapia nei risultati precedentemente descritti, abbiamo effettuato un'ulteriore analisi comparando questa volta tutti i campioni al T<sub>0</sub> (indipendentemente dal tipo di trattamento) solo con il T<sub>1/2</sub> di un paziente per ciascun tipo di terapia. Lo scopo di tale analisi era quello di aumentare il potere statistico e di verificare se eventuali cambiamenti nel metiloma spermatico fossero più evidenti e significativi dopo sei mesi dalla fine della terapia rispetto a ciò che è stato osservato dopo un anno (T<sub>1</sub>).

I campioni al T<sub>0</sub> utilizzati per questo tipo di analisi sono identificati con la lettera A e appartengono ai pazienti con codice 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 10 e 11. Questi nove campioni sono stati comparati separatamente con il T<sub>1/2</sub> del paziente 8 (8B) trattato con ABVD in associazione a radioterapia (gruppo 1), con il T<sub>1/2</sub> del paziente 10 (10B) trattato con Carboplatino (gruppo 2) e con il T<sub>1/2</sub> del paziente 11 (11B) trattato con PEB (gruppo 3) (Tabella 25).

#### Analisi globale della metilazione del DNA spermatico

Non è stata osservata una differenza statisticamente significativa dei livelli di metilazione in tutti i loci analizzati a livello del DNA spermatico tra prima e dopo il trattamento. Questo risultato è stato ottenuto confrontando i T<sub>0</sub> sia tutti insieme che singolarmente con ciascuno dei tre campioni al T<sub>1/2</sub> (Figura 26A e B; Figura 27A e B; Figura 28A e B). In ognuno dei tre gruppi è stato osservato un leggero aumento del grado di metilazione dopo la fine del trattamento, come dimostrato dai risultati delle medie calcolate sulla base dei *b-values* ottenuti. Nel primo gruppo il valore della media varia da 0.457 ± 0.409 a 0.458 ± 0.41 (media ± deviazione standard); nel secondo gruppo la media al T<sub>0</sub> è pari a 0.457 ± 0.409 (media ± deviazione standard) mentre quella al T<sub>1/2</sub> è pari a 0.466 ± 0.41 (media ± deviazione standard); infine, nel terzo gruppo il valore della media si sposta da 0.457 ± 0.409 (media ± deviazione standard) a 0.463 ± 0.409 (media ± deviazione standard).

Attraverso il *Manhattan plot* sono state identificate 133, 85 e 65 CpGs rispettivamente per il primo, secondo e terzo gruppo con differenze di metilazione tra i due tempi di raccolta il cui *p-value* raggiungeva o superava la soglia di significatività statistica fissata a 5.4. Tuttavia, in seguito all'eliminazione di tutti i siti con differenza di metilazione inferiore al 10%, solo il gruppo 1 e il

gruppo 3 presentano rispettivamente 3 (cg17894577; cg27184867; cg14269510) e 1 (cg05725940) CpGs (Figura 29A, B e C; Figura 30). Tramite analisi bioinformatica è stato possibile ricavare la posizione genomica di tali loci e le informazioni sul ruolo degli eventuali geni che li contengono (Tabella 28). Nessuno dei siti identificati mostrava un *p-value* maggiore o uguale alla soglia imposta dalla correzione di Bonferroni.

Il test di permutazione random ha identificato alcuni loci con differenze del livello di metilazione superiori al 10%.

#### Analisi della metilazione del DNA spermatico sui 100 loci

Concentrandosi sull'analisi dei 100 loci più vicini a raggiungere una differenza di metilazione statisticamente significativa, è stato individuato un aumento dei livelli di metilazione prima e dopo trattamento in tutti e tre i gruppi, sia considerando i pazienti T<sub>0</sub> nel loro insieme che singolarmente nel confronto con 8B, con 10B e con 11B. Nel primo gruppo, i valori di media dei *b-values* pre- e post-terapia sono rispettivamente  $0.499 \pm 0.47$  (media  $\pm$  deviazione standard) e  $0.521 \pm 0.5$ . Nel secondo gruppo si passa da un valore di media pari a  $0.437 \pm 0.471$  a  $0.45 \pm 0.498$  (media  $\pm$  deviazione standard); mentre nel terzo gruppo la media dei *b-value* al T<sub>0</sub> era pari a  $0.411 \pm 0.467$  contro quella al T<sub>1/2</sub> pari a  $0.419 \pm 0.493$  (media  $\pm$  deviazione standard). Tuttavia, anche in questo caso tali differenze non raggiungono la significatività statistica fissata al 10% (Figura 31A e B; Figura 32A e B; Figura 33A e B).

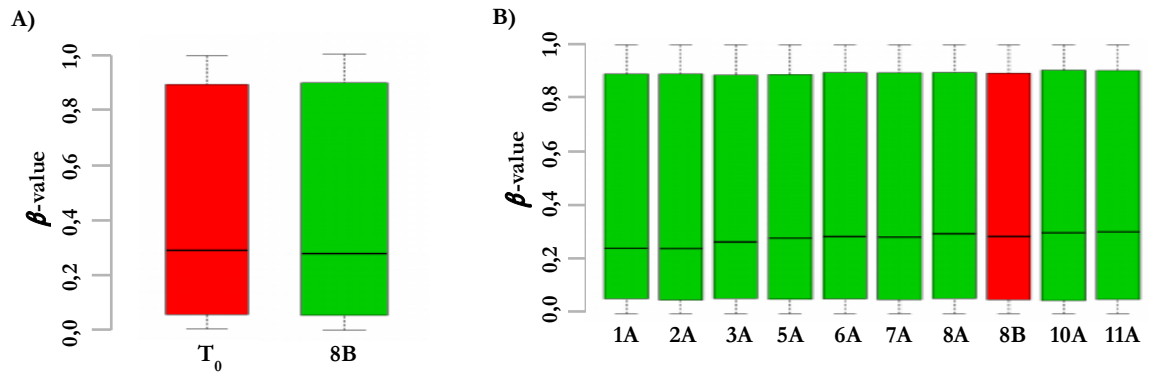


Figura 26 - Analisi globale della metilazione del DNA dopo sei mesi di trattamento combinato a base di ABVD e radioterapia (A) per il gruppo  $T_0$  (n=9) *versus* il campione 8B ( $T_{1/2}$ ); (B) per tutti i singoli campioni al  $T_0$  *versus* il campione 8B ( $T_{1/2}$ ).

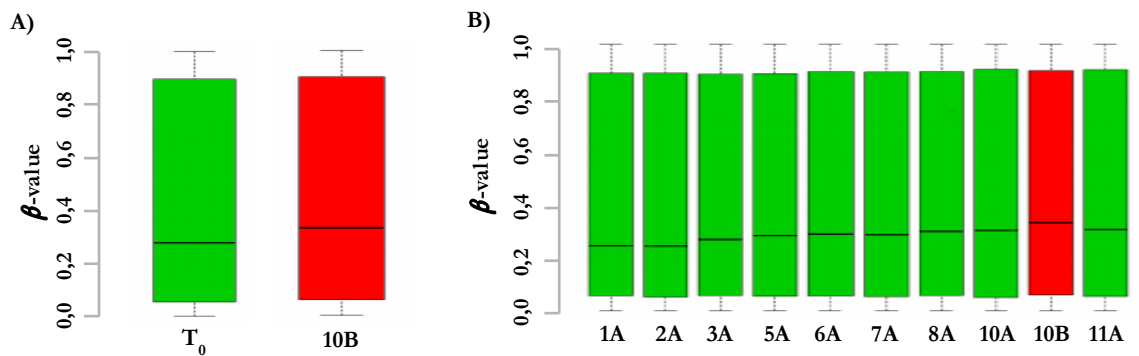


Figura 27 - Analisi globale della metilazione del DNA dopo sei mesi di trattamento con Carboplatino (A) per il gruppo  $T_0$  (n=9) *versus* il singolo campione 10B ( $T_{1/2}$ ); (B) per tutti i singoli campioni al  $T_0$  *versus* il campione 10B ( $T_{1/2}$ ).

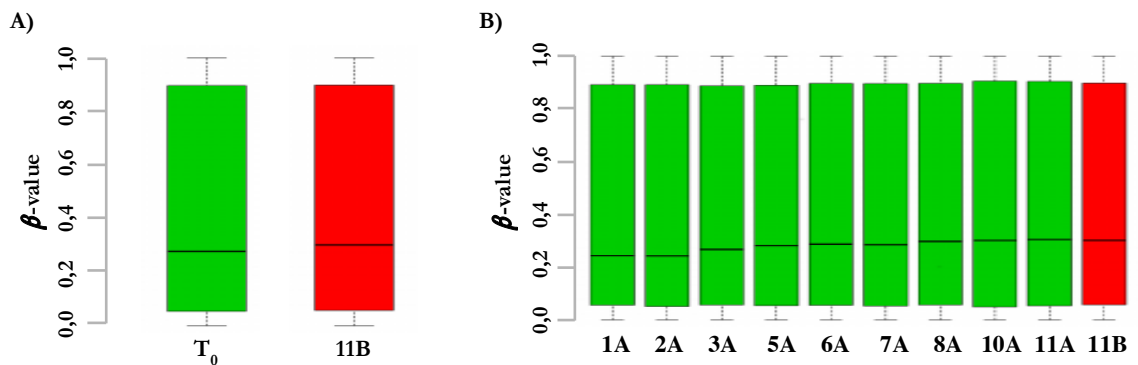


Figura 28 - Analisi globale della metilazione del DNA dopo sei mesi di trattamento con PEB (A) per il gruppo  $T_0$  (n=9) *versus* il campione 11B ( $T_{1/2}$ ); (B) per tutti i singoli campioni al  $T_0$  *versus* il campione 11B ( $T_{1/2}$ ).

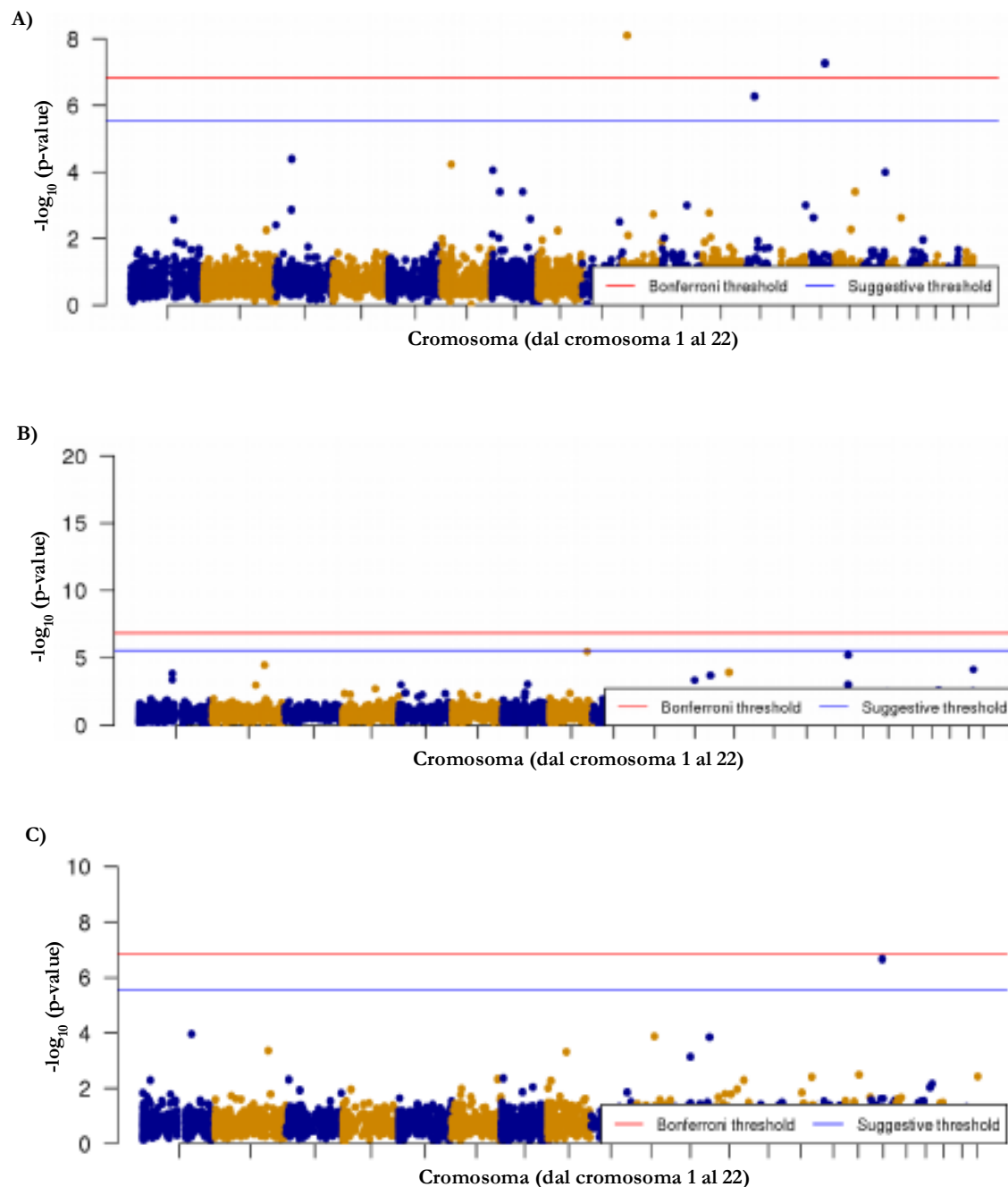


Figura 29 - *Manhattan plots* delle CpGs che presentano differenze di metilazione maggiori rispetto alla soglia di risoluzione del *chip* (10%). La linea blu rappresenta la soglia *suggestive*, quella rossa indica la soglia imposta con la correzione di Bonferroni. (A) Tre siti CpGs hanno un *p-value* superiore alla soglia *suggestive* (linea blu), due dei quali superano la soglia di Bonferroni (linea rossa) nel confronto tra il gruppo  $T_0$  ( $n=9$ ) ed il campione 8B ( $T_{1/2}$ ); (B) nessun sito CpG supera la soglia *suggestive* (linea blu) nel confronto tra il gruppo  $T_0$  ed il campione 10B ( $T_{1/2}$ ); (C) solo un sito CpG ha un *p-value* superiore alla soglia *suggestive* (linea blu), che però non supera quella di Bonferroni (linea rossa) nel confronto tra il gruppo  $T_0$  ed il campione 11B ( $T_{1/2}$ ).



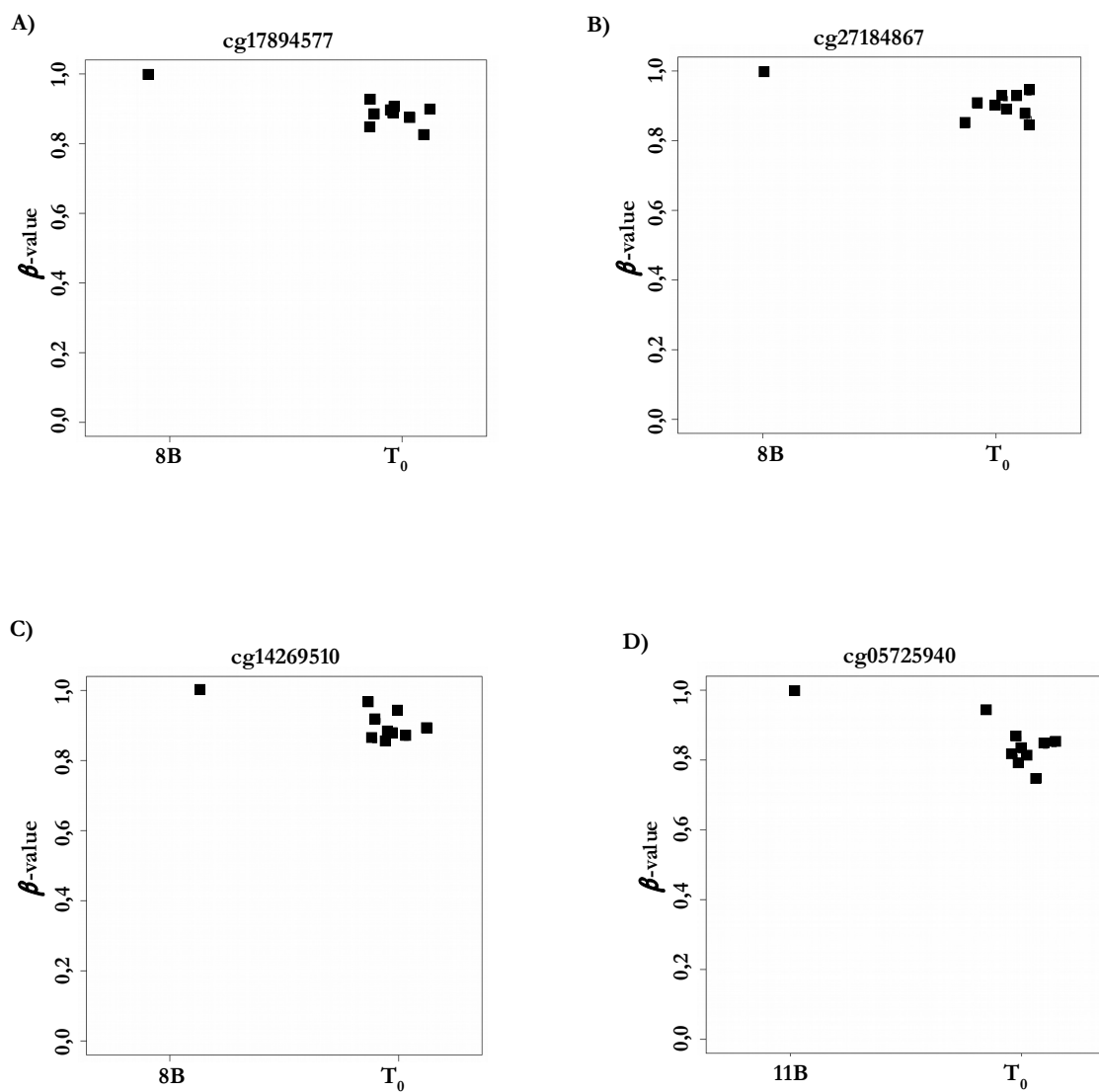


Figura 30 - Variazione assoluta del  $b$ -value riferita ai loci più significativi identificati dall'analisi di comparazione tra valori riferiti a tutti i campioni  $T_0$  ( $n=9$ ) (A, B, C) *versus* il campione 8B ( $T_{1/2}$ ); (D) *versus* il campione 11B ( $T_{1/2}$ ).

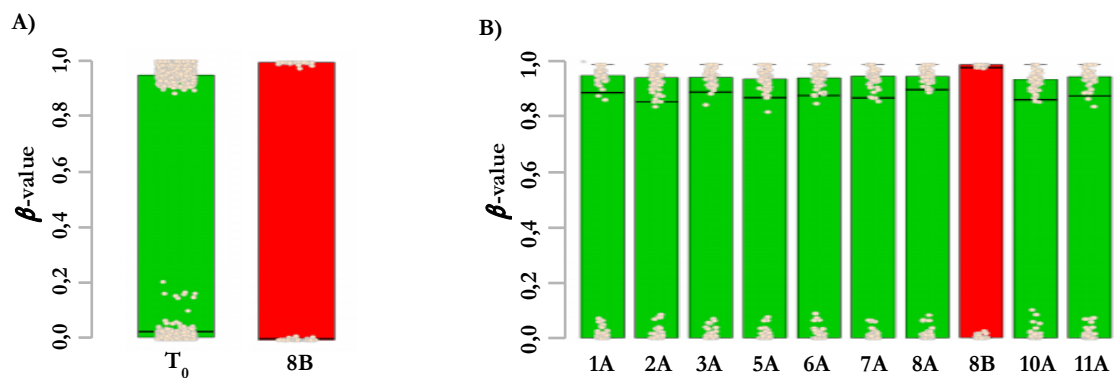


Figura 31 - Analisi dei 100 loci sulla metilazione del DNA dopo sei mesi di trattamento combinato a base di ABVD e radioterapia (A) per il gruppo  $T_0$  ( $n=9$ ) *versus* il campione 8B; (B) per tutti i singoli campioni al  $T_0$  *versus* il campione 8B ( $T_{1/2}$ ).

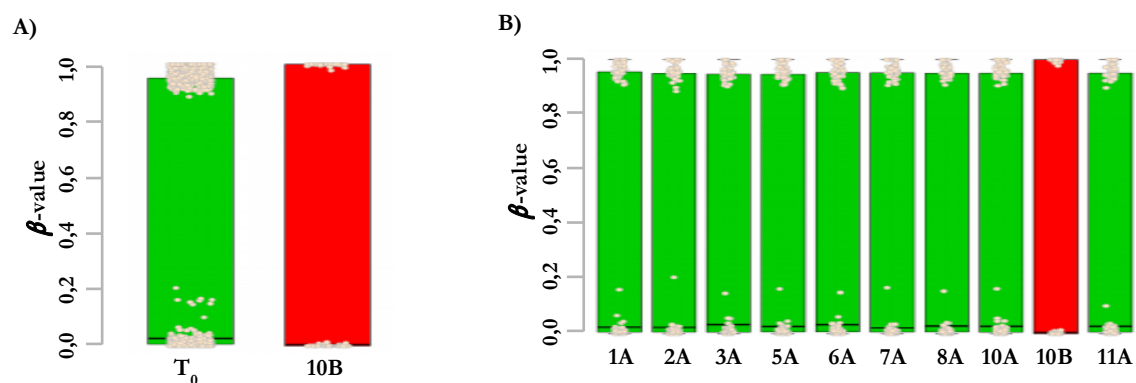


Figura 32 - Analisi della metilazione del DNA sui 100 loci dopo sei mesi di trattamento a base di Carboplatino (A) per il gruppo  $T_0$  ( $n=9$ ) *versus* il campione 10B ( $T_{1/2}$ ); (B) per tutti i singoli campioni al  $T_0$  *versus* il campione 10B ( $T_{1/2}$ ).

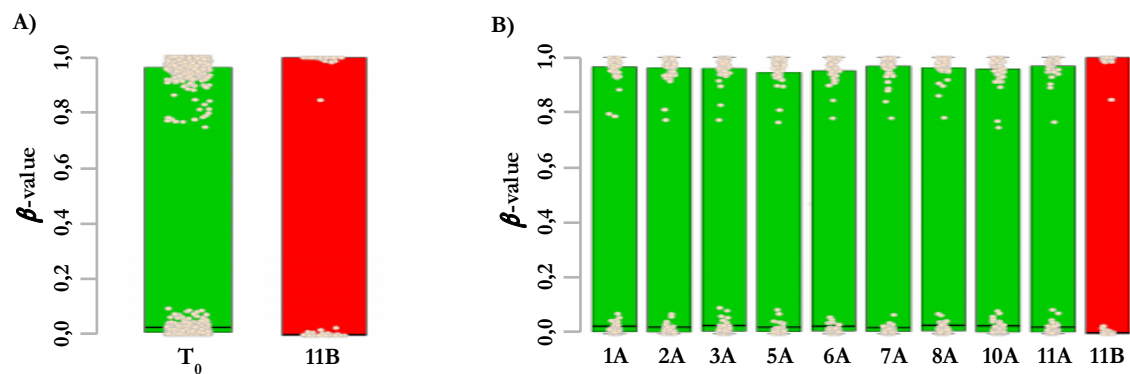


Figura 33 - Analisi della metilazione del DNA a livello dei 100 loci dopo sei mesi dal termine della terapia a base di PEB (A) per il gruppo  $T_0$  ( $n=9$ ) *versus* il campione 11B ( $T_{1/2}$ ); (B) per tutti i singoli campioni al  $T_0$  *versus* il campione 11B ( $T_{1/2}$ ).

Probe ID	Cromosoma	Posizione genomica	Gene	Relazione con le CpGs Island	Differenza di metilazione	p-values
cg17894577	10p13	15600165	ITGA8	<i>Open Sea</i>	12%	7.93x10 <sup>-9</sup>
cg27184867	15	65428922	assente	<i>Shelf</i>	10.7%	5.4x10 <sup>-8</sup>
cg14269510	13q14.13-q14.2	47204488	LRCH1	<i>Open Sea</i>	10.3%	5.36x10 <sup>-7</sup>
cg05725940*	17q21.1*	38074925*	GSDMB*	<i>Open Sea</i> *	17%*	2.19x10 <sup>-7</sup> *

Tabella 28 - Descrizione dei siti CpGs con *p-value* superiore a quello della soglia *suggestive* rilevati dall'analisi del gruppo T<sub>0</sub> (n=9) *versus* il campione 8B (post-terapia, T<sub>1/2</sub>) e dall'analisi del gruppo T<sub>0</sub> *versus* il campione 11B (T<sub>1/2</sub>; indicato con \*).



## 5. DISCUSSIONE

### 5.I. SCOPO 1: RIARRANGIAMENTI AZFc COME FATTORI DI RISCHIO DEI TTCG

Il tumore testicolare a cellule germinali (TTCG), così chiamato perché derivante dall'epitelio germinale dei tubuli seminiferi, rappresenta una delle forme di neoplasia maligna più comune tra i giovani uomini Caucasiche di età compresa tra i 15 e i 40 anni (11% di tutti i tumori maligni in Italia). L'incidenza di questa forma di tumore è di 3-6 nuovi casi all'anno per 100,000 soggetti nei paesi occidentali, con un aumento osservato negli ultimi 30 anni. In Italia, nel 2016, sono stati riscontrati circa 2,300 nuovi casi di tumore testicolare.

È oggi noto che il TTCG ha come precursore più probabile una lesione primaria maligna pre-invasiva che originerebbe nella vita fetale da gonociti fetali sfuggiti al normale processo di maturazione (Skakkebaek 1972; Oosterhuis et al. 2005). Tale lesione (GCNIS) rimarrebbe quiescente durante l'infanzia per diventare TTCG in età giovanile (Rajpert-De Meyts et al. 2003). La GCNIS non regredisce quindi spontaneamente, ma l'acquisizione di alterazioni genomiche secondarie ne aumenterebbero la capacità proliferativa e invasiva determinando così lo sviluppo di un tumore seminomatoso o non-seminomatoso. Vari sono i fattori capaci di influenzare il rischio di sviluppare tale lesione primaria e quindi il TTCG. Tra questi, i più importanti sono rappresentati da: microlitiasi testicolare, precedente tumore controlaterale, Sindrome della Disgenesia Testicolare (SDT), fattori ambientali, etnia e storia familiare per i TTCG. Relativamente a questi due ultimi fattori, è stato documentato come la frequenza dei TTCG risulti molto più elevata negli Europei rispetto ad Africani e ad Asiatici (Gajendran et al. 2005) e nei figli, fratelli, gemelli mono e dizigotici di soggetti affetti da questa forma di tumore. Per i suddetti familiari il rischio di sviluppare i TTCG risulta incrementato di, rispettivamente, 4-6, 8-10, 75 e 35 volte (Swerdlow et al. 1997; Hemminki e

Li 2004). Tali valori di rischio si differenziano molto da quelli relativi a tante altre forme di tumore in cui l'incremento del rischio per i familiari raramente supera 4 volte (Hemminki et al. 2004). La differente incidenza dei TTCG in funzione del *background* genetico (etnia) e il maggior rischio di sviluppare il tumore per i parenti di pazienti affetti, suggeriscono, quindi, una forte componente genetica nella suscettibilità allo sviluppo di questa patologia. Dalla letteratura, infatti, è possibile rilevare sempre più informazioni su alterazioni genomiche che pur non essendone causa diretta, ne aumentano il rischio di sviluppo.

Poiché gli studi iniziali su geni candidati portarono a risultati fallimentari in tal senso, l'identificazione di fattori genetici di suscettibilità allo sviluppo dei TTCG è avvenuta in seguito all'avvento di nuove piattaforme tecnologiche, come per esempio lo SNP-array. Queste hanno permesso la diffusione di un nuovo approccio, definito *genome-wide*, tramite il quale è stata possibile eseguire l'analisi completa delle variazioni di sequenza dell'intero genoma in popolazioni di studio estremamente ampie (*Genome Wide Association Study*, GWAS). Dieci studi di associazione *genome-wide* sui TTCG hanno identificato 27 loci o regioni genomiche indipendenti con alleli specifici associati a questa forma di tumore (Rajpert-De Meyts et al. 2016; Pyle and Nathanson 2016). Tra questi il locus che conferisce maggior rischio di sviluppare TTCG è rappresentato da *KITLG* in associazione a *SPRY4* e *BAK1* (Kanetsky et al. 2009; Rapley et al. 2009). Studi recenti hanno, infatti, confermato come la presenza contemporanea dell'allele minore relativo a cinque polimorfismi presenti su tali geni (*KITLG*: rs995030, rs1508595, *SPRY4*: rs4624820, rs6897876, *BAK1*: rs210138) sia responsabile di un aumento del rischio di sviluppare TTCG pari a cinque volte (Nemtsova et al. 2016, 2017; Grasso et al. 2016).

Anche il cromosoma Y è stato un *target* nella ricerca dei fattori genetici associati al tumore testicolare a cellule germinali. Le regioni AZF sul braccio lungo di questo cromosoma contengono dei geni espressi esclusivamente nel testicolo e nelle cellule germinali. È noto che le alterazioni strutturali a carico di tali regioni rappresentano una delle principali cause d'infertilità maschile. Questo, in combinazione all'ipotesi di un'origine comune dell'infertilità maschile e dei TTCG (nel contesto della SDT), anche le alterazioni strutturali a carico di tale cromosoma sessuale sono state studiate al fine di individuarne un eventuale contributo al rischio di sviluppo dei TTCG.

Ad oggi, la letteratura è concorde nel ritenere le delezioni complete AZF prive di un ruolo nell'influenzare lo sviluppo dei TTCG (Frydelund-Larsen 2003; Lutke Holzik et al. 2005; Bor et al. 2006; Ferlin et al. 2007). Questo risultato è stato confermato anche nel nostro lavoro. I dati mostrano, infatti, un'assenza di tali riarrangiamenti completi nei 400 pazienti affetti da questa forma di tumore.

In merito ad un possibile effetto delle delezioni parziali sui TTCG, la letteratura fornisce informazioni solo per quelle relative alla regione AZFc e nello specifico per la delezione gr/gr.

Essa determina l'eliminazione di 1.6 Mb che comprendono metà del contenuto genico della regione AZFc (9 copie geniche trascrizionali tra cui due copie di *DAZ* e una di *CDY*) con possibili

conseguenze sul normale andamento della spermatogenesi. Tale delezione, infatti, rappresenta uno dei più importanti fattori di rischio per l'alterata spermatogenesi conferendo un aumentato rischio di ridotta qualità spermatica di 2-2.5 volte (Tüttelmann et al. 2007; Visser et al. 2009; Navarro-Costa et al. 2010b; Stouffs et al. 2011; Rozen et al. 2012; Bansal et al. 2016). L'entità del rischio è variabile tra le varie popolazioni tanto da raggiungere un valore di circa 6 nella popolazione Italiana con una frequenza della delezione gr/gr in oligozoospermici di 3.3% (Giachini et al. 2008; Krausz e Casamonti 2017). Alla luce di queste conoscenze, la delezione gr/gr rappresenta il principale riarrangiamento investigato nel nostro studio in termini di associazione con i TTTCG.

Nel nostro studio, sebbene la frequenza della delezione nella totalità dei controlli (soggetti normozoospermici e non-normozoospermici) sia relativamente più bassa (1.7%) rispetto a quella riscontrata nella totalità dei casi (2.8%), non emerge una differenza statisticamente significativa tra i due gruppi. A tale riguardo è da tenere presente che il gruppo dei controlli, è costituito anche da soggetti infertili idiopatici ai quali potrebbe essere riconducibile l'alta frequenza di tale riarrangiamento parziale. Di fatto la frequenza di delezione gr/gr nell'intera casistica di pazienti affetti da TTTCG è sovrapponibile a quella riscontrata nei controlli con alterata spermatogenesi (2.8% *versus* 2.8%). Escludendo tali soggetti dall'analisi statistica, infatti, riscontriamo una differenza statisticamente significativa della delezione gr/gr tra la totalità dei casi e i controlli normozoospermici ( $p < 0.01$ , OR 3.9, 95% CI 1.3-11.3). Confrontando i casi e controlli, entrambi normozoospermici, l'entità del rischio risulta ancora più pronunciata ( $p < 0.05$ , OR 4.5, 95% CI 1.4-14.2), mentre tra i casi non-normozoospermici *versus* controlli normozoospermici si ottiene una differenza vicina alla significatività statistica ( $p = 0.087$ ). L'ampliamento della casistica potrebbe quindi portare al raggiungimento di significatività e in tal caso la delezione gr/gr potrebbe essere considerata un fattore di rischio indipendente dal fenotipo seminale.

Questi dati sono parzialmente in linea con lo studio più ampio, presente in letteratura, che ha per primo individuato un'associazione tra delezione gr/gr e TTTCG (Nathanson et al. 2005). Questo ha riportato un rischio aumentato di sviluppare il TTTCG di quasi 2 volte per i portatori della delezione gr/gr rispetto ai soggetti privi di tale riarrangiamento. Il rischio è ulteriormente aumentato (di 3 volte) nei soggetti con familiarità per il TTTCG. Nello specifico, tale lavoro ha riscontrato una frequenza della delezione gr/gr pari al 3%, al 2% e all'1.3% rispettivamente nei pazienti affetti da TTTCG familiare, da TTTCG sporadico e nei soggetti non affetti da questa patologia (Nathanson et al. 2005). E' da sottolineare che non sono noti i parametri seminali per nessuno delle tre coorti. Pertanto, è possibile che la proporzione dei controlli normo/oligozoospermici in questo studio sia differente dal nostro lavoro, con possibile sovra-rappresentazione di normozoospermici.

Considerando il gruppo dei casi da un punto di vista istologico, si osservano frequenze sovrapponibili della delezione gr/gr tra il gruppo dei pazienti seminomatosi e quello dei non-seminomatosi (2.7% *versus* 3%). Il confronto delle frequenze di delezione gr/gr tra Seminomi e i controlli normozoospermici raggiunge la significatività statistica ( $p = 0.016$ , OR 3.9, 95% CI 1.3-12),

mentre per i casi non-seminomatosi tale confronto è prossimo al raggiungimento della significatività statistica ( $p=0.069$ ).

Questo potrebbe essere riconducibile ad una maggior numerosità dei pazienti affetti da Seminoma ( $n=291$ ) rispetto a quelli affetti da Non-seminoma ( $n=101$ ). Pertanto, anche per tale aspetto l'ampliamento della casistica potrebbe condurre in futuro a delle conclusioni differenti.

Resta ancora da chiarire il meccanismo con cui tale riarrangiamento parziale potrebbe agire sullo sviluppo dei TTCCG. È, infatti, possibile ritenere tale delezione il risultato di un'instabilità generalizzata del DNA dei soggetti affetti da questa condizione patologica tale da renderlo maggiormente pronò ad alterazioni strutturali, anche sul cromosoma Y. Tuttavia, non è da escludere che tale associazione sia riconducibile invece, ad un effetto intrinseco legato alla delezione stessa. Nello specifico, infatti, vi è la probabilità che, in seguito a delezione gr/gr, il tipo di copia/coppia deleta di *CDY1* e di *DAZ* o il ridotto numero di copie di tali geni rispetto alla sequenza di riferimento (geni dosaggio-sensibili) siano i responsabili dell'aumentata suscettibilità ai TTCCG.

Per quanto concerne la prima ipotesi, la delezione gr/gr può verificarsi in seguito all'appaiamento di più ampliconi determinando così punti di rottura differenti, con la conseguente rimozione di copie/coppie geniche diverse a seconda degli ampliconi che sono coinvolti nel meccanismo di *Non-Allelic Homologous Recombination* (NAHR). Tramite l'applicazione dell'analisi RFLP, il nostro lavoro ha valutato per la prima volta in letteratura, il tipo di copia/coppia genica di *CDY1* e di *DAZ* eliminate dalla delezione in relazione allo sviluppo del TTCCG. I nostri risultati non individuano, però, una differenza statisticamente significativa del tipo di copia/coppia genica rimossa in seguito a delezione gr/gr, tra il gruppo dei casi e quello dei controlli. Quindi, così come per l'infertilità maschile, anche per i TTCCG sembrerebbe che le diverse copie/coppie geniche non abbiano una diversa capacità di influenzare la suscettibilità a tale patologia.

Relativamente alla seconda ipotesi, la possibile associazione tra delezione gr/gr e TTCCG in funzione di una riduzione del numero di copie di specifici geni potrebbe essere riconducibile alla coesistenza di due condizioni: i geni devono essere dosaggio-sensibili ed avere un ruolo nello sviluppo delle cellule germinali. Di fatto, la delezione gr/gr coinvolge geni testicolo-specifici che per il corretto svolgimento della propria funzione biologica necessitano di un determinato numero di copie geniche. Questo attribuisce ad essi la qualifica di geni dosaggio-sensibili e pertanto, un aumentato o un ridotto numero delle copie geniche rispetto alla sequenza di riferimento, potrebbe compromettere la loro specifica funzione biologica (Repping et al. 2006). Dalla letteratura si evince che tutti i geni AZFc hanno un potenziale ruolo nella spermatogenesi, tuttavia, ad oggi, il ruolo più chiaro in tal senso è attribuibile al gene *DAZ*. Esso occupa una funzione centrale nello sviluppo delle cellule germinali primordiali, ovvero le cellule dalle quali originano i gonociti fetali e quindi gli spermatozoi. I TTCCG hanno come precursore più probabile gonociti fetali anomali che non progrediscono nella spermatogenesi. La riduzione, rispetto alla sequenza di riferimento, del numero



di copie di *DAZ* potrebbe, quindi, inficiare il normale processo maturativo delle cellule germinali innescando lo sviluppo della lesione primaria dalla quale scaturisce il TTCG. Il gene *DAZ*, quindi, potrebbe essere considerato il nesso principale tra i riarrangiamenti AZFc e TTCG.

Oltre alla delezione gr/gr, la regione AZFc è in realtà fonte di ulteriori riarrangiamenti con un ruolo meno evidente nell'infertilità maschile. Pertanto, nonostante il principale interesse del nostro studio fosse diretto all'analisi della delezione gr/gr, abbiamo comunque esteso la nostra analisi a dei parametri aggiuntivi.

Nello specifico: i) delezioni parziali non-gr/gr a carico di tale regione; ii) i riarrangiamenti multipli; iii) le duplicazioni parziali. Tutti questi riarrangiamenti portano ad una variazione del dosaggio genico AZFc.

Relativamente alle delezioni parziali a carico della regione AZFc, il nostro studio ha anche individuato la delezione parziale b2/b3 che rimuove metà del contenuto genico della regione AZFc. Nonostante che la sua frequenza sia il doppio nei casi (0.8%) rispetto ai controlli (0.3%), l'estrema rarità di questo tipo di delezione non permette di raggiungere la significatività statistica nella nostra casistica. Tuttavia, la significatività statistica è stata raggiunta prendendo in considerazione entrambe le delezioni parziali.

Nello specifico, una differenza significativa si ottiene dal confronto dell'intero gruppo dei casi con l'intera popolazione dei controlli ( $p < 0.05$ , OR 1.9, 95% CI 1-3.6) e anche dal confronto della totalità dei casi *versus* i controlli normozoospermici ( $p \leq 0.001$ , OR 4.1, 95% CI 1.7-10) e dei soggetti normozoospermici di entrambe le popolazioni di studio ( $p < 0.01$ , OR 4.3, 95% CI 1.7-12.4). Inoltre, a differenza di quanto riscontrato per la delezione gr/gr, la significatività è raggiunta anche analizzando il gruppo dei casi non-normozoospermici *versus* i controlli normozoospermici ( $p < 0.05$ , OR 3.5, 95% CI 1.2-10.5).

Questo avvalorava la precedente ipotesi proposta relativamente alle delezioni gr/gr secondo cui le delezioni parziali a carico della regione AZFc siano responsabili di un'aumentata suscettibilità allo sviluppo del TTCG indipendentemente dal fenotipo seminale.

Oltre alle delezioni, questo lavoro di tesi ha valutato anche il ruolo delle duplicazioni parziali. Il nostro studio conferma i dati riportati in letteratura secondo cui tali riarrangiamenti non giocano un ruolo nell'alterazione del processo spermatogenetico (Giachini et al. 2008; Lo Giacco et al. 2014). Queste, infatti, presentano, come atteso, frequenze sovrapponibili tra il gruppo dei controlli normozoospermici e infertili non-normozoospermici (circa 3% in entrambi i gruppi). L'analisi delle duplicazioni parziali tra l'intero gruppo dei casi TTCG e dei controlli mostra una differenza prossima alla significatività statistica ( $p = 0.056$ ). Il gruppo con la più alta frequenza è rappresentato dai casi TTCG non-normozoospermici (7.4%) mentre è stata riscontrata solo 2.7% nei controlli non-normozoospermici. Il confronto tra questi due gruppi indica che la duplicazione parziale conferisce un rischio di sviluppare TTCG aumentato di 3 volte nei soggetti con alterata spermatogenesi ( $p < 0.05$ , OR: 2.9, 95% CI 1.2-7). Anche per questo riarrangiamento il nesso con la

patologia tumorale potrebbe essere riconducibile ad un effetto dosaggio genico o ad un'instabilità generalizzata dell'intero genoma di pazienti affetti da TTTCG.

In conclusione, i nostri risultati attribuiscono alla delezione gr/gr il ruolo di fattore di suscettibilità allo sviluppo dei TTTCG. In particolar modo questa osservazione è maggiormente significativa nel confronto tra soggetti "normozoospermici".

Inoltre, dai nostri dati sono emerse anche osservazioni sul dosaggio di geni testicolo-specifici indicando che, sia un difetto che un eccesso del dosaggio di questi geni rispetto alla sequenza di riferimento, conferiscono un potenziale rischio per la formazione dei TTTCG.

## **5.II. SCOPO 2: EFFETTI DEL TRATTAMENTO CITOTOSSICO SULLA RIPRESA DELLA SPERMATOGENESI IN PAZIENTI ONCOLOGICI E SUL GENOMA/EPIGENOMA SPERMATICO DI PAZIENTI AFFETTI DA TUMORE TESTICOLARE**

Come già accennato nel capitolo precedente, il tumore testicolare rappresenta ad oggi la neoplasia più frequentemente diagnosticata negli uomini tra i 15-40 anni (Parkin et al. 2002; Rosti et al. 2016), pertanto esso rappresenta una delle neoplasie più incidenti negli uomini di età riproduttiva. I progressi in campo oncologico hanno consentito un miglioramento della prognosi, tanto che, per tale forma di tumore, il tasso di sopravvivenza a 5 anni raggiunge il 95% (Bonadonna et al. 2007). Nonostante ciò, uno dei principali effetti avversi del trattamento antiproliferativo (chemioterapia e radioterapia) è rappresentato dalla compromissione, temporanea o permanente, della spermatogenesi. Quindi, le questioni sulla salute riproduttiva con il disagio psico-sociale ad esse legato, rappresentano un importante problema che si pone nei giovani pazienti oncologici in età fertile. Si stima che più del 50% degli uomini con diagnosi di cancro esprima il desiderio di preservare la propria fertilità in futuro (Sabanegh et al. 2009).

La crioconservazione del seme rappresenta, ad oggi, l'unica strategia efficace di preservazione della fertilità. Essa è eseguibile in tempi estremamente ridotti e dovrebbe essere offerta a tutti gli uomini prima di iniziare i trattamenti potenzialmente gonadotossici. Il seme crioconservato può essere, infatti, utilizzato in diverse procedure di riproduzione assistita (ART), soprattutto la fecondazione *in vitro*, in particolare la ICSI in caso di bassa motilità e numero totale di spermatozoi. Tuttavia, la procedura di congelamento/scongelo del liquido seminale può provocare degli effetti dannosi su una varietà di parametri spermatici importanti per il processo di fecondazione, ad esempio perdita di motilità e vitalità oltre che un aumento della decondensazione cromatinica (Boitrelle et al. 2012) e della frammentazione del DNA (McDowell et al. 2013; Meamar et al. 2012; Degl'Innocenti et al. 2013). Relativamente a quest'ultimo parametro, dati in letteratura riportano, che dopo lo scongelamento del liquido seminale, il valore di SDF risulta più elevato per i pazienti affetti da tumori, quali TTTCG e neoplasie ematologiche, rispetto a coloro che crioconservano per malattie

autoimmuni e per oligozoospermia severa (Tamburrino et al. 2015). Non si evidenzia, tra le diverse forme di tumore, un differente grado di frammentazione del DNA post-scongelo (Tamburrino et al. 2015), mentre è stato riportato un minore tasso di recupero della vitalità e della motilità dopo scongelamento nei pazienti TTCCG (Degl'Innocenti et al. 2013).

È da tenere presente che, oltre alla ridotta qualità del seme che si ottiene in seguito a scongelamento, la probabilità di ottenere una gravidanza con le tecniche di fecondazione assistita può essere inficiata da ulteriori fattori. Tra questi si annovera l'importante coinvolgimento fisico e psicologico per la *partner* femminile. Essa deve essere, infatti, sottoposta a trattamento di stimolazione ovarica con farmaci induttori dell'ovulazione e al successivo prelievo degli ovociti.

Per tutta questa serie di motivi, quindi, nonostante ad oggi la crioconservazione del seme rappresenti una valida opportunità, per il paziente oncologico in età riproduttiva, di ottenere una gravidanza con tecniche di fecondazione assistita, la fecondazione naturale risulta essere di più facile applicabilità e preferita dai pazienti oncologici che hanno recuperato la spermatogenesi dopo il trattamento. A questo proposito sarebbe utile analizzare non solo il recupero quantitativo della spermatogenesi ma anche la qualità del genoma/epigenoma spermatico a seguito della conclusione del trattamento antiproliferativo. Queste tematiche, infatti, sono state l'oggetto investigato in questa seconda parte del lavoro di tesi. Nel nostro studio, quindi, si è cercato *in primis* di valutare la ripresa della spermatogenesi a distanza di 2 e 3 anni dalla fine dei trattamenti (T<sub>2</sub> e T<sub>3</sub>). Come secondo obiettivo, è stato analizzato l'effetto che le terapie citostatiche producono non soltanto sui canonici parametri seminali, ma anche sulla qualità del genoma/epigenoma degli spermatozoi.

### **Effetti della terapia sulla spermatogenesi di pazienti oncologici**

Confrontando la qualità del liquido seminale dei pazienti con tumore testicolare (TT) con quella dei soggetti affetti da neoplasie ematologiche (NE) al momento della crioconservazione, emerge come i primi presentino parametri seminali, soprattutto quantitativi, significativamente più bassi rispetto agli NE. Nel nostro studio, infatti, solo il 55% dei pazienti con tumore testicolare (TT) è normozoospermico al momento della diagnosi (contro il 67% nel gruppo NE); inoltre, nei pazienti con TT risulta nettamente più incidente l'oligo/azoospermia pre-trattamento. Questo andamento è stato osservato anche in altri studi, come in quelli di Bahadur (2005), Gandini (2006) Caponecchia (2016) e Di Bisceglie (2013), con i rispettivi collaboratori. Varie sono state le spiegazioni proposte per questi dati. Tra questi, vi è l'evidenza secondo cui la presenza stessa della neoplasia può influire negativamente sulla spermatogenesi mediante meccanismi differenti. La massa neoplastica può, infatti, danneggiare la spermatogenesi distruggendo il tessuto circostante, alterando la barriera emato-testicolare ed innescando una risposta immunitaria. Quest'ultima determinerebbe la produzione di autoanticorpi che limitano la motilità degli spermatozoi o il rilascio di citochine che danneggiano le cellule germinali e di Leydig (Barr et al. 1993; Costabile et al. 1998). Dalla letteratura si evince inoltre che i tumori non-seminomatosi sono caratterizzati dalla secrezione di  $\beta$ -hCG riducendo la sintesi di FSH e LH alterando il processo di spermatogenesi. Occorre inoltre tener

presente che al momento della visita la maggior parte dei pazienti aveva già subito l'intervento chirurgico di orchietomia, fonte rilevante di stress (Sabanegh et al. 2009). I suddetti dati possono essere inoltre inquadrati alla luce della Sindrome della Disgenesia Testicolare (SDT) che comprende quattro diverse condizioni patologiche (tumore testicolare, alterazione della spermatogenesi, ipospadia e criptorchidismo) che possono manifestarsi separatamente l'una dall'altra o coesistere nello stesso paziente (Skakkebaek et al. 2001). Sviluppare una di queste condizioni patologiche conferirebbe un aumentato rischio d'insorgenza di tutte le altre.

Con l'obiettivo di una più completa caratterizzazione andrologica, i pazienti dello studio sono stati valutati anche in termini di dosaggi dei principali ormoni sessuali: negli individui con tumore testicolare sono stati riscontrati valori più elevati di FSH. Questa sembra essere un'ulteriore conferma di una spermatogenesi più difficoltosa nei pazienti con TT, per la quale si rende necessaria una maggiore stimolazione ipofisaria.

Successivamente abbiamo valutato l'effetto delle terapie oncologiche sui parametri quantitativi e qualitativi (morfologia) a distanza di due e tre anni dalla fine del trattamento (T<sub>2</sub> e T<sub>3</sub>).

A livello quantitativo risulta clinicamente interessante la valutazione dei pazienti che non mostrano alcuna ripresa della spermatogenesi. L'incidenza di azoospermia in entrambe le categorie di neoplasie non supera il 20% a 3 anni. Contrariamente all'atteso, i pazienti TTTCG presentano la minore incidenza di azoospermia post-terapia nonostante la peggior qualità del liquido seminale al T<sub>0</sub>. È stata, infatti, rilevata una frequenza dell'8% e del 3% di pazienti azoospermici, rispettivamente dopo 2 e 3 anni dal trattamento. Questa bassa incidenza di azoospermia nei pazienti con TTTCG è stata rilevata anche in altri studi, come quello svolto nel 2005 da Bahadur e collaboratori. Sebbene molti dei pazienti con TT che sono risultati azoospermici a T<sub>2</sub>/T<sub>3</sub> hanno eseguito un elevato numero di cicli chemioterapici PEB (3-4), analoghi trattamenti erano stati effettuati anche in pazienti risultati non-azoospermici al *follow-up* (alcuni dei quali mostravano peraltro una spermatogenesi perfino più compromessa in fase pre-trattamento). Questo dato evidenzia l'assenza di correlazione fra il regime di chemioterapia effettuato dai pazienti con TT e la qualità del liquido seminale post-trattamento. Di contro, abbiamo rilevato come nessuno dei 22 pazienti trattati esclusivamente con radioterapia a dosaggio inferiore a 36 Gy sia divenuto azoospermico al T<sub>2</sub>, mentre 2/5 pazienti sono risultati tali allo stesso tempo di osservazione dopo aver subito dosi maggiori di 36 Gy.

A differenza di quanto accade per i pazienti con tumore testicolare, coloro che sono affetti da NE mostrano una maggiore difficoltà nel riprendere la spermatogenesi. Sebbene al T<sub>0</sub> la percentuale di azoospermia in questo gruppo sia inferiore a quella dei pazienti con TTTCG (5% vs 7%), sia a T<sub>2</sub> che a T<sub>3</sub> si assiste ad un notevole incremento della sua incidenza (che raggiunge valori attorno al 20% per entrambi i tempi di osservazione). Questi dati confermano quanto osservato da Bahadur (2005) e da Bujan (2014) con i propri gruppi di lavoro. Probabile spiegazione di questo fenomeno è legata alla maggior gonadotossicità del trattamento subito da questi pazienti. È interessante notare come la

stragrande maggioranza degli azoospermici divenuti tali dopo il trattamento siano andati incontro a regimi chemioterapici ad alte dosi (HDS-CT o BEAM) associati a trapianto autologo di midollo osseo (ABMT); ancora più rilevante che nessun paziente è risultato normo/oligozoospermico a T<sub>2</sub> e T<sub>3</sub> aveva subito tale trattamento. Inoltre, nessun paziente della nostra casistica trattato con esclusivo regime chemioterapico ABVD sia diventato azoospermico dopo la terapia: perfino 10 o 12 cicli ABVD non hanno condotto ad azoospermia permanente al *follow-up*. L'assenza di spermatozoi riscontrata al T<sub>2</sub> nel paziente trattato con 8 cicli ABVD è pertanto probabilmente attribuibile alla lunga monoterapia di mantenimento con Metotrexato (due anni). Questi dati sono in accordo con quanto rilevato in altri studi come quello di O'Flaherty e collaboratori (2010), secondo i quali ABVD induce una azoospermia transitoria.

