



# UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI CATANIA

Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale  
Dottorato di Ricerca Internazionale in “Medicina Sperimentale Clinica e  
Fisiopatologia Cellulare” – XXVI ciclo  
(Coordinatore: Prof. Enzo S. Vicari)

Tesi di Dottorato

## **Sinergia d'azione dei polimorfismi dei geni *FSHR* ed *FSHB* sui livelli ormonali nell'uomo**

**Dott.ssa Lucia Tamburino**

**Tutor**

**Prof. Aldo E. Calogero**

**Coordinatore**

**Chiar.mo Prof. Enzo S. Vicari**

Anno Accademico 2013/2014

# INDICE

<b>1. INTRODUZIONE</b> .....	Pag. 2
1.1 Infertilità.....	Pag. 2
1.2 Cause genetiche.....	Pag. 3
1.3 Polimorfismi.....	Pag. 5
1.4 Spermatogenesi.....	Pag. 6
1.5 Ormone follicolo-stimolante.....	Pag. 8
1.6 Gene <i>FSHR</i> .....	Pag. 9
1.7 Gene <i>FSHB</i> .....	Pag. 11
1.8 Scopo della tesi.....	Pag. 13
<b>2. MATERIALI E METODI</b> .....	Pag. 14
2.1 Pazienti.....	Pag. 14
2.2 Analisi genetiche.....	Pag. 14
2.3 Ormoni della riproduzione e parametri spermatici.....	Pag. 16
2.4 Analisi statistica.....	Pag. 16
<b>3. RISULTATI</b> .....	Pag. 18
3.1 Gene <i>FSHR</i> .....	Pag. 18
3.1.1 Polimorfismo -29G/A.....	Pag. 18
3.1.2 Polimorfismo A2039G.....	Pag. 20
3.2 Gene <i>FSHB</i> .....	Pag. 22
3.2.1 Polimorfismo -211G/T.....	Pag. 22
3.3 Combinazione dei polimorfismi dei geni <i>FSHR</i> ed <i>FSHB</i> .....	Pag. 25
<b>4. DISCUSSIONE</b> .....	Pag. 26
<b>5. CONCLUSIONI</b> .....	Pag. 31
<b>6. BIBLIOGRAFIA</b> .....	Pag. 32

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 INFERTILITA'

L'infertilità, definita come fallimento al concepimento di una coppia dopo almeno 12 mesi di rapporti regolari non protetti (WHO, 2010), rappresenta un problema di salute sociale dal momento che, secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità, circa il 15% delle coppie in età fertile nei paesi occidentali ne è affetta. In circa il 30% delle coppie infertili si riconosce un fattore maschile, nel 35% dei casi un fattore femminile, nel 20% dei casi entrambi i fattori ed infine nel 15% delle coppie l'eziologia rimane sconosciuta. I fattori noti responsabili dell'infertilità maschile sono: varicocele, infezioni, ipogonadismo endocrino, criptorchidismo, disfunzioni erettili-eiaculatore, anticorpi antispermatozoi, ostruzioni delle vie seminali e cause genetiche.

Tra le forme di infertilità maschile la più grave è l'azoospermia che consiste nell'assenza di spermatozoi nel liquido seminale. Essa è responsabile di infertilità maschile nel 10-15% dei casi. Altre forme di infertilità maschile hanno le seguenti basi seminologiche:

- Oligozoospermia: concentrazione di spermatozoi <15 mil/ml;
- Astenozoospermia: percentuale di spermatozoi con motilità progressiva <32%;
- Teratozoospermia: percentuale di spermatozoi con forme normali <4%.

## 1.2 CAUSE GENETICHE

Le cause genetiche dell'infertilità maschile includono sia anomalie cromosomiche che mutazioni geniche. Le alterazioni cromosomiche riguardano sia il numero che la struttura dei cromosomi e le anomalie nei pazienti con azoospermia coinvolgono principalmente i cromosomi sessuali, mentre nei pazienti con oligozoospermia predominano le anomalie cromosomiche degli autosomi (Mau-Holzmann et al., 2005). Tra le anomalie cromosomiche di particolare rilievo è la sindrome di Klinefelter, caratterizzata da un cromosoma X in eccesso (47,XXY). Essa rappresenta la causa più frequente di ipogonadismo ipergonadotropo, e la sua incidenza è elevata, 1 ogni 500 soggetti di sesso maschile nati vivi. I principali sintomi clinici sono atrofia bilaterale dei testicoli, aumentati di consistenza, in soggetti azoospermici o con severa oligozoospermia. Sono possibili mosaicismi XY/XXY e XX/XXY che presentano quadri fenotipici più sfumati.

Analoga per alcuni aspetti alla sindrome di Klinefelter, ma molto più rara e di eziopatogenesi diversa, è la condizione del maschio XX. Si tratta di una discordanza tra sesso fenotipico, che è maschile, e quello genotipico, che è femminile (46, XX) ed ha una incidenza dello 0,9 %. Questa sindrome è legata ad una traslocazione su un cromosoma X della sequenza dei geni responsabili del differenziamento gonadico maschile (SRY). Come i portatori della sindrome di Klinefelter, anche questi pazienti presentano ipotrofia testicolare ed azoospermia.

La sindrome del doppio cromosoma Y (47,XYY), ha una frequenza più elevata di circa 4 volte negli uomini infertili che nei fertili (0,1-0,3% versus 0,05%) e presenta un grado molto variabile di compromissione della fertilità, poiché esistono individui con due

cromosomi Y che producono un numero normale di spermatozoi e che hanno generato figli.

Altre anomalie cromosomiche sono: traslocazioni ed inversioni bilanciate degli autosomi, che sono privi di effetti sul fenotipo sui portatori ma che si manifestano con un'oligozoospermia resistente alle terapie e attraverso la ricorrenza di aborti spontanei nella partner. Il meccanismo d'azione chiama in causa l'aumentata produzione di spermatozoi aneuploidi che avviene nel processo meiotico per irregolare segregazione dei cromosomi coinvolti dalla traslocazione. Le traslocazioni hanno un'incidenza dell'1-2 per mille nella popolazione generale, mentre nella popolazione maschile infertile la frequenza di traslocazioni Robertsoniane è di circa lo 0,8%. Particolarmente frequente è la traslocazione Robertsoniana tra i cromosomi 13 e 14. Fra le anomalie strutturali, particolarmente importanti sono le microdelezioni di Yq, che rappresentano una delle cause genetiche più frequenti dell'infertilità maschile (8% nei pazienti con azoospermia e 3-5% nei pazienti con oligozoospermia grave) (Ferlin et al., 2007; Simoni et al., 2008). Tra i geni più importanti la cui alterazione contribuisce a ridurre la fertilità di coppia, vi sono: il gene *CFTR* (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), le cui mutazioni causano la fibrosi cistica e l'assenza dei vasi deferenti, il gene *AR* (androgen receptor), le cui mutazioni provocano la sindrome di insensibilità agli androgeni e danni alla corretta spermatogenesi, i geni *INSL3-LGR8*, le cui mutazioni sono state associate ad un'anomala discesa testicolare (criptorchidismo), il gene *KALI* (Kallmann Syndrome), il gene *LH* (lutening hormone), il gene *FSHB* (follicle stimulating hormone  $\beta$  subunit) ed i geni per recettori *FSHR* e *LHR*.

### 1.3 POLIMORFISMI

I polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs) sono variazioni in una singola base nella sequenza del DNA presenti in almeno l'1% della popolazione e differiscono dalle mutazioni geniche per la loro frequenza nella popolazione. Sono le varianti genetiche più comuni nell'intero genoma umano e per questo sono quindi utilizzati molto frequentemente nelle mappe degli studi di associazione (GWAS). Gli studi di associazione più diffusi sono quelli casi-controllo, in cui avviene il confronto tra le frequenze alleliche dei polimorfismi genetici all'interno del genoma di soggetti affetti da patologia e soggetti sani di controllo (Manolio et al., 2006)

Molti polimorfismi sono specifici per ogni popolazione, pertanto nel 2002 è stato creato l' "International HapMap project" per garantire alla ricerca genetica un database di informazioni utili. Il progetto "HapMap" crea delle mappe attraverso l'inserimento di tutte le varianti genetiche dividendole per gruppi di popolazione provenienti da diverse regioni etniche. I database dell' "HapMap" sono diventati quindi un'efficace strumento per effettuare studi di associazione genome-wide su larga scala. Infatti, la diminuzione dei costi e l'incremento della densità dei polimorfismi nei pannelli di genotipizzazione permette di analizzare l'intero genoma per lo studio di patologie complesse, sostituendo tale approccio a quello comunemente utilizzato dell'analisi di un gene candidato. La possibilità di associare le varianti genetiche presenti sull'intero genoma con ben specifiche caratteristiche fenotipiche risulta utilissimo nello studio delle malattie complesse (International HapMap Consortium). Un altro strumento utilissimo per gli studi di associazione è il National Center for Biotechnology Information (NCBI) SNPs database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) in cui gli SNP sono registrati con una specifica nomenclatura.

