

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI CATANIA

FACOLTA' DI SCIENZE MATEMATICHE, FISICHE E NATURALI

CORSO DI LAUREA IN SCIENZE BIOLOGICHE

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA ANIMALE "*M. La Greca*"

PELLIGRA MELISSA

**Studio della condensazione cromatinica in
spermatozoi di pazienti teratozoospermici in
programmi di P.M.A.**

Relatrice:

Chiar.ma Prof.ssa Renata Viscuso

Correlatore:

Dott. Giovanni Bracchitta

INDICE

PREMESSA	Pag. 3
INTRODUZIONE	Pag. 9
Apparato genitale maschile	Pag. 9
Testicolo	Pag. 9
Vie spermatiche	Pag. 11
Ghiandole annesse	Pag. 11
Organi genitali esterni	Pag. 12
SPERMATOGENESI	Pag. 13
Compattazione del DNA	Pag. 17
SCOPO DEL LAVORO	Pag. 20
MATERIALI E METODI	Pag. 21
Esame del liquido seminale	Pag. 21
RISULTATI	Pag. 26
CONCLUSIONI	Pag. 30

PREMESSA

Una coppia che dopo un anno di rapporti regolari e non protetti non riesce a concepire è in genere considerata infertile. Una non trascurabile percentuale di coppie riesce ad avere un figlio dopo due anni di tentativi, per cui, in genere, si parla di infertilità dopo 24 mesi di rapporti tendenti alla fecondazione senza successo (secondo i criteri della Organizzazione Mondiale della Sanità). Se una coppia ha già avuto figli ma non riesce ad averne altri, si dice affetta da infertilità secondaria. Complessivamente, l'infertilità riguarda circa il 15% delle coppie.

Considerando che i vari studi di popolazione danno un indice di fecondità (possibilità di concepire per ciclo) intorno al 25% in coppie giovani, le statistiche prevedono che nelle nuove coppie il 19% avrà problemi riproduttivi dopo 2 anni e che di queste il 4% sarà sterile e le altre coppie saranno subfeconde. Subfecondità sta ad indicare un indice di fecondità 3 o 4 volte più basso della norma, quindi alcune coppie dovranno attendere un tempo maggiore per concepire.

Numerosi fattori portano ad una riduzione della fertilità della coppia, valutare quale sia l'impatto dei diversi fattori è molto difficile. Una stima affidabile, benchè relativa solo ad una parte della popolazione, proviene dai dati riguardanti le coppie che si rivolgono ai centri per la Procreazione Assistita. I dati raccolti dal Registro Nazionale sulla Procreazione Medicalmente Assistita sono i seguenti:

- Infertilità maschile: 35,4%
- Infertilità femminile: 35,5%
- Infertilità maschile e femminile: 15%
- Infertilità idiopatica: 13,2%
- Altro: 1%

Inoltre, la letteratura medica sottolinea sempre di più il ruolo di fattori psicosociali di infertilità dovuti a fenomeni complessi come lo stile di vita, la ricerca del primo figlio in età tardiva, l'uso di droghe, l'abuso di alcool, il fumo, le condizioni lavorative, l'inquinamento.

Un fattore incisivo di subfecondità è l'età della donna. Sia studi demografici sulla percentuale di nuove coppie sterili che segnalano un aumento progressivo della sterilità con l'età, sia i risultati delle tecniche di Procreazione Medicalmente Assistita (PMA) dimostrano che con l'avanzare dell'età esiste una riduzione della capacità di concepire.

Le donne italiane fanno figli tardi, più tardi di quasi tutte le altre donne europee, si sposano in media a 28 anni, partoriscono il primo figlio a 30 (un anno in più rispetto alla media europea), e hanno meno figli delle altre europee (1.22 contro 1.44). Le ragioni che spingono le coppie a rimandare la genitorialità sono di natura economica e sociale, la profonda modificazione culturale degli ultimi cinquanta anni ha dato un significato diverso alla filiazione, frutto di scelta e quindi di responsabilità individuale e di coppia, e ha consentito un ruolo più incisivo della donna nel mondo del lavoro. Così, quando si ritiene di poter finalmente avere un figlio, l'età della donna è spesso avanzata. Il periodo più fertile per una donna è infatti tra i 20 e i 25 anni (100%), resta sufficientemente alto fino ai 35 (circa il 50%), subisce un considerevole calo dai 35 ai 40 (20%), è bassissimo oltre i 40 (5-7%). Con l'avanzare dell'età, infatti, i gameti femminili stentano alla ripresa della corretta attività del ciclo cellulare, aumenta così il rischio di aneuploidie, spesso anche gravi e tali da indurre aborti spontanei precoci; inoltre aumenta il rischio di malattie connesse alla infertilità-sterilità quali malattie infiammatorie pelviche, patologie tubariche, sviluppo di miomi uterini, endometriosi.

L'invecchiamento degli ovociti è un fattore di sterilità particolarmente rilevante. Gli ovociti di donne non più giovani hanno più spesso anomalie genetiche (cromosomiche) e, se fecondati, possono dare luogo ad embrioni malformati (la percentuale di bambini con Sindrome di Down, ad esempio, è di 1 su 2000 in donne di 20 anni, 1 su 900 in donne di 30 anni, 1 su 350 nelle donne di 35 anni, 1 su 110 nelle donne di 40 anni, 1 su 25 nelle donne di 46 anni), o abortiti spontaneamente (l'abortività è del 18% per le donne tra i 30 e i 39 anni, del 34% per quelle intorno ai 40 anni, contro il 10% delle donne con meno di 30 anni). I fattori che riducono la fertilità sono di ordine sia quantitativo che qualitativo, ci sono meno ovociti e sono di peggiore qualità. Con il tempo, soprattutto intorno ai 38 anni, nelle ovaie restano pochi ovociti, che, in una significativa percentuale di casi, non sono in grado di essere fecondati e/o dare luogo ad un embrione normale.