Relativamente alla proporzione di soggetti normozoospermici, è stata invece rilevata al *follow-up* una situazione opposta a quella per l'azoospermia. Come descritto precedentemente, pur mostrando una spermatogenesi maggiormente compromessa in fase pre-trattamento (55% normozoospermici fra i TT vs 67% fra le NE), i pazienti con tumore testicolare presentano un netto incremento della qualità del liquido seminale post-terapia. La concentrazione di spermatozoi nell'eiaculato aumenta, infatti, in questo gruppo di pazienti in maniera significativa da T<sub>0</sub> a T<sub>2</sub>-T<sub>3</sub> e la percentuale di normozoospermici raggiunge valori attorno al 68-69% ad entrambi i tempi di *follow-up*.

È curioso, ma spiegabile, come una parte di coloro che presentavano una spermatogenesi compromessa al T<sub>0</sub> siano divenuti normozoospermici dopo la terapia (attorno al 45% dei soggetti non-normozoospermici pre-trattamento). L'apparente compromissione della spermatogenesi pre-terapia, in questi pazienti potrebbe essere attribuito in parte sia ai trattamenti antibiotici effettuati prima della crioconservazione in concomitanza con l'intervento di orchifunicolectomia (80-90% casi), che ai sopracitati effetti legati alla presenza della malattia. Questo aumento della proporzione di soggetti con TTTCG diventati normozoospermici dopo la terapia, indica un andamento transitorio dell'oligozoospermia. Tuttavia, circa il 55% dei pazienti non-normozoospermici a T<sub>0</sub> permangono tali anche a distanza di 2-3 anni dalla fine dei trattamenti: questa rappresenta verosimilmente la reale quota di pazienti inquadrabili clinicamente nel contesto della sindrome della disgenesia testicolare.

Al tempo T<sub>2</sub> e al T<sub>3</sub> più dell'80% dei pazienti normozoospermici in fase pre-trattamento sono rimasti tali anche dopo la terapia citostatica. Pertanto, anche nel nostro studio, analogamente a quanto osservato in letteratura (Bujan et al. 2013; Lampe et al. 1997), essere normozoospermici a T<sub>0</sub> si è rivelato (nei soggetti affetti da TT) predittivo di rimanere tali anche dopo la terapia antiproliferativa.

Per quanto concerne invece i pazienti affetti da NE, come già accennato essi presentano maggiori difficoltà nel recupero della spermatogenesi post-trattamento: i valori di concentrazione di spermatozoi nell'eiaculato si riducono significativamente al T<sub>2</sub> rispetto ai valori pre-trattamento e la percentuale di normozoospermici cala dal 67% al 52%. Al terzo anno di *follow-up* si assiste invece ad un lieve miglioramento dei suddetti parametri (58% normozoospermici): questo andamento è indice

di una ripresa della spermatogenesi, seppur più tardiva. Vi è un sostanziale accordo in letteratura fra i vari autori nel ritenere che la spermatogenesi dei pazienti con linfomi e leucemie venga maggiormente compromessa dai trattamenti chemio-radioterapici (rispetto a quanto non accada per i tumori testicolari). In particolare, questo sembra verificarsi principalmente a causa dei regimi chemioterapici contenenti agenti alchilanti (CHOP e MOPP), in grado di danneggiare le cellule spermatogoniali in maniera dose-dipendente (Trottmann et al. 2007; O'Flaherty et al. 2010).

Relativamente al parametro qualitativo rappresentato dalla morfologia degli spermatozoi, è comune in entrambe le categorie di tumori e a tutti i tempi di osservazione il riscontro di un peggioramento significativo nel numero di forme normali rispetto ai valori pre-trattamento. Nonostante i valori permangano in media in un *range* di normalità (ovvero > 4% del totale di spermatozoi), ad entrambi i tempi di osservazione più del 30% dei soggetti mostrava valori al di sotto della norma: circa il 25% di essi possedeva, addirittura, lo 0% di forme normali di spermatozoi sia a T<sub>2</sub> che a T<sub>3</sub>. Tale peggioramento non risulta dipendente dal tipo di terapia eseguita. Sebbene pochi siano gli studi in merito in letteratura, e i risultati degli stessi siano talvolta contrastanti (Gatimel et al. 2017), alcuni autori associano un'alterata morfologia degli spermatozoi ad una ridotta integrità del DNA spermatico, un ridotto tasso di fertilizzazione ed un maggior rischio di aborti ricorrenti (Abu Hassan Abu et al. 2012). In particolare, tale associazione sarebbe più consistente in caso di assenza totale di spermatozoi con morfologia normale nell'eiaculato (Cao et al. 2017).

### **Effetti della terapia sull'integrità del genoma spermatico di pazienti affetti da TTTCG**

Dai dati esposti nel precedente sottoparagrafo, è possibile rilevare come il problema della mancata ripresa della spermatogenesi post-terapia citostatica assuma proporzioni marginali. Più del 90% e più dell'80% dei pazienti, rispettivamente affetti da TT e NE, presenta, infatti, spermatozoi nell'eiaculato (normo/oligozoospermia) già dopo due anni dalla fine del trattamento. In questi pazienti, pertanto, assume maggior rilevanza l'importanza della valutazione della qualità genomica dei gameti maschili. I pazienti oncologici in età fertile temono, infatti, possibili ripercussioni della terapia a livello della progenie, come ad esempio malattie genetiche, anomalie cromosomiche o malformazioni congenite.

Molti chemioterapici posseggono come bersaglio principale il DNA cellulare ed anche la radioterapia vi può arrecare danno. Di fatto, un'analisi epidemiologica risalente al 2011 (Ståhl et al. 2011) ha riscontrato un aumento, seppur lieve, del rischio di malformazioni congenite in bambini concepiti da padri con precedente storia di cancro. Tuttavia, ad oggi, la letteratura fornisce pochi studi in tal senso, oltretutto inconcludenti e con un *follow-up* limitato (2 anni) (Bujan et al. 2013; O'Flaherty et al. 2010; Bujan et al. 2014). Pertanto, rimane ancora la necessità di stabilire quali siano i danni a lungo termine indotti dai trattamenti citotossici al DNA degli spermatozoi che potrebbero inficiare lo stato di salute del futuro figlio. Il monitoraggio di tali danni nel tempo fornirebbe al paziente informazioni maggiori sul "*timing*" più appropriato di un eventuale ricerca di gravidanza spontanea.

L'unico test validato e di relativamente facile esecuzione utilizzabile come *biomarker* di un eventuale insulto genomico degli spermatozoi è l'analisi della frammentazione del DNA spermatico (*Sperm DNA fragmentation*, SDF) mediante saggio Tunel.

Il nostro studio ha voluto valutare l'effetto della terapia citostatica sul livello di frammentazione del DNA spermatico di pazienti affetti da tumore testicolare fino a 3 anni di *follow-up*. A tale scopo abbiamo utilizzato due disegni di studio: uno *cross-sectional* ed uno longitudinale.

Il primo analizzava e confrontava il livello di frammentazione del DNA spermatico nei pazienti oncologici rispetto ad una popolazione di controllo (composta da 58 individui sani e fertili), ai vari tempi di osservazione (T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub> e T<sub>3</sub>). Questo comporta quindi che la casistica per ogni *time point* non sempre include i medesimi pazienti.

Nello studio longitudinale invece i livelli di frammentazione di ogni paziente ricavati al T<sub>0</sub>, sono stati confrontati con quelli ai vari tempi di *follow-up* del medesimo paziente. È opportuno precisare che la metodica scelta per l'analisi della frammentazione (*Tunel-assay*) presenta una limitazione legata al numero minimo di spermatozoi che devono essere utilizzati (10 milioni di spermatozoi) per poter eseguire l'analisi. Questo implica che non è stato possibile avere a disposizione dati su pazienti con oligozoospermia grave.

Studio *cross-sectional*: i pazienti oncologici per i quali erano disponibili i valori di SDF ai vari tempi, sono stati ripartiti in diverse categorie in base al trattamento subito: carboplatino, PEB  $\leq 2$  cicli, PEB  $\geq 3$  cicli, radioterapia in combinazione o meno con chemioterapia. A tutti i tempi di osservazione e in tutte le categorie di trattamento, il livello medio di frammentazione del DNA (sia totale che *brighter*) è apparso aumentato rispetto a quello della popolazione di controllo. Tale aumento è risultato statisticamente significativo per il gruppo dei pazienti trattati con carboplatino al T<sub>1</sub>, per il gruppo trattato con PEB  $\geq 3$  cicli e radioterapia al T<sub>2</sub> e per quello trattato con radioterapia in combinazione con chemioterapia non solo al T<sub>2</sub> ma anche al T<sub>3</sub>. L'andamento osservato nel nostro studio è in accordo con quanto riscontrato da O'Flaherty e collaboratori (2010). Quest'ultimi evidenziano come nei pazienti oncologici con TT sia presente un tasso di frammentazione del DNA significativamente più elevato, rispetto al gruppo di controllo, dopo 18-24 mesi dalla fine della terapia. Tuttavia, in letteratura sono stati riportati anche dei dati che mostrano una normalizzazione della frammentazione entro 2 anni dal termine del trattamento (Trottmann et al. 2007). I risultati contraddittori sono probabilmente dovuti sia a diverse metodiche analitiche per la valutazione della frammentazione del DNA che a differenze nel disegno di studio, nei trattamenti terapeutici e nei protocolli di *follow-up*.

È interessante, da un punto di vista clinico, valutare quanto fosse frequente in questi soggetti un livello patologicamente alto di frammentazione del DNA spermatico. A tal fine, nel nostro studio abbiamo utilizzato un valore soglia arbitrario, superiore al 75° percentile della "normalità" calcolato sulla distribuzione dei valori di SDF<sup>*brighter*</sup> nella popolazione di controllo (SDF<sup>*brighter*</sup> > 25%). Tale valore è, infatti, da ritenersi presumibilmente indice di un danno severo al DNA. L'analisi è stata

condotta nella sottopopolazione citofluorimetrica *brighter* poiché, a differenza della popolazione *dimmer*, essa risulta composta da spermatozoi con DNA frammentato sia vivi che morti (Muratori et al. 2008; Marchiani et al. 2011). Di conseguenza, uno spermatozoo frammentato, appartenente alla popolazione *brighter*, può conservare buone caratteristiche di motilità e morfologia, e la probabilità di partecipare al processo di fecondazione, o di essere scelti dall'operatore che esegue la ICSI, risulta molto elevata per questo sottotipo di popolazione spermatica.

A tutti i tempi di osservazione (T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub> e T<sub>3</sub>), indipendentemente dalla terapia effettuata, più del 30% dei pazienti ha un valore di SDF<sup>*brighter*</sup> ≥ 75° percentile (39% al T<sub>1</sub>, 39% al T<sub>2</sub> e 36% al T<sub>3</sub>). In particolare, al terzo anno post-terapia il 55% degli individui sottoposti a più di 3 cicli PEB e il 100% di quelli trattati con la combinazione radioterapia+chemioterapia mostravano un valore di SDF<sup>*brighter*</sup> superiore alla soglia arbitraria. Pertanto, danni rilevanti a carico del DNA che permangono anche dopo tre anni dalla fine della terapia, sembrano essere provocati da dosi maggiori di farmaci chemioterapici.

Studio longitudinale: purtroppo, date le difficoltà nell'ottenere per ogni pazienti i valori di SDF al T<sub>0</sub> e ai vari tempi di *follow-up*, per tale studio avevamo a disposizione solo 12 pazienti, per 10 dei quali avevamo a disposizione tutti i valori di SDF fino al T<sub>2</sub>, per 2 pazienti fino al T<sub>3</sub>. L'analisi osservazionale eseguita su tali pazienti ci mostra un aumento dei valori di SDF-totale e *brighter* al T<sub>1</sub> per poi ridursi al T<sub>2</sub> e al T<sub>3</sub>. L'unico trattamento che sembrerebbe essere responsabile di un andamento univoco dei valori di SDF è rappresentato dal PEB indipendentemente dal numero di cicli. Un andamento così netto di tale trattamento, può essere riconducibile alla sua maggiore gonatotossicità rispetto al Carboplatino. L'analisi dei pazienti mostra come al T<sub>2</sub> il 25% dei pazienti trattati con PEB e al T<sub>3</sub> l'unico paziente trattato con radioterapia, mostrano valori di SDF<sup>*brighter*</sup> ≥ 75° percentile.

Dai nostri due studi emerge che un grave danno alla doppia elica del DNA può permanere dopo due e tre anni dalla fine del trattamento in una percentuale relativamente alta di pazienti trattati con chemio/radioterapia. Da questi risultati ne deriva il potenziale utilità clinica dello studio dell'SDF nei pazienti oncologici, in quanto questo test potrebbe essere introdotto nella pratica clinica come indicatore di danno genomico spermatico. Sulla base dell'esito dell'esame, il tempo di attesa per una gravidanza naturale potrebbe essere personalizzato.

### **Effetti della terapia sull'instabilità del genoma spermatico di pazienti affetti da TTCG**

L'entità del danno che può essere indotto dai trattamenti citotossici sulla qualità genomica degli spermatozoi non si limita ad una possibile alterazione dell'integrità della doppia elica. Per tale motivo il nostro studio, per la prima volta in letteratura, non ha determinato solo il livello di frammentazione del DNA spermatico, ma ha ampliato la valutazione della qualità genomica degli spermatozoi anche all'analisi: i) dell'instabilità dei microsatteliti (MSI); ii) del profilo di metilazione.

Ad oggi, la maggior parte dei dati sull'instabilità dei microsatteliti presenti in letteratura sono in relazione alla cancerogenesi, e per il momento nessun lavoro ha valutato gli MSI come *marker* di



instabilità genomica post-terapia del tumore del testicolo sull'uomo. Nel nostro studio è stata messa a confronto la lunghezza dei sette microsatelliti analizzati prima dell'inizio della terapia, misurata nel DNA estratto dai leucociti, con quella misurata nel DNA estratto da spermatozoi ai diversi tempi di *follow-up*. Eventuali differenze tra DNA genomico e quello derivato dagli spermatozoi nella lunghezza di tali microsatelliti possono essere considerate marcatori di instabilità genomica (Maduro et al. 2003). Nessun individuo della nostra casistica ha presentato instabilità nei microsatelliti ai tre tempi di *follow up*, indicando che, su questi loci, difficilmente si verificano grandi cambiamenti genici. È da notare che la sensibilità della metodica utilizzata (GeneScan) è relativamente bassa e non permette il rilevamento di mosaicismi inferiori al 50%. Questa limitazione metodologica non permette quindi una conclusione definitiva sul mancato effetto della chemio/radioterapia sulla stabilità genomica.

### **Effetti della terapia sull'epigenoma spermatico di pazienti affetti da TCG**

È oggi noto che alterazioni del profilo di metilazione del DNA sono capaci di influenzare la suscettibilità della progenie allo sviluppo di malattie, come ad esempio quelle neuro-psichiatriche o i tumori pediatrici (Hare et Moran 1979; Brunner et al. 1997; Goldberg et al. 1993; Zheng et al. 2015; Frans et al. 2008; Miller et al. 2013; Oksuzyan et al. 2012). Cambiamenti nel metiloma possono avvenire in seguito all'interazione dell'individuo con diversi fattori estrinseci come lo stile di vita, l'*aging* e/o fattori ambientali tra i quali si annoverano i trattamenti farmacologici come quelli antitumorali. In questa tesi abbiamo valutato eventuali cambiamenti unidirezionali (tendenza alla perdita o al guadagno di siti metilati) del profilo di metilazione del DNA spermatico, in seguito al trattamento citotossico, che potrebbero essere trasmessi alla progenie compromettendone lo stato di salute. L'analisi del pattern di metilazione è stata condotta mediante l'*array Infinium Illumina 450K* tramite il quale sono stati effettivamente analizzati 349.488 posizioni genomiche contenenti siti CpGs, rappresentando l'1,2% delle CpGs totali contenute nel genoma umano (pari a circa 28,3 milioni) (Babenko et al. 2017). L'*array* è stato applicato al DNA estratto da campioni di liquido seminale appartenenti a pazienti con tumore al testicolo o con linfoma di Hodgkin e raccolti sia prima ( $T_0$ ) che dopo 6 mesi ( $T_{1/2}$ ) e/o 1 anno ( $T_1$ ) dalla fine del trattamento con chemioterapico da solo o in combinazione con radioterapia (campioni appaiati). Al fine di individuare trattamenti più o meno predisponenti ad epimutazioni, i pazienti sono stati suddivisi in tre gruppi in base al tipo di terapia somministrata: Carboplatino, PEB e ABVD in combinazione con radioterapia (ABVD+RAD).

L'indagine epigenetica è stata condotta sulla totalità delle CpGs analizzate (349.488) e su un sottogruppo di *loci* (100) prossimi all'essere differenzialmente metilati. In seguito all'analisi della metilazione globale tramite il calcolo delle medie dei *beta values* (utilizzato come indice del grado di metilazione) rilevati prima e dopo il trattamento, non sono state trovate differenze statisticamente significative, considerando i pazienti con lo stesso tipo di protocollo terapeutico nel loro insieme e singolarmente.

Per ciascun tipo di terapia, la significatività statistica è stata ottenuta solo per alcuni loci ritenuti quindi “differenzialmente metilati” tra prima e dopo il trattamento eseguito. In particolare, nei pazienti affetti da tumore testicolare, trattati con PEB o con Carboplatino, sono stati identificati rispettivamente 4 e 5 *loci*, nei pazienti affetti da tumori ematologici e trattati con ABVD+RAD, ne sono stati trovati 3.

I suddetti siti, risultati differenzialmente metilati in seguito al trattamento con Carboplatino o con PEB, non mostrano cambiamenti radicali del loro stato di metilazione tali da poterne alterare l'espressione genica. Infatti, essi appaiono meno ipometilati e meno ipermetilati mantenendo comunque lo stato di ipometilazione e di ipermetilazione osservati al T<sub>0</sub>. La maggior parte di questi siti si trova all'interno di specifici geni la cui espressione non dovrebbe subire importanti alterazioni in seguito a trattamento, a causa della lieve variazione del grado di metilazione (inferiore al 10%) di tali *loci*. Nessuno di questi *loci* appartiene a geni coinvolti in malattie da imprinting. È tuttavia da notare che tra questi due sembrano essere coinvolti nella spermatogenesi. Il gene *c16orf55* (SPATA 33, *spermatogenesis associated 33*) risulta essere molto espresso a livello testicolare sia subito dopo la nascita che durante la vita adulta, allo stadio di spermatogonio, di spermatozoi e di spermatozoi rotondi (Chen et al. 2013). Il gene *c1orf14* (SHCBP1L), molto conservato nei mammiferi e con alta espressione a livello testicolare, codifica per una proteina caratterizzata da un dominio di omologia per Src capace di interagire con una *Heat Shock protein* da 70 kDa (HSPA2). Questo gene mappa sul cromosoma 1, in una regione che comprende un *locus* di suscettibilità per lo sviluppo del cancro alla prostata. Il legame tra la proteina codificata dal gene *c1orf14* ed HSPA2, contribuisce al mantenimento dell'integrità del fuso meiotico. Uno studio su topi *knock out* per questo gene ha mostrato un numero ridotto di spermatozoi nella fase *early* della meiosi a causa della loro morte per apoptosi (Liu et al, 2014). Il nostro dato sullo stato ipometilato di tali *loci* (stato permissivo per la trascrizione) al T<sub>0</sub>, conferma il coinvolgimento di entrambi i geni nella spermatogenesi.

Relativamente al trattamento a base di ABVD+RAD, si osserva come per due dei tre siti “differenzialmente metilati” in modo significativo, vi sia un cambiamento dello stato di metilazione tra prima a dopo il trattamento citotossico (tutti e tre i siti mostrano variazioni dei livelli di metilazione superiori alla soglia di risoluzione del *chip* fissata al 10%). Nello specifico, un *locus* passa dall'essere mediamente metilato all'essere ipometilato (cg04955116), l'altro da ipometilato diventa ipermetilato (cg25855592). Entrambi questi siti CpGs cadono all'interno di CpGs *shores*, le quali rappresentano quelle regioni distanti da 0 a 2kb da una CpG *island*. Dalla letteratura è noto che la metilazione delle *shores*, analogamente a quella delle CpGs *island*, è strettamente associata alla repressione del gene a valle. Pertanto, la variazione del grado di metilazione di queste specifiche regioni del DNA è associata alla regolazione dell'espressione genica tessuto-specifica (Martinez-Quetglas et al. 2016).

Allo scopo di aumentare il numero di campioni da analizzare e perciò il potere statistico (*statistical power*), sono stati presi in considerazione tutti i campioni al T<sub>0</sub> e confrontati con il T<sub>1/2</sub> di un solo

paziente per ciascun tipo di terapia. Quest'analisi ha rilevato la presenza di 4 siti la cui differenza di metilazione tra prima e dopo il trattamento è statisticamente significativa. Alcuni di tali siti cadono all'interno di geni non implicati, però, nella spermatogenesi. Poiché la differenza del grado di metilazione supera di poco il valore soglia di risoluzione del *chip* (10%), non si assiste ad un cambiamento dello stato di metilazione dei *loci* tale da poter influenzarne l'espressione genica.

In letteratura non ci sono studi relativi all'effetto dei trattamenti antitumorali analizzati in questa tesi sul metiloma spermatico umano. Esiste però uno studio condotto sul topo che valuta le alterazioni epigenetiche sul DNA spermatico in seguito al trattamento con PEB. È stato riscontrato che alcuni siti CpGs, tra i circa 3.000 analizzati, hanno una maggiore tendenza all'ipermetilazione in tutti i topi trattati rispetto ai controlli (Chan et al. 2012). Nel nostro studio non è stato rilevato un effetto globale unidirezionale (verso l'ipometilazione o verso l'ipermetilazione) in nessuno dei tre gruppi di pazienti sottoposti alle diverse tipologie di trattamento. Inoltre, il basso numero di siti con differenze di metilazione statisticamente significative, rilevati in questo lavoro, suggerisce un effetto random e bidirezionale della terapia antitumorale sulle cellule staminali spermatogenetiche, facendo escludere la presenza di specifiche sequenze di DNA bersaglio sulle quali agisce il trattamento.

Di fatto, è probabile che il ripopolamento dei tubuli seminiferi origini da più cellule staminali, pertanto il liquido seminale conterrebbe spermatozoi provenienti da precursori con differenti livelli di metilazione post-terapia. Pertanto, non è da escludere che la terapia possa influire sulla metilazione, anche in maniera rilevante, a livello delle singole cellule che non sarebbe però rilevabile con l'analisi dell'intera popolazione spermatica. Un approccio valido potrebbe essere la valutazione del "carico epimutazionale" inteso come il numero di *loci* con variazioni di metilazione post-terapia citostatica. Poiché, non ci sono dati sulle variazioni della metilazione del DNA spermatico in funzione del tempo nello stesso individuo, per realizzare quest'analisi si necessita di un gruppo di controllo costituito da individui non-trattati con prelievo seminale agli stessi intervalli di tempo dei pazienti oncologici.



## 6. CONCLUSIONI

### 6.I. SCOPO 1: RIARRANGIAMENTI AZFc COME FATTORI DI RISCHIO DEI TTCG

Questa parte della tesi descrive uno studio che, per la prima volta in letteratura, ha fornito informazioni dettagliate riguardo i riarrangiamenti AZFc in relazione al loro ruolo nella suscettibilità allo sviluppo dei tumori testicolari a cellule germinali.

Infatti, oltre a valutare la delezione gr/gr, già studiata in relazione a questa malattia, abbiamo esteso la nostra analisi a dei parametri aggiuntivi: i) delezioni parziali non-gr/gr a carico di tale regione con la definizione del tipo di copie geniche rimosse; ii) i riarrangiamenti multipli; iii) le duplicazioni parziali. I suddetti riarrangiamenti portano ad una variazione del dosaggio a carico di geni AZFc, espressi esclusivamente nel testicolo.

Nel nostro studio l'associazione tra TTCG e delezione gr/gr non è presente quando il confronto viene eseguito con la totalità dei controlli. Questo è da attribuire alla presenza di pazienti con alterata spermatogenesi nel gruppo di controllo (48%), che a loro volta rappresentano un gruppo a rischio di essere portatori di tale riarrangiamento. Infatti le frequenze nei casi è sovrapponibile a quella riscontrata nei controlli con alterata spermatogenesi (2.8% *versus* 2.8%). Escludendo i controlli infertili dall'analisi statistica, infatti, riscontriamo una differenza statisticamente significativa della delezione gr/gr tra la totalità dei casi e i controlli normozoospermici ( $p < 0.01$ , OR 3.9, 95% CI 1.3-11.3). Confrontando i casi e i controlli, entrambi normozoospermici, l'entità del rischio risulta ancora più pronunciata ( $p < 0.05$ , OR 4.5, 95% CI 1.4-14.2). Questo dato, indica che la delezione gr/gr si può considerare un fattore di rischio per TTCG indipendentemente dal suo ruolo di fattore di suscettibilità per alterata spermatogenesi. Pertanto, sebbene la delezione gr/gr risulti un fattore di rischio per entrambe le patologie facenti parti della SDT, l'alterata spermatogenesi non è una condizione *sine qua non* per l'associazione tra delezione gr/gr e TTCG. Di conseguenza, anche i portatori della delezione gr/gr con normoozoospermia rappresentano una categoria a rischio per TTCG e necessitano di eventuale *follow-up* nel tempo.

Il nostro studio, per la prima volta in letteratura, ha valutato anche il tipo di copia/coppia genica eliminata a seguito delle delezioni parziali, il ruolo dei riarrangiamenti multipli e delle duplicazioni parziali AZFc. I risultati indicano che, le diverse copie/copie geniche non hanno una capacità diversa di influenzare la suscettibilità ai TTCG. Invece, la rarità degli eventi di riarrangiamenti multipli preclude una conclusione definitiva sul loro ruolo nel TTCG. Relativamente, all'analisi delle duplicazioni, contrariamente a quello osservato per la delezione gr/gr, si rileva una differenza della frequenza, tra casi e controlli, prossima alla significatività. Tale discrepanza è verosimilmente da attribuire al fatto che le duplicazioni parziali non rappresentano un fattore di rischio per alterata spermatogenesi, pertanto il gruppo di controllo non è "arricchito" di soggetti portatori di tale riarrangiamento. Di fatto, il rischio di TTCG è aumentato di circa 3 volte quando si comparano i casi TTCG non-normozoospermici *versus* i controlli non-normozoospermici.

Entrambi i riarrangiamenti portano ad un alterato dosaggio di geni testicolo-specifici coinvolti nello sviluppo delle cellule germinali. In particolare il gene *DAZ* occupa un ruolo centrale nello sviluppo delle cellule germinali dalle quali originano i gonociti fetali. Poiché i TTCG hanno come precursore più probabile gonociti fetali anomali, è probabile che un'alterazione del numero (sia in difetto che in eccesso) di copie di tale gene vada ad inficiare il normale processo maturativo delle cellule germinali. Il gene *DAZ*, quindi, potrebbe essere considerato il nesso principale tra i riarrangiamenti AZFc e TTCG. Tuttavia, oltre all'ipotesi di un effetto dosaggio genico AZFc, la predisposizione ai TTCG nei soggetti portatori di riarrangiamenti, potrebbe riflettere una condizione di instabilità genomica generalizzata in essi.

In conclusione, il nostro studio conferma per la delezione gr/gr il ruolo come fattore di rischio per TTCG, mentre per quanto concerne le duplicazioni parziali sarà necessario un ampliamento della casistica per poter meglio definire il loro ruolo nello sviluppo dei TTCG.

## **6.II. SCOPO 2: EFFETTI DEL TRATTAMENTO CITOTOSSICO SULLA RIPRESA DELLA SPERMATOGENESI IN PAZIENTI ONCOLOGICI E SUL GENOMA/EPIGENOMA SPERMATICO DI PAZIENTI AFFETTI DA TUMORE TESTICOLARE**

La seconda parte della tesi è volta a valutare, *in primis*, il recupero dell'attività spermatogenetica durante i tre anni successivi al trattamento citotossico in pazienti affetti da tumore testicolare a cellule germinale (TTCG) e neoplasie ematologiche (NE).

I nostri dati rilevano che circa l'80% dei pazienti affetti da TTCG o da NE presentano spermatozoi nell'eiaculato (normo/oligozoospermia) già dopo due anni dalla fine del trattamento. Tuttavia, tale ripresa della spermatogenesi risulta maggiormente difficoltosa nei pazienti ematologici rispetto a quelli con tumore testicolare. I pazienti con NE mostrano un'incidenza di azoospermia

relativamente alta anche dopo 3 anni dalle terapie (rispettivamente, 23% e 3%). Il diverso andamento di ripresa della spermatogenesi tra i due gruppi di neoplasie è da attribuire alla maggiore gonadotossicità delle terapie effettuate dai pazienti con NE. Quindi, in generale, il problema relativo alla sterilità permanente assume proporzioni marginali. Rimane, tuttavia, da stabilire se permangono degli effetti negativi a lungo termine indotti dai trattamenti citotossici sul DNA degli spermatozoi che potrebbero inficiare lo stato di salute del futuro figlio.

Di fatto, le terapie citostatiche, avendo in molti casi come bersaglio principale il DNA, possono comportare danni/alterazioni al patrimonio genetico dei gameti maschili, con possibili ripercussioni sull'*outcome* riproduttivo e sulla progenie. Il monitoraggio di tali danni permetterebbe di rispondere ad alcune questioni fondamentali da affrontare con i pazienti oncologici in età fertile: i) l'impossibilità di ottenere o mantenere una gravidanza, ii) la paura di trasmettere danni genomici alla progenie. Ad oggi, però, la letteratura fornisce pochi studi relativi agli effetti dei trattamenti citotossici sul genoma spermatico. Tali lavori sono oltretutto inconcludenti e con un *follow-up* limitato (2 anni). Per tale motivi, il nostro studio si è posto come ulteriore obiettivo quello di valutare, nei pazienti affetti da TTCG, alcuni aspetti relativi alla qualità del genoma spermatico post-terapia oncologica, con un *follow-up* fino a 3 anni. Nello specifico, abbiamo analizzato: i) il livello di frammentazione del DNA, ii) instabilità dei microsatelliti (MSI). Ulteriore aspetto innovativo di tale tesi, poiché mai riportato in letteratura in relazione ai trattamenti citotossici, consiste nello studio dell'epigenoma in termini di cambiamenti del profilo di metilazione del DNA spermatico come effetto della terapia oncologica in pazienti affetti da TTCG e da NE. Tale valutazione è stata eseguita ad un anno dal termine della terapia.

Relativamente all'analisi della frammentazione del DNA spermatico (*Sperm DNA Fragmentation*, SDF) questo parametro è stato utilizzato da noi come biomarcatore di un eventuale insulto genomico degli spermatozoi. Dal nostro studio *cross-sectional*, il valore medio di frammentazione del DNA spermatico è risultato significativamente più alto, anche al tempo T3, nei pazienti sottoposti a terapie più drastiche, come radioterapia in combinazione con chemioterapia, rispetto al gruppo di controllo. Riguardo la frazione cellulare "*brighter*" (SDF<sup>*brighter*</sup>), a tutti i tempi di osservazione è stato rilevato che più del 30% dei pazienti con TTCG presentavano valori > 75° percentile della "normalità". Il monitoraggio dei valori di frammentazione ai vari tempi di *follow-up*, nel medesimo paziente (studio longitudinale), è stato condotto solo in 2 soggetti al T3. Il paziente trattato con radioterapia mostra alti valori di SDF anche dopo 3 anni dalla fine del trattamento. Lo studio longitudinale è attualmente in corso.

Per quanto concerne l'altro aspetto genotossico, MSI, il nostro studio non ha mostrato instabilità genomica in relazione ai sette microsatelliti analizzati. Questo indica che eventuali cambiamenti (se esistono) non avvengono nella maggior parte delle cellule. Sarebbe, pertanto, auspicabile l'utilizzo di metodiche più sensibili al fine di individuare mosaicismi che coinvolgono meno del 50% delle cellule analizzate.

L'aspetto epigenetico degli effetti della terapia è stato affrontato tramite la valutazione dei livelli di metilazione del DNA spermatico. Dal nostro studio si evince che, nella quasi totalità dei siti CpGs, non si rilevano variazioni significative, con un effetto bidirezionale e casuale del trattamento sul metiloma spermatico. E', tuttavia, opportuno precisare che questo può essere riconducibile alla tipologia di *array* utilizzato che permette l'analisi di circa 400.000 siti coinvolti nell'oncogenesi. Gli studi futuri, quindi, dovrebbero incentrare la loro analisi sull'osservazione di un maggior numero di siti tramite *arrays* di nuova generazione che garantiscono una miglior copertura dei *loci* CpGs presenti sul genoma umano (oltre 850.000). La nuova piattaforma con un numero maggiore di siti potrebbe avvalorare la presenza dei 3 siti che hanno mostrato un cambiamento statisticamente significativo (superiore al 10%) del loro stato di metilazione in seguito al trattamento con ABVD+RAD. Inoltre, per studiare il reale impatto del trattamento citotossico sul profilo di metilazione del DNA spermatico, sarebbe opportuno valutare anche il carico "epimutazionale" attraverso il confronto dei pazienti con un gruppo di controllo (soggetti sani non trattati). Nello specifico rimane da stabilire se il numero di *loci* con variazioni di metilazione post-terapia citostatica sia maggiore rispetto a quello osservabile in un individuo non-trattato a distanza dello stesso intervallo di tempo.

Quindi in conclusione, se l'instabilità dei microsatelliti e il profilo di metilazione sono elementi ancora da investigare, i livelli di frammentazione del DNA ci hanno invece fornito dati interessanti. Attualmente, la ricerca di una gravidanza spontanea viene sconsigliata solo nei primi due anni post-terapia. Data l'incidenza relativamente alta di pazienti con valori di SDF patologici dopo 3 anni dalle fine del trattamento, sarebbe consigliabile rivalutare il tempo di attesa oltre questo limite temporale. In base ai risultati di questa tesi, la valutazione del SDF potrebbe essere introdotto nella pratica clinica per monitorizzare il danno genomico, in modo tale da fornire maggiori certezze ai pazienti oncologici riguardo la tempistica più appropriata per la ricerca di un concepimento naturale.



## 7. APPENDICE

**Tabella 1. Ditta dalla quale è stato acquistato ogni reagente utilizzato nel il nostro studio.**

Reagente	Ditta
EDTA	Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, Stati Uniti
Proteinasi K	MACHEREY-NAGEL, Düren, Germania
Trisi-EDTA (TE)	Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, Stati Uniti
Buffer + Go-Taq	Promega, Madison, Wisconsin, Stati Uniti
Buffer + Fast-Taq	Hoffmann-La Roche, Basilea, Svizzera
Buffer + Platinum Taq	Invitrogen Corporation, Carlsbad, California, Stati Uniti
Buffer + AB Taq	AB ANALITICA, Padova, Italia
dNTPs	Hoffmann-La Roche, Basilea, Svizzera
MgCl <sub>2</sub> per PCR	Invitrogen Corporation, Carlsbad, California, Stati Uniti
Agarosio	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Stati Uniti
Bromuro di etidio	EUROCLONE S.p.A., Milano, Italia
<i>GeneScan</i> ® 400HD ROX	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Stati Uniti
Formamide <i>ABI Prism</i> ®	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Stati Uniti
<i>Bovine Serum Albumin</i> (BSA)	Mp Biomedicals, Illkirch-Graffenstaden, Francia
PvuII	Promega, Madison, Wisconsin, Stati Uniti
DraI	Promega, Madison, Wisconsin, Stati Uniti
PureSperm	Biocare Europe Srl, Roma, Italia
<i>Human Tubaric Fluid</i> (HTF)	IRVINE SCIENTIFIC, Santa Ana, California
<i>Human Serum Albumin</i> (HSA)	Origio, Danimarca
<i>Dynabeads</i>	Invitrogen Corporation, Carlsbad, California, Stati Uniti
<i>Phosphate buffered saline</i> (PBS)	EUROCLONE S.p.A., Milano, Italia
Paraformaldeide	Merck KGaA, Darmstadt, Germania
Buffer + Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)	Hoffmann-La Roche, Basilea, Svizzera
Primers	Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, Stati Uniti

Tabella 2. Sequenze delle coppie di *primers* utilizzati nel nostro studio con le corrispettive temperature di *annealing* e lunghezze dell'amplicone

Tipo di analisi	Marcatore amplificato	Primer Forward (5'-3')	Primer Reverse (5'-3')	Temperatura <i>annealing</i> (°C)	Lunghezza amplicone (bp)	
STSs per screening delezioni	Y142	AGCTTCTATTTGAGGGCTTC	CTCTTCGCAATCCCTGACAT	58	196	
	SY1258	AACCCCAATCTTAGCAAAAATATATG	TAGGTGACAGGGCAGGATTC	62	968	
	SY1161	CGACACTTTTGGGAAGTTCA	TTGTGTCAGTGGTGGCTTA	58	330	
	SY1197	TCATTTGTGTCCTTCTCTTGGA	CTAAGCCAGGAAGTTGCCAC	58	453	
	SY1191	CCAGACGTTCTAACCCTTTCCG	GAGCCGAGATCCAGTTACC	60	385	
	SY1291	TAAAAGGCGAAGCTGCCAAGG	GGGAGAAAAGTTCTGCCAAGG	60	520	
	SY1206	ATTGATCTCCTTGGTTCCCC	GACATGTGTGGCCAAATTTGA	62	394	
	SY1201	CCGACTTCGACAAATGGCT	GGGAGAAAAGTTCTGCCAAGG	62	677	
	Dosaggio genico <i>CDY1</i> e <i>DAZ</i>	oMj953-o1023	FAM-TATTTGAGACCCTTGGACCCTG	GTTTCTTTGGAGTTTCCCTTCTGTCACC	60	134-137
		o1130-o1313	FAM-TTAAAGTACTACTGTAGACAC	GTTTCTTGTATTAATGTAGAAAGATGAGAC	56	214-217
RFLP <i>CDY1</i> e <i>DAZ</i>	o1025-o1026	GAAATGCCATTAATGTGCTAACAACATG	AAGGAGAGTGTAAATACATAACCCCTG	58	200	
	o912-o913	TGTATTTAAMAATGTGCACCTTCACTGT	CCAGTCAAAAATGGCACAT	58	250	
Analisi microsatelli	AR	TCCAGAAATCTGTTCAGAGCCGTGC	FAM-GCTGTGAAGGTGTGCTGTTCCTCAT	60	240-290	
	ER	FAM-GACGCATGATATACCTCACC	GCAGAATCAAAATATCCAGATG	56	160-180	
	D17S250	FAM-GCTGGCCATATATATATTTAAACC	CCAAATTTATATATATATACCGGTCCG	56	~158	
	D2S123	ACATTTGCTGGAAAGTTCTTGGC	HEX-ACCATAGGTTCAAGTCTTTCC	56	~217	
	D5S346	ACTCACTCTAAGTATAAATTCG	NED-AGCAGATGGGAGACAGTATTTACTAGTT	56	~131	
	BA126	HEX-TGACTACTTTTGGACTTCAGCC	CCCAATTTTAACTAACTAACCA	56	~122	
	BA125	FAM-TGGCCCTCCAAAGAAATGTAAAGT	TCTGCATTTTAACTATATGCGTCC	56	~127	

## 8. BIBLIOGRAFIA

- Abu Hassan Abu D, Franken DR, Hoffman B, Henkel R (2012)** Accurate sperm morphology assessment predicts sperm function. *Andrologia*. 44 Suppl 1:571-7.
- Ahmadi A, Ng SC (1999)** Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. *The Journal of Experimental Zoology* 284:696-704.
- Albanell J, Bosl GJ, Reuter VE, Engelhardt M, Franco S, Moore MA, Dmitrovsky E (1999)** Telomerase activity in germ cell cancers and mature teratomas. *J Natl Cancer Inst*. 91(15):1321-6.
- Almstrup K, Høi-Hansen CE, Wirkner U, Blake J, Schwager C, Ansoorge W, Nielsen JE, Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Leffers H (2004)** Embryonic stem cell-like features of testicular carcinoma in situ revealed by genome-wide gene expression profiling. *Cancer Res*. 64(14):4736-43.
- Babenko VN, Chadaeva IV, Orlov YL (2017)** Genomic landscape of CpG rich elements in human. *BMC Evol Biol*. 17(Suppl 1):19.
- Bahadur G et al. (2005)** "Semen quality before and after gonadotoxic treatment," *Human Reproduction*, vol. 20, pp. 774-781.
- Bansal SK, Jaiswal D, Gupta N, Singh K, Dada R, Sankhwar SN, Gupta G, Rajender S (2016)** Gr/gr deletions on Y-chromosome correlate with male infertility: an original study, meta-analyses, and trial sequential analyses. *Sci Rep* 6:19798.
- Barr RD, Clark DA, Booth JD (1993)** Dyspermia in men with localized Hodgkin's disease. A potentially reversible, immune-mediated disorder. *Medical Hypotheses* 40:165-8.
- Barton, T. S., Robaire, B., and Hales, B. F (2005)** Epigenetic programming in the preimplantation rat embryo is disrupted by chronic paternal cyclophosphamide exposure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(22):7865-70.
- Beal MA, Rowan-Carroll A, Campbell C et al. (2015)** Single-molecule PCR analysis of an unstable microsatellite for detecting mutations in sperm of mice exposed to chemical mutagens. *Mutation Research* 775:26-32.
- Bellott DW, Hughes JF, Skaletsky H, Brown LG, Pyntikova T, Cho TJ, Koutseva N, Zaghoul S, Graves T, Rock S, Kremitzki C, Fulton RS, Dugan S, Ding Y, Morton D, Khan Z, Lewis L, Buhay C, Wang Q, Watt J, Holder M, Lee S, Nazareth L, Alföldi J, Rozen S, Muzny DM, Warren WC, Gibbs RA, Wilson RK, Page DC (2014)** Mammalian Y chromosomes retain widely expressed dosage-sensitive regulators. *Nature* 508(7497):494-499.
- Bianco AR (1999)** Manuale di Oncologia Clinica. p. 333.
- Bieber AM, Marcon L, Hales BF, Robaire B (2006)** Effects of chemotherapeutic agents for testicular cancer on the male rat reproductive system, spermatozoa, and fertility. *Journal of Andrology* 27:189-200.
- Boitrelle F, Albert M, Theillac C, Ferfour F, Bergere M, Vialard F, Wainer R, Bailly M, Selva J (2012)** Cryopreservation of human spermatozoa decreases the number of motile normal spermatozoa, induces nuclear vacuolization and chromatin decondensation. *Journal of Andrology* 33(6):1371-8.

- Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, Meltzer SJ, Rodriguez-Bigas MA, Fodde R, Ranzani GN, Srivastava S (1998)** A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Research* 58(22):5248-57.
- Bonadonna G, Robustelli della Cuna G and Valagussa P (2007)** Medicina oncologica.
- Bor P, Hindkjaer J, Kolvraa S, Rossen P, von der Maase H, Jorgensen TM, Sorensen VT, Eiberg H, Ingerslev HJ (2006)** Screening for Y microdeletions in men with testicular cancer and undescended testis. *Journal of assisted reproduction and genetics* 23:41-5.
- Bujan L, Walschaerts M, Brugnion F, Daudin M, Berthaut I, Auger J, Saias J, Szerman E, Moinard N, Rives N, Hennebicq S (2014)** Impact of lymphoma treatments on spermatogenesis and sperm deoxyribonucleic acid: a multicenter prospective study from the CECOS network. *Fertility and Sterility* 102(3):667-674.
- Bujan L, Walschaerts M, Moinard N, Hennebicq S, Saias J, Brugnion F, Auger J, Berthaut I, Szerman E, Daudin M, Rives N (2013)** Impact of chemotherapy and radiotherapy for testicular germ cell tumors on spermatogenesis and sperm DNA: a multicenter prospective study from the CECOS network. *Fertility and Sterility* 100(3):673-80.
- Brunner EJ, Marmot MG, Nanchahal K, Shipley MJ, Stansfeld SA, Juneja M, Alberti KG (1997)** Social inequality in coronary risk: central obesity and the metabolic syndrome. Evidence from the Whitehall II study. *Diabetologia*. 40(11):1341-9.
- Cao X, Cui Y, Zhang X, Lou J, Zhou J, Wei R (2017)** The correlation of sperm morphology with unexplained recurrent spontaneous abortion: A systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*. 8(33):55646-55656.
- Cao PR, Wang L, Jiang YC, Yi YS, Qu F, Liu TC, Lv Y (2015)** De novo origin of VCY2 from autosome to Y-transposed amplicon. *PLoS ONE* 10(3):e0119651.
- Cao X, Cui Y, Zhang X, Lou J, Zhou J, Wei R (2017)** The correlation of sperm morphology with unexplained recurrent spontaneous abortion: A systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*. 8(33):55646-55656.
- Caponecchia L, Cimino G, Sacchetto R, Fiori C, Sebastianelli A, Salacone P, Marcucci I, Tomassini S, Rago R (2016)** Do malignant diseases affect semen quality? Sperm parameters of men with cancers. *Andrologia*. 48(3):333-40.
- Castrillon DH, Gönczy P, Alexander S, Rawson R, Eberhart CG, Viswanathan S, DiNardo S, Wasserman SA (1993)** Toward a molecular genetic analysis of spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*: characterization of male-sterile mutants generated by single P element mutagenesis. *Genetics* 135(2):489-505.
- Chai NN, Zhou H, Hernandez J, Najmabadi H, Bhasin S, Yen PH (1998)** Structure and organization of the RBMY genes on the human Y chromosome: transposition and amplification of an ancestral autosomal *bmRNPG* gene. *Genomics* 49(2):283-289.
- Chan D, Delbès G, Landry M, Robaire B (2012)** Epigenetic alterations in sperm DNA associated with testicular cancer treatment. *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology* 125(2):532-43.
- Chen H, Yi M, Sheng Y, Cheng H, Zhou R (2013)** A novel testis-enriched gene Spata33 is expressed during spermatogenesis. *PLoS One*. 8(7):e67882.
- Choi J, Song SH, Bak CW, Sung SR, Yoon TK, Lee DR, Shim SH (2012)** Impaired spermatogenesis and gr/gr deletions related to Y chromosome haplogroups in Korean men. *PLoS ONE* 7(8):e43550.
- Chung PW, Gospodarowicz MK, Panzarella T, Jewett MA, Sturgeon JF, Tew-George B, Bayley AJ, Catton CN, Milosevic MF, Moore M, Warde PR (2004)** Stage II testicular seminoma: patterns of recurrence and outcome of treatment. *European Urology* 45: 754-760.
- Classen J, Schmidberger H, Meisner C, Souchon R, Sautter-Bihl ML et al (2003)** Radiotherapy for stage IIA7B testicular seminoma: final report of a prospective multicenter clinical trial. *Journal of Clinical Oncology* 21: 1101-1106.
- Coffey J, Huddart RA, Elliott F, Sohaib SA, Parker E, Dudakia D, Pugh JL, Easton DF, Bishop DT, Stratton MR, Rapley EA (2007)** Testicular microlithiasis as a familial risk factor for testicular germ cell tumour. *Br J Cancer*.97(12):1701-6.
- Conrad, DF and Hurles, ME (2007)** The population genetics of structural variation. *Nat. Genet.* 39, S30- S36.
- Costabile RA, Spevak M (1998)** Cancer and male factor infertility. *Oncology (Williston Park)* 12(4):557-62.

- de Carvalho CM, Zuccherato LW, Fujisawa M, Shirakawa T, Ribeiro-dos-Santos AK, Santos SE, Pena SD, Santos FR (2006) *Study of AZFc partial deletion gr/gr in fertile and infertile Japanese males*. *J Hum Genet* 51(9):794–799.
- Degl'Innocenti S, Filimberti E, Magini A, Krausz C, Lombardi G, Fino MG, Rastrelli G, Maggi M, Baldi E (2013) Semen cryopreservation for men banking for oligospermia, cancers, and other pathologies: prediction of post-thaw outcome using basal semen quality. *Fertility and Sterility* 100(6):1555-63.
- De Mas P, Daudin M, Vincent MC, Calvas P, Mieusset R, Bujan L (2001) Increased aneuploidy in spermatozoa from testicular tumor patients after chemotherapy with cisplatin, etoposide and bleomycin. *Human Reproduction* 16:1204-8.
- Del Mastro L, Lambertini M, Anserini P et al. (2016) "LINEE GUIDA PRESERVAZIONE DELLA FERTILITÀ NEI PAZIENTI ONCOLOGICI" AIOM.
- Delbes, G., Hales, B. F., Robaire, B (2007) Effects of the chemotherapy cocktail used to treat testicular cancer on sperm chromatin integrity. *Journal of Andrology* 28(2):241-9.
- Delbès G, Hales BF, Robaire B (2010) Toxicants and human sperm chromatin integrity. *Molecular Human Reproduction* 16(1):14-22.
- Di Bisceglie C, Bertagna A, Composto ER, Lanfranco F, Baldi M, Motta G, Barberis AM, Napolitano E, Castellano E, Manieri C (2013) Effects of oncological treatments on semen quality in patients with testicular neoplasia or lymphoproliferative disorders. *Asian J Androl.* 15(3) 425-429.
- Dietmaier W, Wallinger S, Bocker T, Kullmann F, Fishel R, Rüschoff J (1997) Diagnostic microsatellite instability: definition and correlation with mismatch repair protein expression. *Cancer Res.* 57(21):4749-56.
- Dong C and Hemminki K (2001) Modification of cancer risks in offspring by sibling and parental cancers from 2,112,616 nuclear families. *Int J Cancer.* 92(1):144-50.
- Drasga RE, Einhorn LH, Williams SD, Patel DN, Stevens EE (1983) Fertility after chemotherapy for testicular cancer. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 1 (3):179– 83.
- Dreumont N, Bourgeois CF, Lejeune F, Liu Y, Ehrmann IE, Elliott DJ, Stévenin J (2010) Human RBMY regulates germline-specific splicing events by modulating the function of the serine/ arginine-rich proteins 9G8 and Tra2- $\beta$ . *J Cell Sci* 123(Pt 1):40–50.
- Dromard M, Bompard G, Glondu-Lassis M, Puech C, Chalbos D, Freiss G (2007) The putative tumor suppressor gene PTPN13/ PTPL1 induces apoptosis through insulin receptor substrate-1 dephosphorylation. *Cancer Res* 67(14):6806–6813.
- Dubrova YE, Nesterov VN, Krouchinsky NG, Ostapenko VA, Neumann R, Neil DL, Jeffreys AJ (1996) Human minisatellite mutation rate after the Chernobyl accident. *Nature.* 380(6576):683-6.
- Dubrova YE, Plumb M, Brown J, Jeffreys AJ (1998) Radiation-induced germline instability at minisatellite loci. *Int J Radiat Biol.* 74(6):689-96.
- Dubrova YE (2003) Long-term genetic effects of radiation exposure. *Mutat Res.* 544(2-3):433-9.
- Dubrova YE, Nesterov VN, Krouchinsky NG, Ostapenko VA, Vergnaud G, Giraudeau F, Buard J, Jeffreys AJ (1997) Further evidence for elevated human minisatellite mutation rate in Belarus eight years after the Chernobyl accident. *Mutat Res.* 381(2):267-78.
- Eberhart CG, Maines JZ, Wasserman SA (1996) Meiotic cell cycle requirement for a fly homologue of human deleted in azoospermia. *Nature* 381(6585):783–785.
- Elliott DJ (2004) The role of potential splicing factors including RBMY, RBMX, hnRNP-G-T and STAR proteins in spermatogenesis. *Int J Androl* 27(6):328–334.
- Eloualid A, Rhaissi H, Reguig A, Bounaceur S, El Houate B, Abidi O, Charif M, Louanjli N, Chadli E, Barakat A, Bashamboo A, McElreavey K, Rouba H (2012) Association of spermatogenic failure with the b2/b3 partial AZFc deletion. *PLoS ONE* 7(4):e34902.
- Evenson DP, Jost LK, Corzett M, Balhorn R (2000) Characteristics of human sperm chromatin structure following an episode of influenza and high fever: a case study. *Journal of Andrology* 21:39-46.
- Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Purvis K, de Angelis P, Claussen OP (1999) Utility of

the sperm chromatin structure *assay* as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Human Reproduction* 14:1039-49.

**Feinberg AP, Tycko B (2004)** The history of cancer epigenetics. *Nature Reviews. Cancer* 4(2):143-53.

**Fenster L, Katz DF, Wyrobek AJ, Pieper C, Rempel DM, Oman D, Swan SH (1997)** Effects of psychological stress on human semen quality. *Journal of Andrology* 18:194-202.

**Ferlin A, Speltra E, Garolla A, Selice R, Zuccarello D, Foresta C (2007)** Y chromosome haplo- groups and susceptibility to testicular cancer. *Mol Hum Reprod* 13:615-9.

**Ferlin A, Tessari A, Ganz F, Marchina E, Barlati S, Garolla A, Engl B, Foresta C (2005)** Association of partial AZFc region deletions with spermatogenic impairment and male infertility. *J Med Genet* 42(3):209-213.