I polimorfismi sono considerati potenziali fattori di rischio che contribuiscono al malfunzionamento del processo spermatogenetico. Diverse varianti polimorfiche a singolo nucleotide sono state descritte in associazione con l'infertilità maschile (Aston et al., 2009). Nonostante questo, tali studi non riportano risultati interpretabili in maniera univoca. Questo è dovuto a numerosi aspetti: la composizione e la grandezza del campione preso in esame, il tipo di polimorfismo analizzato e le tecniche utilizzate, le differenti condizioni che influenzano lo sviluppo del fenotipo infertile, gli effetti delle cause a livello testicolare in relazione alla variabilità di risposta tra individui e le differenze etniche e geografiche che contribuiscono alle variazioni genetiche. Dal momento che, come detto prima, le conseguenze fenotipiche del polimorfismo genetico sono influenzate sia da fattori genetici che ambientali, il polimorfismo genetico può provocare errori nella spermatogenesi o alterazioni delle funzioni testicolari, solo quando è associato ad uno specifico background genetico-ambientale.

#### **1.4 SPERMATOGENESI**

La spermatogenesi è la sequenza di eventi cellulari attraverso cui le cellule staminali localizzate nell'epitelio seminifero si dividono e si differenziano sino alla formazione di spermatozoi maturi che vengono rilasciati nel lume del tubulo seminifero. Il processo comprende tre fasi: 1) proliferazione mitotica, che coinvolge gli spermatogoni, con la quale si garantisce la continua disponibilità di cellule indifferenziate per le tappe successive della spermatogenesi e si avvia il processo differenziativo che consiste nella produzione di diversi tipi di spermatogoni 2) fase meiotica, effettuata dagli spermatociti, che consiste nella ripartizione del genoma in cellule aploidi (spermatidi) e durante la quale avvengono i processi collegati con il crossing-over 3) spermiogenesi che è la parte

finale della spermatogenesi e comprende i cambiamenti morfologici che portano dallo spermatide allo spermatozoo maturo.

Questo processo che porta dalla cellula progenitrice allo spermatozoo, è finemente regolato da fattori ormonali prodotti a livello ipotalamo-ipofisario ed a livello testicolare. Le gonadotropine prodotte dall'ipofisi anteriore in risposta al releasing-hormone ipotalamico sono indispensabili per la realizzazione della spermatogenesi. L'ormone follicolo-stimolante (FSH), e l'ormone luteinizzante (LH) sono ormoni glicoproteici prodotti dall' ipofisi anteriore che agiscono direttamente sul testicolo e contribuiscono all'induzione ed al mantenimento della spermatogenesi. Nell'uomo i recettori di FSH sono sulle cellule del Sertoli , i recettori di LH sono sia a livello delle cellule di Leydig che nelle cellule spermatogenetiche. Anche il testosterone, prodotto dalle cellule interstiziali di Leydig, riveste un ruolo essenziale nel mantenimento della spermatogenesi durante la fase postpuberale e nell'età adulta.

## **1.5 ORMONE FOLLICOLO-STIMOLANTE**

L'ormone follicolo-stimolante (FSH) è un ormone glicoproteico prodotto e secreto dall'ipofisi anteriore e agisce nell'uomo lungo l'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi per la proliferazione delle cellule del Sertoli ed il mantenimento di una normale produzione spermatica dal punto di vista quantitativo e qualitativo (Plant et al., 2001). In epoca fetale e neonatale, l'FSH attiva la proliferazione delle cellule del Sertoli, processo fondamentale per lo sviluppo normale dei testicoli; successivamente, nella fase puberale, influenza l'attività mitotica degli spermatogoni e ne favorisce la differenziazione lungo la via spermatogenetica, attraverso la meiosi, fino allo stadio di



spermatidi rotondi (Ruwanpura et al., 2010). Il testosterone prodotto dalle cellule di Leydig sotto lo stimolo dell'ormone luteinizzante (LH), invece sembra influenzare le ultime fasi maturative spermatogenetiche. Nell'uomo adulto, l'FSH è importante per il mantenimento delle funzioni metaboliche delle cellule del Sertoli, tappa essenziale per il mantenimento di una qualitativamente e quantitativamente normale spermatogenesi (Nieschlag et al., 1999). L'FSH è un eterodimero costituito da una subunità  $\alpha$  (comune a tutta la famiglia degli ormoni glicoproteici) legata da legame non covalente ad una subunità  $\beta$  ed è secreto in forme molecolari multiple che conferiscono all'ormone differenti attività biologiche. L'efficienza dell'azione dell'FSH dipende dalla bioattività intrinseca dell'ormone, dalla sua concentrazione sierica e dall'efficacia di trasduzione del segnale da parte del suo recettore (FSHR) in risposta alla stimolazione ormonale (Laan et al., 2012). Si tratta di un recettore transmembrana associato ad una proteina G; presenta pertanto un dominio extracellulare (estremità N-terminale che lega l'ormone), un dominio intracellulare (estremità C-terminale) e un dominio transmembrana costituito da sette  $\alpha$ -eliche. L'attivazione del recettore per l'FSH codificato dal gene *FSHR* è necessaria per il normale funzionamento dell'FSH (Simoni et al., 1997). Sebbene entrambe le subunità dell'ormone contribuiscano al legame con l'FSHR, la specificità del legame è garantita dalla subunità  $\beta$  (FSHB)(Fan et al., 2005). La tappa limitante la produzione e la secrezione di FSH è la trascrizione del gene codificante la subunità  $\beta$ : il gene *FSHB* (McNeilly et al., 2003).

## 1.6 GENE *FSHR*

Il gene *FSHR* è situato sul cromosoma 2p21, contiene 192 kb e codifica una proteina di 695 amminoacidi. E' definito da dieci esoni e nove introni ed è espresso nelle cellule del Sertoli. L'esone 1 codifica per il peptide segnale e parte del dominio extracellulare, l'esone 2-9 codificano per il dominio extracellulare, l'esone 10 codifica per l'estremità C-terminale del dominio extracellulare e l'intero dominio transmembrana. E' un gene altamente polimorfico: ad oggi secondo il National Center for Biotechnology Information (NCBI) SNP (Single Nucleotide Polymorphism) database (<http://ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>) il gene contiene più di 2000 polimorfismi all'interno di regioni codificanti e non codificanti. Tra di essi tre polimorfismi a singolo nucleotide sono stati ben caratterizzati (Figura 1). Il primo polimorfismo è il -29G/A situato nel promotore del gene *FSHR* risultante in una sostituzione G/A in un potenziale dominio di legame GGAAA per uno specifico fattore di trascrizione C-E- twenty six (c- ETS).

Alcuni studi condotti su linee cellulari COS7 e SK11 non hanno evidenziato alcuna differenza nell'attività del promotore nelle varianti *FSHR* (Wunsch et al., 2005). Uno studio *in vitro* ha dimostrato, utilizzando Chinese Hamster Ovary Cells (CHO), che l'attività trascrizionale del promotore in presenza dell'allele -29 A è ridotta del 56% rispetto a quella con l'allele -29 G (Nakayama et al., 2006). Inoltre, su cellule di granulosa ottenute da tecniche di riproduzione assistita, i livelli di espressione di mRNA e di proteina erano più bassi in soggetti con genotipo *FSHR* AA rispetto a donne con genotipo GG (Desai et al 2011). Molti studi clinici sono stati svolti per definire il ruolo del polimorfismo -29 G/A del gene *FSHR* sui parametri riproduttivi, ma nessuno di essi ha evidenziato un'associazione tra lo SNP ed i parametri analizzati (Ahda et al.,

2005; Pengo et al., 2006; Balkan et al., 2010; Li et al., 2011; Wu et al., 2012). Molto recentemente, solo uno studio ha evidenziato che lo SNP *FSHR* -29G/A era associato con differenti livelli sierici di FSH in un ampio gruppo di uomini di origine Baltica (Grigorova et al., 2014).

Gli altri due polimorfismi studiati nel gene *FSHR* sono situati nell'esone 10 e sono in forte linkage disequilibrium: A919G (corrispondente nella proteina a Thr307Ala) e A2039G (corrispondente nella proteina a Asn680Ser) (Figura 1).