In genere, ricorrere alla fecondazione assistita in queste situazioni non serve a molto, studi comprovati hanno dimostrato che anche in questo caso, l'età della donna influenza molto le possibilità di successo: le donne pur sottoposte a stimolazione ovarica producono meno ovociti e con aumento delle alterazioni cromosomiche e/o genetiche. La percentuale di successo per ciclo, (intendasi bimbo in braccio) per una donna di più di 40 anni è di conseguenza non più del 5%.

Una ulteriore prova è data dal fatto che la donazione di ovociti da parte di una donna più giovane spesso riporta la fertilità entro la norma di quell'età.

L'età dell'utero, invece, è molto meno importante. Tuttavia, dati statistici mostrano una correlazione tra età dell'utero e incremento della percentuale di aborti spontanei di embrioni cromosomicamente normali e una maggiore incidenza di casi di placenta previa, di difficoltà nel travaglio, di patologie uterine, come polipi all'endometrio e miomi uterini. Sembra esserci anche un aumento delle lesioni sclerotiche nelle arterie uterine, che pur non avendo un impatto diretto sulla fertilità sono correlate a complicanze ostetriche come il

distacco di placenta, espletamento del parto con taglio cesareo, malpresentazione del feto, ecc.

L'età dell'uomo è molto meno significativa. Tuttavia, uomini in età avanzata hanno un eiaculato peggiore sia in termini qualitativi che quantitativi. Gli spermatozoi sono di meno, sono meno mobili, sono più frequenti le anomalie cromosomiche. Un ovocita fecondato da uno spermatozoo non normale, va incontro spesso ad un aborto spontaneo o sarà portatore di malattie genetiche.

Anche la fertilità maschile ha subito, quindi, una significativa riduzione. Secondo molti studi, la percentuale di milioni di spermatozoi per millilitro si sarebbe quasi dimezzata negli ultimi 50 anni. Per questo motivo circa il 35% dei casi di infertilità ha una causa maschile. L'infertilità maschile riconosce sicuramente una grossa componente sociale. Su di essa, infatti, oltre alle condizioni soggettive, chiaramente patologiche, sembrano influire anche le condizioni ambientali e lo stile di vita (incluso lo stress).

Si annoverano come condizioni patologiche che causano sterilità maschile:

- Disturbi della sfera sessuale;
- Alterazioni della qualità del liquido seminale;
- Assenza di spermatozoi nel liquido seminale (azoospermia: ostruttiva o secretiva);
- Difetti genetici alla linea spermatogenetica con conseguenti abortività ripetuta o mancato concepimento;

I disturbi della sfera sessuale comprendono, tra gli altri, l'impotenza, l'eiaculazione precoce, in questi casi il paziente necessita di visite specialistiche urologiche, endocrinologiche ed eventualmente psicologiche, la risoluzione di tali disturbi porta in genere al recupero della fertilità.

Le alterazioni della qualità del liquido seminale riguardano i parametri chimico – fisici del liquido seminale (volume, pH, viscosità) e la componente cellulare,

gli spermatozoi, dell'eiaculato. Le cause dell'alterazione della qualità del liquido seminale sono molteplici:

- utilizzo di farmaci e/o droghe,
- parotite,
- varicocele,
- diabete,
- infezioni delle vie genitali,
- interventi chirurgici,
- criptorchidismo,
- traumi testicolari,
- tumori,
- esposizione a sostanze tossiche,
- eiaculazione retrograda,
- radiazioni,
- stili di vita e abitudini non corrette;

altre volte, invece, non è possibile stabilire una causa evidente.

Le alterazioni dei parametri seminali comprendono la ridotta produzione di spermatozoi da parte del testicolo (oligozoospermia), la ridotta motilità progressiva degli spermatozoi (astenozoospermia) e l'alterata morfologia spermatica (teratozoospermia). Tali alterazioni possono essere di lieve, moderata o elevata entità, e, a seconda della gravità, influiscono più o meno pesantemente sulla fertilità del soggetto.

Le azoospermie, assenza di spermatozoi nell'eiaculato, possono essere di natura secretiva per mancata produzione di spermatozoi da parte del testicolo, o ostruttive; in questi ultimi casi la ricanalizzazione delle vie escrettrici, o il prelievo chirurgico degli spermatozoi dalla sede testicolare può risolvere il problema di sterilità o, per lo meno, permettere il ritrovamento di spermatozoi maturi utilizzabili in tecniche di fecondazione assistita.

I difetti genetici alla linea spermatogenetica comprendono, tra gli altri, le aneuploidie spermatiche, derivanti da alterazioni del processo meiotico della spermiogenesi e che possono essere causate da farmaci chemioterapici o da radioterapia, e le alterazioni dei processi di spermioistogenesi, tra le quali, per esempio, le anomalie nella sostituzione degli istoni con le protamine.

Quest'ultimo aspetto della spermioistogenesi condiziona enormemente l'attività dell'ovocita nella riprogrammazione del genoma paterno, infatti, in seguito alla fecondazione, la cellula uovo matura ristrutturata la cromatina dello spermatozoo, programma sia il DNA paterno che quello materno per un adeguato sviluppo embrionale e dirige infine il processo di singamia dei genomi parentali.