**Fernandes S, Huellen K, Goncalves J, Dukal H, Zeisler J, Rajpert De Meyts E, Skakkebaek NE, Habermann B, Krause W, Sousa M, Barros A, Vogt PH (2002)** High frequency of DAZ1/DAZ2 gene deletions in patients with severe oligozoospermia. *Mol Hum Reprod* 8(3):286-298.

**Feuk L, Carson AR, Scherer SW (2006)** Structural variation in the human genome. *Nat Rev Genet.* 7(2):85-97.

**Fraietta R, Spaine DM, Bertolla RP, Ortiz V, Cedenho AP (2010)** Individual and seminal characteristics of patients with testicular germ cell tumors. *Fertility and Sterility* 94:2107-12.

**Frans EM, Sandin S, Reichenberg A, Lichtenstein P, Långström N, Hultman CM. (2008)** Advancing paternal age and bipolar disorder. *Arch Gen Psychiatry.* 65(9):1034-40.

**Frydelund-Larsen L, Vogt PH, Leffers H, Schadwinkel A, Daugaard G, Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E (2003)** No AZF deletion in 160 patients with testicular germ cell neoplasia. *Mol Hum Reprod* 9:517-21.

**Fu XF, Cheng SF, Wang LQ, Yin S, De Felici M, Shen W (2015)** DAZ family proteins, key players for germ cell development. *Int J Biol Sci* 11(10):1226-1235.

**Gajendran VK, Nguyen M, Ellison LM (2005)** Testicular cancer patterns in African-American men. *Urology* 66(3):602-5.

**Gandini L, Sgrò P, Lombardo F, Paoli D, Culasso F, Toselli L, Tsamatropoulos P, Lenzi A (2006)** Effect of chemo- or radiotherapy on sperm parameters of testicular cancer patients. *Human Reproduction* 21(11):2882-9.

**Garcia-del-Muro X, Maroto P, Gumà J, Sastre J, López Brea M, Arranz JA, Lainez N, Soto de Prado D, Aparicio J, Piulats JM, Pérez X, Germá-LLuch JR (2008)** Chemotherapy as an alternative to radiotherapy in the treatment of stage IIA and IIB testicular seminoma: a Spanish germ cell cancer group study. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 26(33):5416-21.

**Garolla A, Ferlin A, Vinanzi C, Roverato A, Sotti G, Artibani W, Foresta C (2005)** Molecular analysis of the androgen receptor gene in testicular cancer. *Endocr. Relat. Cancer.* 12(3):645-55.

**Gatimel N, Moreau J, Parinaud J, Léandri RD (2017)** Sperm morphology: assessment, pathophysiology, clinical relevance, and state of the art in 2017. *Andrology.* 5(5):845-862.

**Giachini C, Guarducci E, Longepied G, Degl'Innocenti S, Becherini L, Forti G, Mitchell MJ, Krausz C (2005)** The gr/gr deletion(s): a new genetic test in male infertility? *J Med Genet* 42(6):497-502.

**Giachini C, Laface I, Guarducci E, Balercia G, Forti G, Krausz C (2008)** Partial AZFc deletions and duplications: clinical cor- relates in the Italian population. *Hum Genet* 124(4):399-410.

**Giwercman A, Lundin KB, Eberhard J, Ståhl O, Cwikiel M, Cavallin- Ståhl E, Giwercman YL (2004)** Linkage between androgen receptor gene CAG trinucleotide repeat length and testicular germ cell cancer histological type and clinical stage. *Eur J Cancer.* 40(14):2152-8.

**Goldberg DM, Diamandis EP (1993)** Models of neoplasia and their diagnostic implications: a historical perspective. *Clin Chem.* 39(11 Pt 2):2360-74.

**Grasso C, Zugna D, Fiano V, Robles Rodriguez N, Maule M, Gillio-Tos A, Ciuffreda L, Lista P, Segnan N, Merletti F, Richiardi L (2016)** Subfertility and Risk of Testicular Cancer in the EPSAM Case-Control Study. *PLoS One.* 11(12):e0169174.

**Hammoud, S. S., Purwar, J., Pflueger, C., Cairns, B. R., and Carrell, D. T (2010)** Alterations in sperm DNA methylation patterns at imprinted loci in two classes of infertility. *Fertility and Sterility* 94(5):1728-33.

- Hansen SW, Berthelsen JG, von der Maase H (1990)** Longterm fertility and Leydig cell function in patients treated for germ cell cancer with cisplatin, vinblastine, and bleomycin versus surveillance. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 8(10):1695-8.
- Hare EH, Moran PA (1979)** Raised parental age in psychiatric patients: evidence for the constitutional hypothesis. *Br J Psychiatry. Feb*;134:169-77.
- Heaney JD, Lam MY, Michelson MV, Nadeau JH (2008)** Loss of the transmembrane but not the soluble kit ligand isoform increases testicular germ cell tumor susceptibility in mice. *Cancer Res.* 68(13):5193-7.
- Hecht NB (1998)** Molecular mechanisms of male germ cell differentiation. *BioEssays* 20(7):555-561.
- Hemminki K and Li X (2002)** Cancer risks in Nordic immigrants and their offspring in Sweden. *Eur. J. Cancer.* 38(18):2428-34.
- Hemminki K and Li X (2004)** Familial risk in testicular cancer as a clue to a heritable and environmental aetiology. *Br J Cancer.* 90(9):1765-70.
- Hemminki K, Rawal R, Chen B, Bermejo JL (2004)** Genetic epidemiology of cancer: from families to heritable genes. *Int J Cancer.* 111: 944-50.
- Hopps CV, Mielnik A, Goldstein M, Palermo GD, Rosenwaks Z, Schlegel PN (2003)** Detection of sperm in men with Y chromosome microdeletions of the AZFa, AZFb and AZFc regions. *Hum Reprod* 18(8):1660-1665.
- Huyghe E, Matsuda T, Thonneau P (2003)** Increasing incidence of testicular cancer worldwide: a review. *Journal of Urology* 170: 5-11.
- Ionita-Laza I., Rogers A.J., Lange C., Raby B.A., Lee C (2009)** Genetic association analysis of copy-number variation (CNV) in human disease pathogenesis. *Genomics.* 93:22-26.
- Ishikawa T, Kamidono S and Fujisawa M (2004)** Fertility after high-dose chemotherapy for testicular cancer. *Urology* 63,137-140.
- Jeffreys AJ, Bois P, Buard J, Collick A, Dubrova Y, Hollies CR, May CA, Murray J, Neil DL, Neumann R, Stead JD, Tamaki K, Yardley J (1997)** Spontaneous and induced minisatellite instability. *Electrophoresis.* 18(9):1501-11.
- Kaneda, M., Okano, M., Hata, K., Sado, T., Tsujimoto, N., Li, E., and Sasaki, H. (2004)** Essential role for de novo DNA methyltransferase Dnmt3a in paternal and maternal imprinting. *Nature* 429(6994):900-3.
- Kanetsky PA, Mitra N, Vardhanabhuti S, Li M, Vaughn DJ, Letrero R, Ciosek SL, Doody DR, Smith LM, Weaver J, Albano A, Chen C, Starr JR, Rader DJ, Godwin AK, Reilly MP, Hakonarson H, Schwartz SM, Nathanson KL (2009)** Common variation in KITLG and at 5q31.3 predisposes to testicular germ cell cancer. *Nat. Genet.* 41(7):811-5.
- Karpman E, Sander JC, Spiess PE, Pisters LL, Lipshultz LI (2009)** Pretreatment semen parameters in men with cancer. *Urol.* 181(2):736-40.
- Kee K, Angeles VT, Flores M, Nguyen HN, Reijo Pera RA (2009)** Human *DAZL*, *DAZ* and *BOULE* genes modulate pre-mordial germ-cell and haploid gamete formation. *Nature* 462(7270):222-225.
- Kenney LB, Nicholson HS, Brasseux C, Mills JL, Robison LL, Zeltzer LK, Meadows AT, Reaman GH, Byrne J (1996)** Birth defects in offspring of adult survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia. *A Childrens Cancer Group/National Institutes of Health Report. Cancer* 78:169-176.
- Kleiman SE, Yogev L, Lehavi O, Hauser R, Botchan A, Paz G, Yavetz H, Gamzu R (2011)** The likelihood of finding mature sperm cells in men with AZFb or AZFb-c deletions: six new cases and a review of the literature (1994-2010). *Fertil Steril* 95(6):2005- 2012, 2012.e1-4.
- Krausz C (2012)** An encore for the repeats: new insights into an old genetic variant. *J Clin Endocrinol Metab.* 97(3):764-7.
- Krausz C, Casamonti E (2017)** Spermatogenic failure and the Y chromosome. *Hum Genet.* 136(5):637-655.
- Krausz C, Degl'Innocenti S, Nuti F, Morelli A, Felici F, Sansone M, Varriale G, Forti G (2006)** Natural transmission of USP9Y gene mutations: a new perspective on the role of AZFa genes in male fertility. *Hum Mol Genet* 15(18):2673-2681.
- Krausz C, Giachini C, Xue Y, O'Bryan MK, Gromoll J, Rajpert-de Meyts E, Oliva R, Akinin-Seifer I, Erdei E,**

- Jorgensen N, Simoni M, Ballescà JL, Levy R, Balercia G, Piomboni P, Nieschlag E, Forti G, McLachlan R, Tyler-Smith C (2009)** Phenotypic variation within European carriers of the Y-chromosomal gr/gr deletion is independent of Y-chromosomal background. *J Med Genet* 46(1):21–31.
- Krausz C, Looijenga LH (2008)** Genetic aspects of testicular germ cell tumors. *Cell. Cycle* 7(22):3519–24.
- Krausz C, Quintana-Murci L, McElreavey K (2000)** Prognostic value of Y deletion analysis: what is the clinical prognostic value of Y chromosome microdeletion analysis? *Hum Reprod* 15(7):1431–1434.
- Kobayashi, H., Sato, A., Otsu, E., Hiura, H., Tomatsu, C., Utsunomiya, T., Sasaki, H., Yaegashi, N., and Arima, T (2007)** Aberrant DNA methylation of imprinted loci in sperm from oligospermic patients. *Human Molecular Genetics* 16(21):2542–51.
- Kühnert B, Gromoll J, Kostova E, Tschanter P, Luetjens CM, Simoni M, Nieschlag E (2004)** Case report: natural transmission of an AZFc Y-chromosomal microdeletion from father to his sons. *Hum Reprod* 19(4):886–888.
- Kuroda-Kawaguchi T, Skaletsky H, Brown LG, Minx PJ, Cordum HS, Waterston RH, Wilson RK, Silber S, Oates R, Rozen S, Page DC (2001)** The AZFc region of the Y chromosome features massive palindromes and uniform recurrent deletions in infertile men. *Nat Genet* 29(3):279–286.
- La Salle, S., Mertineit, C., Taketo, T., Moens, P. B., Bestor, T. H., and Trasler, J. M (2004)** Windows for sex-specific methylation marked by DNA methyltransferase expression profiles in mouse germ cells. *Developmental Biology* 268(2):403–15.
- Lahn BT, Page DC (1997)** Functional coherence of the human Y chromosome. *Science* 278(5338):675–680
- Lahn BT, Page DC (1999)** Retroposition of autosomal mRNA yielded testis-specific gene family on human Y chromosome. *Nat. Genet.* 21(4):429–33.
- Lahn BT, Tang ZL, Zhou J, Barndt RJ, Parvinen M, Allis CD, Page DC (2002)** Previously uncharacterized histone acetyltransferases implicated in mammalian spermatogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(13):8707–8712.
- Lampe H, Horwich A, Norman A, Nicholls J and Dearnaley DP (1997)** Fertility after chemotherapy for testicular germ cell cancer. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 15,239–245.
- Lee C, Scherer SW (2010)** The clinical context of copy number variation in the human genome. *Expert Rev Mol Med* 9;12:e8.
- Li Q, Qiao D, Song NH, Ding Y, Wang ZJ, Yang J, Wang W, Yin CJ (2013)** Association of DAZ1/DAZ2 deletion with spermatogenic impairment and male infertility in the South Chinese population. *World J Urol* 31(6):1403–1409.
- Lin YW, Hsu LC, Kuo PL, Huang WJ, Chiang HS, Yeh SD, Hsu TY, Yu YH, Hsiao KN, Cantor RM, Yen PH (2007)** Partial duplication at AZFc on the Y chromosome is a risk factor for impaired spermatogenesis in Han Chinese in Taiwan. *Hum Mutat* 28(5):486–494.
- Linger R, Dudakia D, Huddart R, Easton D, Bishop DT, Stratton MR, Rapley EA (2007)** A physical analysis of the Y chromosome shows no additional deletions, other than Gr/Gr, associated with testicular germ cell tumour. *Br J Cancer.* 96(2):357–61.
- Liu M, Shi X, Bi Y, Qi L, Guo X, Wang L, Zhou Z, Sha J (2014)** SHCBP1L, a conserved protein in mammals, is predominantly expressed in male germ cells and maintains spindle stability during meiosis in testis. *Mol Hum Reprod.* 20(6):463–75.
- Lo Giacco D, Ars E, Bassas L, Galan JJ, Rajmil O, Ruíz P, Caffaratti J, Guarducci E, Ruiz-Castané E, Krausz C (2011)** ESR1 promoter polymorphism is not associated with nonsyndromic cryptorchidism. *Fertil Steril.* 95(1):369–71, 371.e1–2.
- Lo Giacco D, Chianese C, Sánchez-Curbelo J, Bassas L, Ruiz P, Rajmil O, Sarquella J, Vives A, Ruiz-Castané E, Oliva R, Ars E, Krausz C (2014)** Clinical relevance of Y-linked CNV screening in male infertility: new insights based on the 8-year experience of a diagnostic genetic laboratory. *Eur J Hum Genet* 22(6):754–761.
- Longhi A, Macchiagodena M, Vitali G, Bacci G (2003)** Fertility in male patients treated with neoadjuvant chemotherapy for osteosarcoma. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology* 25 (4):292–6.
- Lu C, Zhang J, Li Y, Xia Y, Zhang F, Wu B, Wu W, Ji G, Gu A, Wang S, Jin L, Wang X (2009)** The b2/b3 subdeletion shows higher risk of spermatogenic failure and higher frequency of complete AZFc deletion than the gr/gr subdeletion in a Chinese population. *Hum Mol Genet* 18(6):1122–1130.



- Lutke Holzik MF, Storm K, Sijmons RH, D'Hollander M, Arts EG, Verstraaten ML, Sleijfer DT, Hoekstra HJ** (2005) Absence of constitutional Y chromosome AZF deletions in patients with testicular germ cell tumors. *Urology* 65:196-201.
- Machev N, Saut N, Longepied G, Terriou P, Navarro A, Levy N, Guichaoua M, Metzler-Guillemain C, Collignon P, Frances AM, Belougne J, Clemente E, Chiaroni J, Chevillard C, Durand C, Ducourneau A, Pech N, McElreavey K, Mattei MG, Mitchell MJ** (2004) Sequence family variant loss from the AZFc interval of the human Y chromosome, but not gene copy loss, is strongly associated with male infertility. *J Med Genet.* 41(11):814-25. Erratum in: *J Med Genet.* 41(12):960.
- Machiela MJ, Dagnall CL, Pathak A, Loud JT, Chanock SJ, Greene MH, McGlynn KA, Stewart DR** (2017) Mosaic chromosome Y loss and testicular germ cell tumor risk. *J Hum Genet.* 62(6):637-640.
- Maduro MR, Casella R, Kim E, Lévy N, Niederberger C, Lipshultz LI, Lamb DJ** (2003) Microsatellite instability and defects in mismatch repair proteins: a new aetiology for Sertoli cell-only syndrome. *Molecular Human Reproduction* 9(2):61-8.
- Mangs HA, Morris BJ** (2007) The human pseudoautosomal region (PAR): origin, function and future. *Curr Genom* 8(2):129–136.
- Marchiani S, Tamburrino L, Giuliano L, Nosi D, Sarli V, Gandini L, Piomboni P, Belmonte G, Forti G, Baldi E, Muratori M** (2011) Sumo1-ylation of human spermatozoa and its relationship with semen quality. *International Journal of Andrology* 34:581-93.
- Marcon L, Hales BF, Robaire B** (2008) Reversibility of the effects of subchronic exposure to the cancer chemotherapeutics bleomycin, etoposide, and cisplatin on spermatogenesis, fertility, and progeny outcome in the male rat. *Journal of Andrology* 29: 408-17.
- Marmor D, Elefant E, Dauchez C, Roux C** (1986) Semen analysis in Hodgkin's disease before the onset of the treatment. *Cancer* 57(10):1986-7.
- Martin R, Ernst S, Rademaker A, Barclay L, Ko E, Summers N** (1997) Analysis of human sperm karyotypes in testicular cancer patients before and after chemotherapy. *Cytogenetic and Cell Genetics* 78:120–123.
- Martinez-Quetglas I, Pinyol R, Dauch D, Torrecilla S, Tovar V, Moeini A, Alsinet C, Portela A, Rodriguez-Carunchio L, Solé M, Lujambio A, Villanueva A, Thung S, Esteller M, Zender L, Llovet JM** (2016) IGF2 Is Up-regulated by Epigenetic Mechanisms in Hepatocellular Carcinomas and Is an Actionable Oncogene Product in Experimental Models. *Gastroenterology.* 151(6):1192-1205.
- McDowell S, Harrison K, Kroon B, Ford E, Yazdani A** (2013) Sperm DNA fragmentation in men with malignancy. *Fertility and Sterility* 99(7):1862-6.
- McElreavey K, Krausz C** (1999) Sex chromosome genetics '99. Male infertility and the Y chromosome. *Am J Hum Genet* 64(4):928–933.
- Meamar M, Zribi N, Cambi M, Tamburrino L, Marchiani S, Filimberti E, Fino MG, Biggeri A, Menezo Y** (2012) Sperm DNA fragmentation induced by cryopreservation: new insights and effect of a natural extract from *Opuntia ficus-indica*. *Fertility and Sterility* 98:326-33.
- Medrano JV, Ramathal C, Nguyen HN, Simon C, Reijo Pera RA** (2012) Divergent RNA-binding proteins, DAZL and VASA, induce meiotic progression in human germ cells derived in vitro. *Stem Cells* 30(3):441–451.
- Meistrich ML** (2013) Effects of chemotherapy and radiotherapy on spermatogenesis in human. *Fertility and Sterility*.
- Meistrich ML, Byrne J** (2002) Genetic disease in offspring of long-term survivors of childhood and adolescent cancer treated with potentially mutagenic therapies. *American Society of Human Genetics* 70:1069–1071.
- Meistrich ML, Trostle-Weige PK, Lin R, Bhatnagar YM, Allis CD** (1992) Highly acetylated H4 is associated with histone displacement in rat spermatids. *Mol Reprod Dev* 31(3):170–181.
- Miller LS, Brown CL, Mitchell MB, Williamson GM** (2013) Activities of daily living are associated with older adult cognitive status: caregiver versus self-reports. *J Appl Gerontol.* 32(1):3-30.
- Moch H, Cubilla AL, Humphrey PA, Reuter V, Ulbright T** (2016) The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs—Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours. *European Urology*.

**Moller H and Skakkebaek NE** (1997) Testicular cancer and cryptorchidism in relation to prenatal factors: case-control studies in Denmark. *Cancer Causes Control*. 8:904-12.

**Mortusewicz, O., Schermelleh, L., Walter, J., Cardoso, M. C., and Leonhardt, H** (2005) Recruitment of DNA methyltransferase I to DNA repair sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(25):8905-9.

**Muratori M, Marchiani S, Tamburrino L, Tocci V, Failli P, Forti G, Baldi E** (2008) Nuclear staining identifies two populations of human sperm with different DNA fragmentation extent and relationship with semen parameters. *Journal of Andrology* 23:1035-43.

**Muratori M, Tamburrino L, Marchiani S, Guido C, Forti G, Baldi E** (2010) Critical aspects of detection of sperm DNA fragmentation by TUNEL/flow cytometry. *Systems biology in reproductive medicine* 56(4):277-85.

**Nathanson KL, Kanetsky PA, Hawes R, Vaughn DJ, Letrero R, Tucker K, Friedlander M, Phillips KA, Hogg D, Jewtt MAS, Lohynska R, Daugaard G, Richard S, Chompret A, Bonaïti-Pellié C, Heidenreich A, Olah E, Geczi L, Bodrogi I, Ormiston WJ, Daly PA, Oosterhuis W, Gillis AJM, Looijenga LHJ, Guilford P, Fossà SD, Heimdal K, Tjulandin SA, Liubchenko L, Stoll H, Weber W, Rudd M, Huddart R, Crockford GP, Forman D, Oliver DT, Einhorn L, Weber BL, Kramer J, McMaster M, Greene MH, Pike M, Cortessis V, Chen C, Schwartz SM, Bishop DT, Easton DF, Stratton MR, Rapley EA** (2005) The Y deletion gr/gr and susceptibility to testicular germ cell tumor *Am. J. Hum. Genet.* 77(6):1034-43.

**Navarro-Costa P** (2012) Sex, rebellion and decadence: the scandalous evolutionary history of the human Y chromosome. *Biochim Biophys Acta* 1822(12):1851–1863.

**Navarro-Costa P, Gonçalves J, Plancha CE** (2010b) The AZFc region of the Y chromosome: at the crossroads between genetic diversity and male infertility. *Hum Reprod Update* 16(5):525–542.

**Navarro-Costa P, Plancha CE, Gonçalves J** (2010a) Genetic dissection of the AZF regions of the human Y chromosome: thriller or filler for male (in)fertility? *J Biomed Biotechnol* 2010:936569.

**Nemtsova MV, Ivkin EV, Simonova OA, Rudenko VV, Chernykh VB, Mikhaylenko DS, Loran OB** (2016) [Polymorphisms of KITLG, SPRY4, and BAK1 genes in patients with testicular germ cell tumors and individuals with infertility associated with AZFc deletion of the Y chromosome]. *Mol Biol (Mosk)*. 50(6):960-967.

**Nemtsova MV, Ivkin EV, Tryakin AA, Rudenko VV, Dantsev IS, Tyulyandin SA, Loran OB** (2017) [Genetic risk factors for sporadic germ cell testicular tumors]. *Urologiia*. (1):24-30.

**Neri G, Genuardi M** (2010) *Genetica umana e medica. Seconda edizione, Elsevier.*

**Noordam, MJ et al.** (2011). Gene copy number reduction in the azoospermia factor c (AZFc) region and its effect on total motile sperm count. *Hum. Mol. Genet.* 20, 2457–2463

**Oakes, C. C., La Salle, S., Smiraglia, D. J., Robaire, B., and Trasler, J. M** (2007b) Developmental acquisition of genome-wide DNA methylation occurs prior to meiosis in male germ cells. *Developmental Biology* 307(2):368-79.

**O'flaherty C, Hales BF, Chan P, Robaire B** (2010) Impact of chemotherapeutics and advanced testicular cancer or Hodgkin lymphoma on sperm deoxyribonucleic acid integrity. *Fertility and Sterility* 94:1374-9.

**O'flaherty C, Vaisheva F, Hales BF, Chan P, Robaire B** (2008) Characterization of sperm chromatin quality in testicular cancer and Hodgkin's lymphoma patients prior to chemotherapy. *Human Reproduction* 23:1044-52.

**Oksuzyan S, Crespi CM, Cockburn M, Mezei G, Kheifets L** (2012) Birth weight and other perinatal characteristics and childhood leukemia in California. *Cancer Epidemiol.* 36(6):e359-65.

**Oosterhuis J.W, Leendert H, Looijenga H.J** (2005) Testicular germ-cell tumours in a broader perspective. *Nature Reviews Cancer* 5(3):210-22.

**Parenti GC, Zago S, Lusa M, Campioni P, Mannella P** (2007) Association between testicular microlithiasis and primary malignancy of the testis: our experience and review of the literature. *Radiol Med.* 112(4):588-96.

**Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, Teppo L, Thomas DB** (2002) Cancer incidence in five continents, vol. VIII. IARC Scientific Publications No. 155. Lyon: International Agency for Research on Cancer.

**Paulsen M, Ferguson-Smith AC** (2001) DNA methylation in genomic imprinting, development, and disease. *The Journal of Pathology* 195(1):97-110.

- Petersen PM, Hansen SW, Giwercman A, Rørth M, Skakkebaek NE (1994)** Dose dependent impairment of testicular function in patients treated with cisplatin-based chemotherapy for germ cell cancer. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology* 5(4):355-8.
- Piltoft JS, Larsen SB, Dalton SO, Johansen C, Baker JL, Cederkvist L, Andersen I (2017)** Early life risk factors for testicular cancer: a case-cohort study based on the Copenhagen School Health Records Register. *Acta Oncol.* 56(2):220-224.
- Pyle LC, Nathanson KL (2016)** Genetic changes associated with testicular cancer susceptibility. *Semin Oncol.* 43(5):575-581.
- Rajpert-De Meyts E (2006)** Developmental model for the pathogenesis of testicular carcinoma in situ: genetic and environmental aspects. *Hum Reprod Update.* 12(3):303-23.
- Rajpert-De Meyts E., Bartkova, J., Samson, M., Hoei-Hansen, C. E., Frydelund-Larsen, L., Bartek, J. & Skakkebaek, N. E. (2003)** The emerging phenotype of the testicular carcinoma in situ germ cell. *APMIS* 111, 267–278.
- Rajpert-De Meyts E, Leffers H, Daugaard G, Andersen CB, Petersen PM, Hinrichsen J, Pedersen LG, Skakkebaek NE (2002)** Analysis of the polymorphic CAG repeat length in the androgen receptor gene in patients with testicular germ cell cancer. *Int J Cancer.* 102(2):201-4.
- Rajpert-De Meyts E., McGlynn, K. A., Okamoto, K., Jewett, M. A. & Bokemeyer, C (2016)** Testicular germ cell tumours. *Lancet* 387, 1762–1774.
- Rajpert-De Meyts E, Nielsen JE, Skakkebaek NE, Almstrup K (2015)** Diagnostic markers for germ cell neoplasms: from placental-like alkaline phosphatase to micro-RNAs. *Folia Histochem Cytobiol.* 53(3):177-88.
- Rajpert-De Meyts E, Skakkebaek NE (1993)** The possible role of sex hormones in the development of testicular cancer. *Eur. Urol.* 23(1):54-9.
- Rapley EA, Turnbull C, Al Olama AA, Dermitzakis ET, Linger R, Huddart RA, Renwick A, Hughes D, Hines S, Seal S, Morrison J, Nsengimana J, Deloukas P; UK Testicular Cancer Collaboration, Rahman N, Bishop DT, Easton DF, Stratton MR (2009)** A genome-wide association study of testicular germ cell tumor. *Nat. Genet.* 41(7):807-10.
- Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH, Andrews TD, Fiegler H, Shapero MH, Carson AR, Chen W, Cho EK, Dallaire S, Freeman JL, González JR, Gratacòs M, Huang J, Kalaitzopoulos D, Komura D, MacDonald JR, Marshall CR, Mei R, Montgomery L, Nishimura K, Okamura K, Shen F, Somerville MJ, Tchinda J, Valsesia A, Woodwark C, Yang F, Zhang J, Zerjal T, Zhang J, Armengol L, Conrad DF, Estivill X, Tyler-Smith C, Carter NP, Aburatani H, Lee C, Jones KW, Scherer SW, Hurles ME (2006)** Global variation in copy number in the human genome. *Nature.* 444(7118):444-54.
- Repping S, Skaletsky H, Brown L, van Daalen SK, Korver CM, Pyntikova T, Kuroda-Kawaguchi T, de Vries JW, Oates RD, Silber S, van der Veen F, Page DC, Rozen S (2003)** Polymorphism for a 1.6-Mb deletion of the human Y chromosome persists through balance between recurrent mutation and haploid selection. *Nat. Genet.* 35(3):247-51.
- Repping S, van Daalen SK, Brown LG, Korver CM, Lange J, Marszalek JD, Pyntikova T, van der Veen F, Skaletsky H, Page DC, Rozen S (2006)** High mutation rates have driven extensive structural polymorphism among human Y chromosomes. *Nat Genet* 38(4):463–467.
- Repping S, van Daalen SK, Korver CM, Brown LG, Marszalek JD, Gianotten J, Oates RD, Silber S, van der Veen F, Page DC, Rozen S (2004)** A family of human Y chromosomes has dispersed throughout northern Eurasia despite a 1.8-Mb deletion in the azoospermia factor c region. *Genomics* 83(6):1046–52.
- Ribeiro TM, Bertolla RP, Spaine DM, Fraietta R, Ortiz V, Cedenho AP (2008)** Sperm nuclear apoptotic DNA fragmentation in men with testicular cancer. *Fertility and Sterility* 90: 1782-1786.
- Rives N, Perdrix A, Hennebicq S, Saïas-Magnan J, Melin MC, Berthaut I, Barthélémy C, Daudin M, Szerman E, Bresson JL, Brugnion F, Bujan L (2012)** The semen quality of 1158 men with testicular cancer at the time of cryopreservation: results of the French national CECOS network. *Journal of Andrology* 33:1394-401.
- Roskoski R Jr (2005)** Signaling by Kit protein-tyrosine kinase--the stem cell factor receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 337(1):1-13.
- Rosti G, Basso U, Colecchia M et al (2016)** “Linee guida sul Tumore del Testicolo” AIOM. pp. 5-21.
- Rozen SG, Marszalek JD, Irenze K, Skaletsky H, Brown LG, Oates RD, Silber SJ, Ardlie K, Page DC (2012)** AZFc deletions and spermatogenic failure: a population-based survey of 20,000 Y chromosomes. *Am J Hum Genet* 91(5):890–896.

- Rozen S, Skaletsky H, Marszalek JD, Minx PJ, Cordum HS, Waterston RH, Wilson RK, Page DC (2003)** Abundant gene conversion between arms of palindromes in human and ape Y chromosomes. *Nature* 423(6942):873–876.
- Ruggiu M, Speed R, Taggart M, McKay SJ, Kilanowski F, Saunders P, Dorin J, Cooke HJ (1997)** The mouse *Dazl* gene encodes a cytoplasmic protein essential for gametogenesis. *Nature* 389(6646):73–77.
- Sabanegh ES, Ragheb Jr and AM (2009)** Male fertility after cancer. *Urology* 73:225-231.
- Sampath Kumar A, Seah MK, Ling KY, Wang Y, Tan JH, Nitsch S, Lim SL, Lorthongpanich C, Wollmann H, Low DH, Guc- cione E, Messerschmidt DM (2017)** Loss of maternal Trim28 causes male-predominant early embryonic lethality. *Genes* 31(1):12–17.
- Saxena R, Brown LG, Hawkins T, Alagappan RK, Skaletsky H, Reeve MP, Reijo R, Rozen S, Dinulos MB, Disteche CM, Page DC (1996)** The *DAZ* gene cluster on the human Y chromosome arose from an autosomal gene that was transposed, repeatedly amplified and pruned. *Nat Genet* 14(3):292–299.
- Shnorhavorian M, Schwartz SM, Stansfeld B, Sadler-Riggelman I, Beck D, Skinner MK (2017)** Differential DNA Methylation Regions in Adult Human Sperm following Adolescent Chemotherapy: Potential for Epigenetic Inheritance. *Plos One*.
- Simon B, Lee SJ, Partridge AH, Runowicz CD (2005)** Preserving fertility after cancer. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 55 (4):211-28.
- Sin HS, Koh E, Shigehara K, Sugimoto K, Maeda Y, Yoshida A, Kyono K, Namiki M (2010)** Features of constitutive gr/gr deletion in a Japanese population. *Hum Reprod* 25(9):2396– 2403.
- Skaletsky H, Kuroda-Kawaguchi T, Minx PJ, Cordum HS, Hillier L, Brown LG, Repping S, Pyntikova T, Ali J, Bieri T, Chinwalla A, Delhaunty A, Delhaunty K, Du H, Fewell G, Fulton L, Fulton R, Graves T, Hou SF, Latrielle P, Leonard S, Mardis E, Maupin R, McPherson J, Miner T, Nash W, Nguyen C, Ozersky P, Pepin K, Rock S, Rohlffing T, Scott K, Schultz B, Strong C, Tin-Wollam A, Yang SP, Waterston RH, Wilson RK, Rozen S, Page DC (2003)** The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature* 423:825-37.
- Skakkebaek NE (1972)** Possible carcinoma-in-situ of the testis. *Lancet* 2(7776):516-7.
- Skakkebaek NE (2016)** A Brief Review of the Link between Environment and Male Reproductive Health: Lessons from Studies of Testicular Germ Cell Cancer. *Horm Res Paediatr.* 86(4):240-246.
- Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Buck Louis GM, Toppari J, Andersson AM, Eisenberg ML, Jensen TK, Jørgensen N, Swan SH, Sapra KJ, Ziebe S, Priskorn L, Juul A (2016)** Male Reproductive Disorders and Fertility Trends: Influences of Environment and Genetic Susceptibility. *Physiol Rev.* 96(1):55-97.
- Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Main KM (2001)** Testicular dysgenesis syndorme: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Human Reproduction* 16:972-8.
- Smith M, van Casteren NJ, Wildhagen MF, Romijn JC, Dohle GR (2010)** Sperm DNA integrity in cancer patients before and after cytotoxic tratment. *Human Reproduction* 25 (8): 1877-1883.
- Spano M, Bonde JP, Hjøllund HI, Kolstad HA, Cordelli E, Leter G (2000)** Sperm chromatin damage impairs human fertility. The Danish first pregnancy planner study team. *Fertility and Sterility* 73:43-50.
- Ståhl O, Boyd HA, Giwercman A, Lindholm M, Jensen A, Kjær S, Anderson H, Cavallin-Ståhl E, Rylander L (2011)** Risk of Birth Abnormalities in the Offspring of Men With a History of Cancer: A Cohort Study Using Danish and Swedish National Registries. *Journal of the National Cancer Institute* 103(5):398-406.
- Stouffs K, Lissens W, Tournaye H, Haentjens P (2011)** What about gr/gr deletions and male infertility? Systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update* 17(2):197–209.
- Stouffs K, Lissens W, Verheyen G, Van Landuyt L, Goossens A, Tournaye H, Van Steirteghem A, Liebaers I (2004)** Expres- sion pattern of the Y-linked PRY gene suggests a function in apoptosis but not in spermatogenesis. *Mol Hum Reprod* 10(1):15–21.
- Suzuki K, Yumura Y, Ogawa T, Saito K, Kinoshita Y, Noguchi K (2013)** Regeneration of spermatogenesis after testicular cancer chemotherapy. *Urologia Internationalis* 91:445-450.
- Swerdlow AJ, De Stavola BL, Swanwick MA, Maconochie NE (1997)** Risks of breast and testicular cancers in young adult twins in England and Wales: evidence on prenatal and genetic aetiology. *Lancet.* 350(9093):1723-8.

- Tamburrino L, Cambi M, Marchiani S, Manigrasso I, Degl'Innocenti S, Forti G, Maggi M, Baldi E, Muratori M** (2015) Sperm DNA fragmentation in cryopreserved samples from subjects with different cancers. *Reprod Fertil Dev*. doi: 10.1071/RD15190.
- Tan IB, Ang KK, Ching BC, Mohan C, Toh CK, Tan MH** (2010) Testicular microlithiasis predicts concurrent testicular germ cell tumors and intratubular germ cell neoplasia of unclassified type in adults: a meta-analysis and systematic review. *Cancer*. 116: 4520–32.
- Tandstad T, Dahl O, Cohn-Cedermark G, Cavallin-Stahl E, Stierner U, Solberg A, Langberg C, Bremnes RM, Laurell A, Wijkström H, Klepp O** (2009) Risk-adapted treatment in clinical stage I nonseminomatous germ cell testicular cancer: The SWENOTECA management program. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 27: 2122-2188.
- Tempest HG, Ko E, Chan P, Robaire B, Rademaker A, Martin RH** (2008) Sperm aneuploidy frequencies analysed before and after chemotherapy in testicular cancer and Hodgkin's lymphoma patients. *Human Reproduction* 23(2):251-8.
- Thomas C, Cans C, Pelletier R, De Robertis C, Hazzouri M, Sele B, Rousseaux S, Hennebicq S** (2004) No long-term increase in sperm aneuploidy rates after anticancer therapy: sperm fluorescence in situ hybridization analysis in 26 patients treated for testicular cancer or lymphoma. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 10:6535-43.
- Tiepolo L, Zuffardi O** (1976) Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm. *Hum Genet* 34:119–124.
- Trottmann M, Becker AJ, Stadler T, Straub J, Soljanik I, Schlenker B, Stief CG** (2007) Semen quality in men with malignant diseases before and after therapy and role of cryopreservation. *European urology* 52(2):355-67.
- Tsui S, Dai T, Roettger S, Schempp W, Salido EC, Yen PH** (2000) Identification of two novel proteins that interact with germ- cell-specific RNA-binding proteins *DAZ* and *DAZL1*. *Genomics* 65(3):266–273.
- Tüttelmann F, Rajpert-De Meyts E, Nieschlag E, Simoni M** (2007) Gene polymorphisms and male infertility—a meta-analysis and literature review. *Reprod Biomed Online* 15(6):643–658
- Vaisheva F, Delbes G, Hales BF, Robaire B** (2007) Effects of chemotherapeutic agents for non-Hodgkin lymphoma, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (CHOP), on the male rat reproductive system and progeny outcome. *Journal of Andrology* 28: 578-87.
- Valsesia A, Macé A, Jacquemont S, Beckmann JS, Kutalik Z** (2013) The Growing Importance of CNVs: New Insights for Detection and Clinical Interpretation. *Front Genet*. 4:92.
- van Gurp RJ, Oosterhuis JW, Kalscheuer V, Mariman EC, Looijenga LH** (1994) Biallelic expression of the H19 and IGF2 genes in human testicular germ cell tumors. *J Natl Cancer Inst*. 86(14):1070-5.
- Vijesh VV, Nambiar V, Mohammed SI, Sukumaran S, Suganthi R** (2015) Screening for AZFc partial deletions in Dravidian men with nonobstructive azoospermia and oligozoospermia. *Genet Test Mol Biomark* 19(3):150–155.
- Virro MR, Larson-Cook KL, Evenson DP** (2004) Sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertility and Sterility* 81:1289-95.
- Virtanen HE, Bjerknes R, Cortes D, Jørgensen N, Rajpert-De Meyts E, Thorsson AV, Thorup J, Main KM** (2007) Cryptorchidism: classification, prevalence and long-term consequences. *Acta Paediatrica* 96(5):611-6.
- Visser L, Westerveld GH, Korver CM, van Daalen SK, Hovingh SE, Rozen S, van der Veen F, Repping S** (2009) Y chromosome gr/ gr deletions are a risk factor for low semen quality. *Hum Reprod* 24(10):2667–2673.
- Vogt PH, Edelmann A, Kirsch S, Henegariu O, Hirschmann P, Kiesewetter F, Köhn FM, Schill WB, Farah S, Ramos C, Hartmann M, Hartschuh W, Meschede D, Behre HM, Castel A, Nieschlag E, Weidner W, Gröne HJ, Jung A, Engel W, Haidl G** (1996) Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. *Hum Mol Genet* 5:933–943.
- Vogt PH, Falcao CL, Hanstein R, Zimmer J** (2008) The AZF proteins. *Int J Androl* 31(4):383–394.
- Vogt PH, Fernandes S** (2003) Polymorphic *DAZ* gene family in polymorphic structure of AZFc locus: artwork or functional for human spermatogenesis? *APMIS* 111:115–126.
- Wanderås EH, Fosså SD, Tretli S** (1997) Risk of a second germ cell cancer after treatment of a primary germ cell cancer in 2201 Norwegian male patients. *Eur. J. Hum. Genet*. 33(2):244-52.

- Wang YM, Li Q, Song LB, Zhang JY, Yang J, Song NH** (2016) Association of the deleted DAZ gene copy related to gr/gr and b2/b3 deletions with spermatogenic impairment. *Zhonghua Nan Ke Xue* 22(1):17–21
- Webster KE, O'Bryan MK, Fletcher S, Crewther PE, Aapola U, Craig J, Harrison DK, Aung H, Phutikanit N, Lyle R, Meachem SJ, Antonarakis SE, de Kretser DM, Hedger MP, Peterson P, Carroll BJ, Scott HS** (2005) Meiotic and epigenetic defects in Dnmt3L- knockout mouse spermatogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(11):4068-73.
- Wilson MA, Makova KD** (2009) Genomic analyses of sex chromosome evolution. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 10:333-54.
- Winther JF, Boice JD Jr, Mulvihill JJ, Stovall M, Frederiksen K, Tawn EJ, Olsen JH** (2004) Chromosomal abnormalities among offspring of childhood-cancer survivors in Denmark: a population-based study. *American Society of Human Genetics* 74:1282– 1285.
- Wong EY, Tse JY, Yao KM, Lui VC, Tam PC, Yeung WS** (2004) Identification and characterization of human VCY2-interacting protein: VCY2IP-1, microtubule-associated protein-like protein. *Biol Reprod* 70(3):775–784.
- Wong EY, Tse JY, Yao KM, Tam PC, Yeung WS** (2002) VCY2 protein interacts with the HECT domain of ubiquitin-protein ligase E3A. *Biochem Biophys Res Commun* 296(5):1104–1111.
- Wu B, Lu NX, XiaYK, Gu AH, Lu CC, Wang W, Song L, Wang SL, Shen HB, Wang XR** (2007) A frequent Y chromosome b2/b3 subdeletion shows strong association with male infertility in Han-Chinese population. *Hum Reprod* 22(4):1107–1113.
- Yaman, R., and Grandjean, V** (2006) Timing of entry of meiosis depends on a mark generated by DNA methyltransferase 3a in testis. *Molecular Reproduction and Development* 73(3):390-7.
- Yang F, Cao P, Zhou G** (2016) [Association of common copy number variations with diseases]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi.* 33(3):388-91.
- Yang Y, Ma M, Li L, Zhang W, Chen P, Ma Y, Liu Y, Tao D, Lin L, Zhang S** (2008a) Y chromosome haplogroups may confer susceptibility to partial AZFc deletions and deletion effect on spermatogenesis impairment. *Hum Reprod* 23(9):2167–2172.
- Yang Y, Ma M, Li L, Zhang W, Xiao C, Li S, MaY, Tao D, LiuY, Lin L, Zhang S** (2008b) Evidence for the association of Y-chromosome haplogroups with susceptibility to spermatogenic failure in a Chinese Han population. *J Med Genet* 45(4):210–215.
- Yang B, Ma YY, Liu YQ, Li L, Yang D, Tu WL, Shen Y, Dong Q, Yang Y** (2015) Common AZFc structure may possess the optimal spermatogenesis efficiency relative to the rearranged structures mediated by non-allele homologous recombination. *Sci Rep* 5:10551.
- Ye JJ, Ma L, Yang LJ, Wang JH, Wang YL, Guo H, Gong N, Nie WH, Zhao SH** (2013) Partial AZFc duplications not deletions are associated with male infertility in the Yi population of Yunnan Province. *China. J Zhejiang Univ Sci B* 14(9):807–815.
- Yen PH, Chai NN, Salido EC** (1996) The human autosomal gene *DAZL4*: testis specificity and a candidate for male infertility. *Hum Mol Genet* 5(12):2013–2017.
- Zheng W, Suzuki K, Shinohara R, Sato M, Yokomichi H, Yamagata Z.** (2015) Maternal smoking during pregnancy and growth in infancy: a covariance structure analysis. *J Epidemiol.*; 25(1):44-9.
- Zini A, Boman JM, Belzile E, Ciampi A** (2008) Sperm DNA damage is associated with an increased risk of pregnancy loss after IVF and ICSI: systematic review and metaanalysis. *Human Reproduction.* 23:2663-8.
- Zorn B, Auger J, Velikonja V, Kolbezen M, Meden-Vrtovec H** (2008) Psychological factors in male partners of infertile couples: relationship with semen quality and early miscarriage. *International Journal of Andrology* 31:557-64.

## ANNESSI

**Casamonti E**, Vinci S, Serra E, Fino MG, Brilli S, Lotti F, Maggi M, Coccia ME, Forti G, Krausz C. Short-term FSH treatment and sperm maturation: a prospective study in idiopathic infertile men. *Andrology*. 2017 May;5(3):414-422. doi:10.1111/andr.12333. Epub 2017 Mar 15. PubMed PMID: 28296254.

Krausz C, **Casamonti E**. Spermatogenic failure and the Y chromosome. *Hum Genet*. 2017 May;136(5):637-655. doi: 10.1007/s00439-017-1793-8. Epub 2017 Apr 29. Review. PubMed PMID: 28456834.

Vaszkó T, Papp J, Krausz C, **Casamonti E**, Géczi L, Olah E. Discrimination of Deletion and Duplication Subtypes of the Deleted in Azoospermia Gene Family in the Context of Frequent Interloci Gene Conversion. *PLoS One*. 2016 Oct 10;11(10):e0163936. doi: 10.1371/journal.pone.0163936. eCollection 2016. Erratum in: *PLoS One*. 2017 Jan 30;12(1):e0171396. PubMed PMID: 27723784; PubMed Central PMCID: PMC5056753.

## ORIGINAL ARTICLE

**Correspondence:**

Csilla Krausz, Department of Experimental and Clinical Biomedical Sciences "Mario Serio", Sexual Medicine and Andrology Unit, Viale Pieraccini 6, 50139 Florence, Italy.  
E-mail: c.krausz@dfc.unifi.it

**Keywords:**

FSH therapy, male infertility, pharmacogenetics, spermatogenesis, sperm hyaluronic acid binding

Received: 18-Oct-2016

Revised: 16-Dec-2016

Accepted: 7-Jan-2017

doi: 10.1111/andr.12333

## Short-term FSH treatment and sperm maturation: a prospective study in idiopathic infertile men

<sup>1</sup>E. Casamonti, <sup>1</sup>S. Vinci, <sup>1</sup>E. Serra, <sup>1</sup>M. G. Fino, <sup>1</sup>S. Brilli, <sup>1</sup>F. Lotti, <sup>1</sup>M. Maggi, <sup>2</sup>M. E. Coccia, <sup>1</sup>G. Forti and <sup>1</sup>C. Krausz

<sup>1</sup>Sexual Medicine and Andrology Unit, Department of Experimental and Clinical Biomedical Sciences "Mario Serio", University of Florence, Florence, and <sup>2</sup>Center for Artificial Reproductive Techniques, University of Florence, Florence, Italy

**SUMMARY**

The standard FSH treatment is based on a 3 months period, after which both quantitative/qualitative improvement of sperm parameters and increased pregnancy rate were reported. In this prospective clinical trial, for the first time, we studied (i) Sperm hyaluronic acid binding capacity after highly purified FSH (hpFSH) treatment; (ii) the effect after short-term and standard treatment on this functional parameter. As secondary objective, we analyzed three SNPs on *FSHβ* and *FSHR* genes to define their potential predictive value for responsiveness. From a total of 210 consecutive patients, 40 oligo- and/or astheno- and/or teratozoospermic patients fulfilled the inclusion criteria. Treatment consisted in hpFSH 75 IU/L every other day for 3 months. To avoid potential biases derived from the lack of placebo, we analyzed each patient after 4–6 months of 'wash-out' period. After FSH treatment, we observed a statistically significant ( $p < 0.001$ ) improvement of the percentage of hyaluronic acid bound spermatozoa from basal to T1 (after 1 month) and to T3 (after 3 months). Importantly, these values returned to near-baseline value after the wash-out. The same results were detected for total motile sperm count after 3 months with return to baseline after wash-out. Forty-two percent of patients responded to the therapy with increasing hyaluronic acid binding capacity above the double of the Intraindividual Variation (IV) while 24% of patients reached above the normal Sperm-Hyaluronan Binding Assay (HBA) value. Further increase in 'responders' was observed at T3. The responsiveness to treatment resulted independent from *FSHR/FSHβ* polymorphisms. The significant positive effect on sperm maturity after 1 month opens novel therapeutic perspectives. In view of both the high cost and the relative invasiveness of treatment, the short protocol (1 month) could represent a viable FSH treatment option prior Assisted Reproductive Techniques since FSH, by acting on sperm maturation, increases the proportion of functionally competent cells.

**INTRODUCTION**

Infertility affects approximately 15% of couples and male factor is present in approximately 50% of cases. The etiology of impaired sperm production and function can be related to endocrine, genetic/epigenetic and environmental factors (Krausz, 2011; Tournaye *et al.*, 2016a). Despite progresses in diagnosing the causes of infertility, in about 30–50% cases, the etiology remains unknown and it is termed 'idiopathic infertility'. In this category of patients a number of empirical treatments have been proposed from antioxidant to hormonal therapies with controversial results (for review see Tournaye *et al.*, 2016b). A recent meta-analysis of 15 controlled clinical trials in which FSH was administered to idiopathic infertile men (compared with placebo or no treatment) showed that FSH administration to the male partner significantly improves sperm concentration and

pregnancy rate both spontaneously or after Assisted Reproductive Techniques (ART; Santi *et al.*, 2015). However, because of heterogeneity of the studies, data quality is not considered optimal by the authors of the meta-analysis, leaving FSH treatment in idiopathic infertility still an open question. In addition, studies dealing with FSH therapy and sperm parameters have clearly shown that only a portion (approximately 50%) of treated subjects respond in terms of quantitative and qualitative improvement of spermatogenesis. The impossibility to predict responsiveness to treatment remains therefore a great limitation to this relatively expensive therapeutic approach and has prompted some authors to search for predictive parameters (Glander and Kratzsch, 1997; Foresta *et al.*, 2000). Pharmacogenetics seems to be a promising tool as two SNPs (*FSHβ* c.-211G>T, rs10835638; *FSHR* c.2039A>G, rs6166) have been



proposed as predictive factors (Ferlin *et al.*, 2011; Selice *et al.*, 2011).

Data in the literature refer to the standard FSH treatment's length which is 3–4 months, covering the entire period of spermatogenesis. So far, no studies have been conducted to assess the effect of FSH treatment on the last phase of spermatogenesis. To define whether FSH treatment can positively affect sperm maturation, i.e. spermiogenesis, we selected a functional test, the Sperm-Hyaluronan Binding Assay (HBA; Huszar *et al.*, 2003). The hyaluronic acid (HA) binding capacity of spermatozoa appears to be correlated with cellular and chromatin maturity, DNA integrity, chromosomal aneuploidy frequency and sperm function (Huszar *et al.*, 2000, 2003, 2007; Cayli *et al.*, 2003; Roudebush *et al.*, 2004; Jakab *et al.*, 2005; Prinosilova *et al.*, 2009; Yagci *et al.*, 2010). Hyaluronic acid or hyaluronan is a molecule involved in the natural process of human fertilization as it seems to play a pivotal role in physiological sperm selection. The exposure of receptors for hyaluronic acid on sperm cells surface indicates that these cells have completed the remodeling of plasma membrane. Only mature spermatozoa which have correctly completed spermiogenesis expose on their surface a high density of HA receptors (Huszar *et al.*, 2003). Accordingly, the HA binding capacity can be considered a biomarker of fully completed spermiogenesis. By evaluating both HA binding capacity and sperm creatine kinase activity in the same sample it has been proposed that an HA binding over 60% is compatible with the use of a less invasive-assisted reproduction technique such as IUI or even with natural conception (Huszar *et al.*, 2002; Huszar *et al.*, 2007).

Moreover, in subjects showing  $\leq 65\%$  of HA binding, the selection of Hyaluronan-Bound (HB) spermatozoa for Intra Cytoplasmic Sperm Injection (ICSI) led to a statistically significant reduction in pregnancy loss rate in respect to direct ICSI performed with a sperm selection based upon the visual examination of morphology and motility alone (Worrilow *et al.*, 2013).

Sperm HA binding capacity could therefore represent not only a good predictor for sperm maturity but also a better predictor of the probability to conceive in respect to 'classic' semen parameters. Our study is the first aiming to evaluate whether FSH therapy is effective in improving HA binding capacity in idiopathic infertile men and whether this effect is present already after 1 month of therapy (during spermiogenesis). As secondary endpoints, we analyzed two selected sperm parameters: total sperm number (TSN) and total motile sperm count (TMSC) in relationship with the 3 months treatment. Finally, we aimed at defining the predictive capacity of hormonal, seminal and genetic parameters to HA binding-response following FSH administration.

## MATERIALS AND METHODS

### Study population

Two hundred and ten consecutive infertile men attending the Sexual Medicine and Andrology Clinics of the University Hospital, Florence, Careggi underwent a comprehensive clinical examination: medical history, physical examination, hormonal dosage, semen analysis (according to WHO guidelines), karyotype and Y chromosome microdeletion analysis. In 107 patients all known causes of infertility have been excluded and 70 of them presented either impaired sperm number

(oligozoospermia) or impaired sperm motility (asthenozoospermia) or reduced normal morphology (teratozoospermia) or the combination of the above anomalies (oligoasthenoteratozoospermia) with FSH value  $< 8$  IU/L. At baseline or during the treatment period 30 patients were excluded/dropped out for various reasons reported in Figure S1. A total of 40 patients completed the study. None of these men experienced a previous fatherhood, i.e. all cases were of primary infertility.