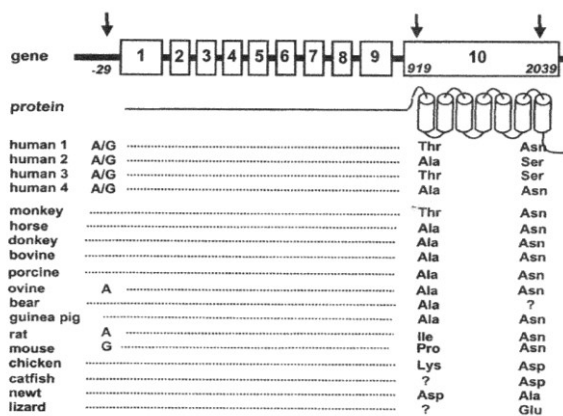
Le conseguenze molecolari dei due polimorfismi sono state studiate *in vitro*. Su cellule di granulosa umana le due varianti recettoriali rispondono attivando differenti pathways di trasduzione del segnale con differenti cinetiche di risposta all'ormone (Casarini et al., 2014).

La distribuzione dei polimorfismi del gene *FSHR* è stata valutata nella popolazione maschile infertile e di controllo di differenti origini etniche di cui sono stati presi in considerazione come parametri, il volume testicolare, i livelli sierici di FSH e di testosterone ed i parametri seminali. La combinazione dei tre polimorfismi determinava la formazione di dieci combinazioni con differenze di frequenza statisticamente significativa fra gruppi di uomini con azoospermia e controlli, essendo l'aplotipo G-29/Thr307/Asn680 rappresentato più frequentemente nel gruppo di uomini con normozoospermia (Adha et al., 2005, Lend et al., 2010). Gli autori suggeriscono che l'attività trascrizionale del promotore *FSHR* potrebbe essere influenzata dallo SNP -29G/A in modo che l'FSH diventa meno efficiente quando è presente il recettore con le varianti Ala307/Ser680. Altri studi hanno evidenziato che nessuno dei parametri clinici analizzato né la spermatogenesi sono influenzati dal pattern di espressione dei

polimorfismi del gene *FSHR*, indicando che nell'uomo l'espressione di tali recettori polimorfici non presenta alcuna implicazione funzionale (Simoni et al., 1999, Asatiani et al., 2002, Pengo et al., 2006, Shimoda et al., 2009, Balkan et al., 2010, Safarinejad et al., 2011, Ghirelli-Filho et al., 2012).

Solo ultimamente, è stato dimostrato un effetto del polimorfismo *FSHR* A2039G sui livelli di FSH, volume testicolare e testosterone su un gruppo molto ampio di 1790 pazienti dopo stratificazione con un altro polimorfismo nel gene *FSHB* -211G/T (Tuttelmann et al., 2012).

**Figura 1- Gene e proteina *FSHR***

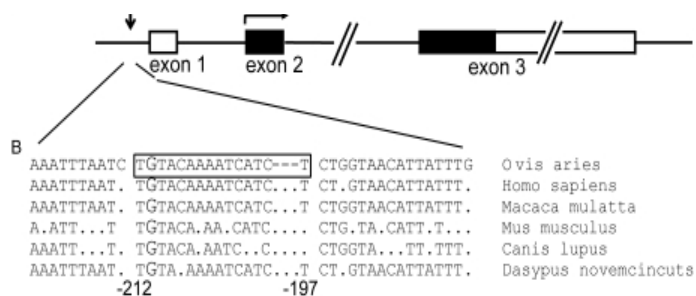


## 1.7 GENE *FSHB*

Il gene *FSHB* è situato sul cromosoma 11p13 contiene 4262bp e la proteina codificata è di 119 amminoacidi. E' costituito da 3 esoni ed è espresso nelle cellule gonadotrope della ipofisi anteriore. E' caratterizzato da un basso numero di polimorfismi all'interno di regioni non codificanti. Secondo il National Center for Biotechnology Information

(NCBI) SNP (Single Nucleotide Polymorphism) database (<http://ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>) il gene *FSHB* lega un totale di 143 SNPs. Un polimorfismo a singolo nucleotide G/T in posizione -211 relativamente al sito di inizio della trascrizione è localizzato all'interno di un elemento altamente conservato dal punto di vista evolutivo in una regione coinvolta nella regolazione della trascrizione del gene (Figura 2). In particolare l'affinità di legame del promotore del gene *FSHB* carrier dell'allele -211 T è ridotta rispetto a quella del promotore wild-type con l'allele -211G (Benson et al. 2013). L'attività relativa del promotore con l'allele -211 T valutata *in vitro* con luciferasi è più bassa del 50% comparata a quella della variante wild-type con l'allele -211G (Hoogendoorn et al., 2003). Quindi il più recente, dal punto di vista evolutivo, allele -211T è associato a cambiamenti dell'attività trascrizionale del gene *FSHB* determinando ridotti livelli sierici di FSH.

**Figura 2- Gene *FSHB***



In accordo con questa attività funzionale, alcuni studi clinici hanno evidenziato una associazione tra il polimorfismo *FSHB* -211 G/T e i livelli sierici di FSH e altri parametri riproduttivi negli uomini di differenti etnie (Grigorova et al., 2008, 2010; Ferlin et al., 2011; Tuttelmann et al., 2012). In particolare è stata dimostrata una correlazione fra l'allele G e livelli di FSH più elevati; gli uomini con genotipo omozigote -211 GG avevano livelli di FSH più alti di quelli con genotipo -211GT e -

211TT (Grigorova et al., 2008, 2010; Ferlin et al., 2011; Tuttelmann et al., 2012). Inoltre il genotipo omozigote -211 TT era associato con un significativo aumento di testosterone e volume testicolare, ma non era osservata nessuna differenza dei livelli di inibina B e dei parametri seminali fra i carrier dell'allele -211T e carrier dell'allele -211G (Grigorova et al., 2008). Successivamente è stato dimostrato dagli stessi ed altri autori, su un gruppo di uomini più ampio, che l'allele -211T era maggiormente frequente negli uomini infertili (Grigorova et al., 2010, Tuttelmann et al., 2012). Inoltre è stata osservata una associazione del polimorfismo -211T con volume testicolare, conta spermatica e testosterone più bassi e livelli di LH più elevati (Grigorova et al., 2010; Ferlin et al., 2011; Tuttelmann et al., 2012). Quindi il polimorfismo *FSHB* -211G/T potrebbe essere coinvolto nella modulazione della funzione testicolare in uomini fertili ed infertili

## **1.8 SCOPO DELLA TESI**

Scopo di questo lavoro è stato quello di determinare gli effetti dei polimorfismi:

- *FSHR* -29G/A
- *FSHR* A2039G
- *FSHB* -211G/T

sui parametri ormonali e seminali in pazienti maschi che si rivolgevano alla Sezione di Andrologia, Endocrinologia e Medicina Interna, P.O “G. Rodolico”, A.O.U. “Policlinico – Vittorio Emanuele”, Università degli Studi di Catania, per un controllo andrologico.

## **2. MATERIALI E METODI**

### **2.1 PAZIENTI**

Il nostro studio è stato condotto presso la Sezione di Andrologia, Endocrinologia e Medicina Interna, P.O “G. Rodolico”, A.O.U. “Policlinico – Vittorio Emanuele”, Università degli Studi di Catania. Nell’ambito degli esami di screening andrologico abbiamo selezionato 196 uomini di origine Caucasica provenienti dalla Sicilia Orientale suddivisi in due gruppi secondo i parametri seminali: 90 pazienti avevano oligozoospermia (conta spermatica <39 mil) o azoospermia (assenza di spermatozoi) e 106 pazienti erano con normozoospermia (parametri seminali normali).

Sono stati esclusi i pazienti con criptorchidismo, tumori testicolari, patologie ipotalamo-ipofisarie e infertilità per cause genetiche:

- anomalie del cariotipo
- microdelezioni del cromosoma Yq
- mutazioni del gene *CFTR*.