Per apprezzare la rilevanza biologica di questi interventi basta analizzare la tumultuosa serie di modificazioni che subisce la cromatina spermatica nei minuti e nelle ore che seguono la penetrazione nella cellula uovo. Come è noto il DNA spermatico è impacchettato in una forma inerte grazie a specifiche proteine, le protamine, che, per i numerosi ponti disolfuro che sviluppano, compattano la cromatina in una struttura che non si osserva in nessun altro tipo cellulare. Quando lo spermatozoo entra nella cellula uovo e più precisamente nel suo citoplasma i ponti disolfuro, che stabilizzano la cromatina spermatica, vengono rimossi e le protamine vengono sostituite da una complessa serie di istoni fino a costruire una cromatina di tipo somatico.

INTRODUZIONE

APPARATO GENITALE MASCHILE

L'apparato genitale maschile ha l'importante funzione di produrre il liquido seminale contenente gli spermatozoi, che sono le cellule deputate alla riproduzione, conseguentemente il corretto funzionamento di tutte le strutture che lo compongono permette la produzione di un liquido seminale di buona qualità, contenente spermatozoi con buone capacità fecondante. L'apparato genitale maschile è costituito dai testicoli, dalle vie spermatiche, dalle ghiandole annesse e dai genitali esterni.

genitali esterni e le ghiandole annesse, sono organi in comune con l'apparato urinario.

TESTICOLO

Il testicolo, ha la funzione di produrre spermatozoi a partire da cellule germinali immature, ha una forma ovoidale, è contenuto in una borsa detta scroto posta dietro il pene, ed è parzialmente rivestito da una sierosa, la tonaca vaginale propria, che oltre a rivestire il testicolo riveste anche l'epididimo. Sotto la tonaca vaginale si trova la tonaca albuginea, formata da fasci di fibre collagene, che si ispessisce particolarmente nella parte posteriore formando il mediastino. Da quest'ultimo si dipartono una serie di setti che dividono il testicolo in 200-300 spazi, chiamati logge, e sono costituiti da tessuto connettivo lasso che offre sostegno e nutrizione ai tubuli seminiferi contorti e alle cellule interstiziali (endocrine) che sono contenute al loro interno. I tubuli seminiferi contorti sono condotti lunghi 30-100 cm, iniziano a fondo cieco in prossimità della tonaca albuginea, si avvicinano al mediastino e sboccano nella rete testis, formata da un'insieme di canalicoli intercomunicanti situati nello spessore del mediastino. I tubuli seminiferi sono costituiti da un epitelio germinativo pluristratificato, che poggia su una sottile tonaca propria la quale è racchiusa da una membrana

basale, sono costituiti inoltre dalle cellule del Sertoli, cellule di sostegno, e dalle cellule di Leydig, cellule endocrine. Nell'epitelio germinativo pluristratificato i vari strati cellulari corrispondono ai vari stadi di sviluppo delle cellule germinali, dalla parte basale verso il lume dei tubuli seminiferi si trovano cellule ad uno strato di maturazione sempre maggiore, spermatogoni staminali, spermatogoni di tipo A, spermatogoni di tipo B, spermatociti I, spermatociti II, spermatidi e infine gli spermatozoi maturi in corrispondenza del lume dei tubuli. Le cellule del Sertoli sono grandi cellule di forma triangolare con la base poggiante sulla membrana basale e l'apice rivolto verso il lume del tubulo, sono dotate di un complicato sistema di prolungamenti che avvolgono le cellule germinali fino agli stadi finali della spermatogenesi; gli spermatogoni poggiano, invece, direttamente sulla membrana basale. Le cellule del Sertoli sono unite tra loro da giunzioni specializzate, dette giunzioni serrate, che determinano la formazione di un anello attorno al lume del tubulo seminifero con la funzione di accogliere le cellule spermatogenetiche nei loro diversi stadi di differenziazione. Compito delle cellule del Sertoli è quello di formare la barriera emato-testicolare che impedisce l'entrata, o anche l'uscita di sostanze tossiche dal lume dei tubuli seminiferi. Questa barriera serve ad impedire l'entrata di ioni, proteine, o farmaci che potrebbero influenzare in modo negativo la spermatogenesi. Allo stesso tempo la barriera emato-testicolare impedisce il contatto sangue-spermatozoi che stimolerebbe la produzione di anticorpi anti spermatozoo. Il secreto delle cellule del Sertoli ha due funzioni particolarmente importanti, quella di fornire nutrimento alle cellule germinali per la maturazione degli spermatozoi, e quella, non meno importante, di permettere il trasporto degli spermatozoi maturi dai tubuli seminiferi verso l'epididimo. Altra funzione delle cellule del Sertoli è quella di fagocitare le cellule danneggiate che si trovano nei tubuli.

Le cellule del Leydig, contenute nella ghiandola interstiziale del testicolo sono deputate alla produzione di ormoni steroidei sotto stimolazione dell'ormone

ipofisario LH. Gli ormoni prodotti da queste cellule sono il Testosterone e l'Androstenedione, che stimolano la spermatogenesi e determinano la comparsa dei caratteri sessuali secondari.

VIE SPERMATICHE

Le vie spermatiche sono costituite da un'insieme di condotti che portano gli spermatozoi dal testicolo all'uretra e sono rappresentate da: tubuli seminiferi retti, rete testis, canale dell'epididimo, dotto deferente e condottini eiaculatori.