All patients received 75 IU/L of highly purified FSH (hpFSH Fostimon; IBSA, Lodi, Italy), every other day for 3 months and they were evaluated in four different time intervals: (i) at baseline (T0); (ii) after 1 month of FSH therapy (T1); (iii) after 3 months of FSH therapy (T3); (iv) 4–6 months after the end of therapy (wash-out or second baseline value).

Seminal samples were collected at T0, T1, T3 and wash-out to evaluate seminal parameters and to perform HBA. For each patient (except one), a blood sample was collected at T0 for molecular genetic analysis. During the study, one drop-out was registered, because of the patient's inability to participate at each visit planned for the study.

### Semen analysis

All semen parameters were obtained from semen analysis in accordance with World Health Organization (WHO) criteria (WHO, 2010). The seminal fluid was obtained by masturbation. We selectively considered TSN and TMSC in the seminal fluid. The TSN was obtained considering the volume of ejaculate and the sperm concentration (calculated with Neubauer-improved chambers). The TMSC represents the total number of progressive motile spermatozoa in the seminal fluid; it can be considered a more reliable indicator of the severity of spermatogenic disturbance as it reflects both numerical and functional competence (progressive motility) of a given ejaculate. TMSC was calculated considering the TSN and the progressive sperm motility  $[(\text{total sperm number} \times \text{progressive sperm motility})/100]$ .

### Sperm-Hyaluronan Binding Assay

The HBA test (HBA Sperm-Hyaluronan Binding Assay; Biocoat, Horsham, PA, USA) distinguishes the mature from immature spermatozoa. The mature spermatozoa bind hyaluronan of the *cumulus oophorus* matrix. Therefore, these spermatozoa have also the capacity to bind hyaluronan chemically attached to a solid support like the HBA slide. The HBA slide has two identical hyaluronan-coated assay chambers. The HBA test was performed in accordance with the instructions for use. The seminal fluid, obtained by masturbation, was kept at 20–28 °C for 30 min to liquefy. Before use, the sample was mixed and a drop of 10  $\mu\text{L}$  in the center of an assay chamber of the slide was loaded. Immediately the cover slip was installed with a viewing circle upward and over the chamber. Then the slide was incubated at room temperature and was read after 10–15 min allowing mature spermatozoa to bind the immobilized hyaluronan layer. Scoring was performed on at least 100 motile bound and unbound spermatozoa with the final calculation of the percentage of hyaluronan-bounded spermatozoa as follows:  $[\text{Bound Motile Sperm}/(\text{Bound Motile Sperm} + \text{Unbound Motile Sperm})] \times 100$ .

### Definition of responders for TSN, TMSC and HBA values

To define 'true' responders, we first aimed to evaluate the Intraindividual Variation (IV) for each selected parameter in our

cohort. Semen analysis and HBA assay were performed twice (two semen collections at a distance from 1 to 6 months) in 50 untreated subjects (40 enrolled and 10 not-enrolled subjects). The Intraindividual Variation for each parameter was calculated as follows: [(parameter's mean analyzed 'basal 1' - parameter's mean analyzed at 'basal 2') / parameter's mean analyzed at 'basal 2']  $\times$  100. The IV for TSN and TMSC was 84%, whereas for HBA it was 23%.

IVs were used as threshold values to define 'responders' and 'non-responders' in an arbitrary way. For TSN and TMSC, we defined 'responders' those patients presenting improvement above the IV.

For HBA two types of 'responders' were defined: (i) 'responders A' with an improvement above the double of the IV value; (ii) 'responders B' with a % HA binding greater than an absolute HBA value equal or above 60% (compatible with lower limit value for normal semen according to Huszar *et al.*, 2002; Kovacs *et al.*, 2011; Molnar *et al.*, 2014).

### Genotyping

Genomic DNA was extracted from EDTA-preserved blood using the Salting-out method. Concentration and purity of DNA were measured with Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA). Minor Allele Frequency of the three SNPs referring to the general population was obtained from 1000 Genomes, ExAC and GO-ESP. For one patient who has completed the study, it was not possible determining the genotypes.

### Molecular analysis for polymorphism rs10835638 of FSH $\beta$

The polymorphism rs10835638 in position -211 of FSH $\beta$  gene was analyzed by PCR followed by RFLP analysis (Restriction Fragment Length Polymorphism analysis) using *RsaI* restriction enzyme (for more details, see 'Supporting information'). All homozygous TT patients were confirmed by Sanger sequencing.

### Molecular analysis for polymorphisms rs6166 and rs1394205 of FSHR

PCR and HRMA (High-Resolution Melting Analysis) using RotoreGene (QIAGEN, Hilden, Germany) were performed to analyze polymorphism rs6166 in position 2039 on exon 10 of FSHR gene and polymorphism rs1394205 in position -29 of the same gene (for more details, see 'Supporting information'). Sanger sequencing of samples with three different HRMA profiles was performed to validate the HRMA method. In addition all homozygous mutated samples and samples with ambiguous profile for the two SNPs were confirmed by Sanger sequencing.

### Statistical analysis

All analyses were performed with statistical package SPSS (version 23.0; SPSS Inc, Chicago, IL, USA). Comparisons for parameters with normal distribution such as % HBA was performed using the 'Paired samples *T*-test': (i) mean HA binding values before and after 1 and 3 months of FSH treatment; (ii) mean HA binding values between subgroups after the stratification on the basis of: baseline sperm parameters (TSN and TMSC), HA binding, baseline FSH, testis volume and FSH $\beta$ /FSHR polymorphisms. 'Non-parametric Mann-Whitney *U* test' for paired samples was used for comparisons of the medians

of semen parameters before and after 3 months of FSH treatment. *p* values are reported and *p* < 0.05 was considered to indicate statistical significance.

### Ethical approval

The local Ethics Committees of the AOUC of Florence approved the study (n. 89/12). All participants gave their informed written consent.

### RESULTS

From 210 patients 70 were enrolled according to the criteria described in 'Materials and Methods'. During the study, 30 patients were excluded or dropped out for various reasons reported in Figure S1. Forty patients were finally evaluated for semen parameters and HBA at baseline (T0), after 1 (T1) and 3 (T3) months of FSH therapy and after 4–6 months from the FSH therapy discontinuation (*wash-out* or second baseline value). As HBA necessitates a minimum number of motile spermatozoa, this test was not possible to perform in 2/40 patients at T1. The mean values of each analyzed parameter in our study population are shown in Table S1. No drug-related adverse effect was observed.

### FSH treatment vs. HBA

After 1 month of FSH therapy HBA test showed a significant improvement of spermatozoa % HA binding capacity from T0 (30.04  $\pm$  2.23%) to T1 (41.22  $\pm$  3.26%; *p* < 0.001) showing an average increase of 37% (Fig. 1A).

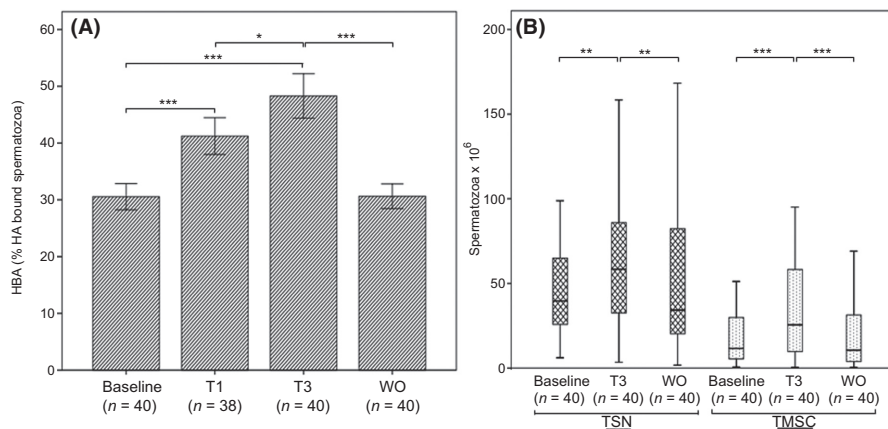
After 3 months of therapy, HA binding capacity further increased, and resulted significantly higher in respect to baseline (47.25  $\pm$  3.79%; *p* < 0.001) with an average 57% increase. The T3 value was significantly higher in respect to T1 value (*p* = 0.042) and importantly, we observed a return to baseline value after the wash-out period of 4–6 months (Fig. 1A). For % HA binding we used two distinct criteria to define responsiveness as indicated in 'Materials and Methods': (i) 'responders A' with an increase equal or above the double of the Intraindividual Variation (>46%); (ii) 'responders B' with % HA binding equal or above an absolute value of 60%. Concerning 'responders A' we observed 42% of patients (16/38) at T1, with a further increase to 63% (25/40) at T3. 'Responders B' (who achieved normalization of % HA binding), were 24% (9/38) after 1 month with a further increase to 35% (14/40) after 3 months of FSH therapy.

Among patients who showed an increase in HBA value during treatment, we observed three distinct patterns (Figure S2): (i) 'rapid responders' (patients with a response to FSH therapy after 1 month and a subsequent *plateau* of HB values at T3); (ii) 'slow responders' (patients with a pronounced improvement of HB values only after 3 months); (iii) 'progressive responders' (patients in whom the HBA values improve progressively throughout the duration of FSH therapy).

### FSH treatment vs. selected semen parameters

We evaluated two semen parameters reflecting the entire spermatogenic cycle: TSN and TMSC. We found a statistically significant improvement of TSN and TMSC after 3 months of treatment and a return to near-baseline values after FSH therapy wash-out (Fig. 1B). As far as TSN is concerned, a statistically significant improvement was observed from the basal (median:

**Figure 1** Dynamic of responsiveness to FSH treatment and comparison of selected semen parameters at different time points of observation: (A) effect of treatment on Hyaluronan Binding capacity of spermatozoa reported as %HBA: the bars show the HBA mean values, the whiskers cover the SEM (Standard Error of Mean) of the raw data; (B) effect of treatment on Total Sperm Number (TSN) and Total Motile Sperm Count (TMSC): the boxes represent the 25th and 75th percentiles, the whiskers cover the minimum and maximum of the raw data, the median value is denoted as the line that bisects the boxes. HBA, Hyaluronan Binding Assay; HA, hyaluronic acid; Baseline = before the therapy; T1 = after 1 month of therapy; T3 = after 3 months of therapy; WO = second baseline after 4–6 months from hpFSH withdrawal. \* $p \leq 0.05$ ; \*\* $p \leq 0.01$ ; \*\*\* $p \leq 0.001$ .  $p$  values referring to the comparison between WO vs. T1/T3 are the same as for T0; no significant differences between T0 vs. WO.



$39.72 \times 10^6$ , min–max:  $6.13\text{--}221 \times 10^6$ ) vs. T3 value (median:  $58.38 \times 10^6$ , min–max:  $3.49\text{--}300.60 \times 10^6$ ) ( $p = 0.002$ ). Similarly, we found a significant increase in TMSC when we compared the T0 value (median:  $11.59 \times 10^6$ , min–max:  $0.64\text{--}85.69 \times 10^6$ ) with T3 value (median:  $25.55 \times 10^6$ , min–max:  $0.37\text{--}95.04 \times 10^6$ ) ( $p = 0.000$ ) with an average increase of 121%. In addition, we found a significant increase in sperm morphology from baseline (median: 1%, min–max: 1–5%) to T3 (median: 2%, min–max: 1–7%) ( $p = 0.008$ ) after FSH therapy.

On the basis of the previously defined Intraindividual Variation (IV), we divided the patient cohort into ‘responders’ (>IV) and ‘no responders’ (<IV) for the two selected parameters. Patients responding in terms of TSN and TMSC were 30% (12/40) and 53% (21/40), respectively.

## Search for predictive parameters for HBA responsiveness

### Baseline sperm parameters

**Total sperm number.** In this study, we included infertile males, regardless the TSN at baseline. Consequently, the study population is made up by subjects with TSN below and above the normal range (39 million, as defined according to WHO, 2010 guidelines): 19 men belonged to the >39 million category (48%), with impaired motility/morphology (asthenoteratozoospermic, AT), and 21 (52%) were oligoasthenoteratozoospermic (OAT)

patients. We sought to analyze whether HBA responsiveness to FSH therapy was related to basal sperm number.

Sperm-Hyaluronan Binding Assay baseline values were not significantly different between AT and OAT patients. In AT patients, we assessed a significant improvement of HBA value from T0 to T1 ( $p = 0.01$ ) and T3 ( $p = 0.001$ ) showing an average 44 and 77% increase, respectively (Table 1). Similarly, in the OAT group HBA values significantly increased from T0 to T1 ( $p = 0.001$ ) and T3 ( $p = 0.004$ ) with an extent of the improvement of HBA values of 33 and 57%, respectively (Table 1). Finally, the frequency of ‘responders’ (both type ‘A’ and ‘B’) was similar in the two subgroups (AT vs. OAT) after 1 and 3 months of FSH treatment (Table 2). The distribution of the two semen categories in the ‘responder’ groups is reported in Table S2.

**Total motile sperm count.** Given that for this parameter there is no normal reference value given by the WHO, we have used a commonly accepted value of TMSC  $10 \times 10^6/\text{mL}$  (Ombelet et al., 2014 and references herewith). On this basis, we stratified our cohort in two groups patients with a low baseline TMSC ( $<10 \times 10^6/\text{mL}$ , 19/40, 48%) and patients with ‘normal’ TMSC ( $\geq 10 \times 10^6/\text{mL}$ , 21/40, 52%). No differences in HA binding baseline values were observed between the two groups. In both groups, a significant increase in HA binding was observed after 1 and 3 months of therapy in respect to baseline: (i) in patients with ‘normal’ TMSC from T0 to T1 ( $p = 0.005$ ) and T3

**Table 1** Comparison of the mean% hyaluronic acid binding before and after FSH therapy in different subgroups based on baseline semen characteristics

	Baseline (mean% $\pm$ SD)	T1 (mean% $\pm$ SD)	T3 (mean% $\pm$ SD)
AT ( $n = 19$ )	29.46 $\pm$ 17.74	41.75 $\pm$ 23.24**	50.05 $\pm$ 26.38***
OAT ( $n = 21$ )	30.11 $\pm$ 13.08	40.75 $\pm$ 17.32***	44.73 $\pm$ 21.93**
TMSC $< 10 \times 10^6$ ( $n = 19$ )	30.40 $\pm$ 13.35	41.04 $\pm$ 17.20**	45.88 $\pm$ 21.34**
TMSC $\geq 10 \times 10^6$ ( $n = 21$ )	29.72 $\pm$ 15.08	41.39 $\pm$ 22.79**	48.50 $\pm$ 26.61***
Baseline HBA $< 30\%$ ( $n = 21$ )	18.45 $\pm$ 6.66	28.79 $\pm$ 16.11**	34.78 $\pm$ 21.48***
Baseline HBA $\geq 30\%$ ( $n = 19$ )	42.85 $\pm$ 7.21	53.66 $\pm$ 15.54*	61.04 $\pm$ 18.73**

Baseline = mean value obtained from two observations: prior therapy and wash-out (after therapy); T1 = after 1 month of therapy; T3 = after 3 months of therapy; SD, standard deviation; AT, asthenoteratozoospermic; OAT, oligoasthenoteratozoospermic; TMSC, total motile sperm count; HBA, Hyaluronan Binding Assay. \* $p \leq 0.05$ ; \*\* $p \leq 0.01$ ; \*\*\* $p \leq 0.001$ .

**Table 2** Comparison of the frequency (number) of 'responders A' and 'B' in different subgroups based on baseline semen characteristics

	AT vs. OAT	TMSC < 10 × 10 <sup>6</sup> vs. TMSC ≥ 10 × 10 <sup>6</sup>	HBA < 30% vs. HBA ≥ 30%
Responders			
'A'			
Baseline-T1	44% (8/18) vs. 40% (8/20)	39% (7/18) vs. 45% (9/20)	47% (9/19) vs. 37% (7/19)
Baseline-T3	68% (13/19) vs. 57% (12/21)	58% (11/19) vs. 67% (14/21)	67% (14/21) vs. 58% (11/19)
'B'			
Baseline-T1	28% (5/18) vs. 20% (4/20)	22% (4/18) vs. 25% (5/20)	5% (1/19) vs. 42% (8/19)*
Baseline-T3	42% (8/19) vs. 29% (6/21)	26% (5/19) vs. 43% (9/21)	14% (3/21) vs. 58% (11/19)**

'Responders A' = hyaluronic acid (HA) binding more than double Intraindividual Variation (46%); 'Responders B' = HA binding ≥60%; Baseline = mean value obtained from two observations: prior therapy and wash-out (after therapy); T1 = after 1 month of therapy; T3 = after 3 months of therapy; AT, asthenoteratozoospermic; OAT, oligoasthenoteratozoospermic; TMSC, Total Motile Sperm Count; HBA, Hyaluronan Binding Assay.  
\* $p \leq 0.05$ ; \*\* $p \leq 0.01$ .

( $p < 0.001$ ) showing an average 39 and 63% increase, respectively (Table 1); (ii) in patients with a low TMSC from T0 to T1 ( $p = 0.002$ ) and T3 ( $p = 0.007$ ) showing an average 35 and 51% increase, respectively (Table 1). The extent of the observed improvements was not different between the two subgroups. Also for this parameter the frequency of 'responders' (both type 'A' and 'B') was similar in the two subgroups after FSH treatment (Table 2). The distribution of the two semen categories in the 'responder' groups are reported in Table S3.

**Sperm-Hyaluronan Binding Assay.** On the basis of the basal median % HA binding at T0, we divided our cohort into two groups: patients with a baseline % HA binding <30% (21/40, 53%) and patients with % HA binding ≥30% (19/40, 47%). This cut-off value was chosen based on a previous article by Mokánszki *et al.* (2012), reporting the HBA value of 30% as the mean value in oligoasthenozoospermic patients. An additional reason for using this value is that this cut-off divided our study population into two groups with equal number of patients, making statistical analysis more reliable.

Both groups displayed a significant improvement for HBA values: (i) patients with HBA baseline values <30% from T0 to T1 ( $p = 0.002$ ) and T3 ( $p = 0.001$ ) showing an average 56 and 89% increase, respectively; (ii) patients with HBA baseline values ≥30% from T0 to T1 ( $p = 0.01$ ) and T3 ( $p = 0.002$ ) showing an average 25 and 42% increase, respectively (Table 1). Despite a more pronounced improvement in the group of patients with baseline HBA < 30%, the average increase for any time point was not statistically different between the two subgroups.

The frequency of 'responders A' between the two subgroups was similar, whereas as expected, there was a significant difference concerning 'responders B' (Table 2). In fact, when we considered the threshold of % HA binding ≥60% ('normalization' of HBA), a significantly higher percentage of patients with baseline % HA binding ≥30% showed a normalization of the % HA binding both after 1 (42% vs. 5%,  $p = 0.019$ , OR = 13.09 with 95% CI = 1.44–119.34) and 3 months (58% vs. 14%,  $p = 0.007$ , OR = 8.25 with 95% CI = 1.80–37.88). Of note, 5/8 (63%) of 'responders B' showed a baseline % HA binding <50%, with a mean of  $36 \pm 4.7\%$ .

#### Baseline FSH and testis volume

We did not find any difference concerning baseline FSH values or testicular volumes between HBA 'responders' and 'non-responders' groups (both type 'A' and type 'B') (Table S1).

#### FSHβ and FSHR polymorphisms

We stratified our population according to *FSHβ* –211G>T, to *FSHR* 2039A>G and to *FSHR* –29G>A genotypes. Baseline characteristics of patients with different genotypes are listed in Table S3. No significant difference was found between patients with 'wild-type' and at least one mutant allele when we compared baseline HA binding, TSN, seminal volume, sperm morphology, TMSC, FSH, LH, testosterone and testicular volume.

We compared the allelic distribution of the three SNPs in our cohort vs. that reported in the general population (data from 1000 Genomes, ExAC and GO-ESP): (i) the frequency of the mutated T-allele for *FSHβ* –211G>T SNP was significantly increased in our patients vs. the general population (15.2% vs. 8.4%, respectively,  $p = 0.028$ ); (ii) a slightly higher (but not statistically significant) frequency of the mutated G-allele in our cohort for *FSHR* 2039A>G SNP (53% vs. 41% in the general population); (iii) similar allelic distribution for *FSHR* –29G>A SNP in the two groups (21% vs. 34%).

Considering *FSHβ* –211G>T SNP genotypes, 25 patients (64%) were GG homozygotes ('wild-type group') and 14 (36%) were GT heterozygotes or TT homozygotes ('mutant group'). In both groups there was a significant difference concerning the HBA values between baseline and after 1 ( $p = 0.001$  and  $p = 0.019$ ) and 3 months ( $p < 0.001$  and  $p = 0.016$ ) of FSH treatment (Table 3).

Considering *FSHR* 2039A>G SNP genotypes, eight patients (21%) were AA homozygotes ('wild-type group') and 31 (79%) were either AG heterozygotes or GG homozygotes ('mutant group'). Concerning the 'wild-type' genotype, there was a statistical difference in HBA value only between baseline and after 3 months ( $p = 0.012$ ) of FSH treatment. In the 'mutant' (AG and GG) genotype subgroup, there were statistical differences in HBA values between baseline and after both 1 and 3 months therapy ( $p < 0.001$  for both) (Table 3).

Considering *FSHR* –29G>A SNP genotypes, 21 patients (54%) were GG homozygotes ('wild-type group') and 18 (46%) were GA heterozygotes or AA homozygotes ('mutant group'). There was a significant difference in HBA value in both groups between baseline and after 1 ( $p = 0.028$  and  $p < 0.001$ ) and 3 months ( $p = 0.003$  and  $p = 0.002$ ) of FSH treatment (Table 3).

The extent of improvement of HBA values from T0 to T1 and to T3 were similar in the different genotypes, with the exception of *FSHR* 2039A>G at T1 (Table S4).

**Table 3** Comparison between mean% hyaluronic acid binding at T0, T1 and T3 between patients stratified on the basis of *FSHβ* -211G>T, *FSHR* 2039A>G and *FSHR* -29G>A genotypes

	HAB (mean% ± SD)		
	Baseline	T1	T3
<i>FSHβ</i> -211G>T			
GG (n = 25)	31.55 ± 15.41	41.45 ± 20.05***	47.30 ± 20.52***
GT-TT (n = 14)	27.92 ± 12.02	40.78 ± 20.91*	48.77 ± 30.12*
<i>FSHR</i> 2039A>G			
AA (n = 8)	27.74 ± 12.07	37.64 ± 16.36	47.19 ± 16.14*
AG-GG (n = 31)	30.90 ± 14.84	42.03 ± 20.96***	47.99 ± 25.88***
<i>FSHR</i> -29G>A			
GG (n = 21)	31.44 ± 13.14	41.20 ± 20.86*	48.84 ± 21.6**
GA-AA (n = 18)	28.85 ± 15.67	41.25 ± 19.7***	46.64 ± 27.15**

Baseline = mean value obtained from two observations: prior therapy and wash-out (after therapy); T1 = after 1 month of therapy; T3 = after 3 months of therapy; SD, standard deviation. \* $p \leq 0.05$ ; \*\* $p \leq 0.01$ ; \*\*\* $p \leq 0.001$ .

## DISCUSSION

FSH and Testosterone are crucial hormones for a quantitatively and qualitatively normal spermatogenesis. Consequently, both FSH and human chorionic gonadotropin (able to stimulate the Testosterone synthesis in Leydig cells) are necessary in patients affected by hypogonadotropic hypogonadism. In case of idiopathic infertility the treatment is limited to FSH because Testosterone level in these patients is normal. Two meta-analyses suggest that therapy with exogenous FSH (for at least 3 months) in idiopathic infertile men with normal FSH levels promotes a quantitative and qualitative improvement of semen parameters and pregnancy rate (Attia *et al.*, 2013; Santi *et al.*, 2015).

Our study is the first focusing on the effect of hpFSH treatment on a functional sperm parameter called HA binding capacity. HA binding capacity is a faithful biomarker of the entire cycle of spermatogenesis, in particular of the final phase of this process, called 'spermiogenesis'. In fact, this sperm parameter reflects the degree of maturation, the morpho-structural, functional and genomic integrity of spermatozoa. Accordingly, our aim was to evaluate the effect of FSH treatment not only after the entire cycle of spermatogenesis (3 months) but also to test whether spermiogenesis (the last 1 month of spermatogenesis) would be also affected positively by the drug. In fact, several experimental evidences support the concept that FSH in concert with Testosterone is essential also in the regulation of the latest phases of spermatogenesis. In vitro studies on human germ cells showed that FSH stimulates meiosis II and round spermatid flagellum extrusion, whereas Testosterone potentiates FSH action and stimulates late spermatid differentiation (Sousa *et al.*, 2002). Both hormones are considered as survival factor for spermatocytes and spermatids through the regulation of both the intrinsic and the extrinsic apoptotic pathways (Ruwanpura *et al.*, 2008). In FSH receptor knockout mice, there is a disturbance in the normal replacement of histones by protamines during spermiogenesis, leading to poor condensation of spermatid nuclei (Krishnamurthy *et al.*, 2000). Previous human studies demonstrated a positive effect of FSH therapy on ultrastructural sperm characteristics and DNA condensation (Bartoov *et al.*, 1994; Baccetti *et al.*, 1997, 2004; Kamischke *et al.*, 1998; Ben-Rafael *et al.*,

2000; Piomboni *et al.*, 2009). Moreover, recent studies showed that FSH therapy improves sperm DNA integrity in men with idiopathic oligoasthenozoospermia by reducing DNA fragmentation index (Palomba *et al.*, 2011; Colacurci *et al.*, 2012; Ruvolo *et al.*, 2013).

To date, no data are available on the effect of FSH therapy on HA binding capacity in idiopathic infertile males. HA is the main constituent of the extracellular matrix surrounding the cumulus, crucial in the natural fertilization process. Only mature spermatozoa have the ability to bind HA and thus the cumulus since only after the completion of the maturation process they exhibit HA receptors on their surface. The ability of spermatozoa to bind HA indicates adequate maturation and morphology, a lower level of chromosomal aneuploidies, a lower DNA fragmentation level, a greater chromatin integrity and, consequently, a greater fertilizing potential (Huszar *et al.*, 2003; Jakab *et al.*, 2005; Prinosilova *et al.*, 2009; Yagci *et al.*, 2010; Worrilow *et al.*, 2013).

In our study, we evaluated the percentage of spermatozoa able to bind HA after 1 (T1) and 3 months (T3) of purified FSH treatment (75 IU/L every other day) in patients affected by idiopathic infertility with oligo-, astheno- or teratozoospermia, normal FSH values (1.5–8 IU/L) and baseline HBA values <60%. We found a significant improvement of HA binding capacity at T1 and at T3 with a 37 and 57% increase, respectively. We observed a high proportion of responsive patients both after one (46% 'responders A') and 3 months of therapy (62% of 'responders A'), reaching in 35% of them a value higher than the HBA 'normality' threshold (>60%). It is important to note that although it is not a double-blind placebo controlled trial, the study design included two baseline evaluations: prior and after the end of the FSH therapy (wash-out). After the wash-out, the observed return of the values to the baseline (pre-therapy) values, supports a potential causative relationship between the drug administration and the observed improvement of the sperm parameters.

Besides the effect on a functional parameter such as HA capacity, we focused our attention on selected sperm parameters, i.e. TSN and the TMSC. After 3 months of therapy (corresponding to an entire spermatogenic cycle), we observed a statistically significant increase in both TSN ( $p < 0.001$ ) and TMSC ( $p < 0.001$ ), with an extent of improvement of 44 and 138% compared with baseline, respectively. Similarly, to HBA also for these parameters we observed a return to the baseline values after 4–6 months from the end of therapy. The percentage of 'responders' (response greater than the Intraindividual Variation in our cohort) for TSN and TMSC was equal to 28 and 53%, respectively. We therefore showed, in line with previous studies that FSH therapy is able to substantially improve semen parameters in about 50% of men affected by idiopathic infertility (Forresta *et al.*, 2002, 2005; Ferlin *et al.*, 2011; Selice *et al.*, 2011).

Our study demonstrates the efficacy of hpFSH administration in idiopathic infertile men, in improving not only TSN and TMSC (after 3 months of treatment) but also functional parameters, such as HA capacity (both after 1 and 3 months of treatment). However, as previously reported, this improvement was found in approximately 30–50% of subjects, depending on the parameter analyzed. The reason behind 'responsiveness' remains largely unclear. We have taken into consideration a series of baseline parameters to evaluate their predictive value for predicting HBA responsiveness. To this purposes we compared subgroups based on baseline values of sperm count

(oligozoospermic vs. astheno/teratozoospermic patients), TMSC (< or >10 millions spermatozoa), FSH value, bilateral testis volume and HBA value. A significant increase in the HBA value was found in all subgroups indicating a lack of predictive power of the above baseline parameters. Concerning 'responders B', i.e. patients achieving HBA absolute values  $\geq 60\%$ , which has been proposed as a 'cut-off' for a less invasive-assisted reproduction techniques such as IUI or even natural conception (Huszar *et al.*, 2002, 2007), we did observed differences between the two subgroups. As expected, a significantly higher percentage of 'responders B' belonged to the subgroup of baseline HBA value 30–60%. In particular, patients with higher HBA baseline values showed a probability almost 13 times higher (OR = 13.09; 95% CI = 1.44–119.34) to reach and/or exceed the clinical cut-off of 60% after 1 month of therapy. Interestingly, also 14% of subjects with HBA value <30% showed a 'normalization' at T3. This percentage reached to 58% in the subgroup with HBA 30–60% with a mean baseline HBA value of  $36 \pm 4.7\%$ . Our finding shows that the 'normalization' of the HBA values is an achievable objective with FSH treatment both after 1 and 3 months.

In the last few years, several studies highlighted the influence of *FSH $\beta$*  and *FSHR* polymorphisms on men's gonadic function and reproductive parameters (Grigorova *et al.*, 2008, 2010, 2011, 2013, 2014; Tüttelmann *et al.*, 2012). To date, only three pharmacogenetic studies have been conducted in relationship with two polymorphisms. Selice *et al.* (2011) and Ferlin *et al.* (2011) reported a strict correlation between the presence of *FSH $\beta$*  (–211G>T) and *FSHR* (Asn680Ser and Thr307Ala) polymorphisms and response to treatment. In their studies, patients carrying the mutated allele of *FSH $\beta$*  and *FSHR* showed a significantly higher improvement of the 'classical' seminal parameters (total sperm count, motility and morphology) than patients with 'wild type' genotype. On the other hand, a recent paper from Simoni *et al.* (2016) demonstrated that FSH administration is effective in reducing sperm DNA fragmentation in men carrying the combined *FSHR* p.N680S N homozygous and *FSH $\beta$*  –211G>T G homozygous genotypes (i.e. 'wild type' genotypes).

We have analyzed three different SNPs: *FSH $\beta$*  –211G>T, *FSHR* Asn680Ser and *FSHR* –29G>A. Ferlin *et al.* (2011) reported that 100% of patients with the mutated genotype responded to the therapy in terms of doubling of the sperm count after 3 months of treatment. Such an effect was not detectable in our two patients carrying the mutated 'T' allele in homozygosis and both resulted 'non-responders' for TSN after 3 months of treatment. Although our study is not powered to detect relatively milder effect of the genotype on FSH responsiveness, based on our data we can conclude that there is no clear-cut effect of the genotype in predicting response to treatment, neither with regard to classical semen parameters, nor to HA binding capacity. Also concerning the two other SNPs we were unable to detect a 'responsive' or 'non-responsive' genotype; hence, we did observe a significant improvement of HBA values regardless to which genotype subgroups belonged our patients. The combination of different alleles is likely to be relevant not only to testicular volume and circulating FSH level (Grigorova *et al.*, 2008, 2010, 2011, 2013, 2014; Tüttelmann *et al.*, 2012) but also in regard to FSH responsiveness. The analysis of an exceptionally large study population is needed to address this issue, i.e. to establish the importance of *FSH $\beta$*  and *FSHR* genotyping prior FSH therapy (Busch *et al.*, 2015).

This study allows us to predict that about 50% of subjects treated with FSH will present a quantitative and qualitative improvement in selected and functional sperm parameters (TMSC and HA binding capacity). More importantly, approximately 30% of all patients treated with hpFSH will reach 'normal' HBA values (>60%) after 3 months. An additional novelty of our study, besides the biomarker analyzed in relation to FSH therapy, is represented by the length of treatment as previous studies have considered a minimum period of 3 months of therapy. We have shown that hpFSH is able to improve both spermatogenesis and spermiogenesis implying that both short and standard regimens are viable therapeutic options. The standard protocol of FSH therapy (3 months), through a quantitative/qualitative improvement of seminal parameters, could be a valuable tool to increase the probability of both natural and ART conception. On the other hand, in view of both the cost and the relative invasiveness of treatment, the short cycle (1 month) would represent an innovative FSH treatment option to increase the proportion of functionally competent cells in the ejaculate prior ART.

In conclusion, our manuscript supports the previously reported positive effect of FSH therapy on spermatogenesis and in addition opens novel exciting perspectives on the efficacy of the short-term FSH treatment in couples undergoing different types of Assisted Reproductive Techniques.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Silvio Dionisi for his precious input concerning the study design. We are grateful to Dr. Chiara Chianese and Dr. Lodovico Parmegiani for their help with the set-up of the HBA assay in our laboratory. We also thank the clinical staff of the Andrology Unit Drs. A. Magini, M. Rossi, V. Boddi, G. Rastrelli for patients recruitment.

#### FUNDING

The study was supported by an unrestricted grant to C.K. from IBSA International that was used to acquire HBA slides used in the study.

#### CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that no conflicts of interest are present.

#### AUTHORS' CONTRIBUTIONS

C.K. designed the study and coordinated the work. E.S., S.B., F.L., M.M., M.E.C., G.F. and C.K. selected and treated the patients. M.G.F. performed semen analysis. S.V. performed Sperm-Hyaluronan Binding Assay (HBA). E.C. performed genetic analysis and with E.S. collected/examined data. C.K., E.S. and E.C. wrote the manuscript. All authors contributed to the final version and approved the manuscript.

#### REFERENCES

- Attia AM, Abou-Setta AM & Al-Inany HG. (2013) Gonadotrophins for idiopathic male factor subfertility. *Cochrane Database Syst Rev* 25.
- Baccetti B, Strehler E, Capitani S, Collodel G, De Santo M, Moretti E, Piomboni P, Wiedeman R & Sterzik K. (1997) The effect of follicle stimulating hormone therapy on human sperm structure (Notulae seminologicae 11). *Hum Reprod* 12, 1955–1968.
- Baccetti B, Piomboni P, Bruni E, Capitani S, Gambera L, Moretti E, Sterzik K & Strehler E. (2004) Effect of follicle-stimulating hormone on sperm quality and pregnancy rate. *Asian J Androl* 6, 133–137.

- Bartoov B, Eltes F, Lunenfeld E, Har-Even D, Lederman H & Lunenfeld B. (1994) Sperm quality of subfertile males before and after treatment with human follicle-stimulating hormone. *Fertil Steril* 61, 727–734.
- Ben-Rafael Z, Farhi J, Feldberg D, Bartoov B, Kovo M, Eltes F & Ashkenazi J. (2000) Follicle-stimulating hormone treatment for men with idiopathic oligoteratoasthenozoospermia before in vitro fertilization: the impact on sperm microstructure and fertilization potential. *Fertil Steril* 73, 24–30.
- Busch AS, Kliesch S, Tüttelmann F & Gromoll J. (2015) FSHB –211G>T stratification for follicle-stimulating hormone treatment of male infertility patients: making the case for a pharmacogenetic approach in genetic functional secondary hypogonadism. *Andrology* 3, 1050–1053.
- Cayli S, Jakab A, Ovari L, Delpiano E, Celik-Ozenci C, Sakkas D, Ward D & Huszar G. (2003) Biochemical markers of sperm function: male fertility and sperm selection for ICSI. *Reprod Biomed Online* 7, 462–468.
- Colacurci N, Monti MG, Fornaro F, Izzo G, Izzo P, Trotta C, Mele D & De Francis P. (2012) Recombinant human FSH reduces sperm DNA fragmentation in men with idiopathic oligoasthenoteratozoospermia. *J Androl* 33, 588–593.
- Ferlin A, Vinanzi C, Selice R, Garolla A, Frigo AC & Foresta C. (2011) Toward a pharmacogenetics approach to male infertility: polymorphism of follicle-stimulating hormone beta-subunit promoter. *Fertil Steril* 96, 1344–1349.
- Foresta C, Bettella A, Merico M, Garolla A, Plebani M, Ferlin A & Rossato M. (2000) FSH in the treatment of oligozoospermia. *Mol Cell Endocrinol* 161, 89–97.
- Foresta C, Bettella A, Merico M, Garolla A, Ferlin A & Rossato M. (2002) Use of recombinant human follicle-stimulating hormone in the treatment of male factor infertility. *Fertil Steril* 77, 238–244.
- Foresta C, Bettella A, Garolla A, Ambrosini G & Ferlin A. (2005) Treatment of male idiopathic infertility with recombinant human follicle-stimulating hormone: a prospective, controlled, randomized clinical study. *Fertil Steril* 84, 654–661.
- Glander HJ & Kratzsch J. (1997) Effects of pure human follicle-stimulating hormone (pFSH) on sperm quality correlate with the hypophyseal response to gonadotrophin-releasing hormone (GnRH). *Andrologia* 29, 23–28.
- Grigороva M, Punab M, Ausmees K & Laan M. (2008) FSHB promoter polymorphism within evolutionary conserved element is associated with serum FSH level in men. *Hum Reprod* 23, 2160–2166.
- Grigороva M, Punab M, Poolamets O, Kelgo P, Ausmees K, Korrovits P, Vihljajev V & Laan M. (2010) Increased prevalence of the –211 T allele of follicle stimulating hormone (FSH) beta subunit promoter polymorphism and lower serum FSH in infertile men. *J Clin Endocrinol Metab* 95, 100–108.
- Grigороva M, Punab M, Zilaitienė B, Erenpreiss J, Ausmees K, Matulevičius V, Tsarev I, Jørgensen N & Laan M. (2011) Genetically determined dosage of follicle-stimulating hormone (FSH) affects male reproductive parameters. *J Clin Endocrinol Metab* 96, E1534–E1541.
- Grigороva M, Punab M, Poolamets O, Söber S, Vihljajev V, Žilaitienė B, Erenpreiss J, Matulevičius V, Tsarev I & Laan M. (2013) Study in 1790 Baltic men: FSHR Asn680Ser polymorphism affects total testes volume. *Andrology* 1, 293–300.
- Grigороva M, Punab M, Punab AM, Poolamets O, Vihljajev V, Zilaitienė B, Erenpreiss J, Matulevičius V & Laan M. (2014) Reproductive physiology in young men is cumulatively affected by FSH-action modulating genetic variants: FSHR –29G/A and c.2039 A/G, FSHB –211G/T. *PLoS ONE* 9, e94244.
- Huszar G, Stone K, Dix D & Vigue L. (2000) Putative creatine kinase M-isoform in human sperm is identified as the 70-kilodalton heat shock protein HspA2. *Biol Reprod* 63, 925–932.
- Huszar G, Jakab A, Sakkas D, Ozenci CC, Cayli S, Delpiano E & Ozkavukcu S. (2002) Fertility testing and ICSI sperm selection by hyaluronic acid binding: clinical and genetic aspects. *Reprod Biomed Online* 14, 650–663.
- Huszar G, Ozenci CC, Cayli S, Zavaczki Z, Hansch E & Vigue L. (2003) Hyaluronic acid binding by human sperm indicates cellular maturity, viability, and unreacted acrosomal status. *Fertil Steril* 79(Suppl. 3), 1616–1624.
- Huszar G, Jakab A, Sakkas D, Ozenci CC, Cayli S, Delpiano E & Ozkavukcu S. (2007) Fertility testing and ICSI sperm selection by hyaluronic acid binding: clinical and genetic aspects. *Reprod Biomed Online* 14, 650–663.
- Jakab A, Sakkas D, Delpiano E, Cayli S, Kovanci E, Ward D, Revelli A & Huszar G. (2005) Intracytoplasmic sperm injection: a novel selection method for sperm with normal frequency of chromosomal aneuploidies. *Fertil Steril* 84, 1665–1673.
- Kamischke A, Behre HM, Bergmann M, Simoni M, Schäfer T & Nieschlag E. (1998) Recombinant human follicle stimulating hormone for treatment of male idiopathic infertility: a randomized, double-blind, placebo-controlled, clinical trial. *Hum Reprod* 13, 596–603.
- Kovacs P, Kovacs T, Sajó A, Szollosi J, Matyas S & Kaali SG. (2011) The role of hyaluronic acid binding assay in choosing the fertilization method for patients undergoing IVF for unexplained infertility. *J Assist Reprod Genet* 28, 49–54.
- Krausz C. (2011) Male infertility: pathogenesis and clinical diagnosis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 25, 271–285.
- Krishnamurthy H, Danilovich N, Morales CR & Sairam MR. (2000) Qualitative and quantitative decline in spermatogenesis of the follicle-stimulating hormone receptor knockout (FORKO) mouse. *Biol Reprod* 62, 1146–1159.
- Mokánszki A, Molnár Z, Ujfalusi A, Balogh E, Bazsáné ZK, Varga A, Jakab A & Oláh É. (2012) Correlation study between sperm concentration, hyaluronic acid-binding capacity and sperm aneuploidy in Hungarian patients. *Reprod Biomed Online* 25, 620–626.
- Molnar Z, Mokanszki A, Kassai Bazsane Z, Bhattoa HP, Benyo M, Olah E & Jakab A. (2014) Sperm concentration, hyaluronic acid-binding capacity, aneuploidy and persistent histones in testicular cancer. *Hum Reprod* 29, 1866–1874.
- Ombelet W, Dhont N, Thijssen A, Bosmans E & Kruger T. (2014) Semen quality and prediction of IUI success in male subfertility: a systematic review. *Reprod Biomed Online* 28, 300–309.
- Palomba S, Falbo A, Espinola S, Rocca M, Capasso S, Cappiello F & Zullo F. (2011) Effects of highly purified follicle-stimulating hormone on sperm DNA damage in men with male idiopathic subfertility: a pilot study. *J Endocrinol Invest* 34, 747–752.
- Piomboni P, Serafini F, Gambera L, Musacchio C, Collodel G, Morgante G & De Leo V. (2009) Sperm aneuploidies after human recombinant follicle stimulating hormone therapy in infertile males. *Reprod Biomed Online* 18, 622–629.
- Prinosilova P, Kruger T, Sati L, Ozkavukcu S, Vigue L, Kovanci E & Huszar G. (2009) Selectivity of hyaluronic acid binding for spermatozoa with normal Tygerberg strict morphology. *Reprod Biomed Online* 18, 177–183.
- Roudebush WE, Worriow KC, Peters AJ, Mitchell-Leef D, Shapiro DB & Massey JB. (2004) The hyaluronan binding assay (HBA™) has a positive and significant relationship with sperm morphology and chromatin integrity. *Fertil Steril* 82, S283–S284.
- Ruvolo G, Roccheri MC, Bruculeri AM, Longobardi S, Cittadini E & Bosco L. (2013) Lower sperm DNA fragmentation after r-FSH administration in functional hypogonadotropic hypogonadism. *J Assist Reprod Genet* 30, 497–503.
- Ruwanpura SM, McLachlan RI, Matthiesson KL & Meachem SJ. (2008) Gonadotrophins regulate germ cell survival, not proliferation, in normal adult men. *Hum Reprod* 23, 403–411.
- Santi D, Granata AR & Simoni M. (2015) FSH treatment of male idiopathic infertility improves pregnancy rate: a meta-analysis. *Endocr Connect* 4, R46–R58.
- Selice R, Garolla A, Pengo M, Caretta N, Ferlin A & Foresta C. (2011) The response to FSH treatment in oligozoospermic men depends on FSH receptor gene polymorphisms. *Int J Androl* 34, 306–312.

- Simoni M, Santi D, Negri L, Hoffmann I, Muratori M, Baldi E, Cambi M, Marcou M, Greither T, Baraldi E, Tagliavini S, Carra D, Lombardo F, Gandini L, Pallotti F, Krausz C, Rastrelli G, Ferlin A, Menegazzo M, Pignatti E, Linari F, Marino M, Benaglia R, Levi-Setti PE & Behre HM. (2016) Treatment with human, recombinant FSH improves sperm DNA fragmentation in idiopathic infertile men depending on the FSH receptor polymorphism p. N680S: a pharmacogenetic study. *Hum Reprod* 31, 1960–1969.
- Sousa M, Cremades N, Alves C, Silva J & Barros A. (2002) Developmental potential of human spermatogenic cells co-cultured with Sertoli cells. *Hum Reprod* 17, 161–172.
- Tournaye H, Krausz C & Oates RD. (2016a) Novel concepts in the aetiology of male reproductive impairment. *Lancet Diabetes Endocrinol*. Epub ahead of print. doi: 10.1016/S2213-8587(16)30040-7.
- Tournaye H, Krausz C & Oates RD. (2016b) Concepts in diagnosis and therapy for male reproductive impairment. *Lancet Diabetes Endocrinol*. Epub ahead of print. doi: 10.1016/S2213-8587(16)30043-2.
- Tüttelmann F, Laan M, Grigороva M, Punab M, Söber S & Gromoll J. (2012) Combined effects of the variants FSHB –211G>T and FSHR 2039A>G on male reproductive parameters. *J Clin Endocrinol Metab* 97, 3639–3647.
- WHO (2010) *WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen*, 5th edn. WHO Press, Geneva, Switzerland.
- Worrilow KC, Eid S, Woodhouse D, Perloe M, Smith S, Witmyer J, Ivani K, Khoury C, Ball GD, Elliot T & Lieberman J. (2013) Use of hyaluronan in the selection of sperm for intracytoplasmic sperm injection (ICSI): significant improvement in clinical outcomes-multicenter, double-blinded and randomized controlled trial. *Hum Reprod* 28, 306–314.
- Yagci A, Murk W, Stronk J & Huszar G. (2010) Spermatozoa bound to solid state hyaluronic acid show chromatin structure with high DNA chain integrity: an acridine orange fluorescence study. *J Androl* 31, 566–572.

## SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

**Figure S1.** Study population (flow chart).

**Figure S2.** Different patterns of responsiveness to FSH therapy in terms of HBA values variations.

**Table S1.** Baseline characteristics of study population.

**Table S2.** Distribution of the two semen categories in the responders groups.

**Table S3.** Baseline characteristics of patients with different genotypes.

**Table S4.** Extent of improvement of % HA binding from T0 to T1 and to T3.

**Appendix S1.** Materials and methods.



# Spermatogenic failure and the Y chromosome

C. Krausz<sup>1</sup>  · E. Casamonti<sup>1</sup>

Received: 16 February 2017 / Accepted: 30 March 2017 / Published online: 29 April 2017  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2017

**Abstract** The Y chromosome harbors a number of genes essential for testis development and function. Its highly repetitive structure predisposes this chromosome to deletion/duplication events and is responsible for Y-linked copy-number variations (CNVs) with clinical relevance. The AZF deletions remove genes with predicted spermatogenic function *en block* and are the most frequent known molecular causes of impaired spermatogenesis (5–10% of azoospermic and 2–5% of severe oligozoospermic men). Testing for this deletion has both diagnostic and prognostic value for testicular sperm retrieval in azoospermic men. The most dynamic region on the Yq is the AZFc region, presenting numerous NAHR hotspots leading to partial losses or gains of the AZFc genes. The *gr/gr* deletion (a partial AZFc deletion) negatively affects spermatogenic efficiency and it is a validated, population-dependent risk factor for oligozoospermia. In certain populations, the Y background may play a role in the phenotypic expression of partial AZFc rearrangements and similarly it may affect the predisposition to specific deletions/duplication events. Also, the Yp contains a gene array, *TSPY1*, with potential effect on germ cell proliferation. Despite intensive investigations during the last 20 years on the role of this sex chromosome in spermatogenesis, a number of clinical and basic questions remain to be answered. This review is aimed at

providing an overview of the role of Y chromosome-linked genes, CNVs, and Y background in spermatogenesis.

## Introduction

The Y chromosome harbors genes essential for testis development and function, such as the master gene for testis determination (*SRY*) and the genes residing in the azoospermia factor (AZF) regions. Since the discovery of the AZF region in 1976 (Tiepolo and Zuffardi 1976), and after the definition of three distinct AZF regions in 1996 (Vogt et al. 1996), this chromosome became the most important molecular genetic target in male infertility. First, the role of complete AZF deletions was addressed by several studies during the 1990s leading to the introduction of AZF testing into clinical practice (Krausz et al. 2014). Subsequently, rearrangements of the AZFc region became a *hot topic* both in relationship with impaired spermatogenesis and testicular germ cell tumors. While the above research on Y chromosome-linked copy number variations (CNV) was highly successful from a clinical point of view, the role of AZF genes in spermatogenesis remains largely unknown. This review is aimed at providing a comprehensive overview of Y chromosome-linked CNVs, genes, and Y chromosome haplogroups in relationship to spermatogenic failure.

## The Y chromosome structure and its genes

The human Y chromosome differs markedly from the remaining chromosomes in terms of its size, genomic structure, content, and evolutionary trajectory (Navarro-Costa 2012). It is an acrocentric chromosome with two pseudoautosomal regions (PAR1 and PAR2) and the MSY

✉ C. Krausz  
c.krausz@dfc.unifi.it

<sup>1</sup> Department of Experimental, Clinical and Biomedical Sciences Mario Serio, Sexual Medicine and Andrology Unit, University of Florence, Viale Pieraccini 6, 50139 Florence, Italy

(male-specific Y region), which represents about 95% of the entire Y chromosome length. The PARs correspond to an X–Y homology block and contain 27 genes encoding for products related to diverse biological function and have accordingly variable expression pattern (Mangs and Morris 2007). PAR1 is involved in meiotic pairing, which is an essential process for successful male meiosis (Kauppi et al. 2011).

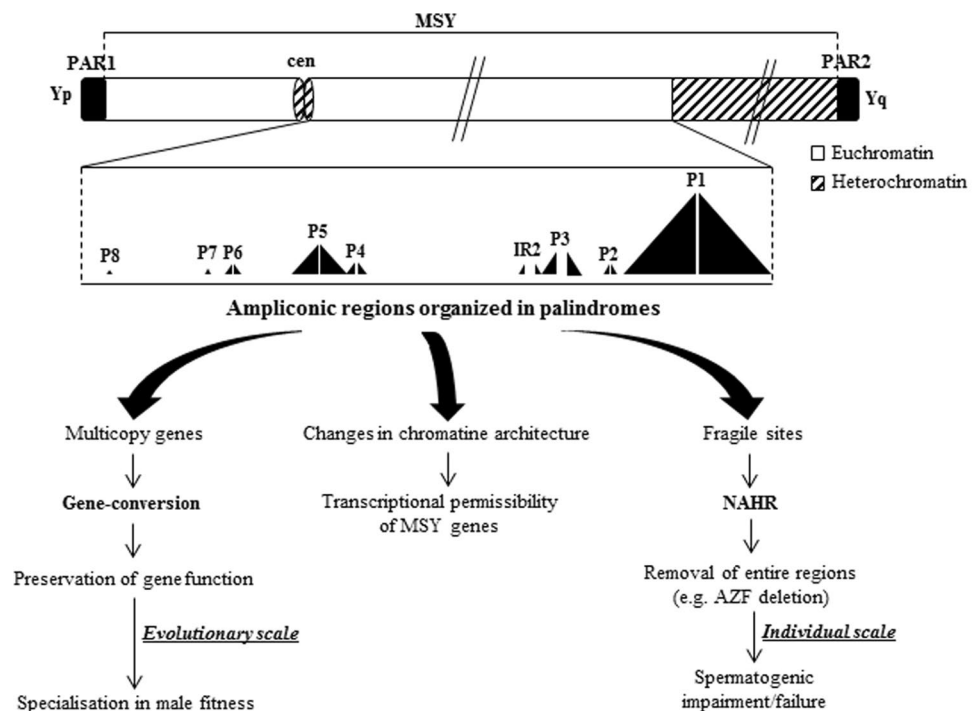
The MSY region does not recombine with the X chromosome and contains three classes of sequences: X-transposed (with 99% identity to the X chromosome), X-degenerate (single-copy genes or pseudogene homologues of X-linked genes) and ampliconic (Skaletsky et al. 2003). During evolution, MSY genes were either driven to decay or to specialization into functions selectively advantageous for males (Navarro-Costa 2012; Bellott et al. 2014). As a consequence of progressive gene decay, the number of genes on the Y chromosome is extremely reduced in respect to the X chromosome (54 protein coding genes vs. approximately 700). According to the Y reference sequence, belonging to a single individual bearing haplogroup R1, MSY contains 156 transcription units including 78 protein-coding units (27 genes encoding proteins). It is important to note that the sequence, structure and the copy number of multicopy genes may vary in different Y chromosomes (Repping et al. 2006, see also other articles of this special issue).