### **2.2 ANALISI GENETICHE**

Il DNA genomico è stato estratto da sangue periferico con the High Pure polymerase chain reaction template preparation kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), secondo le indicazioni date dalla ditta fornitrice. Al fine di trovare i controlli positivi di ogni gruppo genotipico per ogni polimorfismo abbiamo analizzato i primi pazienti con sequenziamento automatico su *AbiPrism310 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems). Il tratto di DNA contenente gli specifici polimorfismi nel promotore del gene *FSHR* (-29G/A), nell’esone 10 del gene *FSHR* (A2039G) e nel promotore del gene

*F5HB* (-211G/T), è stato amplificato con primers specifici. La reazione PCR conteneva: 100pmol di ogni primer (HPLC purification grade, Pharmacia, Sweden), 250 pmol dNTP (Roche, Germany), PCR reaction buffer (10mM Tris HCl pH 8.5, 50 mM KCl, 2mM MgCl<sub>2</sub>) e 0,5 U TaqDNA polymerase (Life technologies, Foster City CA, USA). La PCR era eseguita a 92 °C per 5min e 30 cicli : 2 min a 92°C, 1 min a 68°C e 1min 72°C. Per la successiva reazione di sequenziamento erano aggiunti al prodotto amplificato 4 µl di “big dye terminators ddNTPs”, ed i primers specifici. Dopo purificazione i campioni sono stati sequenziati usando il sequenziatore automatico AbiPrism 310 a singolo capillare.

Successivamente, la genotipizzazione per ogni specifico SNP è stata eseguita con StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA) per la real-time PCR and TaqMan Genotyping Master Mix (Life Technologies, Pleasanton, CA, USA) e TaqMan SNP Assay (Life Technologies, Austin, Texas, USA) specifico per ogni polimorfismo. Sono state quindi utilizzate le seguenti condizioni di PCR: 10 min a 95°C seguiti da 50 cicli di 15 sec a 92°C e 1 min e 30 sec a 60°C. Dopo ogni amplificazione è stata eseguita una discriminazione allelica per determinare il genotipo di ogni soggetto. In particolare, l'analisi denominata allele discrimination/SNP real-time utilizza sonde marcate con fluorescenza per determinare la composizione allelica dei campioni di DNA da analizzare.

Dopo l'amplificazione, i risultati sono stati analizzati e letti tramite l'utilizzo di software specifici, in grado di misurare la fluorescenza ottenuta durante l'amplificazione. I principali vantaggi di questo metodo, rispetto alle tecniche convenzionali basate su PCR, consistono nel fatto che contemporaneamente si possono analizzare, in poco tempo molti campioni ciascuno contenente quantità inferiori di DNA e tempi più brevi



rispetto alla PCR classica. Inoltre il sistema è dotato di una più elevata specificità conferita dalle sonde marcate a fluorescenza e dalla semplificazione della tecnica di rilevazione che non comporta l'utilizzo di elettroforesi su gel.

## **2.3 ORMONI DELLA RIPRODUZIONE E ANALISI DEL LIQUIDO SEMINALE**

Tutti i dosaggi ormonali erano eseguiti presso il laboratorio centrale del P.O. "G. Rodolico", Policlinico di Catania. Le concentrazioni sieriche di FSH, LH, testosterone sono state misurate con metodo immunochemiluminescente (Roche Diagnostic, Mannheim, Germany). Il volume testicolare è stato valutato dallo stesso operatore mediante orchidometro di Prader.

Il liquido seminale era raccolto con masturbazione dopo quattro giorni di astinenza sessuale e l'analisi è stata eseguita seguendo le linee guida internazionali (WHO, 2010).

## **2.4 ANALISI STATISTICA**

Prima di eseguire l'analisi statistica, tutti i dati sono stati analizzati per la distribuzione normale con il test di Kolmogorov-Smirnov. Il testosterone, l'indice di massa corporea (BMI) ed il volume testicolare avevano distribuzione normale. Questi parametri clinici sono stati comparati fra i differenti genotipi attraverso l'analisi della varianza ad una via (ANOVA). Le altre variabili, che non avevano distribuzione normale, sono state analizzate nei differenti genotipi con il test Kruskal-Wallis per dati non parametrici. Per verificare differenze statistiche tra il gruppo di carrier (omozigoti mutant-type+ eterozigoti wild-type) ed il gruppo dei non carrier (omozigoti wild-type) dell'allele mutato di ciascun polimorfismo abbiamo utilizzato l'analisi della varianza ad una via

(ANOVA) per le variabili con distribuzione normale ed il test Mann-Whitney U-test per le variabili distribuite non normalmente.

Il test  $\chi^2$  e lo z -test sono stati utilizzati per paragonare le differenze di frequenza allelica e/o genotipica tra il gruppo di uomini con oligozoospermia o azoospermia ed il gruppo di uomini con normozoospermia. Tutti i test sono stati eseguiti con SPSS software (version 22) (SPSS Inc., Chicago, IL). I valori sono stati considerati statisticamente significativi per  $p \leq 0.05$

## 3. RISULTATI

### 3.1 GENE *FSHR*

#### 3.1.1 Polimorfismo -29 G/A

La distribuzione del polimorfismo in posizione -29 nel promotore del gene *FSHR* è stata del 55,1% (n=108) per il genotipo GG, 38,3% (n=75) per il genotipo GA e 6,6% (n=13) per il genotipo AA. Il polimorfismo è risultato ugualmente distribuito nei gruppi con differenti parametri seminali: negli uomini con oligozoospermia o azoospermia GG: 52,2%, GA: 41,1% e AA: 6,7%; negli uomini con normozoospermia GG: 57,5%, GA: 35,8% e AA: 6,7% ( $X^2$  test,  $p=0,65$ ). Le caratteristiche cliniche ed endocrine di tutti gli uomini suddivisi secondo i loro genotipi GG, GA, AA sono mostrati in tabella 1. I livelli sierici di FSH, LH e testosterone erano rispettivamente  $6\pm 5,7$  IU/L,  $4,7\pm 2,3$  IU/L and  $5,1\pm 1,8$  IU/L. Abbiamo osservato che i livelli sierici di FSH erano significativamente differenti nei tre genotipi. In particolare, abbiamo evidenziato un significativo gradiente dai livelli più bassi nel gruppo omozigote GG ai più alti nel gruppo omozigote AA (figura 1, test Kruskal-Wallis,  $p=0,003$ ). Quando abbiamo paragonato i livelli sierici di FSH del gruppo omozigote GG con il gruppo che comprendeva solo gli omozigoti “mutant type” (AA) e gli omozigoti AA con gli eterozigoti GA (AA+GA), abbiamo trovato una differenza statisticamente significativa (Test Mann-Whitney,  $p=0,002$  e  $p=0,009$ , rispettivamente). Lo stesso trend riduttivo, anche se non raggiungeva la significatività statistica, era evidenziato nei livelli di LH (Test Mann-Whitney,  $p=0,097$  e  $p=0,1$ , rispettivamente). Non abbiamo trovato nessuna associazione significativa tra il polimorfismo *FSHR* -29 G/A ed il BMI, il volume testicolare ed i livelli di testosterone. Abbiamo analizzato l'effetto del polimorfismo

*FSHR* -29 G/A su quattro parametri seminali (concentrazione spermatica, conta spermatica, motilità progressiva, morfologia), ma nessuno dei parametri seminali era differente nei tre genotipi associati al polimorfismo.

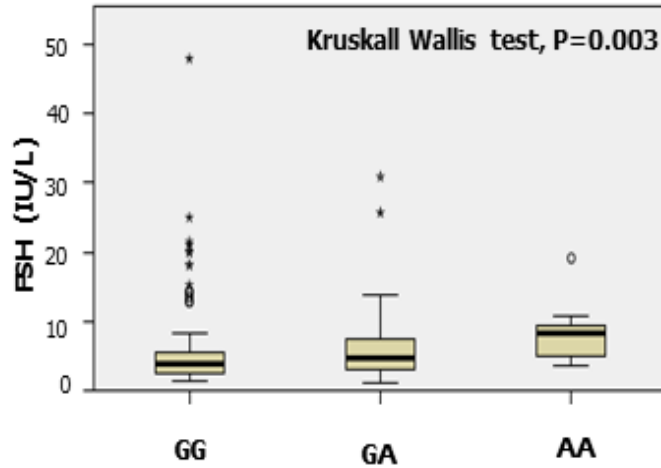
**Tabella 1.** Caratteristiche cliniche ed endocrine dei pazienti suddivisi in gruppi genotipici associati al polimorfismo *FSHR* - 29 G/A