L'*Epilidimo* è un organo di circa 5 cm che poggia sulla parte superiore del testicolo formato da testa, corpo, coda, e da un canale, avvolto su se stesso, lungo 5-6 m costituito da una tonaca muscolare e da cellule ciliate deputate alla secrezione del fluido epididimale. Ha la funzione di completare la maturazione degli spermatozoi e di conservarli fino al momento dell'eiaculazione.

Il *Canale dell'Epilidimo*, può essere diviso in 4 parti: testicolare, funicolare, inguinale e addominopelvica; grazie ai fasci di cellule muscolari lisce, ha la funzione di spingere gli spermatozoi verso il tratto successivo, cioè nel dotto deferente. L'ultima porzione si dilata nell'ampolla deferenziale che, a livello della base della prostata, dà origine al *Condottino Eiaculatore*, lungo circa 2 cm e che attraversa il parenchima della prostata sboccando nell'uretra prostatica. Il *Funicolo Spermatico* è invece un cordone che costituisce un mezzo di sostegno per il testicolo dentro lo scroto.

GHIANDOLE ANNESSE

Oltre agli organi principali sono presenti delle ghiandole annesse: la prostata, le vescichette seminali e le ghiandole bulbo uretrali.

La *Prostata* è una ghiandola situata sotto la vescica, ha la forma di una castagna di circa 4 cm di diametro ed è costituita da una parte ghiandolare e da una parte fibro-muscolare. La componente ghiandolare comprende circa 30 ghiandole con la funzione di produrre un secreto contenente numerosi enzimi quali, ad

esempio, la fosfatasi acida e le prostaglandine, ma anche zinco, acido citrico; il secreto prostatico costituisce circa il 30% del volume del liquido seminale. La secrezione è sierosa, di tipo lattescente a pH debolmente acido (pH = 6), ma rispetto alle secrezioni vaginali è più basica e grazie all'apporto di Albumina determina un miglioramento della motilità spermatica. L'eliminazione del liquido seminale dalla prostata è regolata da un complesso sistema di valvole costituite dalla componente fibro-muscolare. Durante l'eiaculazione si ha l'apertura di una valvola nella prostata che consente l'espulsione del liquido seminale nell'uretra, mentre uno sfintere prostatico si contrae ed impedisce il passaggio dell'urina.

Le *Vescichette Seminali* sono poste tra la vescica e la parte anteriore del retto, hanno una grandezza di circa 5-6 cm e secernono proteine, fruttosio, acido citrico e prostaglandine, il secreto ha, nel complesso, un pH debolmente basico. Le prostaglandine, servono a stimolare le contrazioni uterine in modo da favorire la risalita degli spermatozoi nell'apparato riproduttivo femminile in seguito all'eiaculazione. Tutti gli altri nutrienti del secreto, invece, servono a fornire energia agli spermatozoi dopo l'eiaculazione.

Le *Ghiandole Bulbouretrali* localizzate ai lati dell'uretra, sono deputate alla secrezione di un liquido chiaro e viscoso, dal pH debolmente basico, che si unisce al liquido seminale già formato e che serve a neutralizzare l'acidità dell'uretra e a lubrificarne il lume.

ORGANI GENITALI ESTERNI

Gli organi genitali esterni hanno la funzione particolarmente importante di portare all'esterno il liquido seminale, contenente gli spermatozoi, ed immetterlo nelle vie genitali femminili per permettere l'incontro con l'ovocita e quindi la fecondazione; gli organi che li costituiscono sono lo scroto e il pene.

Lo *Scroto* serve a contenere il testicolo, l'epididimo e la parte iniziale del dotto deferente, è costituito da 6 tonache di cui la più esterna è la cute, sotto la cute

spostandoci verso l'interno troviamo la tonaca dartos, la fascia cremasterica, il muscolo cremastere, la tonaca vaginale comune e infine la tonaca vaginale propria. Questo organo è diviso in 2 metà da un setto sagittale dove, tranne la cute, troviamo gli stessi strati.

Il *Pene* è formato da una radice situata sotto il diaframma urogenitale e costituita dalle radici dei corpi cavernosi del pene, dell'uretra e dai muscoli bulbocavernoso e ischiocavernoso. Il corpo del pene si restringe verso l'apice mentre il corpo cavernoso dell'uretra si dilata per formare il glande, il quale è ricoperto da prepuzio, un involucre cutaneo che può scorrere sul glande in quanto trattenuto solo da un frenulo.