Concerning specialization into male reproductive functions, the majority of genes with a predicted role in spermatogenesis are mapping into ampliconic sequences.

Ampliconic sequences are characterized by sequence pairs showing nearly complete (>99.9%) identity with one or more regions on MSY and are organized in eight massive palindromes. The presence of highly homologous repeated sequences with the same orientation predisposes to two recombining mechanisms with opposite consequences on male reproduction (Fig. 1). On one side, it allows gene conversion, i.e., a non-reciprocal transfer of sequence information occurring between duplicated sequences within the chromosome. This process preserves genes important for male fertility by preventing the gradual accumulation of deleterious mutants across evolutionary time in the absence of crossing over (Rozen et al. 2003). On the other hand, the same structure predisposes to deletion/duplications of the genetic material between repeated sequences through non-allelic homologous recombination (NAHR) with potential negative consequence on spermatogenesis. Finally, it has been speculated that palindromes may regulate the transcriptional permissibility of the MSY genes via changes in chromatin structure (Lemos et al. 2010).

Spermatogenesis is characterized by many unique features, which are especially relevant during meiosis and post-meiotic stages (Hecht 1998). One of the peculiarities is transcriptional silencing, therefore a network of mRNA storage and translational control is crucial for the accomplishment of this process. Similarly, ubiquitination in testis is known to regulate many fundamental biochemical processes, including DNA repair, regulation of meiotic chromatin structure, and histone-to-protamine transition during spermatogenesis. Moreover, germ cells are particularly rich

**Fig. 1** Schematic representation of the Y chromosome, the male-specific Y (MSY) region, and the ampliconic sequences organized into eight massive palindromes on the Yq. The presence of highly homologous repeated sequences (containing genes important for spermatogenesis) with the same orientation predispose to two recombination mechanisms with opposite consequences on male fertility. *AZF* azoospermia factor, *NAHR* non-allelic homologous recombination, *P* palindrome, *IR2* inverted repeats



of microtubule networks mainly involved in meiosis. Many of the MSY genes participate in the above-mentioned specific processes.

**MSY genes** with a predicted role in spermatogenesis are classifiable into two categories: single copy and ampliconic multicopy genes. Genes belonging to the first category have a single-copy homologue on the X chromosome (they are mapping either to the so-called “X-degenerate” or to the “X-transposed” sequences) and these X–Y gene pairs show signs of dosage sensitivity. In fact, thanks to a study on the X and Y chromosome of eight species, it has been demonstrated that a higher proportion of X-linked genes with surviving Y-linked homologues escape X-inactivation compared to those without surviving Y-linked homologues (Bellott et al. 2014). All of these genes are ubiquitous except for *TGIF2LY*, which is expressed exclusively in the testis. Among these genes, those belonging to the AZFa and AZFb regions (see paragraph below) are the strongest spermatogenesis candidate genes (*USP9Y*, *DDX3Y*, *EIF1AY*, *RPS4Y2*, and *KDM5D*) and their deletion *en block* is responsible for spermatogenic failure in humans. Two ubiquitously expressed genes, *USP9Y* and *DDX3Y* (formerly *DBY*), map to the **AZFa region**.

*USP9Y*, a member of a family of deubiquitinating genes, encodes a protein with a ubiquitin C-terminal hydrolase activity. This protein may play an important regulatory role at the level of protein turnover by preventing degradation of proteins by the proteasome through the removal of ubiquitin from protein–ubiquitin conjugates (Ginalski et al. 2004). It has been demonstrated that in humans, the isolated absence of this gene is associated with a large spectrum of testis phenotypes (from azoospermia with hypospermatogenesis to normozoospermia) (Tyler-Smith and Krausz 2009). Based on this, *USP9Y* is more likely a fine tuner that improves efficiency, rather than a provider of an essential function. Moreover, the observed natural conceptions suggest that the protein is not required for the final sperm maturation process or for the acquisition of sperm-fertilizing ability (Krausz et al. 2006; Luddi et al. 2009).

*DDX3Y* encodes an ATP-dependent RNA helicase that is a member of the well-conserved DDX3 DEAD Box Helicase family (Mohr et al. 2002). Although *DDX3Y*'s expression at the RNA level is ubiquitous, there are specific transcript variants expressed only in the male germ line and its protein expression seems to be restricted to the testis (Ditton et al. 2004; Jaroszynski et al. 2011; Rauschendorf et al. 2014). *DDX3Y* protein was found predominantly in spermatogonia, whereas its X chromosome homologue was expressed after meiosis in spermatids. This observation suggests that the X–Y pairs have diverged functionally to fulfill different roles in the RNA metabolism of human spermatogenesis. Based on *DDX3Y*'s expression profile and the above-mentioned *USP9Y* deletion

phenotype, it is highly likely that the removal of this gene is responsible for the SCOS phenotype in AZFa-deleted patients. In line with the role of *DDX3Y* in the early stages of spermatogenesis, a recent study in the *Drosophila melanogaster* on RNA helicase Belle (*DDX3*) shows that this protein is requested for mitotic progression and survival of germline stem cells (GSCs) and spermatogonial cells (Kotov et al. 2016). Overall, *DDX3Y* protein is involved in various biological processes: (1) mRNA nuclear export, (2) RNA unwinding, (3) transcriptional regulation, i.e., *DDX3Y* may initiate global transcriptional remodeling in pre-spermatogonial cells, (4) translation initiation, i.e., by directly activating the expression of RNA metabolism genes through the binding to small ribosomal RNA or mRNA molecules, (5) cell-cycle control, (6) apoptosis (Kotov et al. 2014; Ramathal et al. 2015; Schröder 2010). Since no isolated *DDX3Y* deletion or pathogenic mutations were reported in this gene so far, its exact biological role in spermatogenesis remains to be clarified.

In the **AZFb region**, there are three single-copy genes, *EIF1AY*, *RPS4Y2*, and *KDM5D*, which are involved in post-transcriptional or in epigenetic control.

*EIF1AY* belongs to the *EIF-1A* family requested for a high rate of protein biosynthesis by enhancing ribosome dissociation into subunits and stabilizing the binding of the 43S complex to the 5 end of capped RNA (Mitchell and Lorsch 2008). In particular, *EIF1AY* encodes a protein acting as an essential translation initiation factor during spermatogenesis (Lahn and Page 1997; Kleiman et al. 2007). In the mouse, a Y-encoded subunit of the translation initiation factor, *Eif2*, has been demonstrated as the mouse spermatogonial proliferation factor, which is requested also to complete the first meiotic division (Mazeyrat et al. 2001). Mazeyrat et al. have also convincingly demonstrated that this gene is dosage-sensitive, and its haploinsufficiency is responsible for the early failure of spermatogenesis. Recent studies in the mouse provided further evidence for its fundamental role, showing that two Y-chromosome genes, testis-determinant *Sry*, and spermatogonial proliferation factor *Eif2s3y*, are sufficient to obtain haploid germ cells with successful assisted reproduction (Yamauchi et al. 2014). The replacement of *Sry* by transgenic activation of its downstream target *Sox9*, and *Eif2s3y*, by transgenic overexpression of its X chromosome, encoded homolog *Eif2s3x* allowed generating a Y chromosome-less mouse with the capacity to produce haploid cells (Yamauchi et al. 2016). Unfortunately, these results are difficult to be translated to humans since the Y chromosomes of these two species are highly divergent. For instance, only nine of 17 ancestral genes in the human MSY are conserved in the mouse Y chromosome and only 2.2% of mouse MSY sequence shares ancestry with the primate MSYs. Further, the mouse

Y-chromosome long arm harbors genes that are absent on the primates Y chromosomes (Soh et al. 2014)

*RPS4Y2* encodes a testis-specific, essential ribosomal protein subunit involved in RNA processing that is required for mRNA binding to the ribosome (Bergen et al. 1998). Based on the above, it has been postulated that like many other MSY genes, it also plays a role in the post-transcriptional regulation of the spermatogenic program (Andrés et al. 2008; Lahn and Page 1997; Lopes et al. 2010).

*KDM5D* (alias *SMCY*) is a member of the evolutionarily conserved *KDM5* family of four proteins, *KDM5A/B/C* and *D*, and it was conserved in the genomes of both sexes. This gene encodes for a histone H3 lysine 4 (H3K4) demethylase. H3K4me is an important epigenetic mark that has been implicated in diverse biological functions, such as gene activation and repression, DNA damage response, and genomic imprinting and development (Shao et al. 2014). Proteins that regulate the methylation of H3K4 are known to be involved in neurological and developmental disorders. It has been demonstrated that *KDM5D* forms a protein complex with the *MSH5* DNA repair factor during spermatogenesis (Akimoto et al. 2008; Lee et al. 2007). This complex locates to condensed DNA during the leptotene/zygotene stage, suggesting an involvement in male germ cell chromatin remodeling and a role in chromosome condensation during meiosis (Navarro-Costa et al. 2010b and references therein). Recently, by studying the *Drosophila*'s oocytes, Navarro-Costa et al. (2016) reported that the perturbation of the oocyte's epigenome in early oogenesis, through depletion of the *dKDM5* histone demethylase, results in the temporal deregulation of meiotic transcription and affects female fertility. *KDM5D* is the Y chromosome-specific homologue of *dKDM5*, and it is possible that the meiotic maturation defects seen in *dKDM5*-depleted oocytes may be extended to the human AZFb deletion-phenotype, which is characterized by spermatocytic arrest.

For those genes that are **outside the AZF regions**, a role in gametogenesis has been proposed based on various model organisms (*ZFY*) and testis-specific expression (*TGIFLY*). Given that no deletion or mutations of these genes have been observed in infertile men, direct evidence for their spermatogenic function is still lacking.

*ZFY* is the first coding gene identified on the human Y (Page et al. 1987). It is a transcription factor containing a zinc finger domain that regulates the transcription of a number of genes. The mouse contains two genes, *Zfy1* and *Zfy2*, and through the use of *knock-out* mice and RNAi-mediated disruption of *Zfx/Zfy* in mouse testis, it has been demonstrated that *Zfy1/Zfy2* are required for multiple aspects of spermatogenesis, especially for spermatocyte's functions (Nakasuji et al. 2017 and reference therein; Zhang et al. 2017). *Zfy1* and *Zfy2* act as 'executioners' for checkpoint during the first meiotic division in which *Zfy* genes first

promote meiotic sex chromosome inactivation (MSCI), then monitor its progress, and finally execute cells with MSCI failure. These genes also have a major role in ensuring that the second meiotic division occurs (Royo et al. 2010; Vernet et al. 2014) and in sperm head remodeling and sperm tail development (Vernet et al. 2016). In humans, a single *ZFY* gene expresses two major splice variants: a full-length version, which shows transactivation ability, and a short version, which lacks a key acidic domain and has no detectable transactivation activity (Mardon et al. 1990).

*TGIFLY* belongs to the *TGIFL* family, homeobox gene family encoding for helix-turn-helix transcriptional regulators. In *Drosophila*, *TGIF*-related homeobox genes, *vis* (*vismay*) and *achi* (*achintya*) are required for spermatogenesis and in the absence of *vis* a spermatogenic arrest was observed (Wang and Mann 2003). Since the Y-linked homeobox gene and its X-linked homologue are specifically expressed in adult human testes, a similar spermatogenic function for the human genes is possible.

Concerning **multicopy MSY genes**, they are mapping to the ampliconic regions and are divided into nine gene families, eight of them on the Yq and one on the Yp (Table 1). With the exception of two genes (*BPY2* and *PRY*), the others have either an autosomal homologue (*CDY/CDYL* and *DAZ/DAZL*) or an X-linked homologue. Three of the X–Y pairs are dosage-sensitive (*VCY/VCX*, *HSFY*, *XKRY*), whereas the X homologues of *RBMY* and *TSPY* genes are subjected to X inactivation and their Y-linked partners show signs of functional differentiation. The ampliconic MSY genes, which are discussed below, are involved in various biological processes such as (1) chromatin modification, (2) transcription, (3) splicing, (4) translation, and (5) ubiquitination.

As stated above, translational regulation and RNA metabolism are especially relevant in male gametogenesis due to the gradual reduction of mRNA synthesis in post-meiotic stages. *DAZ* and *RBMY* are two multicopy genes with RNA binding capacity and function as adaptors for target mRNA transport and activators of their translation (Vogt and Fernandes 2003).

*DAZ* is found exclusively in primates and it is homologous to an autosomal gene called "*DAZL*" (*DAZ*-like autosomal; Saxena et al. 1996; Yen et al. 1996) with a highly conserved RNA recognition motif (RRM) for binding target mRNAs and at least one characteristic sequence of 24 amino acids, which are termed as *DAZ* repeats. The Y-linked *DAZ* probably originated from the translocation and amplification of this ancestral autosomal gene. Some insights into human *DAZ* function came from the analysis of its autosomal homologues in other species and in vitro studies on human embryonic stem cells (hESCs) (Fu et al. 2015 and references therein). Targeted disruption of *Dazl* in mice leads to a complete absence of gamete production

**Table 1** Human protein-coding Y genes mapping to Y chromosome amplicons and their homologues

Symbol	Name	Tissue expression	Number of copies	Code of copies	Position	Function	Homologue	Homologue position
<i>TSPY</i>	Testis-specific protein Y	Testis	~35	–	Yp11.2	Cell proliferation	–	–
<i>VCY</i>	Variable change Y	Testis	2	<i>VCYIA-B</i>	Yp11.221	Unknown	<i>VCX</i>	Xp22
<i>XKRY</i>	XK-related Y	Testis	2	<i>XKR1-2</i>	Yq11.222	Membrane transport	–	–
<i>CDY</i>	Chromodomain Y	Testis	4	<i>CDYIA-B</i> ; <i>CDY2A-B</i>	Yq11.23; Yq11.222	Hyperacetylation of histones	<i>CDYL</i>	6p25
<i>HSFY</i>	Heat shock transcription factor Y	Testis	2	<i>HSFY1-2</i>	Yq11.222	Transcription modulator	<i>HSP2</i>	6q22
<i>RBMY1</i>	RNA-binding motif Y	Testis	6	<i>RBM1.A-F</i>	Yq11.223	Splicing regulator	<i>RBMX</i>	Xq26
<i>PRY</i>	PTP-BL-related Y	Testis	2	<i>PRY1-2</i>	Yq11.223	Apoptosis	–	–
<i>BPY2</i>	Basic protein Y 2	Testis	3	<i>BPY2A</i> ; <i>BPY2B-C</i>	Yq11.223; Yq11.23	Cytoskeletal network of microtubules	–	–
<i>DAZ</i>	Deleted in azoospermia	Testis	4	<i>DAZ1-2</i> ; <i>DAZ3-4</i>	Yq11.223; Yq11.23	Translational modulator	<i>DAZL</i> ; <i>BOULE</i>	3p24; 2q33

*VCX* variable charge, X-linked, *CDYL* chromodomain Y-like, *HSP2* heat shock protein, 2, *RBMX* RNA-binding motif protein, X-linked, *DAZL* deleted in azoospermia like, *BOULE* boule protein

in both testis and ovary, demonstrating that *Dazl* is essential for the development or survival of germ cells (Ruggiu et al. 1997). In *Drosophila*, mutation of the *BOULE* gene, another homologue of *DAZ*, results in spermatocyte arrest at the G2/M transition and complete azoospermia (Castrillon et al. 1993; Eberhart et al. 1996). Overexpression of *Dazl*, *BOULE*, and *DAZ* induced both human ES and pluripotent stem (iPS) cells to differentiate into primordial germ cell-like cells (PGCLCs), and enhanced their subsequent maturation and progression through meiosis (Kee et al. 2009; Medrano et al. 2012). These studies provided evidence for an involvement of human *DAZL* in primordial germ cell formation, whereas *DAZ* and *BOULE* promote later stages of meiosis and development of haploid gametes (Kee et al. 2009). While the downstream targets of the *DAZ* family are still unknown, it has been demonstrated that *DAZ* and *DAZL* interact with other proteins involved in mRNA transport/localization including *DAZAP1*, *DAZAP2*, and *PUMILIO-2* (Fu et al. 2015 and references therein; Tsui et al. 2000).

*RBMY1* contains an RNA-binding motif in the N-terminus and four SRGY (serine, arginine, glycine, tyrosine) boxes in the C-terminus. This gene derived from an amplification of X-degenerate gene (*RBMY1.1-6*) (Chai et al. 1998; Skaletsky et al. 2003) and is involved in a series of biological functions related to RNA metabolism such as transport/storage of transcripts, splicing regulation, and signal transduction (Elliott 2004 and references therein). Immunostaining of human germ cells indicates that this

protein is expressed in all stages of spermatogenesis and shows a dynamic shift in its subcellular distribution during spermatogenesis, suggesting its differential functions in the individual stages of germ cell maturation (Elliott et al. 1997, 1998). More recent in vitro experiments have provided a detailed characterization of *RBMY* localization and function showing a specific and dynamic interaction with some components of the exon-junction complex and with splicing factors (Dreumont et al. 2010). These data indicate that *RBMY* could act in germ cells as a co-regulator of a specific set of alternative splicing events. In addition to pre-mRNA splicing activators, *RBM* interacts with the STAR (signal transduction and RNA processing) proteins called *SAM68* and *T-STAR*. These proteins are implicated in cellular signaling pathways, pre-mRNA processing, and cell cycle control (for review see Elliott 2004). The Y-linked gene *Rbmy1a1* is highly methylated in mature sperm and resists DNA demethylation post-fertilization thanks to the action of the maternal *Trim28* (Sampath Kumar et al. 2017). In a mouse model, characterized by the absence of the maternal *Trim28*, an ectopic activation of this gene was observed, causing male-specific peri-implantation lethality. The most likely explanation for this effect is the accumulation of abnormal splice variants riddled with skipped exons and alternative splice donor/acceptor sites, causing large deletions and out-of-frame truncations. These data further confirm the importance of *RBMY* in splicing. In addition, the presence of the *RBMY* protein in post-meiotic germ cells and also in the transcriptionally quiescent

spermatozoa implies its role beyond RNA editing. It is predicted that similarly to *DAZ*, *RBM1* is also involved in translational control (Navarro-Costa et al. 2010b and references therein; Vogt et al. 2008).

Two other ampliconic genes, *CDY* and *HSFY*, are also involved in transcriptional regulation. *CDY1* and *CDY2* gene families originate from a polyadenylated mRNA of the *CDYL1* or *CDYL2* locus on chromosome 6 and 16, respectively, which has been then retrotransposed to the Y chromosome. The *CDY1* gene is expressed only in testis, whereas *CDY2* is expressed ubiquitously (Lahn and Page 1999). The *CDY* genes contain two functional motifs: a chromodomain implicated in chromatin binding, and a catalytic domain involved in acetylation reactions. Accordingly, it has been demonstrated that *CDY1* and *CDY2* are involved in hyperacetylation of histones during the maturation of spermatids (Lahn et al. 2002; Lahn and Page 1997, 1999). This step is fundamental for the displacement of histones by the sperm-specific DNA packaging proteins, protamines, at this final stage of spermatogenesis (Meistrich et al. 1992).

*HSFY* presents two copies on the Y chromosome (*HSFY1-2*), derived from the amplification of an X-degenerate gene (Skaletsky et al. 2003). These genes encode three different mRNA transcripts that are expressed specifically in human testis localizing in the nuclei of germ cells and the cytoplasm of Sertoli cells (Shinka et al. 2004). Tessari et al. (2004) have demonstrated that only the protein translated from transcript variant 1 contains a heat shock factor-like DNA-binding domain, hence representing the critical *HSFY* transcript. However, this protein does not bind to heat shock elements and no *HSFY*-targeted promoters have been identified so far (Shinka et al. 2004). The identification of 4 oligo/azoospermic subjects with a deletion removing the entire P4 palindrome and thus both *HSFY* copies suggested that this gene is not an essential factor for spermatogenesis (Kichine et al. 2012).

The rest of the ampliconic genes are also specifically expressed in the testis and are involved in: (1) membrane transport (*XKRY*), (2) apoptosis of spermatids and spermatozoa (*PRY*), (3) cytoskeletal network of microtubules formed during the post-meiotic elongation phase of the male germ cell (*BPY2*), (4) mRNA stability (*VCY*), and (5) cell proliferation (*TSPY*). While data are rather scarce on *XKRY* and *VCY*, more insights into the function of *PRY* and *BPY2* have been gained from expression studies.

*PRY* encodes a protein homologous to protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 13, which is a signaling molecule involved in the regulation of several cellular processes, particularly in programmed cell death (Dromard et al. 2007). Based on the expression profile of the gene in spermatozoa (i.e., higher in the defective germ cell fraction and is increased in spermatozoa of men with abnormal semen parameters), the involvement of this protein in

apoptosis of spermatids/spermatozoa has been suggested (Stouffs et al. 2004).

The *BPY2* (*alias VCY2*) gene family is generated from transposed autosomal non-protein-coding segments and presents three copies on the reference sequence (Cao et al. 2015). Its role in spermatogenesis is largely unknown, and data are derived only from expression studies and from the analysis of interacting proteins. An interaction with ubiquitin protein ligase E3A (UBE3A), a widely expressed member of the ubiquitin protein degradation system, has been demonstrated (Wong et al. 2002). Since UBE3A corresponds to a testis-expressed E3 ubiquitin protein ligase, *BPY2* may modulate its target specificity. Additionally, the same authors demonstrated that *BPY2* interacts with *VCY2IP-1*, which shows homology with microtubule-associated protein 1S (*MAP1S*) (Wong et al. 2004). They proposed that the interaction of *VCY2* and *VCY2IP-1* in the microtubule network might be regulated by UBE3A through the interaction of *VCY2* and other proteins in the microtubule.

Moreover, there are three transcription unit families in the Y chromosome amplicons with testis-specific expression. The function of *TTY* (testis-specific transcription Y) non-coding genes as well as the function of *CSPG4LY* and *GOLGA2LY* remain unknown (for review see Navarro-Costa 2012; Skaletsky et al. 2003).

There is growing evidence that *MSY* genes are also involved in other than spermatogenic function (Bellot et al. 2014; Kido and Lau 2015). For instance, dosage-sensitive X–Y gene pairs, expressed in multiple tissues, may also have an implication in male viability, since about 99% of human 45,X conceptuses are inviable, and those that survive to term are often mosaic for all or part of a second sex chromosome (Hassold et al. 1988; Bellott et al. 2014). The presence of Y-specific protein isoforms for eight X–Y gene pairs raises the possibility that even widely expressed ancestral genes on the Y chromosome may exhibit subtle functional differences and thus be responsible for sexual dimorphism in health and disease conditions (Bellott et al. 2014). Some of the X homologues of X–Y pairs (*KDM5C*, *UTX*, and *NLGN4X*) are responsible for X-linked intellectual disability syndromes in hemizygous males whereas heterozygous females show mild intellectual impairment (Lindgren et al. 2013; Rujirabanjerd et al. 2010; Shao et al. 2014). It can be speculated that deletion or mutations in the Y copy of these genes may also lead to similar phenotypes (see paragraph below). Moreover, recent studies report that either the loss of the Y chromosome or ectopic expression of Y chromosome genes are closely associated with various male-biased somatic cancers (Kido and Lau 2015).

In summary, although all of the above-described *MSY* genes are likely to play a role (either as essential factor or as a “fine tuner”) in spermatogenesis, their precise biological action remains poorly understood. In the absence of

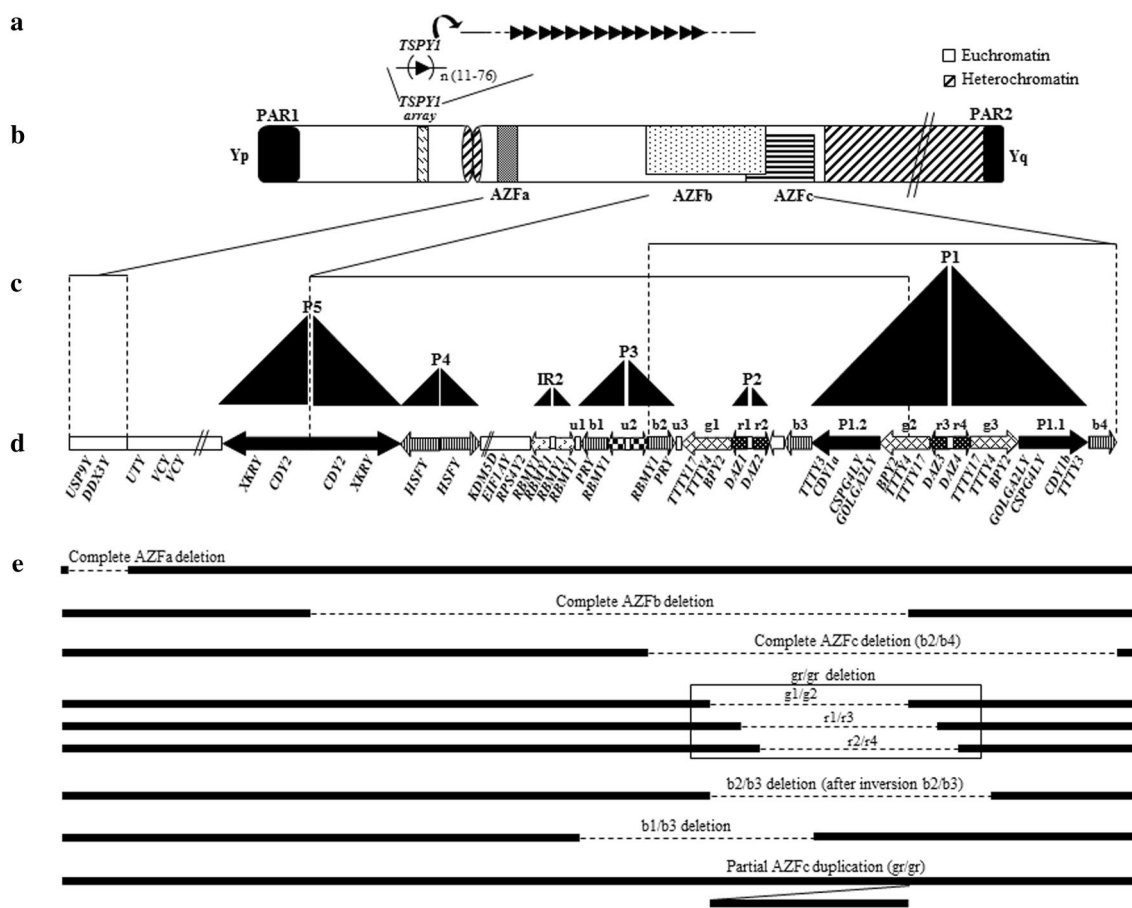
KO models of human Y genes, all of the available information on their putative spermatogenic function originates from testis mRNA and protein expression studies, KO of homologous genes, in vitro studies in hESC-derived germ cells and predicted biological function. As stated above, the search for isolated gene deletions was largely unsuccessful, and provided data only on two AZF genes (*USP9Y* and *HSFY*), demonstrating their non-essential role in spermatogenesis.

### Y chromosome-linked CNVs

As described in the previous paragraph, the Y chromosome should be considered a genetically dynamic

chromosome prone to significant variation owing to the high proportion of segmental duplications, which provide the structural basis for the generation of CNVs. From a clinical point of view, Y-linked CNVs can be divided into three major categories: (1) AZF deletions (complete and partial AZFa and AZFb), (2) partial AZFc deletions/duplications, (3) the *TSPY* array (Fig. 2).

1. Y chromosome microdeletions, removing the entire AZF regions (complete deletions), are one of the leading causes of spermatogenic failure and the screening for AZF deletions became part of the routine diagnostic work-up of men with severe oligozoospermia/azoospermia (Krausz et al. 2014). In 1976, Tiepolo and Zuffardi have demonstrated the first



**Fig. 2** Schematic representation of the Y chromosome, of the different regions/genes involved in spermatogenesis and of the Y-linked copy-number variations. **a** The *TSPY1* gene is located on the short arm of the Y chromosome (Yp) arranged in a tandemly repeated array. **b** Azoospermia factor regions (AZFa, b, and c) are present on the long arm of the Y chromosome (Yq) with an overlap between AZFb and c regions. **c** Triangles represent the relative sizes and the arm locations of palindromes in AZF regions (gaps between opposed triangles are the non-duplicated Y sequences). **d** The reference

sequence (Y haplogroup R1) shows the presence of multicopy genes and transcription units in the AZF regions. The arrows with the same motifs represent repeated homologous sequences, which may undergo NAHR. **e** Complete AZF deletions remove all genes in the region. Three partial AZFc deletions (*gr/gr*, *b2/b3*, *b1/b3*) are shown, which all remove half of the AZFc gene content. *gr/gr* deletion is depicted with three alternative breakpoints. An example of partial AZFc duplication (*gr/gr*) is shown (similarly to the *gr/gr* deletion, different breakpoints may give origin to different types of *gr/gr* duplications)

association between azoospermia and microscopically detectable deletions of the long arm of the Y chromosome (Yq). They proposed the presence of an AZF on distal Yq. After 20 years, Vogt et al. (1996) divided the AZF region into proximal, middle, and distal Yq11 sub-regions (AZFa, AZFb, and AZFc, respectively). The final characterization of the AZF regions was obtained after the sequencing of the Y chromosome. According to the last model, there are five different deletions patterns on Yq and the AZFb and AZFc regions are overlapping (Repping et al. 2002). In clinical practice, the five deletion hotspots are still called AZFa, AZFb, AZFb + c, and AZFc deletions, although the official nomenclature is based on the type of palindromes involved. Partial AZFa and AZFb deletions are extremely rare (Krausz et al. 2014 and references therein).

Complete AZFa deletion (removes 792 kb) occurs after homologous recombination between identical sequence blocks within the retroviral sequences in the same orientation HERV<sub>yq1</sub> and HERV<sub>yq2</sub> (Blanco et al. 2000; Kamp et al. 2000; Sun et al. 2000). The complete deletion of AZFb is caused by homologous recombination between the palindromes P5/proximal P1 that removes also part of the AZFc region belonging to P1 (Repping et al. 2002). This deletion removes 6.2 Mb. The complete deletion of AZFc removes 3.5 Mb, originates from the homologous recombination between amplicons b2 and b4 in palindromes P3 and P1, respectively (Kuroda-Kawaguchi et al. 2001). Deletions of both AZFb and AZFc regions have two potential breakpoints: (1) between P4/distal P1 removing 7.0 Mb sequence with 38 gene copies, (2) between P5/distal P1 removing 7.7 Mb with 42 gene copies. The most frequent deletion type is the AZFc region deletion (~80%) followed by AZFa (0.5–4%), AZFb (1–5%), and AZFbc (1–3%) deletion (Krausz et al. 2014). Deletions that are detected as AZFabc are most likely related to abnormal karyotype such as 46,XX male or iso(Y) (Lange et al. 2009).

The above deletions have a clear-cut cause–effect relationship with severe spermatogenic impairment since complete AZF deletions were never reported in normozoospermic men. The screening for Y chromosome microdeletions not only has a diagnostic but also a prognostic and preventive value. Deletions removing the entire AZFa or AZFb regions (complete deletions) are associated with azoospermia due to Sertoli cell-only syndrome (SCOS) and spermatogenic arrest (SGA), respectively. The rare partial AZFa and partial AZFb deletions are associated with residual sperm production. The complete AZFc deletions are associated with a variable semen phenotype ranging from oligozoospermia (mainly below 2 million spermatozoa/ml) to azoospermia (ranging from

SCOS to hypospermatogenesis). Accordingly, testicular sperm extraction (TESE) is not recommended in case of complete AZFa and AZFb deletions, whereas there is a 50% chance of sperm retrieval in azoospermic men carrying a complete AZFc deletion (Hopps et al. 2003; Kleiman et al. 2011; Krausz et al. 2000). In deletion carriers presenting oligozoospermia, there is a potential risk of a progressive decrease of sperm concentration over time, therefore sperm cryoconservation could be advised as a preventive treatment (McElreavey and Krausz 1999; Krausz and Degl’Innocenti 2006 and references therein). Overall, the frequency of these deletions is higher in azoospermic men (5–10%, reaching the highest value in “idiopathic azoospermia”), followed by severe oligozoospermic men (2–5%) (Lo Giacco et al. 2014).

In case spermatozoa are present in the ejaculate or in the testis (after TESE), patients can generate their own biological children either naturally or through assisted reproductive technology (ART). The large majority of deletions are de novo, but some naturally transmitted cases of partial AZFa or partial AZFb and complete AZFc deletions have also been described (Kichine et al. 2012; Kühnert et al. 2004 and references therein; Krausz et al. 2006; Luddi et al. 2009; Plotton et al. 2010). The deletion will be obligatory transmitted to the male offspring who will suffer either from oligo or azoospermia. Since the genetic background and exposure to environmental factors may modulate the phenotypic expression of AZFc deletions, the exact semen phenotype is not predictable in the son. An important issue, addressed only by a minority of studies, is whether AZF deletions might lead to other pathological conditions beside spermatogenic failure. Studies on men with Yq microdeletions (Jaruzelska et al. 2001; Siffroi et al. 2000) and on patients bearing a mosaic 46,XY/45,X karyotype with sexual ambiguity and/or Turner stigmata (Papadimas et al. 2001; Papanikolaou et al. 2003; Patsalis et al. 2002, 2005), suggested that there is an association between some Yq microdeletions and an overall Y-chromosomal instability which might result in the formation of 45,X cell lines. The limited data on children born from AZF deletion carriers show that they are apparently healthy. However, it is worth noticing that fetus with 45,X karyotype have a very high risk of spontaneous abortion and there are no data about the abortion rate in these couples. Preimplantation genetic diagnosis (PGD) has been performed by two groups with conflicting data about the risk of monosomy X in embryos (Mateu et al. 2010; Stouffs et al. 2005) with consequent need for future investigations.

In 2011, Jorgez et al. (2011) reported that 5.4% of men with AZF microdeletion and normal karyotype displayed haploinsufficiency of the *SHOX* gene located in the pseudoautosomal region PAR1 on the short arm of



the Y chromosome. The authors proposed that the mechanism underlying Y-chromosome microdeletions might also be associated with the occurrence of PAR rearrangements and therefore, might be at higher risk for incurring PAR-related disorders such as SHOX-haploinsufficiency, which is responsible for short stature and skeletal anomalies (Mangs and Morris 2007 and references therein). This highly alarming risk for developing PAR-related disorders prompted researchers to clarify this issue in the context of a large multicenter study. Data on 224 patients with Y chromosome microdeletions and normal karyotype did not confirm the association between partial or complete microdeletions and SHOX haploinsufficiency (Chianese et al. 2013). This data has been confirmed by Castro et al. (2017) who reported PAR abnormalities exclusively in patients with terminal AZFbc deletion associated with isochromosome Yp and/or Y nullisomy. The authors of this recent study report neuropsychiatric disorders in 5/7 patients with terminal AZFbc deletion and abnormal karyotype and hypothesize that CNVs in the pseudoautosomal regions (PARs) and/or the removal of MSY genes such as *NLGN4Y* may play a role in the observed neuropsychiatric disorders. Although not mentioned by the authors, we can also speculate that the removal of the *KDM5D* gene (mapped to the AZFb region) may contribute to these pathological conditions. Moreover, *KDM5D* is among the seven sex chromosome genes showing sexually dimorphic expression in the developing mouse cortex and hippocampus, which may indicate a role for this gene in the development of neural circuits governing distinct behaviors between the sexes as adults (Armoskus et al. 2014). The association between neuropsychiatric disorders and terminal AZFbc deletions needs further confirmation especially in view of the lack of such neurodevelopmental disorders in XX males (Vorona et al. 2007).

2. The AZFc region is rich in amplicons; therefore, it is predisposed to a series of rearrangements including partial deletions or duplications and deletions followed by duplication(s). The role of these rearrange-

ments has been the object of long-lasting debates. The clinically most relevant partial AZFc deletion is called gr/gr, which received its name after the fluorescent probes ('green' and 'red') used for its discovery by Repping et al. (2003). This deletion is associated with a highly variable phenotype ranging from azoo- to normozoospermia. However, its frequency is significantly higher in oligozoospermic men and according to five meta-analyses (Tüttelmann et al. 2007; Visser et al. 2009; Navarro-Costa et al. 2010a; Stouffs et al. 2011; Bansal et al. 2016) and to the largest multi-ethnic study (Rozen et al. 2012), the gr/gr deletion increases by 2–2.5 fold the risk for reduced sperm output. Indeed, by removing half of the gene content, this deletion represents a significant risk factor for spermatogenic impairment. However, the entity of this risk varies between populations and shows the highest values in the Mediterranean area. Indeed, the highest risk was found in the Italian population (Ferlin et al. 2005; Giachini et al. 2005, 2008). The updated OR for the Italian cohort from Florence (642 patients and 685 controls) is of 5.8 (CI 2.0–16.9,  $p = 0.001$ ), whereas the combined data of the Spanish (Lo Giacco et al. 2014) and Italian cohorts show a similarly high value (OR 4.2, CI 2.0–8.8,  $p < 0.001$ ); (Table 2). This suggests that the screening for gr/gr deletion should be performed according to the level of conferred risk in a given population.

Although the deletion removes half of the AZFc gene content, it may have different breakpoints leading to the removal of distinct gene copies. First, it has been proposed that the variability in semen phenotype may depend on the remaining gene copies. In fact, a number of studies reported that *DAZI/DAZ2* copies (and in some papers *CDY1a*) are specifically or predominantly removed in patients with respect to normozoospermic controls (Fernandes et al. 2002; Ferlin et al. 2005; Giachini et al. 2005, 2008; Yang et al. 2008a, 2010; Li et al. 2013; Wang et al. 2016). Since some gr/gr deletions are followed by duplications, hence restoring gene dosage, it has been proposed that gene copy

**Table 2** Comparison of gr/gr deletion frequencies and ORs between the following three different study populations from the Mediterranean area: Giachini et al. (2008); the Giachini et al. study population

		gr/gr deletion frequency		Chi-square test	
		Patients gr/gr/tot	Control gr/gr/tot	OR (95% CI)	<i>p</i> values
Italian population	Giachini et al. (2008)	18/556 (3.2%)	2/487 (0.4%)	7.9 (1.8–33.8)	0.001
	Updated to 2016	21/642 (3.3%)	4/685 (0.6%)	5.8 (2.0–16.9)	0.001
Spanish population	Lo Giacco et al. (2014)	12/302 (3.9%)	5/359 (1.4%)	2.9 (1.02–8.0)	0.032
Italian + Spanish population		33/944 (3.5%)	9/1044 (1%)	4.2 (2.0–8.8)	<0.001

up-dated to 2016; the Lo Giacco et al. (2014) cohort; combination of the three study populations

number may be another modulating factor of the semen phenotype (Noordam et al. 2011). A definitive answer to the question of whether Y chromosomal background, the type of remaining AZFc gene copies, and the dosage of genes may explain phenotypic variability comes from the largest-to-date cohort from the Western European population (Krausz et al. 2009). In this study, a similar distribution of the deletion of different *DAZ* and *CDY1* copies and of Y chromosomal haplogroups was found between gr/gr deletion carriers with normal and abnormal sperm parameters (Krausz et al. 2009). Moreover, in contrast to the Dutch study, the restoration of gene dosage due to duplication was not significantly more frequent in normozoospermic men. Interestingly enough, in line with a recent study (Yang et al. 2015), the presence of deletion followed by duplications affected even more seriously the sperm count than isolated gr/gr deletion. Since in the multicenter study geographic differences were detected concerning the subtypes of gr/gr deletion, it is possible that this genetic anomaly is more penetrant in certain populations than in others. This deletion type also shows large differences in its prevalence from 2% (in the United States) to 15% (in Vietnam) (Rozen et al. 2012). Interestingly enough, Y background seems to play a role in the clinical manifestation of gr/gr deletion in some Asian populations (see paragraph below).

In addition to the gr/gr deletion, two other partial AZFc deletions (b2/b3 and b1/b3) were objects of a number of studies. Both deletions remove 12 gene copies and transcription units and seem not to have a significant effect on male infertility (Repping et al. 2004; Bansal et al. 2016 and references therein; Rozen et al. 2012) with the exception of the Chinese, Moroccan, and South Indian populations, where the b2/b3 deletion shows a strong association with male infertility (Wu et al. 2007; Lu et al. 2009, 2014; Eloulid et al. 2012; Vijesh et al. 2015). Concerning b1/b3, data are scarce due to its low frequency. By analyzing 20,000 Y chromosomes, Rozen and collaborators found 2.5-fold increased risk of developing severe spermatogenic failure in men carrying the b1/b3 deletion.

The questions about a potential deleterious effect of an excess AZFc gene dosage has been proposed based on the fact that the copy number of AZFc-linked genes shows limited inter-individual variation. Hence, a natural selection may act for the conservation of an “optimal” copy number, by removing exceptionally high or low copy number variants from the population (Repping et al. 2006). Studies in the Han Chinese and Chinese-Yi populations reported an association between increased AZFc gene dosage and infertility (Lin et al. 2007; Ye et al. 2013; Yang et al. 2015). Similarly, Noordam et al. (2011) suggested that a higher *DAZ* gene dosage could be deleterious for spermatogenesis also in a cohort of multiethnic patients attending a Dutch infertility clinic. This association was not found in the Italian and Spanish populations where

the frequency of duplications in patients and normozoospermic controls was similar (Giachini et al. 2008; Lo Giacco et al. 2014). Whether this discrepancy has a molecular explanation remains to be established; it is expected that the recently described method for the distinction of different amplified gene copies may provide some clues to it (Vaszko et al. 2017).

3. Apart from the long arm of the Y chromosome, the Y<sub>p</sub>, also contains a multicopy gene, *TSPY1*, with a potential role in spermatogenesis. *TSPY* gene copies are arranged in 20.4-kb of tandemly repeated units, with different copy numbers (ranging from 11 to 76) among individuals (Tyler-Smith et al. 1988). In about 65% of the Italian population, the copy number interval is restricted (21–35 copies) (Giachini et al. 2009), suggesting that a minimum *TSPY1* copy number is likely to be maintained through selection (Tyler-Smith 2008). *TSPY* was originally described as the putative gene for the gonadoblastoma locus on the Y (GBY) chromosome with potential involvement also in other human cancers (Lau et al. 2009). Besides its oncogenic properties, expression analyses converge on a physiological involvement of the TSPY1 protein in spermatogenesis as a pro-proliferative factor expressed in gonocytes/pre-spermatogonia of embryonic testis, in spermatogonia or spermatocytes at meiotic prophase I in adult testis and in early fetal germ cells (Schöner et al. 2010; Lau et al. 2009). Since the mean copy number of *TSPY* is significantly different among different Y haplogroups (Mathias et al. 1994; Giachini et al. 2009), Y haplogroup-matching between cases and controls is crucial for a reliable analysis (Tyler-Smith 2008). The few studies on *TSPY* copy number in relation to male infertility reached different conclusions, which may derive from population stratification bias (Giachini et al. 2009; Vodicka et al. 2007; Nickkhogh et al. 2010). In fact, only the Italian study avoided this potential confounder by analyzing cases and controls matched for their Y hgr distribution. This original study from Florence has been further enlarged and reached the same conclusion, i.e., *TSPY1* copy number influences spermatogenic efficiency and it is positively correlated with sperm count (Giachini et al. 2009; Krausz et al. 2011).

## Y chromosome background and spermatogenesis

Studies dealing with the Y chromosome background in relationship with male infertility can be divided into three groups: (1) search for “at-risk” Y hgrs for spermatogenic disturbances; (2) search for predisposing Y chromosome

background to AZF deletion formation; (3) analysis of the role of Y hgrs in the phenotypical penetrance of partial AZFc deletions.

1. The human Y chromosome belongs to different paternal lineages, called Y chromosome haplogroups, which display very specific patterns of geographical clustering (Seielstad et al. 1994; Tyler-Smith 2008). A chromosomal haplogroup refers to a group of chromosomes sharing a similar combination of allelic states at slowly mutating binary markers at multiple loci (a combination is called haplotype) (Jobling and Tyler-Smith 2003). The localization of these binary markers in the MSY region (which does not recombine with the X chromosome) is responsible for the largely intact passage of their combinations from generation to generation and for the possible tight association between these markers and potential functional variants (undetected microdeletions, or sequence variants) located in this region and associated with Y-linked phenotypes. It is therefore plausible that the definition of Y chromosome haplogroups in patients vs. disease-free and/or the general population is an indirect way of exploring if Y chromosome-linked factors are involved in the etiology of a specific disease (Krausz et al. 2004 and references therein). The hypothesis of an “at-risk Y haplogroup” for spermatogenic disturbances was reported in the Danish, Han Chinese, and Latvian populations but not in others such as Italian, Kinki, and Indian populations (Krausz et al. 2004 and reference therein; Singh and Raman 2009). In Denmark, one class of Y chromosomes (haplogroup K+) was significantly over-represented in idiopathic oligo- or azoospermic men conferring a risk to develop spermatogenic impairment about nine times greater (OR 8.92, 2.8–28.5, CI 95%) than Danish men with hg 1 (the most frequent hgr in Denmark). These data suggested that hg K+ may be under negative selection in Denmark because this haplogroup is associated with decreased reproductive fitness (Krausz et al. 2001). The susceptibility of haplogroup K to spermatogenic failure was suggested in the Han Chinese and Latvian populations by reporting a significantly higher frequency of this hgr among azoo/oligozoospermic men than in controls (Lu et al. 2007, 2013; Yang et al. 2008b; Puzuka et al. 2011). Molecular analysis of the AZFc region suggests that *DAZ* and *BPY2* duplications might underlie the susceptibility of haplogroup K and O1 to spermatogenic impairment in the Han Chinese population (Lu et al. 2013, 2014). On the other hand, the haplogroup R1a1 and O3e seem to have a protective effect on impaired spermatogenesis in Latvian and Han Chinese populations, respectively (Puzuka et al. 2011; Lu et al. 2013). Highly contradictory results have been published concerning the Japanese population since both an association (Kuroki et al. 1999; Sato et al. 2013, 2014) and lack of association (Carvalho et al. 2004) between hgr D/D2 and infertility were reported (Table 3a).
2. Another line of research on Y hgrs and male infertility deals with the relationship between Y chromosome background and AZF deletion formation. It has been hypothesized that sequence differences or different orientation of the repeated blocks may predispose or protect against specific types of deletions. A logical example could be a higher homology between the two retroviral blocks in the flanking sequences of the AZFa region (this occurs after the polymorphic deletion of L1PA4 element) facilitating, in theory, their recombination. To rule out this hypothesis, the haplotype distribution in men carrying Y chromosome microdeletions from Scotland, Germany, Italy, Spain, Holland, France, Ireland, Denmark, and Israel was compared with haplotype distribution of infertile men without microdeletions (Paracchini et al. 2000; Carvalho et al. 2004) or unselected male control population (Quintana-Murci et al. 2001). These studies concluded that chromosome deletion formation is a stochastic event, independent from the Y chromosome background. However, more recent studies reached different conclusions. A study conducted in the Italian population showed a significantly higher frequency of haplogroup E (29.3 vs. 9.7%,  $p = 0.01$ ) in North Italian patients carrying the AZFc microdeletion than those without the microdeletion. The authors concluded that in the North Italian population, haplogroup E probably predisposes to the occurrence of b2/b4 deletions (Arredi et al. 2007). In the South Amerindian population the Q1a3a haplogroup significantly increases the susceptibility to AZFb deletion when compared to controls or cases without deletions or to those with complete or partial-AZFc deletions (Lardone et al. 2013). Haplogroups C and DE\* have been associated with increased rates of partial deletions in the Chinese population (Yang et al. 2008a, b) and haplogroups C3, E1, and G are also particularly prone to partial deletions and duplication affecting the proximal AZFc domain in Russia/Kyrgyzstan, African, and Asian populations, respectively (Balaesque et al. 2008). The above discovery of specific haplogroups with an increased propensity for the occurrence of partial AZFc deletions may explain differences in the frequencies of partial AZFc deletions between populations. Another AZFc-linked CNV with unknown functional effect on spermatogenesis (a 200-

**Table 3** Studies dealing with the Y chromosome background in relationship with male infertility: (a) association of Y hgrs with spermatogenic disturbances; (b) association of Y chromosome background with AZF deletion formation; (c) analysis of the role of Y hgrs in the phenotypical penetrance of partial AZFc deletions

**a. Y hgr and male infertility**

Reference	Population	Hgr	Hgr effect on semen phenotype
Krausz et al. (2001)	Danish	K+	Predisposing to oligo/azoospermia
Lu et al. (2007, 2013) and Yang et al. (2008b)	Han Chinese	K	Predisposing to oligo/azoospermia
Puzuka et al. (2011)	Latvian	K	Predisposing to oligo/azoospermia
Sato et al. (2013, 2014) and Kuroki et al. (1999)	Japanese	D2	Predisposing to azoospermia
Lu et al. (2007, 2013)	Han Chinese	O3e*	Protective to oligo/azoospermia
Puzuka et al. (2011)	Latvian	R1a1	Protective to oligo/azoospermia

**b. Y hgr and specific AZF rearrangements**

Reference	Population	Hgr	Type of rearrangement	Hgr effect on rearrangements
Arredi et al. (2007)	North Italian	E	Complete AZFc	Predisposing
Lardone et al. (2013)	South Amerindian	Q1a3a	Complete AZFb	Predisposing
Yang et al. (2008a, b)	Han Chinese	C, DE*	Partial AZFc deletions	Predisposing
Balaresque et al. (2008)	Russia/Kyrgyzstan	C3	Proximal AZFc deletion (DYS448)	Predisposing
	African	E1	Proximal AZFc duplication (DYS448)	Predisposing
	Asian	G	Proximal AZFc duplication (DYS448)	Predisposing
Lopes et al. (2013)	Caucasian	R1	Gains of <i>DYZ19</i>	Predisposing
	Caucasian	I, J	Losses of <i>DYZ19</i>	Predisposing
Arredi et al. (2007)	North Italian	J	Complete AZFc	Protective
Yang et al. (2008a, b)	Han Chinese	O3	Partial AZFc deletions	Protective
Balaresque et al. (2008)	Multiethnic population	R	Proximal AZFc deletion/duplication (DYS448)	Protective

**c. Y hgr and phenotypical penetrance of partial AZFc rearrangements**

Reference	Population	Hgr	Associated type of rearrangements	Negative effect on spermatogenesis
Choi et al. (2012)	Korean	YAP–	gr/gr deletion	Present
Lu et al. (2013, 2014)	Han Chinese	K, O1	<i>DAZ</i> and <i>BPY2</i> duplications	Present
de Carvalho et al. (2006) and Sin et al. (2010)	Japanese	D2	gr/gr deletion	Absent
Zhang et al. (2007)	Han Chinese	Q1	gr/gr deletion	Absent
Fernandes et al. (2004) and Zhang et al. (2007)	Han Chinese, Asian, European	N*, N1	b2/b3 deletion	Absent

kb tandem repeat on Yq11.22, *DYZ19*, approximately 500 kb distal to palindrome P4) has been reported in association with specific Y hgrs (Lopes et al. 2013). Both gains and losses involving this region have been reported more frequently in oligo/azoospermic men than in the general population (Lopes et al. 2013). The type of copy number changes of this tandem repeat appears to be associated with specific Y backgrounds such as the R1 hgr with gains, whereas the I and J hgrs with losses, suggesting that the different structure of the chromosome may predispose to different rearrangements.

On the other hand, “protective” Y haplogroups (J, R, and O3) against the AZFc deletion have also been reported (Arredi et al. 2007; Balaresque et al. 2008; Yang et al. 2008a, b). The exact molecular bases to explain susceptibility or protection against the formation of deletions remain unexplored and await further research (Table 3c).

3. Finally, a possible role for the Y chromosome background was hypothesized in relationship with the phenotypical penetrance of a given AZFc deletion. For instance, in the Korean population, the gr/gr deletion

seems to be associated with impaired spermatogenesis only in patients with YAP- lineage (Choi et al. 2012). An intriguing issue concerns those Y hgrs on which partial AZFc deletions are fixed. For instance, gr/gr deletion is fixed in haplogroups D2b1 and Q1, common in Japan and in certain areas of China, whereas b2/b3 deletion is fixed in haplogroup N\* and N1 (Repping et al. 2003, 2004; Fernandes et al. 2004; de Carvalho et al. 2006; Zhang et al. 2007; Sin et al. 2010; Bansal et al. 2016 and reference therein). Since “fixed” deletions do not seem to negatively affect fertility, the presence of lineage-specific compensatory factors were proposed by several authors (Wu et al. 2007; Sin et al. 2010; Yang et al. 2008a, b, 2010; Navarro-Costa et al. 2010a) (Table 3b).