	Genotipo <i>FSHR</i> - 29 G/A			Valore di p		
	GG	GA	AA	Tutti i soggetti	GG vs. GA+AA	GG vs. AA
Età (anni)	32,3±8,2 (32)	31,9±7,7 (30)	30,4±5,7 (29)	0,66	0,7	0,52
BMI (Kg/m <sup>2</sup> )	28,8±9,3 (27,3)	27,9±4,8 (26,5)	32,2±6,2 (33,6)	0,19	0,27	0,06
Volume testicolare (ml)	28,8±9,3 (28,7)	28,17±8,4 (26,7)	24,8±8,8 (22,8)	0,5	0,49	0,29
FSH (IU/L)	5,7±6,3 (3,7)	6±4,8 (4,7)	8,1±4,1 (8,2)	0,003*	0,009*	0,002*
LH (IU/L)	4,5±2,2 (3,9)	4,9±2,3 (4,4)	5,4±2,2 (4,9)	0,17	0,1	0,097
Testosterone (nmol/L)	4,9±1,8 (4,9)	5,2±2 (5)	5,0±1,8 (4,9)	0,7	0,43	0,8
Concentrazione spermatozoi (10 <sup>6</sup> /mL)	39,3±43,4 (25)	35,6±49,6 (13)	29,8±43 (16)	0,41	0,18	0,4
Conta spermatica (x10 <sup>6</sup> )	116,2±146,97 (52)	104,16±164,2 (39)	104,8±140,7 (3,5)	0,67	0,38	0,77
Motilità progressiva (%)	14,97±11,5 (12)	15,55±11,5 (15)	15,7±10,4 (18)	0,8	0,645	0,7
Morfologia normale (%)	6,5±5 (6)	5,9±4,3 (5)	5,4±3,8 (5)	0,71	0,4	0,34

Note: i dati sono espressi come media ±deviazione standard ed in parentesi come mediana

\*Valori di p<0,05

Figura 1  
Distribuzione dei livelli di FSH nei  
tre genotipi associati al  
polimorfismo *FSHR* -29 G/A



I dati sono espressi come mediana

### 3.1.2 Polimorfismo A2039G

Il polimorfismo nell'esone 10 *FSHR* A2039G era distribuito similmente nei due gruppi di pazienti con differenti parametri seminali: il genotipo omozigote AA era presente nel 27% e nel 26,7%, il genotipo eterozigote AG nel 53,9% e nel 55,2% ed il genotipo GG nel 19,1% e nel 18,1% dei pazienti rispettivamente con oligozoospermia/azoospermia e con normozoospermia. Tutti i dati clinici dei pazienti stratificati per gruppo genotipico sono mostrati in tabella 2. Non abbiamo evidenziato differenze statisticamente significative di nessun parametro clinico tra i gruppi genotipici associati al polimorfismo *FSHR* A2039G.

**Tabella 2.** Caratteristiche cliniche ed endocrine dei pazienti suddivisi in gruppi genotipici associati al polimorfismo *FSHR* A2039G

	Genotipo <i>FSHR</i> A2039G			Valore di p Tutti i soggetti
	AA	AG	GG	
Età (Anni)	30,74±7,2	32,85±8,3	31,78±7,2	0,08
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	27,9±5,2	27,8±4,4	27,2±5,2	0,97
Volume testicolare (ml)	27±7,5	30,4±8,6	23,4±10	0,16
FSH (IU/L)	5,2±3,8	6±5,3	6,9±8,4	0,88
LH (IU/L)	4,5±1,7	4,7±2,4	4,9±2,7	0,98
Testosterone (nmol/L)	5±1,8	4,9±1,96	5,2±1,7	0,8
Concentrazione spermatozoi (10 <sup>6</sup> /mL)	40,8±48,82	37,9±47,9	30,19±32,73	0,74
Conta spermatica (x10 <sup>6</sup> )	126,5±162,06	111,26±162,14	86,89±102,8	0,6
Motilità progressiva (%)	13,48±8,9	15,5±12,2	17±12,1	0,48
Morfologia normale (%)	6,2±4,1	5,8±4,1	7,2±6,5	0,65

Note: i dati sono espressi come media ± deviazione standard ed in parentesi come mediana

## 3.2 GENE *FSHB*

### 3.2.1 Polimorfismo -211G/T

La frequenza dei genotipi *FSHB* -211 GG, GT e TT era: 72% , 25% e 3%, rispettivamente. Sono state evidenziate differenze statisticamente significative delle frequenze dell'allele *FSHB* -211 T nei gruppi con differenti parametri seminali. Un totale di 31 uomini con parametri seminali alterati avevano l'allele -211T con una frequenza significativamente più elevata (18,9% o 34/180 dei cromosomi analizzati) rispetto a quella degli uomini con normozoospermia (10,9% o 23/212 dei cromosomi analizzati) (z-test,  $p=0,024$ ). La frequenza dei genotipi con l'allele T (eterozigoti GT e omozigoti TT) in uomini con oligozoospermia/azoospermia era del 34,4% ed era statisticamente più elevata di quella osservata in uomini con normozoospermia (20,7%) (z-test,  $p=0,027$ ). Tutte le caratteristiche cliniche nei differenti gruppi genotipici sono mostrate nella tabella 3. Abbiamo osservato un gradiente riduttivo dei livelli sierici di FSH e di LH dal genotipo omozigote GG al genotipo omozigote TT (test Kruskal-Wallis,  $p<0,001$  e  $p=0,011$ , rispettivamente). I livelli di FSH e di LH sono risultati significativamente più elevati negli uomini con genotipo omozigote GG rispetto al gruppo di uomini portatori dell'allele -211 T (GT+TT) (test Mann-Whitney,  $p<0,001$  e  $p=0,031$ , rispettivamente per FSH ed LH) e rispetto al gruppo omozigote TT (test Mann-Whitney,  $p=0,001$  e  $p=0,007$ , rispettivamente per FSH ed LH) (Figura 2). Gli uomini con genotipo omozigote TT avevano livelli di testosterone significativamente più bassi di quelli evidenziati nel genotipo omozigote GG (ANOVA,  $p=0,05$ ). I parametri seminali (concentrazione di spermatozoi, conta spermatica, motilità progressiva) ed il volume testicolare subivano un forte trend riduttivo dal gruppo

omozigote GG al gruppo omozigote TT anche se non in maniera statisticamente significativa.

**Tabella 3.** Caratteristiche cliniche ed endocrine dei pazienti suddivisi in gruppi genotipici associati al polimorfismo *FSHB* - 211 G/

	Genotipo <i>FSHB</i> -211G/T			Valore di p	
	GG	GT	TT	Tutti i soggetti	GG vs TT
Età (Anni)	32,1±7.8 (31)	32,5±7.2 (31.5)	27,2±13.0 (22.5)	0,73	0,008
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	28,23±4.5 (27,9)	25,13±5,18 (25)	31±* (31)	0,32	0,557
Volume testicolare (ml)	28,25±9,1 (28,3)	28,7±8,32 (26,,6)	21.7±9,5 (21,8)	0,57	0,33
FSH (IU/L)	6,9±6,3 (4.6)	3,76±2,39 (3)	2,27±0,77 (2.15)	<0,001*	0,001 *
LH (IU/L)	4,9±2,3 (4,4)	4,35±2,14 (3,8)	2,68±0,8 (2,9)	0,011*	0,007*
Testosterone (nmol/L)	5,18±1,96 (5)	4,87±1,6 (4,9)	3,6±2,1 (3,5)	0,095	0,05*
Concentrazione spermatozoi (10 <sup>6</sup> /mL)	38,9±46,8 (21)	34,01±43,7 (10)	18,4±27,9 (6.8)	0,432	0,622
Conta spermatica(x10 <sup>6</sup> )	116±162,9 (50)	100±124 (25)	60±93,8 (20)	0,395	0,642
Motilità progressiva (%)	15,82±11 (15)	14,3±12,6 (10)	6,75±8,95 (3.5)	0,395	0,682
Morfologia normale (%)	6±4 (5)	6,7±6 (5)	6,2±4.7 (7,5)	0,95	0,497