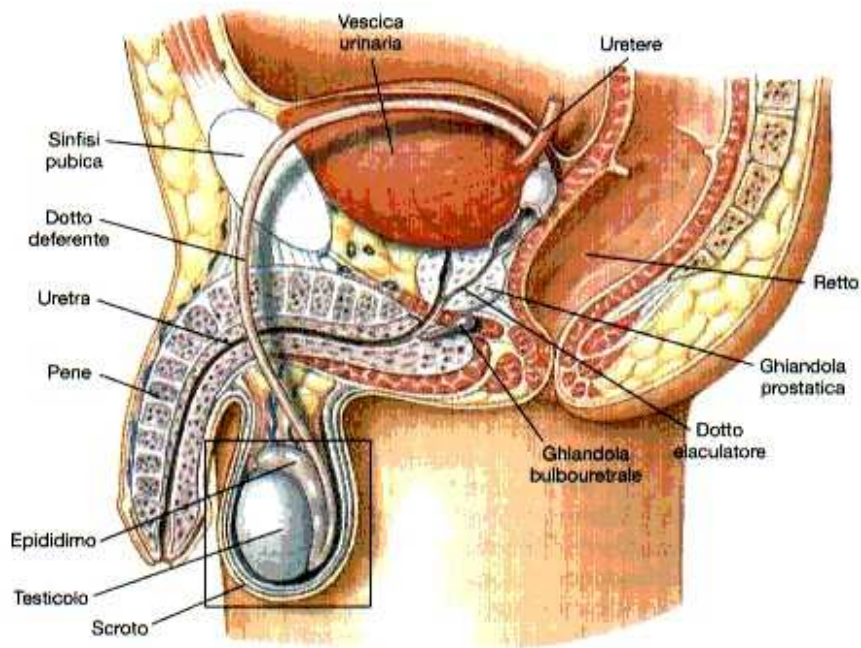


Figura 1- Sezione longitudinale del bacino maschile

SPERMATOGENESI

Intorno alla quarta settimana dello sviluppo fetale, le cellule germinali primordiali, i protogoni, raggiungono la gonade che si sta abbozzando dove subiscono numerose mitosi e acquisiscono i caratteri di prospermatogoni, mentre le cellule di sostegno, di dimensioni più piccole, diventeranno le cellule del Sertoli. Negli ultimi mesi dello sviluppo fetale le cellule germinali e le cellule di

sostegno aumentano di numero e subiscono delle modificazioni morfologiche, il processo di modificazione si interrompe per riprendere nuovamente durante la pubertà, che segna l'inizio della spermatogenesi. La spermiogenesi porta alla formazione di cellule specializzate, gli spermatozoi, a partire da cellule germinali immature, avviene nel testicolo all'interno dei tubuli seminiferi dove si trovano le cellule germinali disposte in modo centripeto verso il lume del tubulo in differenti stadi di maturazione. La spermiogenesi è un processo che dura diverse settimane e può essere suddiviso in 3 fasi : fase mitotica, fase meiotica, fase spermiogenetica. La fase mitotica dura da 8 a 10 giorni, in questa fase gli spermatogoni staminali dotati di una capacità indefinita di dividersi, danno origine sia ad altri spermatogoni staminali, mantenendone così il numero sempre costante, sia a spermatogoni di tipo A. La mitosi comprende solo una piccola parte del ciclo cellulare che è diviso in interfase, e fase mitotica. L'interfase comprende la fase S, in cui avviene la sintesi del DNA, ed è preceduta e seguita da due fasi non sintetiche denominate G1 e G2; nella fase G1 che segue la mitosi, si ha la sintesi di RNA e proteine per ripristinare il volume proprio della cellula madre, mentre nella fase G2 si hanno processi metabolici che preparano la cellula alla divisione cellulare. La fase M in cui avviene la divisione cellulare si divide in 4 stadi: profase, metafase, anafase, telofase. Durante la profase il DNA, disperso nel nucleo sotto forma di eucromatina, si spiralizza a formare i cromosomi che si accostano alla membrana nucleare lasciando la parte centrale vuota, e contemporaneamente si organizza l'apparato mitotico. Prima di passare alla metafase si ha una pro-metafase, che segna la fine della profase, in cui l'involucro si frammenta ed entra a far parte del sistema membranoso del citoplasma. Nella metafase i cromosomi si dispongono sul piano equatoriale a formare la piastra Equatoriale ed entrano in rapporto con le fibre del fuso. Nella fase successiva i cromatidi fratelli di ogni cromosoma si separano migrando verso i poli opposti della cellula con un evento sincrono in tutti i cromosomi. Nell'ultima fase si

verificano degli eventi in direzione opposta a quelli della profase; i cromosomi si despiralizzano (passaggio da etero cromatina ad eucromatina), e attorno ai due nuclei delle cellule figlie si ricostituisce l'involucro nucleare nel quale successivamente si differenziano i pori. Contemporaneamente agli eventi che interessano il nucleo si ha la citodieresi durante la quale tutti i componenti citoplasmatici si distribuiscono tra le due cellule figlie; al centro della cellula compare un solco che man mano si restringe fino a dividere in due la cellula. Nel processo di formazione degli spermatozoi l'ultima fase della mitosi, la citodieresi, non viene completata ma rimane un ponte citoplasmatico tra le cellule, questo si mantiene fino alla fine della spermatogenesi e fa sì che gli spermatozoi si sviluppino in modo sincronizzato. Dagli spermatogoni di tipo A mediante un altro ciclo di mitosi prendono origine gli spermatogoni di tipo B, e da questi, prima di iniziare la fase meiotica, originano gli spermatociti I. Questo evento segna l'inizio della fase meiotica che dura dai 13 ai 18 giorni. La meiosi, diversamente dalla mitosi, è un processo di divisione cellulare che riduce il corredo cromosomico a metà, consta di due divisioni successive di cui la prima di tipo riduzionale e la seconda di tipo equazionale. Ciascuna delle due divisioni si suddivide in 4 fasi che, così come per la mitosi, sono: profase I/II, metafase I/II, anafase I/II e telofase I/II. A differenza della mitosi la profase I viene divisa in ulteriori sottofasi che prendono il nome di: leptotene, zigotene, pachitene, diplotene e diacinesi. In leptotene i cromosomi cominciano a spiralizzarsi, assumono un aspetto filamentoso e sono rivolti con i telomeri verso l'involucro nucleare. In zigotene i cromosomi omologhi si appaiano a partire dai telomeri, come se ci fosse una cerniera, e nella fase successiva di pachitene i cromosomi appaiati si scambiano tratti di DNA, per garantire la variabilità genetica, attraverso il meccanismo del crossing-over. In diplotene i cromosomi omologhi cominciano a respingersi e a separarsi, ma rimangono uniti tra loro in corrispondenza dei punti in cui è avvenuto lo scambio assumendo una forma di croce che prende il nome di "chiasma". L'ultima fase della profase I è la