## Conclusions

The pivotal role of the Y chromosome in spermatogenesis is supported by the presence of Y-linked genes specialized in male reproductive fitness. The removal of these genes *en block* in the AZF regions causes distinct pathological testis phenotypes. After 20 years from the first molecular definition of the AZF regions, Yq deletion screening became a routine diagnostic test with clear-cut cause–effect relationship with severely impaired spermatogenesis. However, there are still some clinical questions that prompt further investigations. For instance, there is an urgent need for more data on pregnancies’ outcome and the health status of children born from AZF deletion carriers. It is especially relevant in view of the potential risk of mosaicism due to the instability of the deleted Y chromosome. In addition, the question of whether partial AZFc deletions act as a pre-mutation to complete AZFc deletion needs to be clarified due to its obvious importance for the future descendants of gr/gr deletion carriers (Zhang et al. 2007; Lu et al. 2009). If this mechanism is going to be further confirmed, the couple should be aware that besides the obligatory transmission of a genetic risk factor for impaired sperm production (gr/gr deletion) to the male offspring, there is a higher risk for the transmission of a complete AZFc deletion, i.e., a clear-cut causative factor for spermatogenic impairment.

Apart from the above concerns related to the descendants of deletion carriers, also Y deletion carriers themselves should be followed-up over time. In fact, it is unknown whether the “fragility” of the Y chromosome is a marker for general “genomic instability” potentially affecting the general health status of the carriers. Especially subjects with multiple Y rearrangements may be at a theoretical higher risk for a more generalized chromosomal instability. Two studies report that multiple duplications of a partial AZFc-deleted

structure has a more serious effect on spermatogenesis than the partial deletion-only mutation (Krausz et al. 2009; Yang et al. 2015). Two possible reasons were proposed to explain this phenomenon: (1) the excessive AZFc NAHR-substrate may increase the risk for AZFc deletions during the division of germ cells and thus may lead to testicular mosaicism (i.e., tubules with absent spermatogenesis); (2) it may indicate a more generalized tendency to deletion load across the genome affecting also other genes involved in spermatogenesis (and perhaps in other diseases). Data to support this latter hypothesis come from array-CGH studies showing a significantly higher deletion load (genome-wide, with a burden on the sex chromosomes) in men with impaired sperm production versus normozoospermic controls (Tüttelmann et al. 2011; Krausz et al. 2012; Lopes et al. 2013).

Finally, with the advent of NGS, large-scale Y chromosome-linked gene mutation screenings are expected in the near future. These analyses have the potential to provide important insights into two unanswered basic questions. First, it will most likely allow the definition of the gene(s) responsible in each AZF region for the respective deletion phenotype and their function. Second, it has the potential to shed light on the molecular basis of the predisposing Y hgrs to impaired spermatogenesis and of the predicted lineage specific compensatory factors on the Y chromosome. It is clear that after 40 years from the first description of the AZF region (Tipeolo and Zuffardi 1976), research on the Y chromosome in relationship to spermatogenic failure continues to be one of the most exciting fields of androgenetics.

**Acknowledgements** The authors thank Prof. G. Forti for his continuous support of research on the Y chromosome; we are also grateful to the ex and current members of the Molecular Genetic laboratory (responsible C Krausz), C. Giachini, C. Chianese, D. Lo Giacco, E. Guarducci, S. Degl’Innocenti, I. Laface, S. Vinci, M. Fino, and A. Riera-Escamilla for their contribution to the original data presented in this review. Funding from the Istituto Toscano Tumori (ITT) grant 2013-2016 to CK is acknowledged.

## Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** On behalf of all authors, the corresponding author states that there are no conflicts of interest.

## References

- Akimoto C, Kitagawa H, Matsumoto T, Kato S (2008) Spermatogenesis-specific association of SMCY and MSH5. *Genes Cells* 13(6):623–633. doi:10.1111/j.1365-2443.2008.01193.x
- Andrés O, Kellermann T, López-Giráldez F, Rozas J, Domingo-Roura X, Bosch M (2008) *RPS4Y* gene family evolution in primates. *BMC Evol Biol* 8:142. doi:10.1186/1471-2148-8-142
- Armoskus C, Moreira D, Bollinger K, Jimenez O, Taniguchi S, Tsai HW (2014) Identification of sexually dimorphic genes in the neonatal mouse cortex and hippocampus. *Brain Res* 1562:23–38. doi:10.1016/j.brainres.2014.03.017

- Arredi B, Ferlin A, Speltra E, Bedin C, Zuccarello D, Ganz F, Marchina E, Stuppia L, Krausz C, Foresta C (2007) Y-chromosome haplogroups and susceptibility to azoospermia factor c microdeletion in an Italian population. *J Med Genet* 44(3):205–208
- Balaresque P, Bowden GR, Parkin EJ, Omran GA, Heyer E, Quintana-Murci L, Roewer L, Stoneking M, Nasidze I, Carvalho-Silva DR, Tyler-Smith C, de Knijff P, Jobling MA (2008) Dynamic nature of the proximal AZFc region of the human Y chromosome: multiple independent deletion and duplication events revealed by microsatellite analysis. *Hum Mutat* 29(10):1171–1180. doi:10.1002/humu.20757
- Bansal SK, Jaiswal D, Gupta N, Singh K, Dada R, Sankhwar SN, Gupta G, Rajender S (2016) Gr/gr deletions on Y-chromosome correlate with male infertility: an original study, meta-analyses, and trial sequential analyses. *Sci Rep* 6:19798. doi:10.1038/srep19798
- Bellott DW, Hughes JF, Skaletsky H, Brown LG, Pyntikova T, Cho TJ, Koutseva N, Zaghlul S, Graves T, Rock S, Kremitzki C, Fulton RS, Dugan S, Ding Y, Morton D, Khan Z, Lewis L, Buhay C, Wang Q, Watt J, Holder M, Lee S, Nazareth L, Alföldi J, Rozen S, Muzny DM, Warren WC, Gibbs RA, Wilson RK, Page DC (2014) Mammalian Y chromosomes retain widely expressed dosage-sensitive regulators. *Nature* 508(7497):494–499. doi:10.1038/nature13206
- Bergen AW, Pratt M, Mehlman PT, Goldman D (1998) Evolution of *RPS4Y*. *Mol Biol Evol* 15(11):1412–1419
- Blanco P, Shlumukova M, Sargent CA, Jobling MA, Affara N, Hurler ME (2000) Divergent outcomes of intrachromosomal recombination on the human Y chromosome: male infertility and recurrent polymorphism. *J Med Genet* 37(10):752–758
- Cao PR, Wang L, Jiang YC, Yi YS, Qu F, Liu TC, Lv Y (2015) De novo origin of *VCY2* from autosome to Y-transposed amplicon. *PLoS ONE* 10(3):e0119651. doi:10.1371/journal.pone.0119651
- Carvalho CM, Rocha JL, Santos FR, Kleiman SE, Paz G, Yavetz H, Pena SD (2004) Y-chromosome haplotypes in azoospermic Israeli men. *Hum Biol* 76(3):469–478
- Castrillon DH, Gönczy P, Alexander S, Rawson R, Eberhart CG, Viswanathan S, DiNardo S, Wasserman SA (1993) Toward a molecular genetic analysis of spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*: characterization of male-sterile mutants generated by single P element mutagenesis. *Genetics* 135(2):489–505
- Castro A, Rodríguez F, Flórez M, López P, Curotto B, Martínez D, Maturana A, Lardone MC, Palma C, Mericq V, Ebensperger M, Cassorla F (2017) Pseudoautosomal abnormalities in terminal AZFb + c deletions are associated with isochromosomes Yp and may lead to abnormal growth and neuropsychiatric function. *Hum Reprod* 32(2):465–475. doi:10.1093/humrep/dew333
- Chai NN, Zhou H, Hernandez J, Najmabadi H, Bhasin S, Yen PH (1998) Structure and organization of the RBMY genes on the human Y chromosome: transposition and amplification of an ancestral autosomal *hnRNP* gene. *Genomics* 49(2):283–289
- Chianese C, Lo Giacco D, Tüttelmann F, Ferlin A, Ntostis P, Vinci S, Balercia G, Ars E, Ruiz-Castañé E, Giglio S, Forti G, Kliesch S, Krausz C (2013) Y-chromosome microdeletions are not associated with SHOX haploinsufficiency. *Hum Reprod* 28(11):3155–3160. doi:10.1093/humrep/det322
- Choi J, Song SH, Bak CW, Sung SR, Yoon TK, Lee DR, Shim SH (2012) Impaired spermatogenesis and gr/gr deletions related to Y chromosome haplogroups in Korean men. *PLoS ONE* 7(8):e43550. doi:10.1371/journal.pone.0043550
- de Carvalho CM, Zuccherato LW, Fujisawa M, Shirakawa T, Ribeiro-dos-Santos AK, Santos SE, Pena SD, Santos FR (2006) Study of AZFc partial deletion gr/gr in fertile and infertile Japanese males. *J Hum Genet* 51(9):794–799
- Ditton HJ, Zimmer J, Kamp C, Rajpert-De Meyts E, Vogt PH (2004) The AZFa gene *DBY (DDX3Y)* is widely transcribed but the protein is limited to the male germ cells by translation control. *Hum Mol Genet* 13(19):2333–2341
- Dreumont N, Bourgeois CF, Lejeune F, Liu Y, Ehrmann IE, Elliott DJ, Stévenin J (2010) Human RBMY regulates germline-specific splicing events by modulating the function of the serine/arginine-rich proteins 9G8 and Tra2- $\beta$ . *J Cell Sci* 123(Pt 1):40–50. doi:10.1242/jcs.055889
- Dromard M, Bompard G, Glondu-Lassis M, Puech C, Chalbos D, Freiss G (2007) The putative tumor suppressor gene *PTPN13/PTPL1* induces apoptosis through insulin receptor substrate-1 dephosphorylation. *Cancer Res* 67(14):6806–6813
- Eberhart CG, Maines JZ, Wasserman SA (1996) Meiotic cell cycle requirement for a fly homologue of human deleted in azoospermia. *Nature* 381(6585):783–785
- Elliott DJ (2004) The role of potential splicing factors including RBMY, RBMX, hnRNP-G-T and STAR proteins in spermatogenesis. *Int J Androl* 27(6):328–334
- Elliott DJ, Millar MR, Oghene K, Ross A, Kiesewetter F, Pryor J, McIntyre M, Hargreave TB, Saunders PT, Vogt PH, Chandley AC, Cooke H (1997) Expression of RBM in the nuclei of human germ cells is dependent on a critical region of the Y chromosome long arm. *Proc Natl Acad Sci USA* 94(8):3848–3853
- Elliott DJ, Oghene K, Makarov G, Makarova O, Hargreave TB, Chandley AC, Eperon IC, Cooke HJ (1998) Dynamic changes in the subnuclear organisation of pre-mRNA splicing proteins and RBM during human germ cell development. *J Cell Sci* 111(Pt 9):1255–1265
- Eloualid A, Rhaissi H, Reguig A, Bounaceur S, El Houate B, Abidi O, Charif M, Louanjli N, Chadli E, Barakat A, Bashambo A, McElreavey K, Rouba H (2012) Association of spermatogenic failure with the b2/b3 partial AZFc deletion. *PLoS ONE* 7(4):e34902. doi:10.1371/journal.pone.0034902
- Ferlin A, Tessari A, Ganz F, Marchina E, Barlati S, Garolla A, Engl B, Foresta C (2005) Association of partial AZFc region deletions with spermatogenic impairment and male infertility. *J Med Genet* 42(3):209–213
- Fernandes S, Huellen K, Goncalves J, Dukal H, Zeisler J, Rajpert De Meyts E, Skakkebaek NE, Habermann B, Krause W, Sousa M, Barros A, Vogt PH (2002) High frequency of *DAZ1/DAZ2* gene deletions in patients with severe oligozoospermia. *Mol Hum Reprod* 8(3):286–298
- Fernandes S, Paracchini S, Meyer LH, Florida G, Tyler-Smith C, Vogt PH (2004) A large AZFc deletion removes *DAZ3/DAZ4* and nearby genes from men in Y haplogroup N. *Am J Hum Genet* 74(1):180–187
- Fu XF, Cheng SF, Wang LQ, Yin S, De Felici M, Shen W (2015) *DAZ* family proteins, key players for germ cell development. *Int J Biol Sci* 11(10):1226–1235. doi:10.7150/ijbs.11536
- Giachini C, Guarducci E, Longepied G, Degl'Innocenti S, Becherini L, Forti G, Mitchell MJ, Krausz C (2005) The gr/gr deletion(s): a new genetic test in male infertility? *J Med Genet* 42(6):497–502
- Giachini C, Laface I, Guarducci E, Balercia G, Forti G, Krausz C (2008) Partial AZFc deletions and duplications: clinical correlates in the Italian population. *Hum Genet* 124(4):399–410. doi:10.1007/s00439-008-0561-1
- Giachini C, Nuti F, Turner DJ, Laface I, Xue Y, Daguin F, Forti G, Tyler-Smith C, Krausz C (2009) TSPY1 copy number variation influences spermatogenesis and shows differences among Y lineages. *J Clin Endocrinol Metab* 94(10):4016–4022. doi:10.1210/jc.2009-1029

- Ginalski K, Rychlewski L, Baker D, Grishin NV (2004) Protein structure prediction for the male-specific region of the human Y chromosome. *Proc Natl Acad Sci USA* 101(8):2305–2310
- Hassold T, Benham F, Leppert M (1988) Cytogenetic and molecular analysis of sex-chromosome monosomy. *Am J Hum Genet* 42(4):534–541
- Hecht NB (1998) Molecular mechanisms of male germ cell differentiation. *BioEssays* 20(7):555–561
- Hopps CV, Mielnik A, Goldstein M, Palermo GD, Rosenwaks Z, Schlegel PN (2003) Detection of sperm in men with Y chromosome microdeletions of the AZFa, AZFb and AZFc regions. *Hum Reprod* 18(8):1660–1665
- Jaroszynski L, Zimmer J, Fietz D, Bergmann M, Kliesch S, Vogt PH (2011) Translational control of the AZFa gene *DDX3Y* by 5'UTR exon-T extension. *Int J Androl* 34(4):313–326. doi:10.1111/j.1365-2605.2010.01079.x
- Jaruzelska J, Korcz A, Wojda A, Jedrzejczak P, Bierla J, Surmacz T, Pawelczyk L, Page DC, Kotecki M (2001) Mosaicism for 45, X cell line may accentuate the severity of spermatogenic defects in men with AZFc deletion. *J Med Genet* 38(11):798–802
- Jobling MA, Tyler-Smith C (2003) The human Y chromosome: an evolutionary marker comes of age. *Nat Rev Genet* 4(8):598–612
- Jorgez CJ, Weedon JW, Sahin A, Tannour-Louet M, Han S, Bourmat JC, Mielnik A, Cheung SW, Nangia AK, Schlegel PN, Lipshultz LI, Lamb DJ (2011) Aberrations in pseudoautosomal regions (PARs) found in infertile men with Y-chromosome microdeletions. *J Clin Endocrinol Metab* 96(4):E674–E679. doi:10.1210/jc.2010-2018
- Kamp C, Hirschmann P, Voss H, Huellen K, Vogt PH (2000) Two long homologous retroviral sequence blocks in proximal Yq11 cause AZFa microdeletions as a result of intrachromosomal recombination events. *Hum Mol Genet* 9(17):2563–2572
- Kauppi L, Barchi M, Baudat F, Romanienko PJ, Keeney S, Jasin M (2011) Distinct properties of the XY pseudoautosomal region crucial for male meiosis. *Science* 331(6019):916–920. doi:10.1126/science.1195774
- Kee K, Angeles VT, Flores M, Nguyen HN, Reijo Pera RA (2009) Human *DAZL*, *DAZ* and *BOULE* genes modulate primordial germ-cell and haploid gamete formation. *Nature* 462(7270):222–225. doi:10.1038/nature08562
- Kichine E, Rozé V, Di Cristofaro J, Taulier D, Navarro A, Streichenberger E, Decarpentrie F, Metzler-Guillemain C, Lévy N, Chiaroni J, Paquis-Flucklinger V, Fellmann F, Mitchell MJ (2012) HSFY genes and the P4 palindrome in the AZFb interval of the human Y chromosome are not required for spermatocyte maturation. *Hum Reprod* 27(2):615–624. doi:10.1093/humrep/der421
- Kido T, Lau YF (2015) Roles of the Y chromosome genes in human cancers. *Asian J Androl* 17(3):373–380. doi:10.4103/1008-682X.150842
- Kleiman SE, Yogev L, Hauser R, Botchan A, Maymon BB, Paz G, Yavetz H (2007) Expression profile of AZF genes in testicular biopsies of azoospermic men. *Hum Reprod* 22(1):151–158
- Kleiman SE, Yogev L, Lehavi O, Hauser R, Botchan A, Paz G, Yavetz H, Gamzu R (2011) The likelihood of finding mature sperm cells in men with AZFb or AZFb-c deletions: six new cases and a review of the literature (1994–2010). *Fertil Steril* 95(6):2005–2012, 2012.e1–4. doi:10.1016/j.fertnstert.2011.01.162
- Kotov AA, Olenkina OM, Kibanov MV (1863) Olenina LV (2016) RNA helicase Belle (*DDX3*) is essential for male germline stem cell maintenance and division in *Drosophila*. *Biochim Biophys Acta* 6:1093–1105. doi:10.1016/j.bbamcr.02.006
- Kotov AA, Akulenko NV, Kibanov MV, Olenina LV (2014) Dead-box RNA helicases in animal gametogenesis. *Mol Biol* 48(1):22–35
- Krausz C, Degl'Innocenti S (2006) Y chromosome and male infertility: update, 2006. *Front Biosci* 11:3049–3061
- Krausz C, Quintana-Murci L, McElreavey K (2000) Prognostic value of Y deletion analysis: what is the clinical prognostic value of Y chromosome microdeletion analysis? *Hum Reprod* 15(7):1431–1434
- Krausz C, Rajpert-De Meyts E, Frydelund-Larsen L, Quintana-Murci L, McElreavey K, Skakkebaek NE (2001) Double-blind Y chromosome microdeletion analysis in men with known sperm parameters and reproductive hormone profiles: microdeletions are specific for spermatogenic failure. *J Clin Endocrinol Metab* 86(6):2638–2642
- Krausz C, Quintana-Murci L, Forti G (2004) Y chromosome polymorphisms in medicine. *Ann Med* 36(8):573–583
- Krausz C, Degl'Innocenti S, Nuti F, Morelli A, Felici F, Sansone M, Varriale G, Forti G (2006) Natural transmission of *USP9Y* gene mutations: a new perspective on the role of AZFa genes in male fertility. *Hum Mol Genet* 15(18):2673–2681
- Krausz C, Giachini C, Xue Y, O'Bryan MK, Gromoll J, Rajpert-de Meyts E, Oliva R, Aknin-Seifer I, Erdei E, Jorgensen N, Simoni M, Ballescà JL, Levy R, Balercia G, Piomboni P, Nieschlag E, Forti G, McLachlan R, Tyler-Smith C (2009) Phenotypic variation within European carriers of the Y-chromosomal *gr/gr* deletion is independent of Y-chromosomal background. *J Med Genet* 46(1):21–31. doi:10.1136/jmg.2008.059915
- Krausz C, Chianese C, Giachini C, Guarducci E, Laface I, Forti G (2011) The Y chromosome-linked copy number variations and male fertility. *J Endocrinol Invest* 34(5):376–382. doi:10.3275/7612
- Krausz C, Giachini C, Lo Giacco D, Daguin F, Chianese C, Ars E, Ruiz-Castane E, Forti G, Rossi E (2012) High resolution X chromosome-specific array-CGH detects new CNVs in infertile males. *PLoS ONE* 7(10):e44887. doi:10.1371/journal.pone.0044887
- Krausz C, Hoefsloot L, Simoni M, Tüttelmann F, Academy European, of Andrology, European Molecular Genetics Quality Network (2014) EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions: state-of-the-art 2013. *Andrology* 2(1):5–19. doi:10.1111/j.2047-2927.2013.00173.x
- Kühnert B, Gromoll J, Kostova E, Tschanter P, Luetjens CM, Simoni M, Nieschlag E (2004) Case report: natural transmission of an AZFc Y-chromosomal microdeletion from father to his sons. *Hum Reprod* 19(4):886–888
- Kuroda-Kawaguchi T, Skaletsky H, Brown LG, Minx PJ, Cordum HS, Waterston RH, Wilson RK, Silber S, Oates R, Rozen S, Page DC (2001) The AZFc region of the Y chromosome features massive palindromes and uniform recurrent deletions in infertile men. *Nat Genet* 29(3):279–286
- Kuroki Y, Iwamoto T, Lee J, Yoshiike M, Nozawa S, Nishida T, Ewis AA, Nakamura H, Toda T, Tokunaga K, Kotliarova SE, Kondoh N, Koh E, Namiki M, Shinka T, Nakahori Y (1999) Spermatogenic ability is different among males in different Y chromosome lineage. *J Hum Genet* 44(5):289–292
- Lahn BT, Page DC (1997) Functional coherence of the human Y chromosome. *Science* 278(5338):675–680
- Lahn BT, Page DC (1999) Retroposition of autosomal mRNA yielded testis-specific gene family on human Y chromosome. *Nat Genet* 21(4):429–433
- Lahn BT, Tang ZL, Zhou J, Barndt RJ, Parvinen M, Allis CD, Page DC (2002) Previously uncharacterized histone acetyltransferases implicated in mammalian spermatogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(13):8707–8712
- Lange J, Skaletsky H, van Daalen SK, Embry SL, Korver CM, Brown LG, Oates RD, Silber S, Repping S, Page DC (2009) Isodicentric Y chromosomes and sex disorders as byproducts of

- homologous recombination that maintains palindromes. *Cell* 138(5):855–869. doi:[10.1016/j.cell.2009.07.042](https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.07.042)
- Lardone MC, Marengo A, Parada-Bustamante A, Cifuentes L, Piot-tante A, Ebensperger M, Valdevenito R, Castro A (2013) Greater prevalence of Y chromosome Q1a3a haplogroup in Y-microdeleted Chilean men: a case–control study. *J Assist Reprod Genet* 30(4):531–538. doi:[10.1007/s10815-013-9950-z](https://doi.org/10.1007/s10815-013-9950-z)
- Lau YF, Li Y, Kido T (2009) Gonadoblastoma locus and the TSPY gene on the human Y chromosome. *Birth Defects Res C Embryo Today* 87(1):114–122. doi:[10.1002/bdrc.20144](https://doi.org/10.1002/bdrc.20144)
- Lee MG, Norman J, Shilatifard A, Shiekhattar R (2007) Physical and functional association of a trimethyl H3K4 demethylase and Ring6a/MBLR, a Polycomb-like protein. *Cell* 128(5):877–887
- Lemos B, Branco AT, Hartl DL (2010) Epigenetic effects of polymorphic Y chromosomes modulate chromatin components, immune response, and sexual conflict. *Proc Natl Acad Sci USA* 107(36):15826–15831. doi:[10.1073/pnas.1010383107](https://doi.org/10.1073/pnas.1010383107)
- Li Q, Qiao D, Song NH, Ding Y, Wang ZJ, Yang J, Wang W, Yin CJ (2013) Association of *DAZI/DAZZ* deletion with spermatogenic impairment and male infertility in the South Chinese population. *World J Urol* 31(6):1403–1409. doi:[10.1007/s00345-013-1058-7](https://doi.org/10.1007/s00345-013-1058-7)
- Lin YW, Hsu LC, Kuo PL, Huang WJ, Chiang HS, Yeh SD, Hsu TY, Yu YH, Hsiao KN, Cantor RM, Yen PH (2007) Partial duplication at AZFc on the Y chromosome is a risk factor for impaired spermatogenesis in Han Chinese in Taiwan. *Hum Mutat* 28(5):486–494
- Lindgren AM, Hoyos T, Talkowski ME, Hanscom C, Blumenthal I, Chiang C, Ernst C, Pereira S, Ordulu Z, Clericuzio C, Drautz JM, Rosenfeld JA, Shaffer LG, Velsher L, Pynn T, Vermeesch J, Harris DJ, Gusella JF, Liao EC, Morton CC (2013) Haploinsufficiency of *KDM6A* is associated with severe psychomotor retardation, global growth restriction, seizures and cleft palate. *Hum Genet* 132(5):537–552. doi:[10.1007/s00439-013-1263-x](https://doi.org/10.1007/s00439-013-1263-x)
- Lo Giacco D, Chianese C, Sánchez-Curbelo J, Bassas L, Ruiz P, Rajmil O, Sarquella J, Vives A, Ruiz-Castañé E, Oliva R, Ars E, Krausz C (2014) Clinical relevance of Y-linked CNV screening in male infertility: new insights based on the 8-year experience of a diagnostic genetic laboratory. *Eur J Hum Genet* 22(6):754–761. doi:[10.1038/ejhg.2013.253](https://doi.org/10.1038/ejhg.2013.253)
- Lopes AM, Miguel RN, Sargent CA, Ellis PJ, Amorim A, Affara NA (2010) The human *RPS4* paralogue on Yq11.223 encodes a structurally conserved ribosomal protein and is preferentially expressed during spermatogenesis. *BMC Mol Biol* 11:33. doi:[10.1186/1471-2199-11-33](https://doi.org/10.1186/1471-2199-11-33)
- Lopes AM, Aston KI, Thompson E, Carvalho F, Gonçalves J, Huang N, Matthiesen R, Noordam MJ, Quintela I, Ramu A, Seabra C, Wilfert AB, Dai J, Downie JM, Fernandes S, Guo X, Sha J, Amorim A, Barros A, Carracedo A, Hu Z, Hurler ME, Moskovtsev S, Ober C, Paduch DA, Schiffman JD, Schlegel PN, Sousa M, Carrell DT, Conrad DF (2013) Human spermatogenic failure purges deleterious mutation load from the autosomes and both sex chromosomes, including the gene *DMRT1*. *PLoS Genet* 9(3):e1003349. doi:[10.1371/journal.pgen.1003349](https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003349)
- Lu C, Zhang F, Xia Y, Wu B, Gu A, Lu N, Wang S, Shen H, Jin L, Wang X (2007) The association of Y chromosome haplogroups with spermatogenic failure in the Han Chinese. *J Hum Genet* 52(8):659–663
- Lu C, Zhang J, Li Y, Xia Y, Zhang F, Wu B, Wu W, Ji G, Gu A, Wang S, Jin L, Wang X (2009) The b2/b3 subdeletion shows higher risk of spermatogenic failure and higher frequency of complete AZFc deletion than the gr/gr subdeletion in a Chinese population. *Hum Mol Genet* 18(6):1122–1130. doi:[10.1093/hmg/ddn427](https://doi.org/10.1093/hmg/ddn427)
- Lu C, Wang Y, Zhang F, Lu F, Xu M, Qin Y, Wu W, Li S, Song L, Yang S, Wu D, Jin L, Shen H, Sha J, Xia Y, Hu Z, Wang X (2013) *DAZ* duplications confer the predisposition of Y chromosome haplogroup K\* to non-obstructive azoospermia in Han Chinese populations. *Hum Reprod* 28(9):2440–2449. doi:[10.1093/humrep/det234](https://doi.org/10.1093/humrep/det234)
- Lu C, Jiang J, Zhang R, Wang Y, Xu M, Qin Y, Lin Y, Guo X, Ni B, Zhao Y, Diao N, Chen F, Shen H, Sha J, Xia Y, Hu Z, Wang X (2014) Gene copy number alterations in the azoospermia-associated AZFc region and their effect on spermatogenic impairment. *Mol Hum Reprod* 20(9):836–843. doi:[10.1093/molehr/gau043](https://doi.org/10.1093/molehr/gau043)
- Luddi A, Margollicci M, Gambera L, Serafini F, Cioni M, De Leo V, Balestri P, Piomboni P (2009) Spermatogenesis in a man with complete deletion of *USP9Y*. *N Engl J Med* 360(9):881–885. doi:[10.1056/NEJMoa0806218](https://doi.org/10.1056/NEJMoa0806218)
- Mangs HA, Morris BJ (2007) The human pseudoautosomal region (PAR): origin, function and future. *Curr Genom* 8(2):129–136
- Mardon G, Luoh SW, Simpson EM, Gill G, Brown LG, Page DC (1990) Mouse *Zfx* protein is similar to *Zfy-2*: each contains an acidic activating domain and 13 zinc fingers. *Mol Cell Biol* 10(2):681–688
- Mateu E, Rodrigo L, Martínez MC, Peinado V, Milán M, Gil-Salom M, Martínez-Jabaloyas JM, Remohí J, Pellicer A, Rubio C (2010) Aneuploidies in embryos and spermatozoa from patients with Y chromosome microdeletions. *Fertil Steril* 94(7):2874–2877. doi:[10.1016/j.fertnstert.2010.06.046](https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.06.046)
- Mathias N, Bayés M, Tyler-Smith C (1994) Highly informative compound haplotypes for the human Y chromosome. *Hum Mol Genet* 3(1):115–123
- Mazeyrat S, Saut N, Grigoriev V, Mahadevaiah SK, Ojarikre OA, Rattigan A, Bishop C, Eicher EM, Mitchell MJ, Burgoyne PS (2001) A Y-encoded subunit of the translation initiation factor Eif2 is essential for mouse spermatogenesis. *Nat Genet* 29(1):49–53
- McElreavey K, Krausz C (1999) Sex chromosome genetics '99. Male infertility and the Y chromosome. *Am J Hum Genet* 64(4):928–933
- Medrano JV, Ramathal C, Nguyen HN, Simon C, Reijo Pera RA (2012) Divergent RNA-binding proteins, *DAZL* and *VASA*, induce meiotic progression in human germ cells derived in vitro. *Stem Cells* 30(3):441–451. doi:[10.1002/stem.1012](https://doi.org/10.1002/stem.1012)
- Meistrich ML, Trostle-Weige PK, Lin R, Bhatnagar YM, Allis CD (1992) Highly acetylated H4 is associated with histone displacement in rat spermatids. *Mol Reprod Dev* 31(3):170–181
- Mitchell SF, Lorsch JR (2008) Should I stay or should I go? Eukaryotic translation initiation factors 1 and 1A control start codon recognition. *J Biol Chem* 283(41):27345–27349. doi:[10.1074/jbc.R800031200](https://doi.org/10.1074/jbc.R800031200)
- Mohr S, Stryker JM, Lambowitz AM (2002) A DEAD-box protein functions as an ATP-dependent RNA chaperone in group I intron splicing. *Cell* 109(6):769–779
- Nakasuji T, Ogonuki N, Chiba T, Kato T, Shiozawa K, Yamatoya K, Tanaka H, Kondo T, Miyado K, Miyasaka N, Kubota T, Ogura A, Asahara H (2017) Complementary critical functions of *Zfy1* and *Zfy2* in mouse spermatogenesis and reproduction. *PLoS Genet* 13(1):e1006578. doi:[10.1371/journal.pgen.1006578](https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006578)
- Navarro-Costa P (2012) Sex, rebellion and decadence: the scandalous evolutionary history of the human Y chromosome. *Biochim Biophys Acta* 1822(12):1851–1863. doi:[10.1016/j.bbadis.2012.04.010](https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.04.010)
- Navarro-Costa P, Gonçalves J, Plancha CE (2010a) The AZFc region of the Y chromosome: at the crossroads between genetic diversity and male infertility. *Hum Reprod Update* 16(5):525–542. doi:[10.1093/humupd/dmq005](https://doi.org/10.1093/humupd/dmq005)



- Navarro-Costa P, Plancha CE, Gonçalves J (2010b) Genetic dissection of the AZF regions of the human Y chromosome: thriller or filler for male (in)fertility? *J Biomed Biotechnol* 2010:936569. doi:[10.1155/2010/936569](https://doi.org/10.1155/2010/936569)
- Navarro-Costa P, McCarthy A, Prudêncio P, Greer C, Guilgur LG, Becker JD, Secombe J, Rangan P, Martinho RG (2016) Early programming of the oocyte epigenome temporally controls late prophase I transcription and chromatin remodelling. *Nat Commun* 7:12331. doi:[10.1038/ncomms12331](https://doi.org/10.1038/ncomms12331)
- Nickkholgh B, Noordam MJ, Hovingh SE, van Pelt AM, van der Veen F, Repping S (2010) Y chromosome TSPY copy numbers and semen quality. *Fertil Steril* 94(5):1744–1747. doi:[10.1016/j.fertnstert.2009.09.051](https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.09.051)
- Noordam MJ, Westerveld GH, Hovingh SE, van Daalen SK, Korver CM, van der Veen F, van Pelt AM, Repping S (2011) Gene copy number reduction in the azoospermia factor c (AZFc) region and its effect on total motile sperm count. *Hum Mol Genet* 20(12):2457–2463. doi:[10.1093/hmg/ddr119](https://doi.org/10.1093/hmg/ddr119)
- Page DC, Mosher R, Simpson EM, Fisher EM, Mardon G, Pollack J, McGillivray B, de la Chapelle A, Brown LG (1987) The sex-determining region of the human Y chromosome encodes a finger protein. *Cell* 51(6):1091–1104
- Papadimas J, Goulis DG, Giannouli C, Papanicolaou A, Tarlatzis B, Bontis JN (2001) Ambiguous genitalia, 45, X/46, XY mosaic karyotype, and Y chromosome microdeletions in a 17-year-old man. *Fertil Steril* 76(6):1261–1263
- Papanikolaou AD, Goulis DG, Giannouli C, Gounioti C, Bontis JN, Papadimas J (2003) Intratubular germ cell neoplasia in a man with ambiguous genitalia, 45, X/46, XY mosaic karyotype, and Y chromosome microdeletions. *Endocr Pathol* 14(2):177–182
- Paracchini S, Stuppia L, Gatta V, Palka G, Moro E, Foresta C, Mengua L, Oliva R, Balleścà JL, Kremer JA, van Golde RJ, Tuerlings JH, Hargreave T, Ross A, Cooke H, Huellen K, Vogt PH, Tyler-Smith C (2000) Y-chromosomal DNA haplotypes in infertile European males carrying Y-microdeletions. *J Endocrinol Invest* 23(10):671–676
- Patsalis PC, Sismani C, Quintana-Murci L, Taleb-Bekkouche F, Krausz C, McElreavey K (2002) Effects of transmission of Y chromosome AZFc deletions. *Lancet* 360(9341):1222–1224
- Patsalis PC, Skordis N, Sismani C, Kousoulidou L, Koumbaris G, Eftychi C, Stavrides G, Ioulianos A, Kitsiou-Tzeli S, Gallavoumvouraki A, Kosmaidou Z, Hadjiathanasiou CG, McElreavey K (2005) Transmissible microdeletion of the Y-chromosome encompassing two *DAZ* copies, four *RBMY1* copies, and both *PRY* copies. *Am J Med Genet A* 135(2):145–149
- Plotton I, Ducros C, Pugeat M, Morel Y, Lejeune H (2010) Transmissible microdeletion of the Y-chromosome encompassing two *DAZ* copies, four *RBMY1* copies, and both *PRY* copies. *Fertil Steril* 94(7):2770.e11–6. doi:[10.1016/j.fertnstert.2010.04.038](https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.04.038)
- Puzuka A, Pronina N, Grinfeld I, Erenpreiss J, Lejins V, Bars J, Pliss L, Pelnena I, Baumanis V, Krumina A (2011) Y chromosome—a tool in infertility studies of Latvian population. *Genetika* 47(3):394–400
- Quintana-Murci L, Krausz C, Heyer E, Gromoll J, Seifer I, Barton DE, Barrett T, Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Mitchell M, Lee AC, Jobling MA, McElreavey K (2001) The relationship between Y chromosome DNA haplotypes and Y chromosome deletions leading to male infertility. *Hum Genet* 108(1):55–58
- Ramathal C, Angulo B, Sukhwani M, Cui J, Durruthy-Durruthy J, Fang F, Schanes P, Turek PJ, Orwig KE, Reijo Pera R (2015) *DDX3Y* gene rescue of a Y chromosome AZFa deletion restores germ cell formation and transcriptional programs. *Sci Rep* 5:15041. doi:[10.1038/srep15041](https://doi.org/10.1038/srep15041)
- Rauschendorf MA, Zimmer J, Ohnmacht C, Vogt PH (2014) *DDX3X*, the X homologue of AZFa gene *DDX3Y*, expresses a complex pattern of transcript variants only in the male germ line. *Mol Hum Reprod* 20(12):1208–1222. doi:[10.1093/molehr/gau081](https://doi.org/10.1093/molehr/gau081)
- Repping S, Skaletsky H, Lange J, Silber S, Van Der Veen F, Oates RD, Page DC, Rozen S (2002) Recombination between palindromes P5 and P1 on the human Y chromosome causes massive deletions and spermatogenic failure. *Am J Hum Genet* 71(4):906–922
- Repping S, Skletsky H, Brown L, van Daalen SK, Korver CM, Pyntikova T, Kuroda-Kawaguchi T, de Vries JW, Oates RD, Silber S, van der Veen F, Page DC, Rozen S (2003) Polymorphism for a 1.6-Mb deletion of the human Y chromosome persists through balance between recurrent mutation and haploid selection. *Nat Genet* 35(3):247–251
- Repping S, van Daalen SK, Korver CM, Brown LG, Marszalek JD, Gianotten J, Oates RD, Silber S, van der Veen F, Page DC, Rozen S (2004) A family of human Y chromosomes has dispersed throughout northern Eurasia despite a 1.8-Mb deletion in the azoospermia factor c region. *Genomics* 83(6):1046–52
- Repping S, van Daalen SK, Brown LG, Korver CM, Lange J, Marszalek JD, Pyntikova T, van der Veen F, Skaletsky H, Page DC, Rozen S (2006) High mutation rates have driven extensive structural polymorphism among human Y chromosomes. *Nat Genet* 38(4):463–467
- Royo H, Polikiewicz G, Mahadevaiah SK, Prosser H, Mitchell M, Bradley A, de Rooij DG, Burgoyne PS, Turner JM (2010) Evidence that meiotic sex chromosome inactivation is essential for male fertility. *Curr Biol* 20(23):2117–2123. doi:[10.1016/j.cub.2010.11.010](https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.11.010)
- Rozen S, Skaletsky H, Marszalek JD, Minx PJ, Cordum HS, Waterston RH, Wilson RK, Page DC (2003) Abundant gene conversion between arms of palindromes in human and ape Y chromosomes. *Nature* 423(6942):873–876
- Rozen SG, Marszalek JD, Irenze K, Skaletsky H, Brown LG, Oates RD, Silber SJ, Ardlie K, Page DC (2012) AZFc deletions and spermatogenic failure: a population-based survey of 20,000 Y chromosomes. *Am J Hum Genet* 91(5):890–896. doi:[10.1016/j.ajhg.2012.09.003](https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2012.09.003)
- Ruggiu M, Speed R, Taggart M, McKay SJ, Kilanowski F, Saunders P, Dorin J, Cooke HJ (1997) The mouse *Dazl* gene encodes a cytoplasmic protein essential for gametogenesis. *Nature* 389(6646):73–77
- Rujirabanjerd S, Nelson J, Tarpey PS, Hackett A, Edkins S, Raymond FL, Schwartz CE, Turner G, Iwase S, Shi Y, Futreal PA, Stratton MR, Geck J (2010) Identification and characterization of two novel JARID1C mutations: suggestion of an emerging genotype-phenotype correlation. *Eur J Hum Genet* 18(3):330–335. doi:[10.1038/ejhg.2009.175](https://doi.org/10.1038/ejhg.2009.175)
- Sampath Kumar A, Seah MK, Ling KY, Wang Y, Tan JH, Nitsch S, Lim SL, Lorthongpanich C, Wollmann H, Low DH, Guccione E, Messerschmidt DM (2017) Loss of maternal Trim28 causes male-predominant early embryonic lethality. *Genes* 31(1):12–17. doi:[10.1101/gad.291195.116](https://doi.org/10.1101/gad.291195.116)
- Sato Y, Shinka T, Iwamoto T, Yamauchi A, Nakahori Y (2013) Y chromosome haplogroup d2\* lineage is associated with azoospermia in Japanese males. *Biol Reprod* 88(4):107. doi:[10.1095/biolreprod.112.105718](https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.105718)
- Sato Y, Iwamoto T, Shinka T, Nozawa S, Yoshiike M, Koh E, Kanaya J, Namiki M, Matsumiya K, Tsujimura A, Komatsu K, Itoh N, Eguchi J, Yamauchi A, Nakahori Y (2014) Y chromosome gr/gr subdeletion is associated with lower semen quality in young men from the general Japanese population but not in fertile Japanese Men. *Biol Reprod* 90(6):116. doi:[10.1095/biolreprod.114.118810](https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.118810)
- Saxena R, Brown LG, Hawkins T, Alagappan RK, Skaletsky H, Reeve MP, Reijo R, Rozen S, Dinulos MB, Distchele CM, Page DC (1996) The *DAZ* gene cluster on the human

- Y chromosome arose from an autosomal gene that was transposed, repeatedly amplified and pruned. *Nat Genet* 14(3):292–299
- Schöner A, Adham I, Mauceri G, Marohn B, Vaske B, Schmidtke J, Schubert S (2010) Partial rescue of the KIT-deficient testicular phenotype in KitW-v/KitW-v Tg(TSPY) mice. *Biol Reprod* 83(1):20–26. doi:[10.1095/biolreprod.109.082156](https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.082156)
- Schröder M (2010) Human DEAD-box protein 3 has multiple functions in gene regulation and cell cycle control and is a prime target for viral manipulation. *Biochem Pharmacol* 79(3):297–306. doi:[10.1016/j.bcp.2009.08.032](https://doi.org/10.1016/j.bcp.2009.08.032)
- Seielstad MT, Hebert JM, Lin AA, Underhill PA, Ibrahim M, Vollrath D, Cavalli-Sforza LL (1994) Construction of human Y-chromosomal haplotypes using a new polymorphic A to G transition. *Hum Mol Genet* 3(12):2159–2161
- Shao GB, Chen JC, Zhang LP, Huang P, Lu HY, Jin J, Gong AH, Sang JR (2014) Dynamic patterns of histone H3 lysine 4 methyltransferases and demethylases during mouse preimplantation development. *Vitro Cell Dev Biol Anim* 50(7):603–613. doi:[10.1007/s11626-014-9741-6](https://doi.org/10.1007/s11626-014-9741-6)
- Shinka T, Sato Y, Chen G, Naroda T, Kinoshita K, Unemi Y, Tsuji K, Toida K, Iwamoto T, Nakahori Y (2004) Molecular characterization of heat shock-like factor encoded on the human Y chromosome, and implications for male infertility. *Biol Reprod* 71(1):297–306
- Siffroi JP, Le Bourhis C, Krausz C, Barbaux S, Quintana-Murci L, Kanafani S, Rouba H, Bujan L, Bourrouillou G, Seifer I, Boucher D, Fellous M, McElreavey K, Dadoune JP (2000) Sex chromosome mosaicism in males carrying Y chromosome long arm deletions. *Hum Reprod* 15(12):2559–2562
- Sin HS, Koh E, Shigehara K, Sugimoto K, Maeda Y, Yoshida A, Kyono K, Namiki M (2010) Features of constitutive gr/gr deletion in a Japanese population. *Hum Reprod* 25(9):2396–2403. doi:[10.1093/humrep/deq191](https://doi.org/10.1093/humrep/deq191)
- Singh K, Raman R (2009) Y-haplotypes and idiopathic male infertility in an Indian population. *Indian J Hum Genet* 15(1):19–22. doi:[10.4103/0971-6866.50865](https://doi.org/10.4103/0971-6866.50865)
- Skaletsky H, Kuroda-Kawaguchi T, Minx PJ, Cordum HS, Hillier L, Brown LG, Repping S, Pyntikova T, Ali J, Bieri T, Chinwalla A, Delehaunty A, Delehaunty K, Du H, Fewell G, Fulton L, Fulton R, Graves T, Hou SF, Latrielle P, Leonard S, Mardis E, Maupin R, McPherson J, Miner T, Nash W, Nguyen C, Ozersky P, Pepin K, Rock S, RohlWng T, Scott K, Schultz B, Strong C, Tin-Wollam A, Yang SP, Waterston RH, Wilson RK, Rozen S, Page DC (2003) The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature* 423:825–837
- Soh YQ, Alföldi J, Pyntikova T, Brown LG, Graves T, Minx PJ, Fulton RS, Kremitzki C, Koutseva N, Mueller JL, Rozen S, Hughes JF, Owens E, Womack JE, Murphy WJ, Cao Q, de Jong P, Warren WC, Wilson RK, Skaletsky H, Page DC (2014) Sequencing the mouse Y chromosome reveals convergent gene acquisition and amplification on both sex chromosomes. *Cell* 159(4):800–813. doi:[10.1016/j.cell.2014.09.052](https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.052)
- Stouffs K, Lissens W, Verheyen G, Van Landuyt L, Goossens A, Tournaye H, Van Steirteghem A, Liebaers I (2004) Expression pattern of the Y-linked PRY gene suggests a function in apoptosis but not in spermatogenesis. *Mol Hum Reprod* 10(1):15–21
- Stouffs K, Lissens W, Tournaye H, Van Steirteghem A, Liebaers I (2005) The choice and outcome of the fertility treatment of 38 couples in whom the male partner has a Yq microdeletion. *Hum Reprod* 20(7):1887–1896
- Stouffs K, Lissens W, Tournaye H, Haentjens P (2011) What about gr/gr deletions and male infertility? Systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update* 17(2):197–209. doi:[10.1093/humupd/dmq046](https://doi.org/10.1093/humupd/dmq046)
- Sun C, Skaletsky H, Rozen S, Gromoll J, Nieschlag E, Oates R, Page DC (2000) Deletion of azoospermia factor a (AZFa) region of human Y chromosome caused by recombination between HERV15 proviruses. *Hum Mol Genet* 9(15):2291–2296
- Tessari A, Salata E, Ferlin A, Bartoloni L, Slongo ML, Foresta C (2004) Characterization of HSFY, a novel AZFb gene on the Y chromosome with a possible role in human spermatogenesis. *Mol Hum Reprod* 10(4):253–258
- Tiepolo L, Zuffardi O (1976) Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm. *Hum Genet* 34:119–124
- Tsui S, Dai T, Roettger S, Schempp W, Salido EC, Yen PH (2000) Identification of two novel proteins that interact with germ-cell-specific RNA-binding proteins *DAZ* and *DAZZL1*. *Genomics* 65(3):266–273
- Tüttelmann F, Rajpert-De Meyts E, Nieschlag E, Simoni M (2007) Gene polymorphisms and male infertility—a meta-analysis and literature review. *Reprod Biomed Online* 15(6):643–658
- Tüttelmann F, Simoni M, Kliesch S, Ledig S, Dworniczak B, Wieacker P, Röpke A (2011) Copy number variants in patients with severe oligozoospermia and Sertoli-cell-only syndrome. *PLoS ONE* 6(4):e19426. doi:[10.1371/journal.pone.0019426](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019426)
- Tyler-Smith C (2008) An evolutionary perspective on Y-chromosomal variation and male infertility. *Int J Androl* 31(4):376–382. doi:[10.1111/j.1365-2605.2008.00889.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2008.00889.x)
- Tyler-Smith C, Krausz C (2009) The will-o'-the-wisp of genetics—hunting for the azoospermia factor gene. *N Engl J Med* 360(9):925–927. doi:[10.1056/NEJMe0900301](https://doi.org/10.1056/NEJMe0900301)
- Tyler-Smith C, Taylor L, Müller U (1988) Structure of a hypervariable tandemly repeated DNA sequence on the short arm of the human Y chromosome. *J Mol Biol* 203(4):837–848
- Vaszkó T, Papp J, Krausz C, Casamonti E, Géczy L, Olah E (2016) Discrimination of deletion and duplication subtypes of the deleted in azoospermia gene family in the context of frequent interloci gene conversion. *PLoS ONE* 11(10):e0163936. doi:[10.1371/journal.pone.0163936](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163936) (Erratum in: *PLoS One* 2017 12 (1):e0171396)
- Vernet N, Mahadevaiah SK, Yamauchi Y, Decarpentrie F, Mitchell MJ, Ward MA, Burgoyne PS (2014) Mouse Y-linked *Zfy1* and *Zfy2* are expressed during the male-specific interphase between meiosis I and meiosis II and promote the 2nd meiotic division. *PLoS Genet* 10(6):e1004444. doi:[10.1371/journal.pgen.1004444](https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004444)
- Vernet N, Mahadevaiah SK, Decarpentrie F, Longepied G, de Rooij DG, Burgoyne PS, Mitchell MJ (2016) Mouse Y-encoded transcription factor *Zfy2* is essential for sperm head remodeling and sperm tail development. *PLoS ONE* 11(1):e0145398. doi:[10.1371/journal.pone.0145398](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145398)
- Vijesh VV, Nambiar V, Mohammed SI, Sukumaran S, Suganthi R (2015) Screening for AZFc partial deletions in Dravidian men with nonobstructive azoospermia and oligozoospermia. *Genet Test Mol Biomark* 19(3):150–155. doi:[10.1089/gtmb.2014.0251](https://doi.org/10.1089/gtmb.2014.0251)
- Visser L, Westerveld GH, Korver CM, van Daalen SK, Hovingh SE, Rozen S, van der Veen F, Repping S (2009) Y chromosome gr/gr deletions are a risk factor for low semen quality. *Hum Reprod* 24(10):2667–2673. doi:[10.1093/humrep/dep243](https://doi.org/10.1093/humrep/dep243)
- Vodicka R, Vrtel R, Dusek L, Singh AR, Krizova K, Svacinova V, Horinova V, Dostal J, Oborna I, Brezinova J, Sobek A, Santavy J (2007) TSPY gene copy number as a potential new risk factor for male infertility. *Reprod Biomed Online* 14(5):579–587
- Vogt PH, Fernandes S (2003) Polymorphic *DAZ* gene family in polymorphic structure of AZFc locus: artwork or functional for human spermatogenesis? *APMIS* 111:115–126 (discussion 126–117)

- Vogt PH, Edelmann A, Kirsch S, Henegariu O, Hirschmann P, Kiesewetter F, Köhn FM, Schill WB, Farah S, Ramos C, Hartmann M, Hartschuh W, Meschede D, Behre HM, Castel A, Nieschlag E, Weidner W, Gröne HJ, Jung A, Engel W, Haidl G (1996) Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. *Hum Mol Genet* 5:933–943
- Vogt PH, Falcao CL, Hanstein R, Zimmer J (2008) The AZF proteins. *Int J Androl* 31(4):383–394. doi:10.1111/j.1365-2605.2008.00890.x
- Vorona E, Zitzmann M, Gromoll J, Schüring AN, Nieschlag E (2007) Clinical, endocrinological, and epigenetic features of the 46, XX male syndrome, compared with 47, XXY Klinefelter patients. *J Clin Endocrinol Metab* 92(9):3458–3465
- Wang Z, Mann RS (2003) Requirement for two nearly identical TGIF-related homeobox genes in *Drosophila* spermatogenesis. *Development* 130(13):2853–2865
- Wang YM, Li Q, Song LB, Zhang JY, Yang J, Song NH (2016) Association of the deleted *DAZ* gene copy related to *gr/gr* and *b2/b3* deletions with spermatogenic impairment. *Zhonghua Nan Ke Xue* 22(1):17–21
- Wong EY, Tse JY, Yao KM, Tam PC, Yeung WS (2002) VCY2 protein interacts with the HECT domain of ubiquitin-protein ligase E3A. *Biochem Biophys Res Commun* 296(5):1104–1111
- Wong EY, Tse JY, Yao KM, Lui VC, Tam PC, Yeung WS (2004) Identification and characterization of human VCY2-interacting protein: VCY2IP-1, amicrotubule-associated protein-like protein. *Biol Reprod* 70(3):775–784
- Wu B, Lu NX, Xia YK, Gu AH, Lu CC, Wang W, Song L, Wang SL, Shen HB, Wang XR (2007) A frequent Y chromosome *b2/b3* subdeletion shows strong association with male infertility in Han-Chinese population. *Hum Reprod* 22(4):1107–1113
- Yamauchi Y, Riel JM, Stoytcheva Z, Ward MA (2014) Two Y genes can replace the entire Y chromosome for assisted reproduction in the mouse. *Science* 343(6166):69–72. doi:10.1126/science.1242544
- Yamauchi Y, Riel JM, Ruthig VA, Ortega EA, Mitchell MJ, Ward MA (2016) Two genes substitute for the mouse Y chromosome for spermatogenesis and reproduction. *Science* 351(6272):514–516. doi:10.1126/science.aad1795
- Yang Y, Ma M, Li L, Zhang W, Chen P, Ma Y, Liu Y, Tao D, Lin L, Zhang S (2008a) Y chromosome haplogroups may confer susceptibility to partial AZFc deletions and deletion effect on spermatogenesis impairment. *Hum Reprod* 23(9):2167–2172. doi:10.1093/humrep/den229
- Yang Y, Ma M, Li L, Zhang W, Xiao C, Li S, Ma Y, Tao D, Liu Y, Lin L, Zhang S (2008b) Evidence for the association of Y-chromosome haplogroups with susceptibility to spermatogenic failure in a Chinese Han population. *J Med Genet* 45(4):210–215
- Yang Y, Ma M, Li L, Su D, Chen P, Ma Y, Liu Y, Tao D, Lin L, Zhang S (2010) Differential effect of specific *gr/gr* deletion subtypes on spermatogenesis in the Chinese Han population. *Int J Androl* 33(5):745–754. doi:10.1111/j.1365-2605.2009.01015.x
- Yang B, Ma YY, Liu YQ, Li L, Yang D, Tu WL, Shen Y, Dong Q, Yang Y (2015) Common AZFc structure may possess the optimal spermatogenesis efficiency relative to the rearranged structures mediated by non-allele homologous recombination. *Sci Rep* 5:10551. doi:10.1038/srep10551
- Ye JJ, Ma L, Yang LJ, Wang JH, Wang YL, Guo H, Gong N, Nie WH, Zhao SH (2013) Partial AZFc duplications not deletions are associated with male infertility in the Yi population of Yunnan Province, China. *J Zhejiang Univ Sci B* 14(9):807–815. doi:10.1631/jzus.B1200301
- Yen PH, Chai NN, Salido EC (1996) The human autosomal gene *DAZLA*: testis specificity and a candidate for male infertility. *Hum Mol Genet* 5(12):2013–2017
- Zhang F, Lu C, Li Z, Xie P, Xia Y, Zhu X, Wu B, Cai X, Wang X, Qian J, Wang X, Jin L (2007) Partial deletions are associated with an increased risk of complete deletion in AZFc: a new insight into the role of partial AZFc deletions in male infertility. *J Med Genet* 44(7):437–444
- Zhang Y, Xi J, Jia B, Wang X, Wang X, Li C, Li Y, Zeng X, Ying R, Li X, Jiang S, Yuan F (2017) RNAi as a tool to control the sex ratio of mouse offspring by interrupting *Zfx/Zfy* genes in the testis. *Mamm Genome* 28(3–4), pp. 100–105, doi:10.1007/s00335-017-9682-y

RESEARCH ARTICLE

# Discrimination of Deletion and Duplication Subtypes of the Deleted in Azoospermia Gene Family in the Context of Frequent Interloci Gene Conversion

Tibor Vaszkó<sup>1\*</sup>, János Papp<sup>1</sup>, Csilla Krausz<sup>3,4</sup>, Elena Casamonti<sup>3</sup>, Lajos Géczzi<sup>2</sup>, Edith Olah<sup>1</sup>

**1** Department of Molecular Genetics, National Institute of Oncology, Budapest, Hungary, **2** Department of Chemotherapy, National Institute of Oncology, Budapest, Hungary, **3** Department of Experimental and Clinical Biomedical Sciences, University of Florence, Florence, Italy, **4** Andrology Service, Fundacio Puigvert, Instituto de Investigaciones Biome´dicas Sant Pau (IIB-Sant Pau), Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

\* [vaszko.tibor@oncol.hu](mailto:vaszko.tibor@oncol.hu)



CrossMark  
click for updates

 OPEN ACCESS

**Citation:** Vaszkó T, Papp J, Krausz C, Casamonti E, Géczzi L, Olah E (2016) Discrimination of Deletion and Duplication Subtypes of the Deleted in Azoospermia Gene Family in the Context of Frequent Interloci Gene Conversion. PLoS ONE 11 (10): e0163936. doi:10.1371/journal.pone.0163936

**Editor:** Michela Grosso, University of Naples Federico II, ITALY

**Received:** October 9, 2015

**Accepted:** September 16, 2016

**Published:** October 10, 2016

**Copyright:** © 2016 Vaszkó et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** This work was funded by: 1) Research Grants KTIA-OTKA CK-80745 (<http://www.nih.gov.hu/palyazatok-eredmenyek/otka-programok/cikk-cime>) received by EO; 2) Research Grants OTKA K-112228 (<http://nyilvanos.otka-palyazat.hu/index.php?menuid=930&num=112228&lang=HU>) received by EO; 3) Norwegian Financial Mechanism's Norway Grant HU-0115/NA/2008-3/

## Abstract

Due to its palindromic setup, AZFc (Azoospermia Factor c) region of chromosome Y is one of the most unstable regions of the human genome. It contains eight gene families expressed mainly in the testes. Several types of rearrangement resulting in changes in the cumulative copy number of the gene families were reported to be associated with diseases such as male infertility and testicular germ cell tumors. The best studied AZFc rearrangement is gr/gr deletion. Its carriers show widespread phenotypic variation from azoospermia to normospermia. This phenomenon was initially attributed to different gr/gr subtypes that would eliminate distinct members of the affected gene families. However, studies conducted to confirm this hypothesis have brought controversial results, perhaps, in part, due to the shortcomings of the utilized subtyping methodology. This proof-of-concept paper is meant to introduce here a novel method aimed at subtyping AZFc rearrangements. It is able to differentiate the partial deletion and partial duplication subtypes of the Deleted in Azoospermia (DAZ) gene family. The keystone of the method is the determination of the copy number of the gene family member-specific variant(s) in a series of sequence family variant (SFV) positions. Most importantly, we present a novel approach for the correct interpretation of the variant copy number data to determine the copy number of the individual DAZ family members in the context of frequent interloci gene conversion. Besides DAZ1/DAZ2 and DAZ3/DAZ4 deletions, not yet described rearrangements such as DAZ2/DAZ4 deletion and three duplication subtypes were also found by the utilization of the novel approach. A striking feature is the extremely high concordance among the individual data pointing to a certain type of rearrangement. In addition to being able to identify DAZ deletion subtypes more reliably than the methods used previously, this approach is the first that can discriminate DAZ duplication subtypes as well.