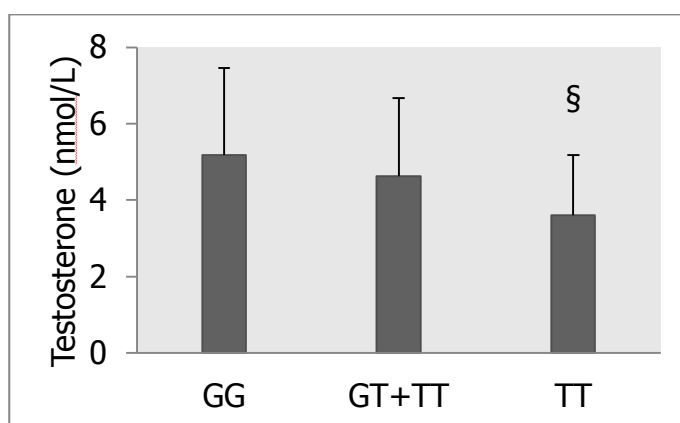
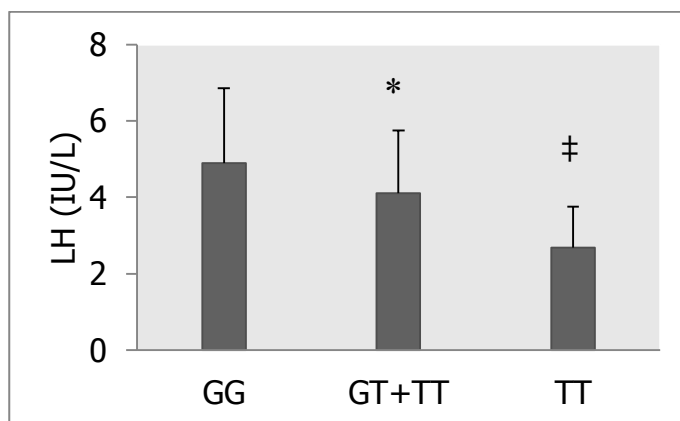
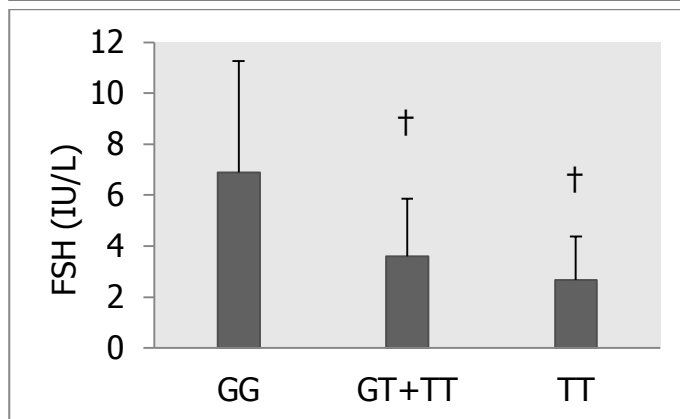
Note: i dati sono espressi come media ± deviazione standard ed in parentesi come mediana

\*Valori di p<0,05.



Figura 2

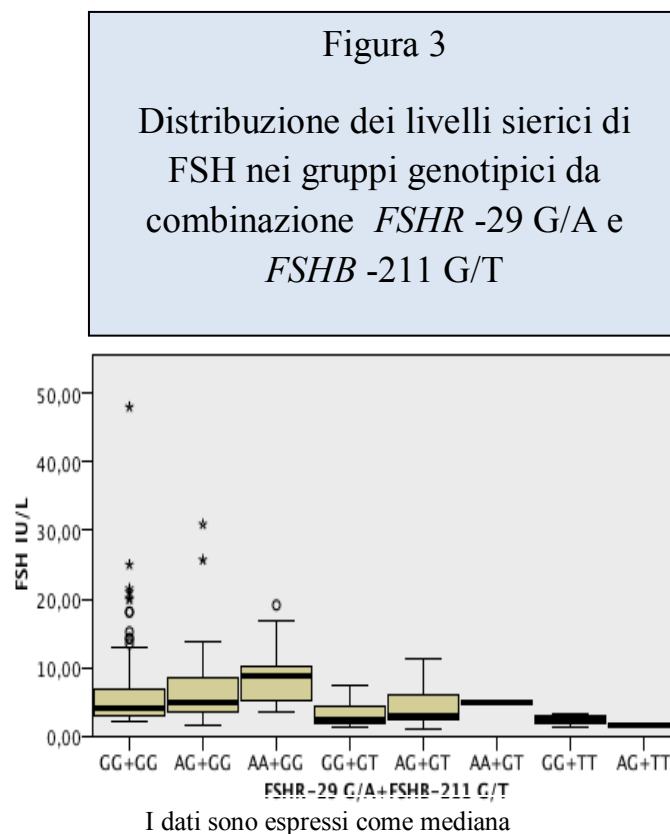
Distribuzione dei livelli di FSH, LH e testosterone nei tre genotipi associati al polimorfismo *FSHB* -211 G/T33



Livelli di FSH, LH e testosterone in uomini stratificati secondo il gruppo *FSHB* -211GG, GT+TT e TT †p<0,005, \*p<0,05, ‡p<0,01 (test Mann-Whitney) e §p=0,05 (ANOVA) versus il genotipo *FSHB* -211 GG.

### 3.3 COMBINAZIONE DEI POLIMORFISMI DEI GENI *FSHB* ED *FSHR*

Combinando i polimorfismi *FSHR* -29 G/A ed *FSHB* -211G/T abbiamo ottenuto otto combinazioni genotipiche con le seguenti frequenze: GG-GG 39,5%, GA-GG 26,5%, AA-GG 6%, GG-GT 12,5%, GA-GT 12%, AA-GT 0,5%, GG-TT 2,5%, GA-TT 0,5%. Le combinazioni “meno favorevoli” in termini di produzione di FSH (GG-TT e GA-TT) ed in termini di espressione recettoriale (GA-GT, AA-GG, AA-GT) rappresentavano insieme il 21,5% del nostro gruppo di studio. I livelli di FSH sono risultati essere differentemente distribuiti nei diversi gruppi: i livelli più elevati di FSH sono stati evidenziati in soggetti con genotipo AA+GG ed i livelli più bassi in soggetti con genotipo carrier allele -211T ( Kruskal-Wallis,  $p < 0,001$ ) (Figura 3).



## 4. DISCUSSIONE

In questo studio sono riportati i risultati delle analisi dei polimorfismi *FSHR* -29 G/A, *FSHR* A2039G, *FSHB* -211G/T e dei loro effetti clinici sui parametri ormonali e seminali di 196 maschi con oligozoospermia/azoospermia e normozoospermia. La frequenza del polimorfismo *FSHR* -29 G/A in accordo con precedenti studi (Ahda et al., 2005; Pengo et al., 2006; Balkan et al., 2010; Li et al., 2011; Wu et al., 2012; Grigorova et al., 2014) non era differente tra maschi con oligozoospermia/azoospermia e maschi con normozoospermia. Questi risultati suggeriscono che il polimorfismo *FSHR* -29 G/A non può essere considerato un fattore di rischio per l'infertilità maschile. Abbiamo osservato che i livelli sierici di FSH erano più elevati del 42% negli uomini omozigoti *FSHR* -29 AA rispetto agli uomini omozigoti *FSHR* -29 GG. Precedenti studi hanno valutato il ruolo del polimorfismo -29 G/A del gene *FSHR* sulla funzione riproduttiva di uomini di origine tedesca (Ahda et al., 2005), italiana (Pengo et al., 2006), turca (Balkan et al., 2010) e cinese (Li et al., 2011), ma non hanno trovato alcuna differenza nei livelli sierici di FSH tra uomini con differenti genotipi GG, GA ed AA. Solo uno studio molto recente ha evidenziato un aumento significativo dei livelli di FSH in uomini di origine baltica carrier dell'allele -29 A (Grigorova et al., 2014). I livelli elevati di FSH negli uomini con genotipo *FSHR* -29 GA e più consistentemente in quelli con genotipo *FSHR* -29 AA, osservati nel nostro studio, sono legati ad una espressione recettoriale genotipo dipendente. Il promotore del gene *FSHR* con l'allele -29 A ha infatti, *in vitro*, una attività trascrizionale più bassa di quella del promotore del gene con l'allele -29 G (Nakayama et al., 2006) e l'espressione stessa del gene, a livello di mRNA e proteina

tradotta su cellule di granulosa umane, è ridotta in donne con genotipo AA (Desai et al., 2011). Quindi gli elevati livelli sierici di FSH da noi osservata nel gruppo di uomini carrier dell'allele *FSHR* -29 A sono determinati da una ridotta espressione recettoriale.

Il nostro studio, in accordo con molti altri studi condotti su uomini di differenti origini etniche (Simoni et al 1999, Asatiani et al., 2002, Pengo et al., 2006, Shimoda et al., 2009, Balkan et al., 2010, Safarinejad et al., 2011, Ghirelli-Filho et al., 2012), non evidenzia alcuna associazione del polimorfismo A2039G nell'esone 10 del gene *FSHR* né con l'infertilità maschile né con i parametri clinico-endocrini analizzati. Infatti, la frequenza del polimorfismo *FSHR* A2039G non differiva nei due gruppi di pazienti con differenti parametri seminali ed i genotipi ad esso associati non presentavano differenze nei livelli ormonali, né su BMI né su volume testicolare.