diacinesi in cui i chiasmi si spostano verso la zona terminale dei cromosomi, il nucleolo e l'involucro nucleare scompaiono e inizia la metafase I, durante questa fase i cromosomi si dispongono lungo la regione equatoriale del fuso per migrare, nella fase successiva, verso i poli opposti della cellula. Infine, nella telofase, si riorganizza l'involucro nucleare e compare il setto tra le due cellule figlie, originano in questo modo gli spermatociti II. Dagli spermatociti II, mediante la seconda divisione meiotica, che ripercorre le stesse tappe della mitosi, originano gli spermatidi che, dopo aver concluso la meiosi, hanno un nucleo sferico con la cromatina finemente dispersa e dei piccoli cromocentri.

Terminata la fase meiotica si ha la fase spermiogenetica, detta anche spermioistogenesi, con una durata di circa 22 giorni, che porta alla maturazione degli spermatozoi.

La spermioistogenesi viene suddivisa in 4 fasi: fase del Golgi, fase del cappuccio, fase acrosomale e fase di maturazione. Durante la fase del Golgi all'interno del complesso di Golgi si ha la comparsa di granuli proacrosomali, che, confluendo tra loro, formano un singolo granulo acrosomico avvolto da una membrana che si addossa alla membrana nucleare. Nella fase del cappuccio la vescicola acrosomica si ingrandisce e ricopre circa i 2/3 del nucleo formando così il cappuccio acrosomico. I due centrioli migrano al polo opposto rispetto al nucleo e costituiscono il centriolo prossimale e quello distale, da quest'ultimo prenderà origine il flagello.

Nella fase acrosomale, si hanno modificazioni dell'acrosoma, del nucleo e del flagello. Il nucleo si allunga e si sposta verso la periferia, la cromatina presente al suo interno si condensa e diventa inattiva; l'acrosoma si adatta alla superficie del nucleo e il citoplasma si allunga verso il polo posteriore del nucleo e va ad avvolgere la parte prossimale del flagello. Nella fase di maturazione si forma il segmento di connessione tra il nucleo e il flagello e i mitocondri si dispongono spirale intorno alla porzione prossimale del flagello. Terminata la spermiogenesi si interrompono i ponti citoplasmatici tra le cellule e si formano

così i corpi residuali attraverso cui viene eliminato più del 70% del citoplasma che verrà fagocitato dalle cellule del Sertoli; in questo modo si ottengono spermatozoi liberi che vengono liberati nel lume del tubulo seminifero.

La spermatogenesi si completa nell'epididimo, qui lo spermatozoo completa la sua maturazione. L'attraversamento nell'epididimo dura 12 giorni, in questa fase gli spermatozoi acquisiscono sia la Motilità che la capacità Fecondante.

La maturazione comporta :

1. Aggiunta di colesterolo che stabilizza la membrana
2. Modificazione dei domini di superficie
3. Il legame di proteine alla superficie dello spermatozoo
4. Acquisizione di cariche negative di superficie, mediante Sialil – Transferasi; ciò determina che gli spermatozoi si respingano l'un l'altro.

COMPATTAZIONE DEL DNA

Nelle cellule somatiche il DNA è impaccato nei nucleosomi costituiti da un core di 8 proteine istoniche (istoni), ed è avvolto attorno al core nucleosomico (DNA core), il DNA che si trova tra un nucleosoma ed un altro prende il nome di DNA linker. Il DNA core ha una lunghezza sempre costante, 147 bp, il DNA linker può avere una lunghezza variabile.

Gli istoni presenti nelle cellule somatiche sono di 5 tipi : H1, H2A, H2B, H3, H4, di questi, gli istoni H2A, H2B, H3 e H4 fanno parte del core nucleosomico, mentre l'istone H1 si lega al DNA linker. Gli istoni del core, che sono presenti in duplice copia in ogni nucleosoma per formare l'ottamero istonico, sono quantitativamente il doppio dell'istone H1, presente in singola copia in ogni nucleosoma. La formazione del core nucleosomico avviene in maniera ordinata solo in presenza del DNA; inizialmente si forma il tetramero formato dagli istoni H3-H4 associato al DNA, successivamente si formano i due dimeri costituiti da H2A-H2B i quali si uniscono al tetramero precedentemente formato per

completare l'ottamero. A nucleosoma assemblato l'istone H1 interagisce con il DNA linker facendo sì che questo stia maggiormente adeso al core.

Il processo di assemblaggio dei nucleosomi avviene immediatamente dopo la replicazione del DNA, le due molecole di DNA figlie saranno impacchettate con nuovi e vecchi istoni. La presenza degli istoni di origine parentale, che hanno subito delle modificazioni ad opera di enzimi specifici, permette di avere anche sugli istoni di nuova sintesi, le stesse modificazioni di quelli parentali. Le modificazioni a carico degli istoni avvengono principalmente sulle lisine e sulle serine delle code N-terminali degli istoni nucleosomici e possono essere delle metilazioni, acetilazioni, e fosforilazioni operate da specifici enzimi che prendono il nome rispettivamente di metil transferasi, acetil transferasi e fosforilasi. I vari tipi di modificazioni formano un codice che viene letto da proteine coinvolte nell'espressione genica e in altre reazioni che riguardano il DNA.