ÖP-9 (<http://eeagrants.org/>, [http://www.oncol.hu/site/en/norway\\_grants.html](http://www.oncol.hu/site/en/norway_grants.html)); 4) the Istituto Toscano Tumori grant proposal to CK. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

## Introduction

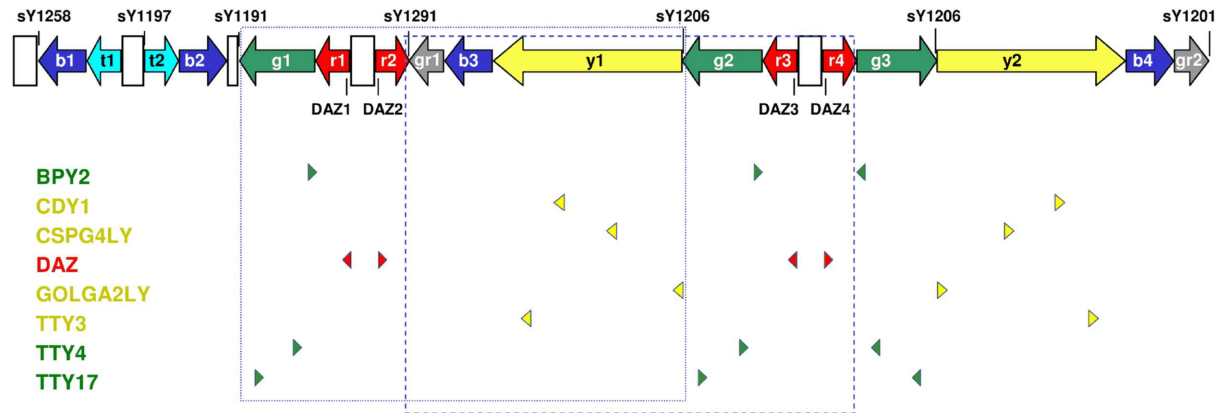
Chromosome Y has a unique structure, with about 30% of the male-specific region (MSY) covered by large palindromes consisting of very long, nearly identical direct and inverted repeats called amplicons [1]. Such a structure makes the Y chromosome prone to rearrangement, especially in the Azoospermia Factor c (AZFc) domain [2]. Indeed, AZFc is one of the most unstable regions of the human genome, and numerous structures deducible from the reference sequence through inversion, deletion and duplication, or combinations thereof, have been reported [3–5].

Eight gene families, including five with protein-coding active copies, are located exclusively within the 3.5 Mb AZFc region [2]. Both decrease and increase in the gene dosage (i.e. the cumulative copy number) of gene families might be associated with diseases. The lack of the entire AZFc region has long been shown to cause azoospermia or oligozoospermia [6]. Many studies have been conducted so far to screen for partial AZFc rearrangements in relationship with male infertility with findings that are not easy to reconcile. [3,5,7–18].

According to a comprehensive review, DAZ (GeneBank accession number: NG\_004755.2) and CDY1 families represent key AZFc spermatogenic determinants [19]. A meta-analysis including 18 studies with more than 12,000 men showed that *gr/gr* deletion occurred more frequently in infertile than control men. Furthermore, the association was dependent on ethnicity and geographic region [20]. A population-based survey of 20,000 Y-chromosomes also states that *gr/gr* deletion doubles the risk of severe spermatogenic failure [21].

Carriers of *gr/gr* deletion show extensive phenotypic variation ranging from normal spermatogenesis to azoospermia [6]. This variation was supposed to rely, at least partly, on the different AZFc deletion subtypes based on the missing *DAZ* or *CDY1* family members. Some studies supported [3,22], others refuted this hypothesis [14,15,17,23]. As far as partial AZFc duplications are concerned, one study linked them to spermatogenic impairment [12], while two others were unable to detect a significant effect of excess AZFc gene dosage on spermatogenesis [15,24]. Subtyping has never been attempted in duplication samples due to the lack of an appropriate method. Apart from spermatogenic impairment, *gr/gr* deletion also seems to be a risk factor for testicular germ cell tumors (TGCTs) according to a study carried out by the International Testicular Cancer Linkage Consortium (ITCLC) [25]. No subtyping studies have been conducted at all in TGCTs so far. In summary, the above findings reflect some inconsistency concerning the role of certain AZFc rearrangements in conferring susceptibility to diseases, and it is likely that selection and methodological biases in some studies are also responsible for the controversies [15,19].

Partial AZFc deletions and duplications always change the cumulative copy number of the affected gene families. For example, the relatively well-characterized *gr/gr* deletion reduces, among others, the dose of the Deleted in Azoospermia (DAZ), the CDY1 and the BPY2 gene families by eliminating, in all cases, two members of the first and one member of the second and third family, respectively. However, the combination of the deleted gene family members may differ depending on the location of the breakpoints (Fig 1). Inversions prior to deletion may further increase the number of potential outcomes. The situation is similarly complicated in the case of duplications. Unlike other AZFc gene families, the four DAZ genes code for proteins with notably different composition [26]. Therefore, rearrangements affecting different members may confer susceptibility of different extent to male infertility and/or TGCTs. The ability to make distinction between the various combinations of deleted or duplicated gene family members, i.e. AZFc deletion and duplication subtypes, has been expected to contribute to the definition of the role of AZFc rearrangements in diseases. However, subtyping efforts, conducted so far exclusively in deletion samples to identify factors responsible for male



**Fig 1. Structure of the AZFc region with the eight gene families.** The colored arrows show the direct and inverted repeats of AZFc. The colored arrowheads indicate the members of the eight gene families located in the region. The two rectangles enclose the gene family members eliminated by gr/gr deletion with two different breakpoints (g1/g2 versus r2/r4 deletion), respectively. The STS markers that have usually been analyzed in search for deletions are also shown.

doi:10.1371/journal.pone.0163936.g001

infertility, have led to inconsistent results. It may mean that the deletion subtypes, at least those distinguished so far, do not really have a role in male infertility. But the controversy may also be the consequence of the shortcomings of the applied methods. Probably, further subtyping studies, partly in duplication samples, will be needed to reassuringly clarify the role of AZFc rearrangements in diseases. Those studies will preferably require methods that are equally efficient in both deletion and duplication subjects and, at the same time, have higher resolution than the presently used ones. We present here a new approach, called variant ratio analysis, which can be an alternative to the often-applied combination of dosage PCR and restriction fragment length polymorphism (RFLP) in AZFc subtyping.

A method suitable for subtyping in AZFc must be capable of differentiating the members of a gene family from one another; therefore, variant ratio analysis has been built upon family member-specific sequence family variants (SFVs). The ratio of the family member-specific variant to its non-specific counterpart is determined at every studied SFV position. This quantification relies on measuring the area-under-the-curve (AUC) of signals given by the specific and the non-specific variants in sequencing electropherograms. Samples are divided into partial deletion, non-rearranged (control) and partial duplication groups based on the within-sample distribution of the variant ratios. Taking the rearrangement status into account, the copy number of the specific variant can be derived from the variant ratio at each SFV position in every sample. The applicability of the family member-specific SFVs as markers, i.e. the copy numbers that unambiguously indicate the copy number of the corresponding DAZ family member, is assessed by using the control panel. This is necessary since in addition to deletion, duplication and inversion, the members of gene families located in AZFc are also subjected to interlocus gene conversion [14,27,28]. This phenomenon can detach gene family member-specific variants from their host family member, thereby contributing to the variability of the variant ratio at a SFV position across a population. Partial deletion and partial duplication samples are then subtyped utilizing the markers' newly derived applicability. Finally, the concordance of data pointing to the assigned subtypes is evaluated to check the probability of the conclusions.

The four DAZ genes were chosen as the targets of variant ratio analysis, but it can be extended to other gene families. The studied SFV positions were selected by aligning the sequences of the four DAZ family members extracted from the human reference genome. Overall, this integrated method is sufficient for grouping samples according to partial

rearrangement along with subtyping deletion and duplication samples. In this paper, we describe the development of variant ratio analysis, and discuss the aspects of its applications and possible extensions.

## Methods

### Collecting genomic DNA

In addition to DNA obtained from the blood of healthy volunteers, germline DNA samples of several TGCT patients with documented gr/gr or b1/b3 deletion were also analyzed in order to enrich for AZFc rearrangements. Altogether, 52 samples were used for this study. All DNA donors gave their informed written consent to the procedure described in this paper. The use of clinical material was approved by the Institutional Review Board of the National Institute of Oncology. (Name of EC: ETT TUKEB, approval number: 20998-0/2010-1018EKU (845/PI/010).)

### Amplification and sequencing of individual samples

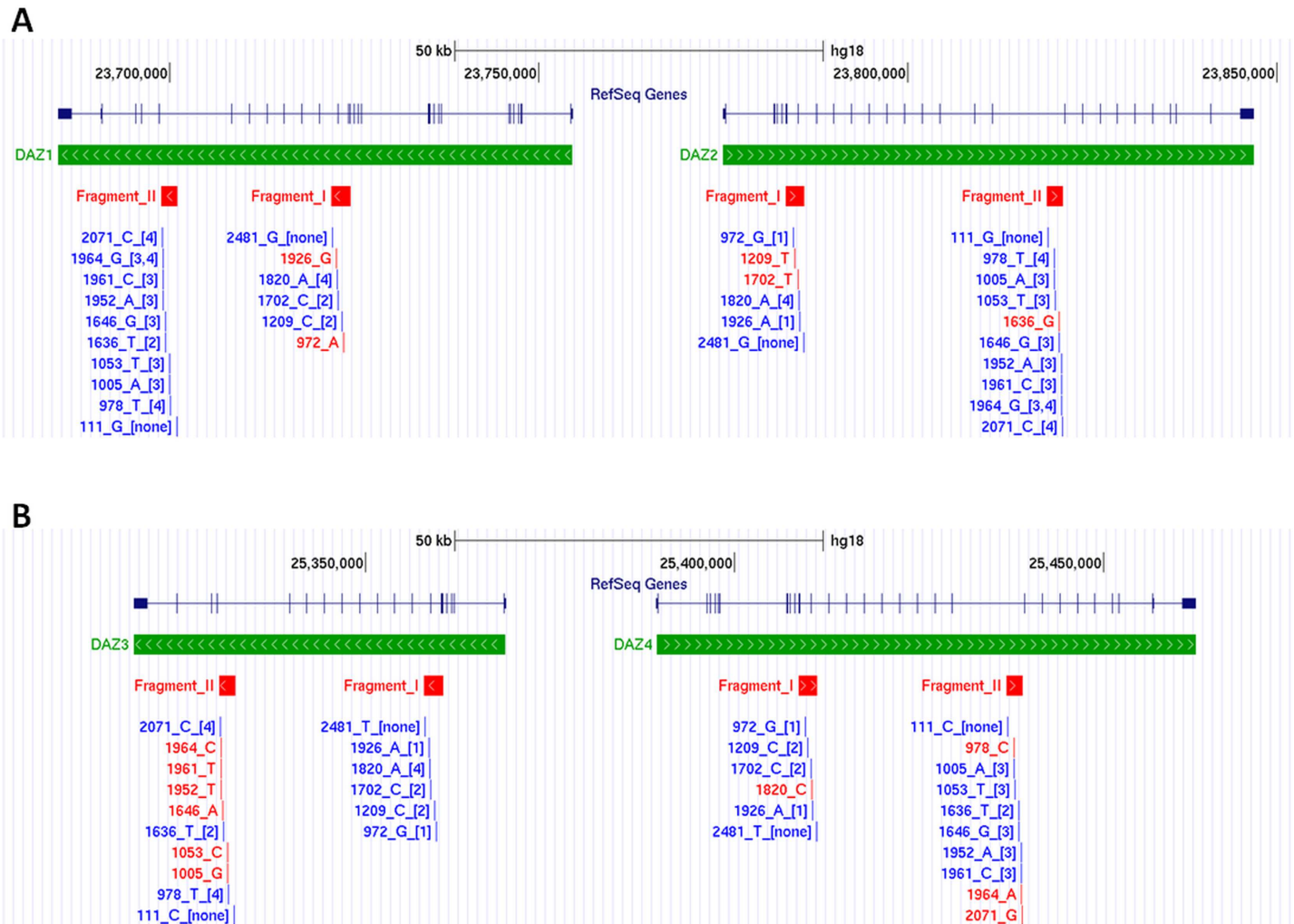
After aligning the sequences of the four DAZ family members using Multalin sequence alignment tool [29], two regions were selected for amplification. The products were designated Fragments I and II (Fig 2). Both were designed to consist of four amplicons derived from the four DAZ family members, respectively, and to contain several SFV positions (S1 Fig, upper part; S1 and S2 Tables; S5–S7 Files). Fragments I and II were amplified in 52 individual samples using the Qiagen Multiplex PCR Kit. In order to characterize all SFV positions, both fragments were sequenced with four sequencing primers on an ABI 3130 Genetic Analyzer using the Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit. Both kits were used according to the manufacturer's instructions. The sequences of all primers utilized in this study are shown in S3 Table.

### Preparation of control DNA mixtures

After inspection of the sequencing electropherograms, two samples were selected that contained every DAZ family member-specific SFV in the region covered by Fragment I. The fragment was freshly amplified and cloned with Invitrogen's TOPO TA Cloning Kit as described in the manufacturers' protocol. For either sample, overnight cultures were grown from 30 white colonies. Plasmids were cleaned up using Invitrogen's PureLink Plasmid Miniprep Kit. The concentration of the plasmid preparations was measured and adjusted to 100.0 ng/ $\mu$ l. The inserts of the preparations were sequenced to find out which DAZ family member they must have been derived from. Four plasmid preps with insert of different origins were chosen to assemble control DNA mixtures in order to mimic Fragment I amplified in samples containing two, four or six DAZ copies in various combinations. The mixtures presented several known variant ratios at every SFV position. The composition of the DNA mixtures is shown in S4 Table.

### Analysis of control DNA mixtures

To adjust the concentration of the DAZ inserts to the value typical of DAZ genes in individual DNA samples in our lab, the control mixtures were diluted 1:500,000. Six aliquots of mixture 1 and three aliquots of mixtures 2–9 were amplified parallel and sequenced as described above. The area-under-the-curve (AUC) ratio was determined from the sequencing electropherograms at each studied SFV position in each aliquot of every DNA mixture. The AUC of the signal given by the DAZ family member-specific variant ( $AUC_{spec}$ ) and that given by the non-specific variant ( $AUC_{non-spec}$ ) was measured separately with the use of ImageJ software [30] in a standardized way. The AUC ratio was calculated using the following formula:



**Fig 2. Schematic representation of the four DAZ family members along with the studied markers.** Panel A: DAZ1 and DAZ2. Panel B: DAZ3 and DAZ4. The figure was captured from the UCSC Genome Browser after uploading an appropriate BED file (S7 File). Below the scale, chromosome Y coordinates according to the human genome build NCBI36/hg18 are shown. Below the RefSeq Genes label, the structure of the DAZ family members are illustrated with the exons indicated by perpendicular lines. The aligned arrowheads in the thick green line show the direction of the coding sequence. Variants presented in red and blue colors are specific and non-specific for the corresponding DAZ family members, respectively. For non-specific variants, a digit in square brackets indicates the DAZ family member for which the relevant SFV position contains a specific variant. The numbers in the variants' name indicate the variants' location in Fragments I or II.

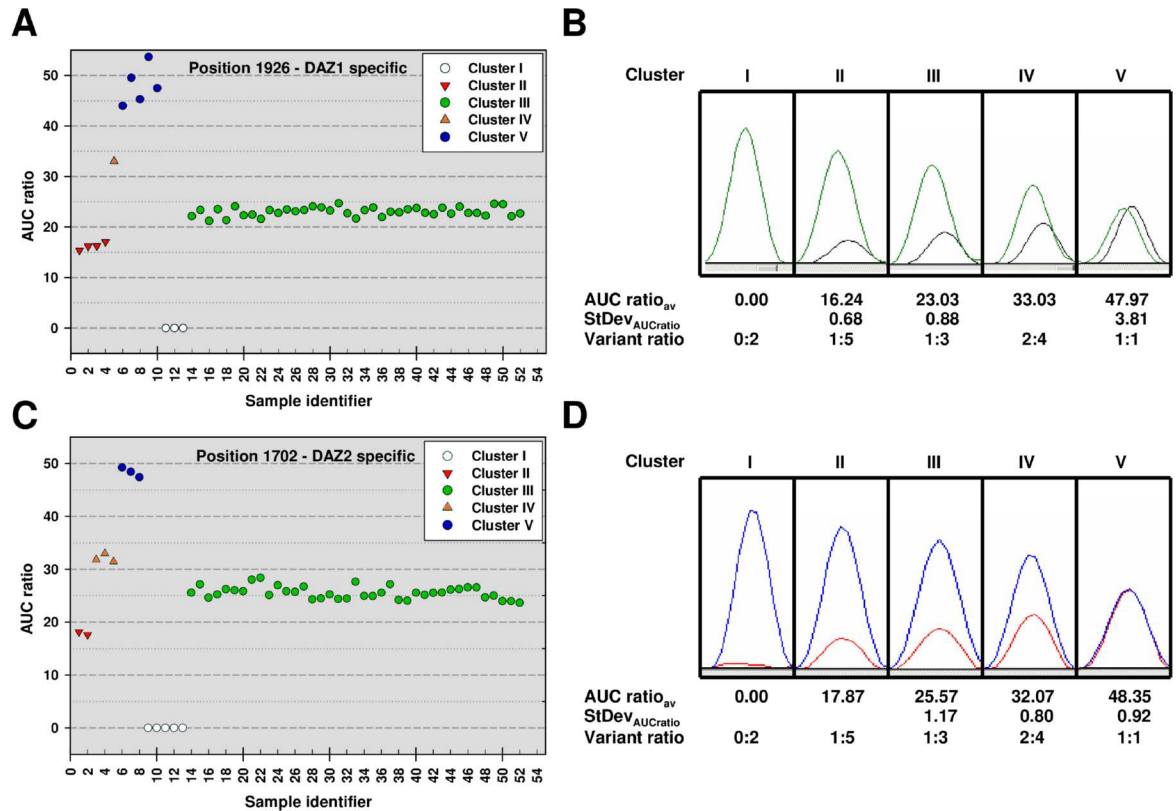
doi:10.1371/journal.pone.0163936.g002

$100 \times \text{AUC}_{\text{spec}} / (\text{AUC}_{\text{spec}} + \text{AUC}_{\text{non-spec}})$ . An average AUC ratio  $\pm$  SD was determined and assigned to each known variant ratio at any tested SFV position (S5 Table).

### Analysis of individuals' samples

The AUC ratio was determined at each SFV position in the 52 samples based on the sequencing electropherograms as described above. The AUC ratios obtained at a given SFV position throughout all samples were compared to one another (Fig 3). Based on cluster formation and, in the case of Fragment I, comparison with the results obtained for the control mixes, too, a variant ratio was assigned to each SFV position in every individual sample. The exact variant ratio for 0:2x, 2x:0 and x:x positions were established after dividing the samples into partial deletion, partial duplication and non-rearranged (control) groups on the basis of their horizontal variant ratio distribution (Table 1).





**Fig 3. Clustering of AUC ratios at two SFV positions in fifty-two samples.** The fifty-two samples sequenced form five distinct clusters according to the AUC ratio measured at SVF positions 1926 (A) and 1702 (C). Samples 1–5 are the duplication samples (referred to as Ydup\_01–05 in the text), whereas samples 6–13 are the deletion samples (referred to as Ydel\_06–13). Samples 14–52, each having one copy of all four DAZ family members, constitute the control panel. Representative electropherogram pictures of SVF positions 1926 (B) and 1702 (D) obtained in samples belonging to the distinct clusters are shown. The average (AUC ratio<sub>av</sub>) and standard deviation (StDev) of the AUC ratio values were calculated from all samples belonging to a cluster. Comparing with the AUC ratio–variant ratio relationship determined in control mixes, a variant ratio was assigned to each cluster at both positions. The AUC ratio (presented here as percentage) calculation is described in the Methods section.

doi:10.1371/journal.pone.0163936.g003

### Validation methods

**Multiplex PCR assays to detect deletions in AZFc region.** Two multiplex PCR reactions were assembled to amplify three and four STS markers, respectively, which are located in AZFc region (except for sY1201). Multiplex I amplified sY1197 (NCBI GenBank Accession Number:

**Table 1. Relationship between a sample’s AZFc partial deletion/duplication status and its horizontal variant ratio distribution.**

AZFc partial deletion/duplication status	Type of SFV positions (#specific variant: #non-specific variant)						
	0:2x	2x:0	x:x	1:3	1:5	2:4	4:2
No partial rearrangement (x = 2)	+	-	+	+	-	-	-
Partial deletion affecting two DAZ family members (x = 1)	+	+	+	-	-	-	-
Partial deletion affecting two DAZ family members followed by duplication (x = 2)	+	+	+	-	-	-	-
Partial duplication affecting two DAZ family members (x = 3)	+	-	+	-	+	+	+

A + sign means that the corresponding type of SFV position may be present in a sample with the relevant deletion/duplication status. A - sign means that the corresponding type of SFV position is not expected in a sample with the relevant deletion/duplication status. The value of x is the function of the deletion/duplication status.

doi:10.1371/journal.pone.0163936.t001

G67168), sY1206 (G67171) and sY1201 (G67170). Multiplex II tested for the presence of sY1191 (G73809), sY1291 (G72340), sY1258 (G75499) and sY1201. Lying outside the AZFc region, sY1201 was used as a control for the presence of chromosome Y and the functionality of the PCR reaction in both multiplex assemblies. The reactions were carried out using the Qiagen Multiplex PCR Kit according to the manufacturer's instructions. The ratios of the primers were optimized so that each band would exhibit approximately equal intensity on agarose gels.

**Gene dosage test for the DAZ gene family.** The cumulative copy number of the DAZ gene family was validated by a previously described method [31]. Briefly, the target (DAZ) and an internal control with known copy number (DAZL) were co-amplified using a FAM-labelled primer pair. The amplification was stopped in the exponential phase. The DAZ and DAZL fragments, which had a 3 bp difference in length, were separated by polyacrylamide gel electrophoresis on an ABI 310 Genetic Analyzer. The quantification was performed by comparing the peak area of the target to that of the internal control.

**Cloning and sequencing selected samples to study the co-segregation characteristics of DAZ family member-specific variants.** Fragments I and II were amplified and cloned, as described above, in four samples selected so that as many SFV positions as possible show a variant ratio of 1:3. In the case of each cloned fragment, the insert was amplified in colony PCR from 30 white colonies using KAPA2G Robust HotStart DNA Polymerase. The products were sequenced and consensus variant series thought to represent the different DAZ family members were determined for both fragments in all four samples.

## Results

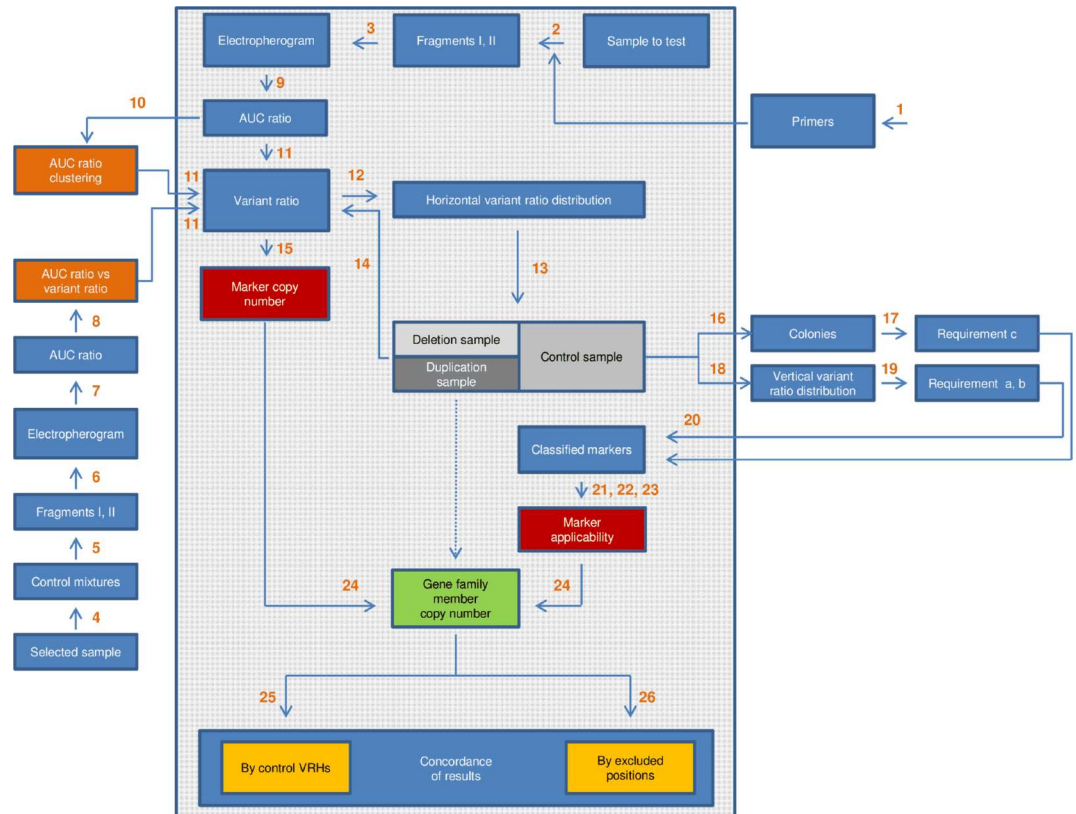
### Evaluation of the control DNA mixtures

**Determination of the variant ratio—AUC ratio relationship.** The steps involved in either the elaboration or the application of variant ratio analysis are depicted by a flowchart shown by Fig 4.

Several control DNA mixtures having known variant ratios at the studied SFV positions were prepared to mimic various deletions and duplications affecting Fragment I. The AUC ratios measured in them well reflected the variant ratios at any selected SFV position. DNA mixtures with identical variant ratio at a given SFV position formed a distinct cluster according to their AUC ratio at the relevant position. Several such clusters could be distinguished at any SFV position. The AUC ratios of the members of a cluster were averaged and the average  $\pm$  SD was assigned to the respective variant ratio at the given SFV position. As an example, the data calculated at SFV positions 1702 and 1926 in Fragment I are shown in S5 Table. This relationship can be used to determine the variant ratio from the measured AUC ratio at the relevant SFV position in the analysis of individual samples.

### Evaluation of individual DNA samples

**Determination of the AZFc partial deletion/duplication status of samples and the copy number of the family member-specific variants.** After calculating the AUC ratio, a variant ratio was assigned to every single SFV position selected for analysis in all of the 52 individual samples. It was achieved partly on the basis of the AUC ratio–variant ratio relationship determined by the analysis of control mixtures (at SFV positions in Fragment I), partly by ordering the clusters formed by the samples according to their AUC ratio (at SFV positions in Fragments I and II) (Fig 3). Cluster formation in itself seemed to be sufficient for variant ratio assignment. In the next step, using the theoretical relationship presented and explained in Table 1, the AZFc partial deletion/duplication status of the samples was inferred from their “horizontal” variant ratio distribution. Eight and five samples were concluded to carry deletion



**Fig 4. Flowchart showing the steps involved in the elaboration and application of variant ratio analysis.** The numbered arrows stand for the processes applied, the rectangles symbolize the result of the respective process. The green rectangle shows the desired end-result of the analysis. Brown rectangles symbolize calibration data used to help derive variant ratios from AUC ratios. Red rectangles stand for input data required for stage 2 or, if there are marker associations, stage 3 analysis. Samples with different partial rearrangement types are indicated by three different shades of gray. The dashed arrow means that only deletion and duplication samples undergo stage 2 or stage 3 analysis. The large rectangle with transparent grey background contains the steps that are required for a complete analysis. The steps outside the large rectangle were used for the elaboration of the method. All processes are listed below. 1/ Aligning the sequences of the four DAZ genes extracted from the human reference genome in order to select amplifiable fragments which i) consist of four amplicons belonging to the four DAZ genes, respectively, and ii) contain as many SFV positions as possible (Fragments I and II) (Fig 2, S1 Fig, S5–S7 Files, S1 and S2 Tables). 2/ Amplification of selected regions in all individual samples to get Fragments I and II. 3/ Sequencing Fragments I and II in all individual samples. 4/ Preparing control plasmid mixtures by cloning Fragment I amplified from samples selected to contain every DAZ1, DAZ2, DAZ3 and DAZ4-specific variant in order to mimic wild-type, AZFc partial deletion and AZFc partial duplication samples having *known* variant ratios at each SFV position (S4 Table). 5/ Amplification of selected regions to get Fragment I in control mixtures. 6/ Sequencing Fragment I in control mixtures. 7/ Measuring AUCs by ImageJ software and calculating the AUC ratio at each SFV position in every control mixture. 8/ Correlating the AUC ratios measured in control mixtures with known variant ratios (S5 Table). 9/ Measuring AUCs and calculating the AUC ratio at each SFV position in all individual samples. 10/ Plotting AUC ratios throughout all samples for each studied position to visualize AUC ratio clustering (Fig 3). 11/ Assigning a variant ratio to each SFV position in all individual samples. 12/ Determining the horizontal variant ratio distribution in all individual samples. 13/ Grouping samples according to AZFc partial deletion/duplication status based on their horizontal variant ratio distribution (Tables 1–4). The results of this step were validated by a generally accepted DAZ dosage test (not shown) and two multiplex PCRs amplifying six sY markers (S2 Fig). 14/ Specifying the variant ratios that remained ambiguous on the basis of the AUC ratio (electropherogram picture) in step 11 (0:2x, x:x and 2x:0 positions). 15/ Deducing the copy number of the specific variant at each SFV position in all individual samples from the relevant variant ratio. 16/ Cloning Fragments I and II in four selected control samples to separate the four amplicons derived from the four DAZ family members, respectively. 17/ Sequencing an appropriate number of colonies in order to study the co-segregation of DAZ family member-specific variants, i.e. the fulfillment of requirement (c) imposed on an ideal marker (S6 Table). 18/ Determining the vertical variant ratio distribution throughout all control samples at each studied SFV position. 19/ Determining p1 and p2 values on the basis of the vertical variant ratio distribution at each SFV position within the control panel in order to study the fulfillment of requirements (a) and (b) also imposed on an ideal marker (Table 4, the equations are seen in the text). 20/ Classifying family member-specific variants on the basis of p1 and p2,

which results in the distinction of class I, class II/a, class II/b and class III markers (Table 5). 21/ Determining the relationship between the copy number of a gene family member-specific variant and the copy number of the corresponding gene family member for class II/a and class II/b markers. It results in the "restricted" applicability of the markers that will be utilized at stage 2 and stage 3 analyses (S1 and S2 Files, Tables 6 and 7). 22/ Searching for perfect associations between variants specific to different DAZ family members in the control panel in order to re-evaluate (extend) the applicability of some markers if possible (Table 4). 23/ Determining the relationship between the copy number of the members of the associated marker pairs and the copy number of the corresponding gene family members for the relevant class II/a and class II/b markers, which results in their "extended" applicability that will be utilized at stage 3 analysis (S3 and S4 Files, Tables 8 and 9). 24/ Evaluating partial deletion and partial duplication samples identified in step 13 using the classified markers with restricted applicability (stage 2 and 3) or, if exists, extended applicability (stage 3) to determine the samples' deletion and duplication subtype (S8 and S9 Tables, Tables 2 and 3). 25/ Comparing the series of the variant ratios (variant ratio haplotype, VRH) of the deletion and duplication samples with the VRHs observed in the control panel in order to support the existence of the assigned rearrangement subtypes in the studied population (S7 and S11 Tables). 26/ Checking if the assigned rearrangement subtypes are concordant with or might even be indicated by the variant ratios determined at positions also examined but not utilized for stage 2 and stage 3 analyses for some reason (S10 Table).

doi:10.1371/journal.pone.0163936.g004

(0:2x, 2x:0 and x:x type positions only, Table 2) or duplication (0:2x, x:x, 1:5, 2:4 and 4:2 type positions, Table 3), respectively. These findings were verified by two independent, previously validated methods. First, an STS marker analysis by two multiplex PCR assays showed that only eight samples found by variant ratio analysis to carry deletion lacked one or three of the tested STS markers (S2 Fig). Second, the DAZ dosage test [31] confirmed the cumulative DAZ copy number in all deletion and duplication samples identified by variant ratio analysis. Since x takes the value of 1, 2 and 3 in partial deletion, control and partial duplication samples, respectively, the variant ratios of 0:2x, 2x:0 and x:x positions were changed to 0:2, 2:0 and 1:1 in deletion samples, 0:4 and 2:2 in control samples and 0:6 and 3:3 in duplication samples (there was no 2x:0 position among the controls and the duplication samples). Based on the variant ratios, the copy number of the specific variant(s) was determined at each SFV position (S8A and S9A Tables).

Supposing pairwise deletion and duplication of the DAZ family members, one of seven different variant ratios (0:2x, 2x:0, x:x, 1:3, 1:5, 2:4 and 4:2) can be assigned to an SFV position on the basis of its electropherogram picture. Except for 2x:0 and x:x, those ratios directly show the copy number of the family member-specific variant at their respective position. The horizontal variant ratio distribution means the distribution of the different types of SFV positions of a sample. The AZFc partial deletion/duplication status can be determined from the horizontal variant ratio distribution. The electropherogram picture of type 0:2x (0:2, 0:4 or 0:6), type 2x:0 (2:0 or 4:0) and type x:x (1:1, 2:2 or 3:3) sites appears identical, respectively. Their exact variant ratio and, in turn, the copy number of the specific variant at the 2x:0 and x:x type positions can be obtained from the AZFc partial deletion/duplication status of the sample. Subtyping uses both the AZFc partial deletion/duplication status and the copy number of the specific variant (s) at each SFV position as the starting point. [There are positions, such as position 1964 in Fragment II, which comprise more than two variants in certain samples; therefore, their description is necessarily more complex. For example, in the view of DAZ3, the integers in the formula 1:(1+2) mean one specific C, one non-specific A (which, at the same time, is specific to DAZ4) and two non-specific Gs. Overall, it refers to a 1:3 type position. Under the same considerations, 1:(0+3) is identical with 1:3; 0:(2+2) and 0:(1+3) with 0:4; and 2:(0+2) with 2:2.]

Based on variant ratios only, no distinction can be made between partial deletion and partial deletion followed by duplication. Therefore, samples found to carry partial deletion must be checked using a dosage test to determine if they also underwent duplication. In a similar way, the identification of samples with the entire AZFc region duplicated requires to subject non-rearranged samples to a dosage test. However, the lack of knowledge of the exact DAZ copy number of samples belonging to these two categories does not influence subtyping.

**Table 2. The human reference genome-based characteristics of the studied SFV positions and their variant ratios found in eight partial deletion samples.**

Location	SFV position on Fragment I								SFV position on Fragment II								Deleted	Identifier
	972	1209	1702	1820	1926	2481 <sup>2</sup>	111 <sup>3</sup>	978	1005	1053	1636	1646	1952	1961	1964 <sup>4</sup>	1964 <sup>4</sup>		
Marker specificity	DAZ1	DAZ2	DAZ2	DAZ4	DAZ1	-	-	DAZ4	DAZ3	DAZ3	DAZ2	DAZ3	DAZ3	DAZ3	DAZ3	DAZ4	DAZ4	
Variants <sup>1</sup>	A:G	T:C	T:C	C:A	G:A	G:T	G:C(:T)	C:T	G:A	C:T	G:T	A:G	T:A	T:C	C:(A+G)	A:(C+G)	G:C	
Variant ratios	0:2	1:1	1:1	0:2	1:1	1:1	1:1 <sup>5</sup>	0:2	0:2	0:2	1:1	0:2	0:2	0:2	0:(0+2)	0:(0+2)	0:2	
	0:2	1:1	1:1	0:2	1:1	2:0	2:0	0:2	0:2	0:2	1:1	0:2	0:2	0:2	0:(0+2)	0:(0+2)	0:2	
	1:1	1:1	1:1	0:2	1:1	2:0	2:0	0:2	0:2	0:2 <sup>5</sup>	0:2	0:2	0:2	0:2	0:(0+2)	0:(0+2)	0:2	
	1:1	0:2	0:2	0:2	1:1	1:1	1:1	0:2	1:1	1:1	0:2	1:1	1:1	1:1	1:(0+1)	0:(1+1)	0:2	
	1:1	0:2	0:2	0:2	1:1	1:1	1:1	0:2	1:1	1:1	0:2	1:1	1:1	1:1	1:(0+1)	0:(1+1)	0:2	
	0:2	0:2	0:2	1:1	0:2	0:2	0:2	0:2	2:0	2:0	0:2	2:0	2:0	2:0	2:(0+0)	0:(2+0)	0:2	
	0:2	0:2	0:2	1:1	0:2	0:2	0:2	0:2	2:0	2:0	0:2	2:0	2:0	2:0	2:(0+0)	0:(2+0)	0:2	
	0:2	0:2	0:2	1:1	0:2	0:2	0:2	0:2	2:0	2:0	0:2	2:0	2:0	2:0	2:(0+0)	0:(2+0)	0:2	
	0:2	0:2	0:2	1:1	0:2	0:2	0:2	0:2	2:0	2:0	0:2	2:0	2:0	2:0	2:(0+0)	0:(2+0)	0:2	

<sup>1</sup>Variants are arranged as family member-specific variant(s); non-specific variant(s) at each SFV position.

<sup>2</sup>At position 2481 in Fragment I, there is no specific variant (DAZ1/2: G, DAZ3/4: T according to the human reference assembly).

<sup>3</sup>At position 111 in Fragment II, there is no specific variant (DAZ1/2: G, DAZ3/4: C according to the human reference assembly). In several of our samples, a T is substituted for one of the Cs.

<sup>4</sup>At position 1964, there is a DAZ3-specific C and a DAZ4-specific A according to the human reference assembly.

<sup>5</sup>Variant ratio not in accordance with the concluded deletion subtype

doi:10.1371/journal.pone.0163936.t002

**Table 3. The human reference genome-based characteristics of the studied SFV positions and their variant ratios found in five partial duplication samples.**

Location	SFV position on Fragment I										SFV position on Fragment II										Duplicated	Identifier
	972	1209	1702	1820	1926	2481 <sup>2</sup>	111 <sup>3</sup>	978	1005	1053	1636	1646	1952	1961	1964 <sup>4</sup>	1964 <sup>4</sup>	2071					
Marker specificity	DAZ1	DAZ2	DAZ2	DAZ4	DAZ1	-	DAZ4	DAZ3	DAZ3	DAZ3	DAZ2	DAZ3	DAZ3	DAZ3	DAZ3	DAZ4	DAZ4					
Variants <sup>1</sup>	A:G	T:C	T:C	C:A	G:A	G:T	G:C(: T)	C:T	G:A	C:T	G:T	A:G	T:A	T:C	C:(A +G)	A:(C +G)	G:C					
Variant ratios	0:6	1:5	1:5	0:6	1:5	2:4	2:4	1:5	3:3	3:3	1:5	3:3	3:3	3:3	3:(0+3)	0:(3+3)	1:5					
	0:6	2:4	2:4	0:6	2:4	2:4	4:2	1:5	1:5	1:5	2:4	1:5	1:5	1:5	1:(0+5)	0:(1+5)	1:5					
	1:5	2:4	2:4	2:4	1:5	1:5	3:3	0:6	3:3	3:3	2:4	3:3	3:3	3:3	3:(0+3)	0:(3+3)	0:6					
	1:5	2:4	2:4	2:4	1:5	1:5	3:3	0:6	3:3	3:3	2:4	3:3	3:3	3:3	3:(0+3)	0:(3+3)	0:6					
	0:6	1:5	1:5	0:6	1:5	1:5	2:4	2:4	2:4	2:4	1:5	2:4	2:4	2:4	2:(2+2)	2:(2+2)	2:4					

<sup>1</sup>Variants are arranged as family member-specific variant(s); non-specific variant(s) at each SFV position.

<sup>2</sup>At position 2481 in Fragment I, there is no specific variant (DAZ1/2: G, DAZ3/4: T according to the human reference assembly).

<sup>3</sup>At position 111 in Fragment II, there is no specific variant (DAZ1/2: G, DAZ3/4: C according to the human reference assembly). In several of our samples, a T is substituted for one of the Cs.

<sup>4</sup>At position 1964, there is a DAZ3-specific C and a DAZ4-specific A according to the human reference assembly.

doi:10.1371/journal.pone.0163936.t003

**Selection of samples to construct a control panel for marker classification.** Out of the 52 samples tested in this work, 39 showed a horizontal variant ratio distribution that is characteristic of the presence of four different DAZ genes (i.e. 0:2x, x:x and 1:3 type positions only, [Table 4](#)). All of them carried SFVs specific to each DAZ family member except one sample that showed no DAZ4 specific variants at all (variant ratio haplotype [VRH] 4). In addition, none of them lacked any of the STS markers according to the two multiplex PCR assays. Therefore, they were all concluded to possess the four DAZ gene family members in 1:1:1:1 ratio. Since these samples were thought not to have been affected by either partial deletion or partial duplication, they were chosen to assess the variability caused by interlocus gene conversion and/or SNPs in the copy number of SFVs designated DAZ family member-specific based on the human reference genome.

**Diversity of the variant ratio haplotypes (VRHs) found in the control panel.** The series of the successive variant ratios define a sample's VRH. An important aspect of this study was to get insight into the various VRHs that are present in the Hungarian population, in men who carry one copy of each member of the DAZ gene family. The eight different VRHs distinguishable in the control panel are indicated in [Table 4](#). Not surprisingly, no individual with a VRH identical to the one that can be derived from the human reference genome was found. The great inter-individual variability observed in the variant ratio of a SFV position in general ([S1 Fig](#), lower part and [Table 4](#)) could confuse the evaluation of unknown samples during the search for AZFc rearrangement subtypes. Therefore, in order to avoid drawing false conclusions, it proved to be indispensable to establish a marker classification system.

**Classification of "specific" SFVs based on how they meet requirements imposed on an ideal marker.** The purpose of marker classification was to revise the single reference genome-conferred specificity status of SFVs. The revision was carried out on the basis of observations made in a group of non-rearranged (i.e. control) samples.

An ideal DAZ family member-specific marker must fulfill three requirements. It must be present in all samples that contain each one of the four DAZ genes (a); it must not be present in more than one member of the DAZ gene family in any sample (b); the DAZ family member containing the marker must be the same in every sample, which also implies that it must be identical with the one to which the marker was associated by the human reference genome (c). The conclusions allowed to be drawn from the presence or absence of a marker depends on which one(s) of the above requirements it fulfills.

Meeting requirement (c) is a prerequisite for a variant to be utilized as a gene family member-specific marker. In order to study the fulfillment of this condition, the co-segregation characteristics of SFVs were examined in four control samples that had been selected in the knowledge of their VRH. The four DAZ family member-specific amplicons constituting Fragments I and II, respectively, were separated by cloning. The consensus SFV series thought representative of the four DAZ family members, respectively, were determined by sequencing the insert in a sufficient number of colonies ([S6 Table](#)). The results were in complete accordance with the samples' VRH in all cases. In addition, we observed that variants considered specific to a given family member co-segregated in the same amplicon in each sample whenever they were found. On the other hand, variants thought specific to different DAZ genes never showed co-segregation provided that they were present in no more than one family member according to the observed variant ratios. In summary, variants associated to different DAZ genes by the reference genome were really located on distinct family members in all four samples. This led us to the assumption that requirement (c) can be considered to be met *in general* in the case of our studied SFVs.

The "vertical" variant ratio distribution that can be obtained upon the examination of samples belonging to the control panel indicates whether a DAZ family member-specific variant

**Table 4. The human reference genome-based characteristics of the studied SFV positions and their variant ratios determined in 39 control samples grouped according to their variant ratio haplotype.**

Location	SFV position on Fragment I					SFV position on Fragment II					VRH <sup>5</sup>		No. <sup>6</sup>				
	972	1209	1702	1820	1926	2481 <sup>2</sup>	111 <sup>3</sup>	978	1005	1053	1636	1646		1961	1964 <sup>4</sup>	1964 <sup>4</sup>	2071
Marker specificity	DAZ1	DAZ2	DAZ2	DAZ4	DAZ1	-	-	DAZ4	DAZ3	DAZ3	DAZ2	DAZ3	DAZ3	DAZ3	DAZ4	DAZ4	
Variants <sup>1</sup>	A:G	T:C	T:C	C:A	G:A	G:T	G:C(T)	C:T	G:A	C:T	G:T	A:G	T:A	C:(A+G)	A:(C+G)	G:C	
Variant ratios	1:3	1:3	1:3	1:3	1:3	2:2	2:2	1:3	1:3	1:3	1:3	1:3	1:3	1:(1+2)	1:(1+2)	1:3	RefSeq <sup>7</sup>
	0:4	1:3	1:3	0:4	1:3	1:3	2:2	1:3	1:3	1:3	1:3	1:3	1:3	0:(1+3)	0:(1+3)	1:3	3b
	0:4	1:3	1:3	0:4	1:3	1:3	2:2	1:3	1:3	1:3	1:3	1:3	1:3	1:(1+2)	1:(1+2)	1:3	3a/1
	0:4	1:3	1:3	0:4	1:3	1:3	2:1(1)	1:3	1:3	1:3	2:2	1:3	1:3	1:(1+2)	1:(1+2)	1:3	3a/2
	0:4	1:3	1:3	0:4	1:3	2:2	2:2	1:3	1:3	1:3	1:3	1:3	1:3	1:(1+2)	1:(1+2)	1:3	3a/3
	1:3	1:3	1:3	1:3	1:3	2:2	2:2	1:3	1:3	1:3	1:3	1:3	1:3	0:(1+3)	0:(1+3)	1:3	2
	1:3	1:3	1:3	1:3	1:3	1:3	2:2	0:4	2:2	2:2	1:3	2:2	2:2	0:(2+2)	0:(2+2)	0:4	1
	0:4	1:3	1:3	0:4	1:3	2:2	N/A	0:4	0:4	0:4	1:3	2:2	2:2	0:(2+2)	0:(2+2)	0:4	4
	0:4	1:3	1:3	0:4	1:3	2:2	N/A	1:3	0:4	0:4	1:3	1:3	1:3	1:(0+3)	0:(1+3)	1:3	3c
p1 <sup>8</sup>	1:00	1:00	1:00	1:00	1:00	-	-	1:00	0:65	0:65	0:92	0:64	0:64	1:00	1:00	1:00	
p2 <sup>8</sup>	0:49	1:00	1:00	0:49	1:00	-	-	0:64	0:92	0:92	1:00	1:00	1:00	0:15	0:64	0:64	
Class of marker	II/b	I	I	II/b	I	-	-	II/b	III	III	II/a	II/a	II/a	II/b	II/b	II/b	

<sup>1</sup>Variants are arranged as family member-specific variant(s); non-specific variant(s) at each SFV position.