Il polimorfismo -211 G/T nel promotore del gene *FSHB*, regola l'attività relativa del promotore *FSHB*: l'attività *in vitro* del promotore con l'allele T è circa la metà di quella del promotore con l'allele G (Hoogendoorn et al., 2003; Benson et al., 2013). Il nostro studio ha affrontato l'analisi anche di questo polimorfismo per valutare il suo impatto sulla funzione riproduttiva degli uomini con differenti parametri seminali. La frequenza dell'allele *FSHB* -211 T era aumentata in maniera statisticamente significativa nel gruppo di soggetti con oligozoospermia/azoospermia rispetto a quella degli uomini con normozoospermia: il 18,9% ed il 10,9 % dei cromosomi analizzati in uomini con oligozoospermia/azoospermia e normozoospermia rispettivamente avevano l'allele T. I parametri seminali nel gruppo di uomini con genotipo GT e genotipo TT erano inoltre fortemente compromessi, anche se non significativamente. Precedenti studi hanno mostrato una associazione non chiara tra il polimorfismo del gene *FSHB* ed i parametri seminali. In uno studio condotto su popolazione estone, gli omozigoti TT avevano una

motilità progressiva ridotta, ma presentavano un aumento della concentrazione spermatica (Grigorova et al., 2010). Successivamente, alcuni autori hanno evidenziato un trend riduttivo della concentrazione spermatica dal genotipo omozigote GG al gruppo omozigote TT (Ferlin et al., 2011, Grigorova et al., 2011 and Tuttelmann et al., 2012). Le differenze di frequenza allelica tra uomini con oligozoospermia/azoospermia e uomini con normozoospermia e l'alterazione dei parametri seminali nei differenti gruppi genotipici associati al polimorfismo -211 G/T del gene *FSHB* nel nostro gruppo di studio rinforzano l'ipotesi di un importante ruolo dello SNP sulla spermatogenesi e conseguentemente sul potenziale riproduttivo degli uomini.

Abbiamo, inoltre, osservato che gli uomini con genotipo GT e TT avevano ridotti livelli di FSH del 35% e 54%, rispettivamente, paragonati ai livelli ormonali degli uomini con genotipo omozigote wild-type. Il forte impatto del polimorfismo *FSHB* -211G/T sui livelli di FSH conferma precedenti studi in cui era evidenziato che i livelli di FSH erano ridotti nel genotipo GT e TT del 10-27% e 24-64% rispettivamente (Grigorova et al., 2008, 2010; Ferlin et al., 2011, Tuttelmann et al., 2012). I nostri risultati confermano anche che la produzione di FSH è geneticamente determinata dai livelli trascrizionali del gene *FSHB* che a loro volta sono regolati da regioni altamente conservate nel promotore del gene *FSHB* (Grigorova et al., 2008) ed in particolare da una regione di 11 bp, che comprende il nucleotide -211, che lega un fattore di trascrizione LHX3 homeodomain transcription factor (Benson et al., 2013).

I ridotti livelli di LH osservati nei carrier dell'allele -211 T del nostro studio, suggerisce un ulteriore effetto del polimorfismo sul bilancio ormonale e sulla fisiologia maschili. E' necessario comunque allargare lo studio per aumentare il numero dei portatori dell'allele T, poiché precedenti studi hanno evidenziato che i livelli di LH aumentavano

con il numero degli alleli T (Grigorova et al. 2010; Tuttelmann et al. 2012). Grigorova e colleghi hanno inoltre riportato una associazione negativa tra lo SNP ed il testosterone (i livelli di testosterone si riducevano all'aumentare del numero degli alleli T) (Grigorova et al. 2010). Nel nostro gruppo di studio, i livelli di testosterone seguivano lo stesso andamento, raggiungendo la significatività statistica negli omozigoti TT vs gli omozigoti GG. Questi risultati sono spiegati da un effetto indiretto dell'FSH sulla produzione di testosterone da parte delle cellule di Leydig. Alcuni studi avevano già supposto un'azione indiretta dell'FSH: surnatanti delle cellule di Sertoli incubati con FSH, stimolavano la secrezione di testosterone da parte delle cellule di Leydig (Lecerf et al., 1993; Rivarola et al., 1995). Quindi i ridotti livelli di testosterone osservati negli uomini portatori dell'allele *FSHB* -211 T, sono determinati dall'alterazione dell'attività delle cellule di Leydig a causa di una sotto-stimolazione, FSH-dipendente e geneticamente determinata, del processo di differenziazione cellulare durante la vita fetale e neonatale.

Precedenti studi hanno valutato l'impatto della combinazione tra il polimorfismo *FSHB* -211 G/T con il polimorfismo *FSHR* A2039G sui parametri riproduttivi maschili: lo SNP del gene *FSHR* modula l'effetto dello SNP del gene *FSHB* sui livelli di FSH e sul volume testicolare (Tuttelmann et al., 2012). In particolare gli omozigoti *FSHR* 2039 GG, con la più bassa sensibilità recettoriale all'ormone, avevano più elevati livelli di FSH e più basso volume testicolare quando avevano genotipo *FSHB* - 211 GT o -211 TT. Più recentemente è stato proposto un modello di associazione di tutti e tre gli SNPs *FSHR* -29 G/A, *FSHR* A2039G e *FSHB* -211G/T (Grigorova et al., 2014), dove i due *FSHR* SNPs con l'*FSHB* SNP determinavano insieme il 2,3%, l'1,4%, l'1% e l'1,1%

della variabilità dei livelli di FSH, inibina B, testosterone e volume testicolare, rispettivamente (Grigorova et al., 2014).

Noi abbiamo elaborato un modello combinando i due polimorfismi che, separatamente, avevano significative implicazioni cliniche sui parametri clinici degli uomini del nostro gruppo di studio: *FSHR* -29 G/A ed *FSHB* -211G/T. I livelli di FSH sono distribuiti diversamente nelle diverse combinazioni genotipiche ottenute associando il polimorfismo *FSHR* -29 G/A con il polimorfismo *FSHB* -211G/T. La diversa distribuzione dimostra chiaramente l'effetto dell'azione sinergica di entrambi gli SNPs, che modulano i livelli dell'ormone FSH influenzando, l'uno (*FSHR* -29 G/A) l'attività del recettore FSHR e l'altro (*FSHB* -211G/T) la disponibilità della subunità  $\beta$  dell'ormone e quindi direttamente la sua concentrazione sierica. Le diverse combinazioni genotipiche sono inoltre presenti con diverse frequenze, indicando la presenza di combinazioni più favorevoli, che sono anche le più frequenti, e meno favorevoli in termini di produzione di FSH ed attività recettoriale.

## 5. CONCLUSIONI

Il nostro studio evidenzia chiaramente le implicazione endocrine del polimorfismo *FSHR* -29 G/A e del polimorfismo *FSHB* -211G/A nel modulare sinergicamente i livelli sierici di FSH nell'uomo, l'uno (*FSHR* -29 G/A) modulando l'attività recettoriale e quindi il legame dell'FSH con il suo recettore *FSHR* ed il successivo segnale di transduzione, l'altro (*FSHB* -211G/A) determinando direttamente la disponibilità della subunità  $\beta$  dell'FSH.

Il polimorfismo *FSHB* -211G/T inoltre influenza anche i livelli sierici di LH, testosterone e contribuisce al mantenimento di una corretta spermatogenesi.

Questo studio, quindi, allarga il complesso quadro di conoscenze sul polimorfismo *FSHB* -211 G/T che presenta una rilevanza funzionale sui livelli ormonali e sulla spermatogenesi e rinforza l'idea che tale SNP può essere considerato un fattore genetico che contribuisce all'origine multigenica dell'infertilità maschile.

Quindi, la determinazione del genotipo associato al polimorfismo *FSHB* -211 G/T da solo, come suggerito e dimostrato da uno studio pilota (Ferlin et al., 2011), o in combinazione con gli altri due del gene *FSHR* , -29 G/A e A2039G, potrebbe permettere l'individuazione di soggetti che rispondono al trattamento con FSH. E' quindi necessario effettuare ulteriori studi per accertare il ruolo di tutti e tre gli SNP sul bilancio ormonale maschile e per definire, quindi, un loro corretto utilizzo come marker genetici per la diagnosi molecolare di infertilità maschile e per il trattamento farmacogenetico.