Nel processo di spermiogenesi, durante la fase acrosomiale, gli istoni sono sostituiti con le nucleo-protamine, mediante un processo multi-step.

Il primo step avviene negli spermatidi rotondi e porta alla sostituzione degli istoni con proteine nucleari di transizione TP1 e TP2; successivamente, negli spermatidi allungati, le proteine di transizione TP1 e TP2 vengono sostituite dalle Protamine, piccole proteine basiche ricche di Arginina e Cisteina. Nell'uomo le protamine spermatiche sono di due tipi, protamina-1 (P1) e protamina-2 (P2), i cui geni sono presenti in singola copia nel genoma aploide, localizzati nel cromosoma 16. Sia la protamina P1 che la protamina P2 si legano al DNA in un rapporto ben determinato P1 / P2 (1.06 ± 0.01 con un range di 0.75-1.26), con concentrazione di P1 pari a $538.7 \pm 28.6 \text{ ng}/10^6 \text{ sperm}$ e di P2 pari a $515.4 \pm 21.1 \text{ ng}/10^6 \text{ sperm}$ (6).

Dallo studio di Aoki, Liu, e Carrel si è constatato che un elevato rapporto P1 / P2 è correlato con l'infertilità maschile; l'aumento del rapporto P1 / P2,

osservato nei maschi infertili oggetto dello studio, è risultato derivante da una diminuzione dell'espressione di P2.

Grazie alla sostituzione degli istoni con le protamine, il DNA dello sperma risulta essere almeno 6 volte più condensato rispetto al DNA dei cromosomi mitotici, generando un nucleo più compatto e idrodinamico. Lo spermatozoo con il nucleo più idrodinamico può muoversi più velocemente, e sarà capace di fecondare l'ovocita per primo. La sostituzione degli istoni con le protamine garantisce inoltre la protezione del messaggio genetico paterno portato dagli spermatozoi rendendolo inaccessibile alle nucleasi o a potenziali agenti mutageni presenti nell'ambiente esterno. L'elevato contenuto di cisteina delle protamine consente la formazione di ponti disolfato che danno al nucleo una stabilità più elevata, conferendone un aspetto cheratinoide (6).

SCOPO DEL LAVORO

Lo spermogramma è un'indagine diagnostica utile e non invasiva nella determinazione della qualità del liquido seminale, viene routinariamente eseguito nei pazienti che si rivolgono ai centri di Diagnosi e Cura della Sterilità.

L'esame seminologico standard contempla la valutazione delle caratteristiche chimico-fisiche, della conta spermatica, della motilità e della morfologia spermatica.

Oggetto del presente lavoro, è stato quello di aggiungere, all'esame seminologico standard, un test specifico per la valutazione del grado di condensazione cromatinica degli spermatozoi in coppie infertili al fine di ipotizzare una associazione tra alterata condensazione cromatinica degli spermatozoi con alterata morfologia spermatica, oppure, in generale, con l'infertilità maschile.

MATERIALI E METODI

ESAME DEL LIQUIDO SEMINALE (SPERMIOGRAMMA)

Lo spermioγραμμα è un esame fondamentale, insieme ad altri esami specifici per la donna, nello studio dell'infertilità di coppia.

Ai pazienti che, nel periodo dal 1 luglio 2007 al 25 gennaio 2008, sono giunti al centro di Cura e Diagnosi della Sterilità di Ragusa, e che sono stati inseriti in un programma di studio dell'infertilità di coppia, in occasione dell'esecuzione dello spermioγραμμα, abbiamo effettuato, sempre sul campione seminale, un test di verifica della condensazione cromatinica (DECON TEST) al fine correlare i parametri seminali, e l'eventuale condizione di infertilità maschile, al livello di condensazione nucleare degli spermatozoi.

L'esecuzione di uno spermioγραμμα implica l'attuazione di alcuni accorgimenti che sono importanti per non inficiare l'esito dell'esame stesso. Il paziente va istruito sulle modalità di raccolta del campione e deve rispettare un numero di giorni di astinenza, compreso tra 2 e 7 giorni secondo il manuale WHO del 2000; il prelievo deve essere fatto esclusivamente per masturbazione usando per la raccolta un contenitore sterile per le urine. È preferibile che il paziente effettui il prelievo in laboratorio per assicurare la rapidità e l'immediatezza della consegna e quindi dell'esame. Nel caso in cui per particolari condizioni, di tipo organizzativo o emotivo, il paziente non può effettuare il prelievo in laboratorio, è indispensabile che la consegna del campione avvenga entro 30 – 60 minuti e che il campione sia mantenuto in posizione verticale per evitarne la fuoriuscita e protetto da eccessivi sbalzi di temperatura, tra i +20°C e i +37°C. Alla consegna del campione, e prima di iniziare l'esecuzione dell'esame, si raccolgono i dati anagrafici (giorni di astinenza e l'ora della produzione del campione) e si effettua l'anamnesi riguardante le abitudini di vita (fumo, alcolici, sport, sostanze voluttuarie), le patologie avute dal paziente e le terapie eseguite nel

periodo precedente l'esame e che potrebbero giustificare il ritrovamento di particolari parametri seminali.