<sup>2</sup>At position 2481 in Fragment I, there is no specific variant (DAZ1/2: G, DAZ3/4: T according to the human reference assembly).

<sup>3</sup>At position 111 in Fragment II, there is no specific variant (DAZ1/2: G, DAZ3/4: C according to the human reference assembly). In three samples (VRH 3a/2), T was found to replace one of the Cs. Based on cloning experiments, T is located in DAZ3 (S6C Table)

<sup>4</sup>At position 1964, there is a DAZ3-specific C and a DAZ4-specific A according to the human reference assembly.

<sup>5</sup>Variant ratio haplotypes were named arbitrarily based on similarities.

<sup>6</sup>Number of samples belonging to a variant ratio haplotype among the 39 controls

<sup>7</sup>RefSeq variant ratio haplotype was determined by the alignment of the corresponding DAZ regions derived from the human reference assembly hg18.

<sup>8</sup>The meaning and calculation of p1 and p2 can be found in the text

doi:10.1371/journal.pone.0163936.t004



meets requirements (a) and/or (b). Vertical variant ratio distribution means the distribution of the variant ratios that a SFV position shows in a defined group of samples. The expected “bins” of that distribution in the control group are 0:4, 1:3 and 2:2. Two numerical values were computed from that distribution for every SFV according to the following formulas:  $p1 = \frac{\text{subjects}_{1:3}}{[\text{subjects}_{1:3} + \text{subjects}_{2:2}]}$  and  $p2 = \frac{\text{subjects}_{1:3}}{[\text{subjects}_{1:3} + \text{subjects}_{0:4}]}$ , where  $\text{subjects}_{1:3}$ ,  $\text{subjects}_{2:2}$  and  $\text{subjects}_{0:4}$  stand for the number of samples with a variant ratio of 1:3, 2:2 and 0:4, respectively, in a given SFV position throughout all control samples (Table 4). p1 reflects the probability that the DAZ family member, which the given variant is considered to be specific to, is present in a deletion sample in which the variant has been found. p2 indicates the probability that the DAZ family member, which the given variant is considered to be specific to, is absent in a deletion sample in which the lack of the variant has been demonstrated. A cut-off of 0.95 was set for both p1 and p2. DAZ family member-specific SFVs were classified according to the way their p1 and p2 values were related to the cut-off. If p1 and/or p2 exceed the cut-off value, requirements (b) and/or (a) must be considered to be fulfilled, respectively (Table 5).

**Finding the relationship between a marker’s copy numbers and the corresponding gene family member’s copy numbers.** The aim of variant ratio analysis is to find the relationship between the copy numbers of a gene family member-specific variant and the copy numbers of the corresponding gene family member itself. Marker classification helps this procedure by allowing to establish the above relationship for each marker class, separately. The copy number of a gene family member can be changed by a large genomic rearrangement, i.e. deletion or duplication. However, the copy number of a specific variant is also affected by local changes such as gene conversion. It means that, as opposed to class I markers, class II/a, class II/b and class III markers are detached from the gene family member they are supposed to be specific to.

The copy number of a class I marker always directly indicates the copy number of its carrier DAZ family member. The same does not hold true of class II/a and class II/b markers, which is shown by the findings that they were present with 2 and 0 copies, respectively, in several control samples. In order to determine the copy numbers of a marker that unambiguously indicate the copy number of the corresponding gene family member, we first determined the whole spectrum of gene conversions assumed to be capable of duplicating a given class II/a or eliminating a given class II/b marker, respectively. Then, each conversion was combined with all theoretically possible DAZ deletion and duplication subtypes (S1 and S2 Files). The informative copy numbers of a marker overall, that can be obtained by the marker’s separate (i.e. association-independent) evaluation, is called its restricted applicability (Tables 6 and 7). Since the applicability of class III markers is very limited, only class I, class II/a and class II/b markers were kept for the analysis of partial deletion and partial duplication samples (S8 File).

**Table 5. Classification of DAZ family member-specific markers.**

Evaluation of control samples				Evaluation of unknown samples	
p1	p2	Requirements fulfilled	Class of marker	Inference that could be drawn from the presence of the marker	Inference that could be drawn from the absence of the marker
> cut-off <sub>1</sub>	> cut-off <sub>2</sub>	(a), (b)	I	DAZ family member present	DAZ family member absent
> cut-off <sub>1</sub>	≤ cut-off <sub>2</sub>	(b)	II/b	DAZ family member present	-
≤ cut-off <sub>1</sub>	> cut-off <sub>2</sub>	(a)	II/a	-	DAZ family member absent
≤ cut-off <sub>1</sub>	≤ cut-off <sub>2</sub>	-	III	-	-

Variants have been classified according to how they fulfill requirements (a) and (b) imposed on an ideal family member-specific marker. Cut-off<sub>1</sub> and cut-off<sub>2</sub> can be arbitrarily set. p1 and p2 are the reliability values which can be calculated from the vertical variant ratio distribution obtained in the control panel at the respective SFV position (the equations are seen in the text).

doi:10.1371/journal.pone.0163936.t005

**Table 6. Restricted applicability of class II/a markers.**

Copy number of a class II/a marker	Copy number of the DAZ family member	
	Deletion samples	Duplication samples
0	0	-
1	no conclusion	1
2	1	no conclusion
3	-	no conclusion
4	-	2

Conclusions allowed to be drawn from the copy number of a class II/a DAZ family member-specific variant for the copy number of the relevant DAZ family member in partial deletion and partial duplication samples, respectively, are shown. The conclusions were established by determining the whole spectrum of gene conversions assumed to be able to duplicate a DAZ family member-specific variant, then combining each potential pairwise DAZ deletion or duplication event with each gene conversion, the latter allowed to take place either before or after the large rearrangement (S1 File). These conclusions are exploited in the stage 2 and stage 3 analyses of unknown samples (S8 and S9 Tables b-c). The '-' sign means a not expected scenario.

doi:10.1371/journal.pone.0163936.t006

**Alleviating the classification-imposed restrictions on the applicability of certain class II/a and class II/b markers.** By definition, the utilization of class II/a and class II/b markers is restricted to one direction, *i.e.* the presence of the former- and the absence of the latter-category-markers is considered to be non-informative. However, this restricted applicability may be modified by the *combined* evaluation of markers that are specific to different family members and, at the same time, show association in the control panel. Two such associations could be discovered in our data set (Table 4).

First, the class II/b DAZ1-specific "A" at position 972 ( $A_{972}$ ) and the class II/b DAZ4-specific "C" at position 1820 ( $C_{1820}$ ), both located in Fragment I, were found to be in perfect linkage disequilibrium. As a result, the presence of one of them endows the otherwise non-informative absence of the other with significance. For example, the absence of the DAZ1-specific  $A_{972}$  does not suggest the lack of DAZ1 in a deletion sample in itself. However, in the presence of the DAZ4-specific  $C_{1820}$ , the absence of the DAZ1-specific  $A_{972}$  is supposed to be due to something other than gene conversion, thereby indicating the lack of DAZ1.

**Table 7. Restricted applicability of class II/b markers.**

Copy number of a class II/b marker	Copy number of the DAZ family member	
	Deletion samples	Duplication samples
0	no conclusion	no conclusion
1	1	no conclusion
2	-	2

Conclusions allowed to be drawn from the copy number of a class II/b DAZ family member-specific variant for the copy number of the relevant DAZ family member in partial deletion and partial duplication samples, respectively, are shown. The above conclusions were established by determining the whole spectrum of gene conversions assumed to be able to eliminate a DAZ family member-specific variant, then combining each potential pairwise DAZ deletion or duplication event with each gene conversion, the latter allowed to take place either before or after the large rearrangement (S2 File). These conclusions are exploited in the stage 2 and stage 3 analyses of unknown samples (S8 and S9 Tables b-c). The '-' sign means a not expected scenario.

doi:10.1371/journal.pone.0163936.t007

Second, the disappearance of class II/b DAZ4-specific variants (C<sub>978</sub> and G<sub>2071</sub>) always coincided with the duplication of class II/a DAZ3-specific ones (A<sub>1646</sub>, T<sub>1952</sub>, T<sub>1961</sub> and C<sub>1964</sub>) in Fragment II. We supposed that DAZ3>DAZ4 gene conversion was responsible for all those changes. On one hand, if the DAZ4-specific variants are present, the DAZ3-specific variants, if also present, must be located on DAZ3. Consequently, the concomitant presence of the class II/b DAZ4-specific variants makes the presence of the class II/a DAZ3-specific ones a reliable indicator of the presence of DAZ3. On the other hand, if the DAZ3-specific variants are absent, the DAZ4-specific variants, if also absent, could not have been removed by gene conversion. Therefore, the concomitant absence of the DAZ3-specific variants makes the absence of the DAZ4-specific ones a reliable indicator of DAZ4 deletion.

In order to determine the copy numbers of the participant markers that unambiguously indicate the copy number of the corresponding gene family members, we first determined the whole spectrum of gene conversions or conversion pairs assumed to be capable of producing simultaneously both components of the above associations. Then, each conversion was combined with all theoretically possible DAZ deletion and duplication subtypes (S3 and S4 Files). The informative copy numbers of a marker overall, that can be obtained by an investigation taking the associations of the marker into consideration, is called its extended applicability (Tables 8 and 9).

**Demonstrating the advantages of using the revised applicability of markers.** Based on the results of the applicability revision detailed above, gene family member-specific variants can be utilized in three different ways. An analysis that uses SFVs in the traditional manner, as if all of the specific variants were of class I, is called here stage 1 analysis. In that case, one copy of the marker is considered equivalent to one copy of the corresponding gene family member. At the same time, stage 2 and stage 3 analyses apply the revised applicability. At stage 2, the restricted applicability is used for all markers. At stage 3, the extended applicability is exploited

**Table 8. Extended applicability of DAZ1-specific A<sub>972</sub> and DAZ4-specific C<sub>1820</sub>.**

Copy number of specific variants		Copy number of DAZ family members			
DAZ1-specific A <sub>972</sub>	DAZ4-specific C <sub>1820</sub>	Deletion samples		Duplication samples	
		DAZ1	DAZ4	DAZ1	DAZ4
0	0	no conclusion	no conclusion	no conclusion	no conclusion
0	1	0	1	1	2
1	0	1	0	2	1
1	1	1	1	no conclusion	no conclusion
1	2	-	-	1	2
2	1	-	-	2	1
2	2	-	-	2	2

Conclusions allowed to be drawn for the copy number of DAZ1 and DAZ4 in partial deletion and partial duplication samples, based on the combined analysis of the class II/b DAZ1-specific A<sub>972</sub> and DAZ4-specific C<sub>1820</sub>, are shown. To establish the above conclusions, the whole spectrum of gene conversions assumed to be able to eliminate the class II/b DAZ1-specific A<sub>972</sub> and the class II/b DAZ4-specific C<sub>1820</sub> in Fragment I, jointly or separately but simultaneously, was determined. Based on the perfect association of these two markers, which had been observed in the control panel, that spectrum could be limited to three conversion pairs (DAZ1>DAZ4 plus DAZ2>DAZ1, DAZ3>DAZ4 plus DAZ2>DAZ1 and DAZ2>DAZ4 plus DAZ3>DAZ1). The conclusions were derived by combining each potential pairwise DAZ deletion or duplication subtype with each of the three gene conversion pairs, the latter allowed to take place either before or after the large rearrangement (S3 File). These results are exploited in the stage 3 analysis of unknown samples (S8C and S9C Tables). The '-' sign means a not expected scenario.

doi:10.1371/journal.pone.0163936.t008

**Table 9. Extended applicability of the class II/a DAZ3- and class II/b DAZ4-specific markers located in Fragment II.**

Copy number of specific variants		Copy number of DAZ family members			
DAZ3-specific variants	DAZ4-specific variants	Deletion samples		Duplication samples	
		DAZ3	DAZ4	DAZ3	DAZ4
0	0	0	0	-	-
0	1	0	1	-	-
1	0	no conclusion	no conclusion	-	-
1	1	1	1	1	1
2	0	1	1	1	1
2	1	-	-	no conclusion	no conclusion
3	0	-	-	no conclusion	no conclusion
1	2	-	-	1	2
2	2	-	-	2	2
4	0	-	-	2	2
3	1	-	-	2	2

Conclusions allowed to be drawn for the copy number of DAZ3 and DAZ4 in partial deletion and partial duplication samples, based on the combined analysis of the class II/a DAZ3- and class II/b DAZ4-specific markers located in Fragment II, are shown. To establish the above conclusions, the whole spectrum of gene conversions assumed to be able to duplicate the class II/a DAZ3-specific variants and eliminate the class II/b DAZ4-specific variants in Fragment II, jointly or separately but simultaneously, was determined. Based on the perfect association between the duplication of these DAZ3-specific and the lack of these DAZ4-specific markers, which had been observed in the control panel, that spectrum could be limited to DAZ3>DAZ4 gene conversion. The conclusions were derived by combining each potential pairwise DAZ deletion or duplication with DAZ3>DAZ4 gene conversion, the latter allowed to take place either before or after the large rearrangement (S4 File). These results are exploited in the stage 3 analysis of unknown samples (S8C and S9C Tables). The '-' sign means a not expected scenario.

doi:10.1371/journal.pone.0163936.t009

for those taking part in a revealed association, whereas the restricted applicability is applied for all others.

We compared the outcome of the three analysis types using our data. At stage 1, we frequently ran against controversy between findings related to a given family member, which resulted, at best, in uncertainty regarding the concluded deletion or duplication subtypes (S8A and S9A Tables). Stage 2 evaluation resulted in the disappearance of the above inconsistencies due to the exclusion of unreliable findings from the analysis (S8B and S9B Tables). It turned out to be sufficient for the successful evaluation of three deletion samples (Ydel\_11, Ydel\_12 and Ydel\_13). However, this improvement often took place at the expense of losing too many data for certain family members to retain the ability to draw any conclusion for their copy number. For example, no exploitable information remained for DAZ4 in the other five deletion and two duplication samples (Ydup\_01, Ydup\_05). In contrast, stage 3 analysis led to the successful evaluation of our all deletion and duplication samples by making it possible to retain a considerable part of the data which would otherwise have been excluded from the analysis at stage 2 (S8C and S9C Tables). It was the first association which allowed to infer the lack of DAZ4 from the absence of the DAZ4-specific C<sub>1820</sub> in the concomitant presence of the DAZ1-specific A<sub>972</sub> in Ydel\_07, Ydel\_09 and Ydel\_10. At the same time, the second association made

it possible that reliable copy number data could be obtained for DAZ4 in samples Ydel\_06, Ydel\_07, Ydel\_08, Ydup\_01 and Ydup\_05 and for DAZ3 in Ydup\_01 and Ydup\_02.

Preferably, the copy number should be determined for all DAZ family members separately, i.e. independently of the copy number of the other DAZ genes. In this point, we could assign a copy number to 48 out of the 52 (92.31%) DAZ family members in our 13 partially rearranged samples at stage 3 analysis. In four samples (Ydel\_09, Ydel\_10, Ydup\_03, Ydup\_04), the DAZ3 copy number was still ambiguous.

**Summary of the results of subtyping.** Our deletion and duplication samples were evaluated by subjecting them to stage 3 analysis in order to determine the samples' deletion or duplication subtype (i.e. which DAZ family members were deleted or duplicated). The results are shown in Tables 2 and 3. Three different subtypes were identified among the 8 deletion samples: DAZ1/DAZ2, DAZ2/DAZ4 and DAZ3/DAZ4 deletions. The subtypes concluded for the duplication samples showed similar variability: DAZ1/DAZ2, DAZ2/DAZ4 and DAZ3/DAZ4 duplications could be distinguished among the 5 individuals inferred to possess six DAZ copies.

## Possible ways to support the conclusions

**Calculation of concordance.** Positions that carry class I, class II/a or class II/b markers are exploited to assign a rearrangement subtype to a sample. They make up the assignment set of SFV positions. As opposed, the information offered by SFVs not benefited in stage 2 or 3 analysis can be used to check the correctness of the concluded subtype. Those positions were either precluded because they contained no variant specific to a DAZ family member according to the reference genome (position 2481 in Fragment I and position 111 in Fragment II), or excluded upon marker classification since their specific variant was found to belong to class III (positions 1005 and 1053 in Fragment II). They can be utilized as the validation set of SFV positions (S10 Table). The variant ratio of an SFV position can fall into one of three categories. It may (1) unambiguously indicate the assigned subtype by itself; (2) behave neutrally, i.e. neither contradict nor unambiguously indicate the assigned subtype; (3) contradict the assigned subtype. Variant ratios belonging to the 1st or 2nd categories are considered to be concordant with the assignments.

The assignment set covered 12 positions. Out of 169 variant ratios (13 observations in each of 8 deletion and 5 duplication samples), 118 (69.82%) was kept at stage 3 analysis. Out of them, 55 (46.61%), 62 (52.54%) and 1 (0.85%) fell in the indicative, neutral and contradictory category, respectively. The validation set encompassed 4 positions. Out of the 52 observations, only 19 (36.54%) proved to be meaningful with respect to checking the rearrangement status. Out of them, 16 (84.21%), 3 (15.79) and 0 (0.00%) were indicative of, neutral to and contradictory to the assigned subtypes, respectively. The concordance for the assignment and validation sets is 99.15% (117/118) and 100.00% (19/19), respectively. Altogether, 137 out of 221 (61.99%) copy number data were kept for analysis. Out of the 137, 71 (51.82%), 65 (47.45%) and 1 (0.73%) proved to be indicative, neutral and contradictory, respectively. All but one (136, 99.27%) observations were found to be in accordance with the assigned subtypes (Tables 2 and 3).

**Comparison of the VRH of the deletion and duplication samples with the VRHs observed in the control panel.** In six out of eight deletion and four out of five duplication samples, the VRH we found could be explained by the deduced type of rearrangement without any discordance if one of the VRHs observed in the control panel was assumed to be the starting point of the rearrangement (S7 Table). In other words, there was at least one VRH identified in the control population whose rearrangement by the deduced deletion or duplication subtype would result in exactly the same VRH that we observed in the respective deletion or

duplication sample. It may mean that the vast majority of the sequence variations as well as their combinations typical of the Hungarian population in the regions corresponding to Fragments I and II are encompassed by our control panel in spite of the relatively low number of individuals it enrolled. The remaining two deletions and one duplication might have occurred on backgrounds with VRHs not represented by our control samples. Another possibility for their existence is that a gene conversion event took place after the deletion or duplication, which modified the VRH produced by the large rearrangement. For example, the VRH of sample Ydup\_01 can be explained by supposing that an initial DAZ3/DAZ4 duplication on a background with a VRH different at position 2481 from 3b (2:2 instead of 1:3) or at position 1964 from 3a/3 (1:3 instead of 1:1:2) was followed by a gene conversion in one DAZ3/DAZ4 pair, which involved the region extending at least from position 978 to position 2071 in Fragment II. Each one of the above-mentioned three variations was otherwise observed in the control panel.

## Discussion

### Keystone of the novel approach—Determination of the variant ratio at a series of SFV positions

Both aspects of this study, namely determining the AZFc partial deletion/duplication status and discriminating the various combinations of deleted or duplicated DAZ family members, are based on the knowledge of the variant ratio at a series of SFV positions. Variant ratios are established by semi-quantitative sequencing, a method that has successfully been used for determination of allele frequency in pooled DNA samples [32] as well as relative quantification of virus population size in mixed genotype infections, among others [33].

### Suitability of variant ratio analysis to identify partial deletion and partial duplication samples

Apart from STS analysis, the most frequently used methods for the identification of AZFc partial deletion and duplication include real-time quantitative PCR [18,34,35], FISH [36], dosage PCR [5,15,17,31,37] and dosage Southern blot [12,37] by determining the cumulative copy number of the DAZ and other gene families. FISH is thought to be reliable but quite laborious, as it requires the use of whole cells. In addition to being labor-intensive, too, dosage Southern blot can be impaired by either gene conversion or the presence of an unexpected SNP at any restriction site. Real-time or dosage PCR evaluation, at the same time, may be biased by either imbalanced amplification or intra-locus segmental copy number variations affecting the region chosen to be amplified. Concordant results of two quantitative PCR assays designed to distant regions of the DAZ genes may be necessary for the secure determination of the family's cumulative copy number [35]. Since variant ratio analysis utilizes the horizontal variant ratio distribution in order to determine the DAZ gene family's partial deletion or duplication status, conclusions are based on a series of data instead of one density/intensity or  $C_t$  reading. The requirement for high concordance between the findings derived from two distantly located long (>2 kb) fragments is expected to offer protection against the bias caused by the above-mentioned factors. All deletions identified by variant ratio analysis were confirmed by the lack of certain STS markers as well as the results of a widely accepted DAZ dosage test. The latter also confirmed all duplications found on the basis of the horizontal variant ratio distribution.

Grouping samples by the horizontal variant ratio distribution is based on partial rearrangement-induced changes in the ratio of the copy number of the DAZ family members, while dosage tests directly measure the cumulative copy number of the gene family. Both methods have some shortcomings with respect to revealing certain AZFc rearrangements. The horizontal

variant ratio distribution is unable to distinguish partial deletions from partial deletions followed by duplication, and it is also insensitive to identify samples with the entire AZFc region duplicated. At the same time, dosage tests cannot make distinction between unaffected samples and those that underwent partial deletion followed by duplication. For these reasons, variant ratio analysis is recommended to be complemented by a dosage test. The integration of the two methods makes it possible to differentiate all the above-mentioned structures. However, dividing samples into partial deletion, control and partial duplication groups for the purpose of subtyping should be made on the basis of the horizontal variant ratio distribution. Samples with partial deletion followed by duplication have four DAZ copies but they must undergo subtyping. At the same time, samples with the entire AZFc region duplicated possess eight DAZ genes but the 1:1:1:1 ratio of the four DAZ family members makes them eligible to be included in the control group. Nevertheless, based on the results of the dosage analysis, neither of these two rearrangement types was identified among our samples.

Although it is not typical, the results of several studies suggest the existence of deletions eliminating only one DAZ gene [3,38]. While the potential mechanisms that may result in such deletions are unknown, the possibility of their occurrence can't be excluded. In spite of the fact that we have not found any sample containing three DAZ genes, the method described in this paper is thought to be able to discriminate them from samples possessing two, four or six DAZ copies. As opposed to the horizontal variant ratio distribution, a dosage test is not expected to reliably discriminate three copies of a target region from four.

### Determination of the concrete applicability of family member-specific variants as markers

To distinguish the members of a gene family from one another would normally require the use of sequence elements that (i) are characteristic of the respective members and (ii) do not show inter-individual variation. Several studies utilized genetic traits supposed to fulfill the above requirements for the discrimination of the various DAZ deletion or duplication subtypes [3–5,12,38]. However, little information has been reported on the inter-individual variation regarding either the actual marker-carrying DAZ family members [see requirement c (S6 Table)] or the copy number [0, 1 or 2 (S8 File)] of the tested “family member-specific” features in a control population consisting of individuals who carry one copy of each member of the DAZ gene family [14]. Based on the ability of variant ratio analysis to sort out samples according to partial rearrangement status, we could easily construct a control panel suitable to tackle this task before subtyping partial deletion and partial duplication samples. The inter-individual variability found at the majority of the studied SFV positions among our controls makes the importance of weighting marker copy number data obvious in order to draw valid conclusions for the copy number of gene family members.

The analysis to identify the different DAZ deletion and duplication subtypes utilizes the knowledge of the copy number of the DAZ family member-specific variant(s) at several SFV positions as a starting point (S8 File). Candidate markers designated on the basis of the reference sequence are divided into four classes according to observations made in a set of control samples. The applicability of markers is then determined for each class severally. The restricted applicability is derived by the analysis of the separate markers (S1 and S2 Files), while the extended applicability is determined on the basis of their observed associations (S3 and S4 Files). Ideally, such a procedure would require the knowledge of the spectrum of actually operating gene conversions resulting in the deletion of a class II/b and/or the duplication of a class II/a marker within a population or haplogroup. In the lack of that knowledge, we can specify that spectrum on the basis of the observations made in the control group.

Stage 3 analysis uses the extended applicability for markers that take part in an association and the restricted applicability for all others. During the analysis of our samples, as opposed to a kind of traditional (i.e. stage 1) evaluation, stage 3 analysis proved to be appropriate to assign a highly probable rearrangement subtype to all samples found partially deleted or duplicated by the horizontal variant ratio distribution (S8 and S9 Tables).

### Looking for perfect concordance—Possible ways to support the correctness of the assigned subtypes

The concordance can be determined per sample for each potential rearrangement subtype. At stage 3, it is 100% for the assigned subtype in almost all cases. The only exception is Ydel\_07 with 92.86%. The concordance for any other subtype is typically lower than 30% in all deletion and duplication samples, but never exceeds 67%. Based on the concordance, it is possible to determine the likelihood of each rearrangement subtype in a sample. In the majority of samples, the likelihood of the assigned subtype is higher than 0.5, while that of the second most probable subtype is typically lower than 0.2. That substantial difference could be achieved due to the usage of the revised applicability of the studied markers.

The comparison of the VRH of a partial deletion or partial duplication sample with those that can theoretically be derived by the concluded type of rearrangement from the VRHs identified in the control panel is a further way to support the pertinence of the conclusion. A picturesque example for this is the case of samples Ydel\_09 and Ydel\_10. Their DAZ2/DAZ4 deletion subtype seemed to be unambiguous at stage 1 analysis. However, due to the non-informative nature of both the presence of the class II/a DAZ3-specific cluster and the absence of the class II/b DAZ4-specific markers, only the presence of DAZ1 and the absence of DAZ2 remained certain at stage 2. After that, these samples can theoretically have either DAZ2/DAZ4 or DAZ2/DAZ3 deletion. According to the association between A<sub>972</sub> and C<sub>1820</sub>, it could be supposed that the DAZ4-specific C<sub>1820</sub> was removed by something other than gene conversion. If DAZ4 is deleted, the DAZ3-specific cluster must be on DAZ3, in accordance with the association between the disappearance of the DAZ4-specific and the doubling of the DAZ3-specific markers on Fragment II. That is to say, the assigned deletion subtype at stage 3 was DAZ2/DAZ4 again. The VRH comparison indicates that there are two control VRHs whose rearrangement by DAZ2/DAZ4 deletion would result in the same series of variant ratios as that found in samples Ydel\_09 and Ydel\_10 (S11A Table). At the same time, there is no control VRH whose DAZ2/DAZ3 deletion would lead to the expected variant ratio series (S11B Table). These findings further confirm the propriety of DAZ2/DAZ4 deletion status concluded by stage 3 analysis for these samples.

In summary, the DAZ deletion/duplication subtype most consistent with the data provided by this method always seems to be the correct one.

### General considerations and possible extensions

The applicability of SFVs for the identification of deletions in the human Y chromosome has been challenged a decade ago [39]. It is obvious from previous efforts invested to make distinction among the various partial rearrangement types in AZFc that much caution is required to interpret the results obtained by the analysis of SFV positions. However, since we do not have other types of reliable markers in sufficient number, the information offered by SFV positions can be still very useful and is worthy trying to exploit to the best advantage. Several important aspects of the utilization of the information carried by SFVs must be emphasized here.

*First*, any improvement in the methodology that allows determining the variant ratio of an SFV position may add significantly to the success of subtyping AZFc partial rearrangements.



RFLP has been the most frequently used method for AZFc subtyping [5,15,17]. In the view of a family member-specific variant, gene conversion can take place in two directions: it either eliminates or duplicates the variant. Restriction digestion can detect the loss of a family member-specific variant, but is insensitive to its duplication. This may have a bias on the evaluation of deletion samples. In addition, it makes RFLP insufficient for subtyping of duplication samples, since no variant loss is expected in them. Nevertheless, if made quantitative, this technique could also be used for variant ratio analysis. Despite this potentiality, semi-quantitative sequencing seems to be more suitable for the rapid and accurate determination of several variant ratios simultaneously. Massively parallel sequencing of PCR amplified fragments may make automation of variant ratio determination possible as well by taking advantage of simply counting the reads that contain different variants at an SFV position, instead of AUC measurements of fluorescent signals. The per-base coverage required to ensure specific variant reads frequencies with standard deviation low enough to reliably reflect the different variant ratios at a studied position may approximate or even exceed 1000-fold. However, the ever-increasing yield and decreasing costs of an average sequencing run made that high coverage easily attainable.

*Second*, in the absence of the knowledge of the common SFV organizations in the Y chromosome genealogical branches [39], characterization of the conversion profiles of the tested family member-specific SFVs by using a well-defined, extensive control panel seems obligatory [14]. We would like to underline that it must be done in each population studied, separately. The  $p_1$  and  $p_2$  values and the association pattern of the tested variants must preferably be re-evaluated after the examination of a new set of samples by summarizing all available data. Revealing the associations, which may be different from population to population, is of utmost importance for the success of subtyping. Alternatively, it is also possible to classify the studied variants in samples belonging to defined Y haplogroups. In that case, their haplogroup-restricted applicability could be used when analyzing haplogroup-typed samples. Some markers are expected to advance one class, or perhaps even two, when used within a given haplogroup. The larger the number of the higher class markers, the more unambiguous the outcome of the evaluation. Variant ratio analysis is suitable for the easy selection of control individuals carrying the four DAZ family members in a 1:1:1:1 ratio. To our knowledge, no method used so far for subtyping in AZFc region is suitable for marker classification.

*Third*, an important element of the presented method is the concordance of data obtained in the analysis of an individual. The more extensive is the concordance, the more likely the conclusion is correct. It is possible to expand the method by the inclusion of further SFV positions scattered along the entire length of the DAZ genes. We could identify three further long fragments, each containing several variants specific to different DAZ family members based on the reference sequence. The short amplicons that carry the well-known SNV sites (SNV I-VII) can also be involved into the analysis. Altogether, such a set of SFVs probably contains a number of variants large enough to ensure highly probable conclusions after marker classification and the establishment of the relationship between marker copy numbers and gene family member copy numbers. Since the SNVs have already been used in several populations, it can be supposed that the majority of the variants selected on the basis of the reference sequence are also eligible for analysis in samples which belong to Y haplogroups that are not close to the refseq. To test this hypothesis, we carried out a haplogroup analysis in our partial deletion and partial duplication samples [40–41]. The results show that the 13 rearranged samples are split into four haplogroups or haplogroup clusters (S7 Table). The VRHs of the samples are in keeping with the identified haplogroups.

*Fourth*, the analysis can be extended to other gene families of AZFc to discriminate all combinations of deleted or duplicated family members [22]. Although the other seven AZFc gene

families all have members with identical coding sequence, their regulation might differ. Most of them contain some intronic, upstream or downstream SFV positions that may make their differentiation possible. The rapid increase in the capacity of massively parallel sequencing has brought about the opportunity to evaluate several gene families in a large number of individuals with appropriate coverage in one sequencing run. By the preparation of a suitable evaluation script, the rearrangement subtypes can be obtained quickly and easily from next-generation sequencing (NGS) data. The ability to make clear distinction among the various combinations of deleted or duplicated family members will make it possible to conduct association studies to clarify their role in infertility and TGCTs. Another potential outcome of such studies can be the enrichment of certain VRHs within a deletion or duplication subtype, or even in unaffected samples, in the disease group compared to healthy individuals.

The novel approach described in this paper is thought to be able to eliminate some of the methodological bias that possibly affected the results of several subtyping studies carried out so far. By drawing an accurate picture of the studied SFV positions, the application of variant ratio analysis can be expected to contribute to the final settlement of the controversy regarding the role of this rearrangement-prone region in diseases.

This work is meant to be a proof-of-principle study that shows how it is possible to make distinction among the DAZ deletion and duplication subtypes with very high sensitivity by using a single, integrated approach. Based on the described principles, it is possible to develop an NGS-based method that would be easily applicable for rapid routine screening in clinical settings.

## Supporting Information

**S1 Fig. The base composition of the studied SFV positions in Fragments I and II.** The base composition of the studied SFV positions as *expected* on the basis of the human reference assembly (hg18) (**upper part**). The cumulative length of the two amplified fragments is almost 5 kb. The four DAZ genes differ from one another at only several positions in these regions. The base residing in only one member at a given position is called the family member-specific variant. The base carried by the other three family members at the corresponding position is the non-specific variant. The ratio of the specific to the non-specific variant is expected to be 1:3 in unaffected samples. Supposing pairwise deletion and duplication, the ratio of the specific variant in deletion samples would be 1:1 (if two DAZ family members containing the non-specific variant are deleted) or 0:2 (if the member carrying the specific variant is deleted along with another one). A duplication event can modify the variant ratio to 1:5 (if two DAZ family members containing the non-specific variant are duplicated) or 2:4 (if the member carrying the specific variant is duplicated along with another one).

The base composition of the studied SFV positions as *found* on the basis of sequencing the members of the control panel (**lower part**). Contrasting the expectations, more than one typical electropherogram pictures were identified at the majority of the studied SFV positions. Only three positions (1209, 1702 and 1926, all in Fragment I) behaved identically in all 39 samples. The one letter codes of the relevant bases are shown above the electropherogram pictures. Variant ratios were assigned at each position on the basis of AUC ratio clusters in the knowledge of the AZFc partial deletion/duplication status and/or the AUC ratio-variant ratio relationship determined using appropriate control mixtures. Positions 1053, 1646 and 1961 in Fragment II are not shown due to lack of space.  
(TIF)

**S2 Fig. Study of six STS markers using two multiplex PCR assays.** sY1258, sY1201, sY1291, sY1191, sY1197 and sY1206: STS markers. Ydel\_##: deletion sample identifier. Lane 1–4 and 6–8: deletion samples; lane 5 and 9–11: members of the control panel containing all four

members of the DAZ gene family; lane 12: ladder; lane 13–16: control STS markers. The images indicate the existence of three different rearrangement types. Seven out of the eight deletion samples found in the experiment are included in the gel. None of the tested STS markers was missing in any control or duplication sample included in the study.

(TIF)

**S1 File. Relationship between the copy numbers of a class II/a DAZ3-specific marker and the copy numbers of the DAZ3 gene in deletion and duplication samples, respectively.**

(PDF)

**S2 File. Relationship between the copy numbers of a class II/b DAZ1-specific marker and the copy numbers of the DAZ1 gene in deletion and duplication samples, respectively.**

(PDF)

**S3 File. Relationship between the copy numbers of the associated class II/b DAZ1-specific  $A_{972}$  and class II/b DAZ4-specific  $C_{1820}$  markers and the copy numbers of the DAZ1 and DAZ4 genes in deletion and duplication samples, respectively.**

(PDF)

**S4 File. Relationship between the copy numbers of the associated class II/a DAZ3-specific and class II/b DAZ4-specific markers located in Fragment II and the copy numbers of the DAZ3 and DAZ4 genes in deletion and duplication samples, respectively.**

(PDF)

**S5 File. Alignment of the four amplicons constituting Fragment I.** The sequences of the amplicons constituting Fragment I, which were derived from the hg18 reference sequence of the four DAZ genes, respectively, were aligned by Multalin sequence alignment tool. The Y chromosomal coordinates are seen at the beginning of the rows. DAZ1 and DAZ3 are designated by a “-” sign between the coordinates, while DAZ2 and DAZ4 with a “+” sign, according to the coding strand. The bases located in an SFV position are shown in blue. The family members from above are the following: DAZ1, DAZ2, DAZ3 and DAZ4.

(GIF)

**S6 File. Alignment of the four amplicons constituting Fragment II.** The sequences of the amplicons constituting Fragment II, which were derived from the hg18 reference sequence of the four DAZ genes, respectively, were aligned by Multalin sequence alignment tool. The Y chromosomal coordinates are seen at the beginning of the rows. DAZ1 and DAZ3 are designated by a “-” sign between the coordinates, while DAZ2 and DAZ4 with a “+” sign, according to the coding strand. The bases located in an SFV position are shown in blue. The family members from above are the following: DAZ1, DAZ2, DAZ4 and DAZ3.

(GIF)

**S7 File. UCSC Custom Tracks design to visualize the SFVs utilized in this study.** The Fragments track indicates the location of Fragments I and II in the four DAZ family members, respectively. The DAZ SFVs track shows the DAZ family member-specific and non-specific variants utilized in this study. Variants presented in red and blue are specific and non-specific for the DAZ family member displayed in the browser, respectively. For non-specific variants, a digit in square brackets indicates the DAZ family member for which the corresponding SFV position contains a specific variant. The often-used DAZ SNVs are also shown. Switching between DAZ family members is possible by entering the gene symbol in the Genome Browser window then clicking “go”.

(TXT)

**S8 File. Explanations for the difference between the restricted and extended applicability of markers and the advantages of stage 2 and 3 analysis over stage 1.**

(PDF)

**S1 Table. Attributes of the SFV positions covered by Fragment I based on the human reference genome NCBI36/hg18.**

(PDF)

**S2 Table. Attributes of the SFV positions covered by Fragment II based on the human reference genome NCBI36/hg18.**

(PDF)

**S3 Table. Primers used for the amplification and sequencing of Fragments I and II.**

(PDF)

**S4 Table. Composition of the control plasmid DNA mixtures.**

(PDF)

**S5 Table. Relationship between variant ratios and AUC ratios at two SFV positions in control DNA mixtures.**

(PDF)

**S6 Table. Association status of variants considered specific to the four DAZ family members, respectively, in four samples bearing three different VRHs.**

(PDF)

**S7 Table. Control variant ratio haplotypes (VRHs) supposed to underlie the identified rearrangements.**

(PDF)

**S8 Table. Comparison of stage 1, stage 2 and stage 3 analyses of partial deletion samples.**

(PDF)

**S9 Table. Comparison of stage 1, stage 2 and stage 3 analyses of partial duplication samples.**

(PDF)

**S10 Table. Variant ratios concordant with the possible rearrangement subtypes at SFV positions not utilized for stage 2 and 3 analyses.**

(PDF)

**S11 Table. Comparison of an actual deletion VRH with those theoretically produced by DAZ2/DAZ4 or DAZ2/DAZ3 deletions from all control VRHs, respectively.**

(PDF)

## Author Contributions

**Conceptualization:** TV JP EO.

**Data curation:** TV.

**Formal analysis:** TV JP EC CK LG.

**Funding acquisition:** EO CK.

**Investigation:** TV JP EC.

**Methodology:** TV JP EC CK LG.

**Project administration:** TV.

**Resources:** EO CK LG.

**Supervision:** EO CK.

**Validation:** TV JP EC CK.

**Visualization:** TV JP.

**Writing – original draft:** TV.

**Writing – review & editing:** TV JP EC CK EO LG.

## References

1. Skaletsky H, Kuroda-Kawaguchi T, Minx PJ, Cordum HS, Hillier L, Brown LG, et al. The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature*. 2003; 423:825–37. doi: [10.1038/nature01722](https://doi.org/10.1038/nature01722) PMID: [12815422](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12815422/)
2. Kuroda-Kawaguchi T, Skaletsky H, Brown LG, Minx PJ, Cordum HS, Waterston RH, et al. The AZFc region of the Y chromosome features massive palindromes and uniform recurrent deletions in infertile men. *Nat Genet*. 2001; 29:279–86. doi: [10.1038/ng757](https://doi.org/10.1038/ng757) PMID: [11687796](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11687796/)
3. Fernandes S, Huellen K, Goncalves J, Dukal H, Zeisler J, Rajpert De Meyts E, et al. High frequency of DAZ1/DAZ2 gene deletions in patients with severe oligozoospermia. *Mol Hum Reprod*. 2002; 8:286–98. doi: [10.1093/molehr/8.3.286](https://doi.org/10.1093/molehr/8.3.286) PMID: [11870237](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11870237/)
4. Fernandes S, Paracchini S, Meyer LH, Florida G, Tyler-Smith C, Vogt PH. A large AZFc deletion removes DAZ3/DAZ4 and nearby genes from men in Y haplogroup N. *Am J Hum Genet*. 2004; 74:180–7. doi: [10.1086/381132](https://doi.org/10.1086/381132) PMID: [14639527](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14639527/)
5. Machev N, Saut N, Longepied G, Terriou P, Navarro A, Levy N, et al. Sequence family variant loss from the AZFc interval of the human Y chromosome, but not gene copy loss, is strongly associated with male infertility. *J Med Genet*. 2004; 41:814–25. doi: [10.1136/jmg.2004.022111](https://doi.org/10.1136/jmg.2004.022111) PMID: [15520406](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15520406/)
6. 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*. 2013; 2:5–19. doi: [10.1111/j.2047-2927.2013.00173.x](https://doi.org/10.1111/j.2047-2927.2013.00173.x) PMID: [24357628](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24357628/)
7. Repping S, Skaletsky H, Brown L, van Daalen SK, Korver CM, Pyntikova T, et al. Polymorphism for a 1.6-Mb deletion of the human Y chromosome persists through balance between recurrent mutation and haploid selection. *Nat Genet*. 2003; 35:247–51. doi: [10.1038/ng1250](https://doi.org/10.1038/ng1250) PMID: [14528305](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14528305/)
8. Ferlin A, Tessari A, Ganz F, Marchina E, Barlati S, Garolla A, et al. Association of partial AZFc region deletions with spermatogenic impairment and male infertility. *J Med Genet*. 2005; 42:209–13. doi: [10.1136/jmg.2004.025833](https://doi.org/10.1136/jmg.2004.025833) PMID: [15744033](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15744033/)
9. Lynch M, Cram DS, Reilly A, O'Bryan MK, Baker HW, de Kretser DM, et al. The Y chromosome gr/gr subdeletion is associated with male infertility. *Mol Hum Reprod*. 2005; 11:507–12. doi: [10.1093/molehr/gah191](https://doi.org/10.1093/molehr/gah191) PMID: [16123079](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16123079/)
10. Zhang F, Li Z, Wen B, Jiang J, Shao M, Zhao Y, et al. A frequent partial AZFc deletion does not render an increased risk of spermatogenic impairment in East Asians. *Ann Hum Genet*. 2006; 70:304–13. doi: [10.1111/j.1529-8817.2005.00231.x](https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2005.00231.x) PMID: [16674553](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16674553/)
11. Zhang F, Lu C, Li Z, Xie P, Xia Y, Zhu X, et al. Partial deletions are associated with an increased risk of complete deletion in AZFc: a new insight into the role of partial AZFc deletions in male infertility. *J Med Genet*. 2007; 44:437–44. doi: [10.1136/jmg.2007.049056](https://doi.org/10.1136/jmg.2007.049056) PMID: [17412880](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17412880/)
12. Lin YW, Hsu LC, Kuo PL, Huang WJ, Chiang HS, Yeh SD, et al. Partial duplication at AZFc on the Y chromosome is a risk factor for impaired spermatogenesis in Han Chinese in Taiwan. *Hum Mutat*. 2007; 28:486–94. doi: [10.1002/humu.20473](https://doi.org/10.1002/humu.20473) PMID: [17285591](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17285591/)
13. Lardone MC, Parodi DA, Ebensperger M, Peñaloza P, Cornejo V, Valdevenito R, et al. AZFc partial deletions in Chilean men with severe spermatogenic failure. *Fertil Steril*. 2007; 88:1318–26. doi: [10.1016/j.fertnstert.2007.01.038](https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.01.038) PMID: [17416365](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17416365/)
14. Navarro-Costa P, Pereira L, Alves C, Gusmão L, Proença C, Marques-Vidal P, et al. Characterizing partial AZFc deletions of the Y chromosome with amplicon-specific sequence markers. *BMC Genomics*. 2007; 8:342. doi: [10.1186/1471-2164-8-342](https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-342) PMID: [17903263](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17903263/)

15. Giachini C, Laface I, Guarducci E, Balercia G, Forti G, Krausz C. Partial AZFc deletions and duplications: clinical correlates in the Italian population. *Hum Genet.* 2008; 124:399–410. doi: [10.1007/s00439-008-0561-1](https://doi.org/10.1007/s00439-008-0561-1) PMID: [18807255](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18807255/)
16. Stouffs K, Tournaye H, Van der Elst J, Haentjens P, Liebaers I, Lissens W. Do we need to search for gr/gr deletions in infertile men in a clinical setting? *Hum Reprod.* 2008; 23:1193–9. doi: [10.1093/humrep/den069](https://doi.org/10.1093/humrep/den069) PMID: [18326516](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18326516/)
17. Krausz C, Giachini C, Xue Y, O'Bryan MK, Gromoll J, Rajpert-de Meyts E; et al. Phenotypic variation within European carriers of the Y-chromosomal gr/gr deletion is independent of Y-chromosomal background. *J Med Genet.* 2009; 46:21–31. doi: [10.1136/jmg.2008.059915](https://doi.org/10.1136/jmg.2008.059915) PMID: [18782837](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18782837/)
18. Noordam MJ, Westerveld GH, Hovingh SE, van Daalen SK, Korver CM, van der Veen F, et al. Gene copy number reduction in the azoospermia factor c (AZFc) region and its effect on total motile sperm count. *Hum Mol Genet.* 2011; 20:2457–63. doi: [10.1093/hmg/ddr119](https://doi.org/10.1093/hmg/ddr119) PMID: [21429917](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21429917/)
19. Navarro-Costa P, Gonçalves J, Plancha CE. The AZFc region of the Y chromosome: at the crossroads between genetic diversity and male infertility. *Hum Reprod Update.* 2010; 16:525–42. doi: [10.1093/humupd/dmq005](https://doi.org/10.1093/humupd/dmq005) PMID: [20304777](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20304777/)
20. Stouffs K, Lissens W, Tournaye H, Haentjens P. What about gr/gr deletions and male infertility? Systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update.* 2011; 17:197–209. doi: [10.1093/humupd/dmq046](https://doi.org/10.1093/humupd/dmq046) PMID: [20959348](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20959348/)
21. Rozen SG, Marszalek JD, Irenze K, Skaletsky H, Brown LG, Oates RD, et al. AZFc deletions and spermatogenic failure: a population-based survey of 20,000 Y chromosomes. *Am J Hum Genet.* 2012; 91:890–6. doi: [10.1016/j.ajhg.2012.09.003](https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2012.09.003) PMID: [23103232](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23103232/)
22. Yang Y, Ma M, Li L, Su D, Chen P, Ma Y, et al. Differential effect of specific gr/gr deletion subtypes on spermatogenesis in the Chinese Han population. *Int J Androl.* 2012; 33:745–54. doi: [10.1111/j.1365-2605.2009.01015.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2009.01015.x) PMID: [20039973](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20039973/)
23. Sin HS, Koh E, Shigehara K, Sugimoto K, Maeda Y, Yoshida A, et al. Features of constitutive gr/gr deletion in a Japanese population. *Hum Reprod.* 2010; 25:2396–403. doi: [10.1093/humrep/deq191](https://doi.org/10.1093/humrep/deq191) PMID: [20663794](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20663794/)
24. Lo Giacco D, Chianese C, Sánchez-Curbelo J, Bassas L, Ruiz P, Rajmil O, et al. Clinical relevance of Y-linked CNV screening in male infertility: new insights based on the 8-year experience of a diagnostic genetic laboratory. *Eur J Hum Genet.* 2014; 22:754–61. doi: [10.1038/ejhg.2013.253](https://doi.org/10.1038/ejhg.2013.253) PMID: [24193344](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24193344/)
25. Nathanson KL, Kanetsky PA, Hawes R, Vaughn DJ, Letrero R, Tucker K, et al. The Y deletion gr/gr and susceptibility to testicular germ cell tumor. *Am J Hum Genet.* 2005; 77:1034–43. doi: [10.1086/498455](https://doi.org/10.1086/498455) PMID: [16380914](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16380914/)
26. Saxena R, de Vries JW, Repping S, Alagappan RK, Skaletsky H, Brown LG, et al. Four DAZ genes in two clusters found in the AZFc region of the human Y chromosome. *Genomics.* 2000; 67:256–67. doi: [10.1006/geno.2000.6260](https://doi.org/10.1006/geno.2000.6260) PMID: [10936047](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10936047/)
27. Rozen S, Skaletsky H, Marszalek JD, Minx PJ, Cordum HS, Waterston RH, et al. Abundant gene conversion between arms of palindromes in human and ape Y chromosomes. *Nature.* 2003; 423:873–6. doi: [10.1038/nature01723](https://doi.org/10.1038/nature01723) PMID: [12815433](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12815433/)
28. Lepretre AC, Patrat C, Mitchell M, Jouannet P, Bienvenu T. No partial DAZ deletions but frequent gene conversion events on the Y chromosome of fertile men. *J Assist Reprod Genet.* 2005; 22:141–8. doi: [10.1007/s10815-005-4910-x](https://doi.org/10.1007/s10815-005-4910-x) PMID: [16021857](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16021857/)
29. Corpet F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucl Acids Res.* 1988; 16:10881–90. doi: [10.1093/nar/16.22.10881](https://doi.org/10.1093/nar/16.22.10881) PMID: [2849754](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2849754/)
30. Abramoff MD, Magelhaes PJ, Ram SJ. Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International.* 2004; 11:36–42.
31. Giachini C, Guarducci E, Longepied G, Degl'Innocenti S, Becherini L, Forti G et al. The gr/gr deletion (s): a new genetic test in male infertility? *J Med Genet.* 2005; 42:497–502. doi: [10.1136/jmg.2004.028191](https://doi.org/10.1136/jmg.2004.028191) PMID: [15937085](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15937085/)
32. Wilkening S, Hemminki K, Thirumaran RK, Bermejo JL, Bonn S, Försti A, et al. Determination of allele frequency in pooled DNA: comparison of three PCR-based methods. *Biotechniques.* 2005; 39:853–8. doi: [10.2144/000112027](https://doi.org/10.2144/000112027) PMID: [16382903](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16382903/)
33. Hall GS, Little DP. Relative quantitation of virus population size in mixed genotype infections using sequencing chromatograms. *J Virol Methods.* 2007; 146:22–8. doi: [10.1016/j.jviromet.2007.05.029](https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2007.05.029) PMID: [17640742](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17640742/)
34. Premi S, Srivastava J, Chandy SP, Ali S. AZFc somatic microdeletions and copy number polymorphism of the DAZ genes in human males exposed to natural background radiation. *Hum Genet.* 2007; 121:337–46. doi: [10.1007/s00439-006-0318-7](https://doi.org/10.1007/s00439-006-0318-7) PMID: [17308897](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17308897/)

35. Rozé V, Bresson JL, Fellmann F. Quantitative PCR technique for the identification of microrearrangements of the AZFc region. *J Assist Reprod Genet.* 2007; 24:241–8. doi: [10.1007/s10815-006-9055-z](https://doi.org/10.1007/s10815-006-9055-z) PMID: [17410421](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17410421/)
36. Repping S, de Vries JW, van Daalen SK, Korver CM, Leschot NJ, van der Veen F, et al. The use of sperm HALO-FISH to determine DAZ gene copy number. *Mol Hum Reprod.* 2003; 9:183–8. doi: [10.1093/molehr/gag032](https://doi.org/10.1093/molehr/gag032) PMID: [12651899](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12651899/)
37. Lin YW, Hsu CL, Yen PH. A two-step protocol for the detection of rearrangements at the AZFc region on the human Y chromosome. *Mol Hum Reprod.* 2003; 12:347–51. doi: [10.1093/molehr/gal038](https://doi.org/10.1093/molehr/gal038) PMID: [16608905](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16608905/)
38. D'Amico GL, Di Benedetto D, Pezzino FM, Giuffrida V, Libra M, Fichera M, et al. Quantitative evaluation of partial deletions of the DAZ gene cluster. *Int J Mol Med.* 2006; 17:785–9. doi: [10.3892/ijmm.17.5.785](https://doi.org/10.3892/ijmm.17.5.785) PMID: [16596261](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16596261/)
39. Repping S, Korver CM, Oates RD, Silber S, van der Veen F, Page DC, et al. Are sequence family variants useful for identifying deletions in the human Y chromosome? *Am J Hum Genet.* 2004; 75:514–7; author reply 517–9. doi: [10.1086/423394](https://doi.org/10.1086/423394) PMID: [15284951](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15284951/)
40. Paracchini S, Arredi B, Chalk R, Tyler-Smith C. Hierarchical high-throughput SNP genotyping of the human Y chromosome using MALDI-TOF mass spectrometry. *Nucleic Acids Res.* 2002; 30:e27. doi: [10.1093/nar/30.6.e27](https://doi.org/10.1093/nar/30.6.e27) PMID: [11884646](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11884646/)
41. Xue Y, Zerjal T, Bao W, Zhu S, Shu Q, Xu J, et al. Male demography in East Asia: a north-south contrast in human population expansion times. *Genetics.* 2006; 172:2431–9. doi: [10.1534/genetics.105.054270](https://doi.org/10.1534/genetics.105.054270) PMID: [16489223](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16489223/)