## 6. BIBLIOGRAFIA

- Ahda Y, Gromoll J, Wunsch A, Asatiani K, Zitzmann M, Nieschlag E, Simoni M. Follicle-stimulating hormone receptor gene haplotype distribution in normozoospermic and azoospermic men. *J Androl* 2005; 26:494-9.
- Asatiani K, Gromoll J, Eckardstein SV, Zitzmann M, Nieschlag E, Simoni M. Distribution and function of FSH receptor genetic variants in normal men. *Andrologia*. 2002;34:172-6
- Aston KI, Carrell DT. Genome-wide study of single-nucleotide polymorphisms associated with azoospermia and severe oligozoospermia. *J Androl* 2009;30:711– 725.
- Balkan M, Gedik A, Akkoc H, Izci Ay O, Erdal ME, Isi H, Budak T. FSHR single nucleotide polymorphism frequencies in proven fathers and infertile men in Southeast Turkey. *J Biomed Biotechnol* 2010; 2010:640318.
- Benson CA, Kurz TL, Thackray VG. A human FSHB promoter SNP associated with low FSH levels in men impairs LHX3 binding and basal FSHB transcription. *Endocrinology* 2013;154:3016-21.
- Casarini L, Moriondo V, Marino M, Adversi F, Capodanno F, GrisoliaC, La Marca A, La Sala GB, Simoni M. FSHR polymorphism p.N680S mediates different responses to FSH in vitro. *Mol Cell Endocrinol*. 2014;5:393:83-91.
- Desai SS, Achrekar SK, Pathak BR, Desai SK, Mangoli VS, Mangoli RV, Mahale SD. Follicle-stimulating hormone receptor polymorphism (G-29A) is associated with altered level of receptor expression in Granulosa cells. *Clin Endocrinol Metab*. 2011;96:2805-12.

- Fan QR, Hendrickson WA. Structure of human follicle-stimulating hormone in complex with its receptor. *Nature* 2005;433:269-77.
- Ferlin A, Arredi B, Speltra E, Cazzadore C, Selice R, Garolla A, Lenzi A, Foresta C. Molecular and clinical characterization of Y chromosome microdeletions in infertile men: a 10-year experience in Italy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92:762-70.
- Ferlin A, Vinanzi C, Selice R, Garolla A, Frigo AC, Foresta C. Toward a pharmacogenetic approach to male infertility: polymorphism of follicle-stimulating hormone beta-subunit promoter. *Fertil Steril* 2011;96:1344-9.
- Ghirelli-Filho M, Peluso C, Christofolini DM, Gava MM, Glina S, Barbosa CP, Bianco B. Variants in follicle-stimulating hormone receptor gene in infertile Brazilian men and the correlation to FSH serum levels and sperm count. *Reprod Sci.* 2012;19:733-9.
- Grigorova M, Punab M, Ausmees K, Laan M. FSHB promoter polymorphism within evolutionary conserved element is associated with serum FSH level in men. *Hum Reprod.* 2008;23:2160–6.
- Grigorova M, Punab M, Poolamets O, Kelgo P, Ausmees K, Korrovits P, Vihljajev V, Laan M. Increased Prevalance of the -211 T allele of follicle stimulating hormone (FSH) beta subunit promoter polymorphism and lower serum FSH in infertile men. *Clin Endocrinol Metab.* 2010;95:100-8.
- Grigorova M, Punab M, Punab AM, Poolamets O, Vihljajev V, Zilaitienė B, Erenpreiss J, Matulevičius V, Laan M. 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.* 2014;9:e94244.

- Hoogendoorn B, Coleman SL, Guy CA, Smith K, Bowen T, Buckland PR, O'Donovan MC. Functional analysis of human promoter polymorphisms. *Hum Mol Genet.* 2003;12:2249-54.
- Laan M, Grigorova M, Huhtaniemi IT. Pharmacogenetics of follicle-stimulating hormone action. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2012;19:220-7.
- Lecerf L, Rouiller-Fabre V, Levacher C, Gautier C, Saez JM, Habert R. Stimulatory effect of follicle-stimulating hormone on basal and luteinizing hormone-stimulated testosterone secretions by the fetal rat testis in vitro. *Endocrinology.* 1993;133:2313-8.
- Lend AK, Belousova A, Haller-Kikkatalo K, Punab M, Poolamets O, Peters M, Salumets A. Follicle-stimulating hormone receptor gene haplotypes and male infertility in estonian population and meta-analysis. *Syst Biol Reprod Med.* 2010;56:84-90.
- Li Y, Gu A, Yang H, Ding X, Ji G, Lu C, Xia Y, Song L, Wang X. FSH receptor gene polymorphisms in fertile and infertile Han-Chinese males. *Clin Chim Acta* 2011;412:1048-52.
- Manolio TA, Bailey-Wilson JE, Collins FS. Genes, environment and the value of prospective cohort studies. *Nat Rev Genet.* 2006;7:812-20.
- Mau-Holzmann UA. Somatic chromosomal abnormalities in infertile men and women. *Cytogenet Genome Res.* 2005;111:317-36.
- McNeilly AS, Crawford JL, Taragnat C, Nicol L, McNeilly JR. The differential secretion of FSH and LH: regulation through genes, feedback and packaging. *Reprod Suppl.* 2003;61:463-76.

- Nakayama T, Kuroi N, Sano M, Tabara Y, Katsuya T, Ogihara T, Makita Y, Hata A, Yamada M, Takahashi N, Hirawa N, Umemura S, Miki T, Soma M. Mutation of the follicle-stimulating hormone receptor gene 5'-untranslated region associated with female hypertension. *Hypertension*. 2006;48:512-8.
- Nieschlag E, Simoni M, Gromoll J, Weinbauer GF. Role of FSH in the regulation of spermatogenesis: clinical aspects. *Clin Endocrinol*. 1999;51:139-46.
- Pengo M, Ferlin A, Arredi B, Ganz F, Selice R, Garolla A, Foresta C. FSH receptor gene polymorphisms in fertile and infertile Italian men. *Reprod Biomed Online*. 2006;13:795-800.
- Plant TM, Marshall GR. The functional significance of FSH in spermatogenesis and the control of its secretion in male primates. *Endocr Rev*. 2001;22:764-86.
- Rivarola MA, Belgorosky A, Berensztein E, de Dávila MT. Human prepubertal testicular cells in culture: steroidogenic capacity, paracrine and hormone control. *Steroid Biochem Mol Biol*. 1995;53:119-25.
- Ruwanpura SM, McLachlan RI, Meachem SJ. Hormonal regulation of male germ cell development. *J Endocrinol*. 2010;205:117-31.
- Safarinejad MR, Shafiei N, Safarinejad S. Evaluating the role of the FSH receptor gene Thr307-Ala and Asn680-Ser polymorphisms in male infertility and their association with semen quality and reproductive hormones. *BJU Int*. 2011;108(2 Pt 2):E117-25.
- Shimoda C, Koh E, Yamamoto K, Matsui F, Sugimoto K, Sin HS, Maeda Y, Kanaya J, Yoshida A, Namiki M. Single nucleotide polymorphism analysis of the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor in Japanese with male

infertility: identification of codon combination with heterozygous variations of the two discrete FSH receptor gene. *Endocr J.* 2009;56:859-65.

- Simoni M, Gromoll J, Nieschlag E. The follicle-stimulating hormone receptor: biochemistry, molecular biology, physiology, and pathophysiology. *Endocr Rev.* 1997;18:739-73.
- Simoni M, Gromoll J, Höppner W, Kamischke A, Krafft T, Stähle D, Nieschlag E. Mutational analysis of the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor in normal and infertile men: identification and characterization of two discrete FSH receptor isoforms. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84:751-5
- Simoni M, Tüttelmann F, Gromoll J, Nieschlag E. Clinical consequences of microdeletions of the Y chromosome: the extended Münster Experience. *Reprod Biomed Online.* 2008;16:289-303.
- Tüttelmann F, Laan M, Grigorova M, Punab M, Söber S, Gromoll J. Combined effects of the variants *FSHB* -211G>T and *FSHR* 2039A>G on male reproductive parameters. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97:3639-47.
- World Health Organization WHO Laboratory Manual for the Examination and processing of human semen. 2010 FIFTH EDITION. Cambridge University Press, Cambridge.
- Wu W, Cai H, Sun H, Lu J, Zhao D, Qin Y, Han X, Niu X, Lu C, Xia Y, Wang S, De Moor B, Marchal K, Wang X. Follicle stimulating hormone receptor G-29A, 919A>G, 2039A>G polymorphism and the risk of male infertility: a meta-analysis. *Gene.* 2012;505:388-92.

- Wunsch A, Ahda Y, Banaz-Yaşar F, Sonntag B, Nieschlag E, Simoni M, Gromoll J. Single-nucleotide polymorphisms in the promoter region influence the expression of the human follicle-stimulating hormone receptor. *Fertil Steril.* 2005;84:446-53.