Un'aliquota del campione seminale viene inviato al laboratorio di microbiologia per l'esecuzione della spermicoltura, subito dopo il campione viene posto in termostato a +37°C per 15-30 minuti affinché si completi la liquefazione. Si controlla il volume, che deve essere compreso tra 2 ml e 6 ml, il pH che deve essere compreso tra 7.2 e 8, e il colore, che in condizioni fisiologiche è avorio opalescente, mentre in condizioni patologiche può diventare di colore biancastro, giallastro, o ematico (in presenza di emazie). Si controlla la liquefazione, in un tempo che va dai 30 ai 60 minuti circa dall'eiaculazione; questa è definita completa se, facendo colare il liquido seminale da una pipetta questo si stacca a gocce, incompleta se sono presenti filanza o corpi gelatinosi. Terminata questa prima fase in cui vengono analizzate le caratteristiche chimico-fisiche del liquido seminale, si passa all'osservazione microscopica che permette di effettuare una valutazione sul numero degli spermatozoi, sulla loro motilità, e sulla loro morfologia.

Si prepara un vetrino per la prima osservazione, si pongono 10 µl di campione su un vetrino portaoggetto e si coprono con un vetrino coprioggetto da 22x22 mm, si osserva al microscopio con obiettivo 10x e successivamente 40x, e si fa una prima stima dei parametri del campione seminale. La conta degli spermatozoi viene fatta con la camera di Makler, questa consta di una base di vetro su cui si depongono 10 µl di campione e da un coprioggetto che contiene una griglia che permette la conta degli spermatozoi. Viene fatta l'osservazione al microscopio con obiettivo 10x, si distinguono gli spermatozoi mobili progressivi, veloci e lenti, quelli mobili non progressivi, e gli immobili; si contano infine le cellule rotonde che saranno successivamente distinte in infiammatorie o germinali.

Per quanto concerne il numero di spermatozoi, in un campione seminale, si definisce normale la presenza di almeno 20 milioni di spermatozoi per ml di

eiaculato (WHO, 1999); per quanto concerne la motilità, si ritiene normale un campione in cui la frazione di spermatozoi mobili progressivi veloci (tipo a) è maggiore del 25% del totale, o in cui la somma delle frazioni di spermatozoi mobili rettilinei veloci e lenti (a+b) è superiore al 50% del totale della popolazione.

Per l'osservazione della morfologia si preparano dei vetrini sgrassati con alcool, si effettua uno striscio di 10 μ l di campione seminale, lasciano asciugare all'aria, si fissano e si colorano utilizzando la colorazione di Diff-Quick. Tale protocollo prevede un passaggio di fissativo per 5s e due successive colorazioni, ognuna di 5s, con un colorante basofilo e uno acidofilo in sequenza.

Si effettua l'osservazione di almeno 200 spermatozoi al microscopio, con obiettivo 100x ad immersione, e dai parametri del WHO 1999 uno spermatozoo normoconformato deve possedere una testa di forma ovoidale, con l'acrosoma che occupa il 40%-70% della dimensione della stessa, non deve presentare vacuoli e deve avere una lunghezza compresa tra 4,0-5,0 μ m e una larghezza compresa tra 2,5-3,5 μ m; il collo deve misurare una volta e mezzo la lunghezza della testa e deve essere congiunto ad essa in modo assiale, la coda deve essere diritta, non arrotolata, uniforme e più sottile del tratto intermedio e deve essere lunga approssimativamente 45 μ m.

Affinché uno spermatozoo possa essere considerato normale deve avere la testa, il collo e la coda normali.

Le anomalie degli spermatozoi vengono classificate come: 1) anomalie della testa: tutti quegli spermatozoi che presentano teste allungate, piriformi, rotonde, amorfe, vacuolate, o con acrosoma piccolo; 2) anomalie del collo e del tratto intermedio: spermatozoi con collo angolato, inserzione asimmetrica, collo ispessito o assottigliato, presenza di residuo citoplasmatico; 3) anomalie della coda: spermatozoi con coda corta, piegata, o avvolta. Qualsiasi spermatozoo che abbia almeno una di queste anomalie viene considerato anomalo.

Si definisce normale un campione che presenta almeno il 30% di spermatozoi normoconformati (WHO, 1999).

Qualora dall'osservazione della motilità spermatica si evinca che il numero di spermatozoi immobili è particolarmente elevato si esegue il *test di vitalità*. Si mettono 100 µl di seme in una provetta, si aggiungono 200 µl di eosina e, dopo aver aspettato per 30 secondi, vengono aggiunti 300 µl di nigrosina; si strisciano i vetrini con 10 µl e si lasciano asciugare. Si osservano i vetrini al microscopio con obiettivo 100x ad immersione, si contano 200 spermatozoi; gli spermatozoi vivi appaiono non colorati, in quanto la membrana cellulare intatta non permette l'ingresso del colorante, e spiccano sul fondo scuro del vetrino, quelli morti sono colorati in rosa.

Si definisce normale un campione che presenta almeno il 70% di spermatozoi vitali (WHO, 1999).

Al fine di valutare il grado di maturazione nucleare degli spermatozoi, ed in particolare mettere in evidenza il processo di condensazione nel nucleo dello spermatozoo abbiamo effettuato, sui campioni di liquido seminale in esame, il DECON TEST.

A liquefazione avvenuta, si prende un'aliquota di 300 – 400 µl di seme, si mette in una provetta conica e si aggiungono 4 – 5 ml di soluzione fisiologica 0.9 %, si centrifuga per 10 minuti a 1200 rpm. Dopo aver centrifugato si elimina il surnatante e si risospende il pellet in 100 µl di soluzione fisiologica e si aggiungono 1 ml di soluzione Decon Test.

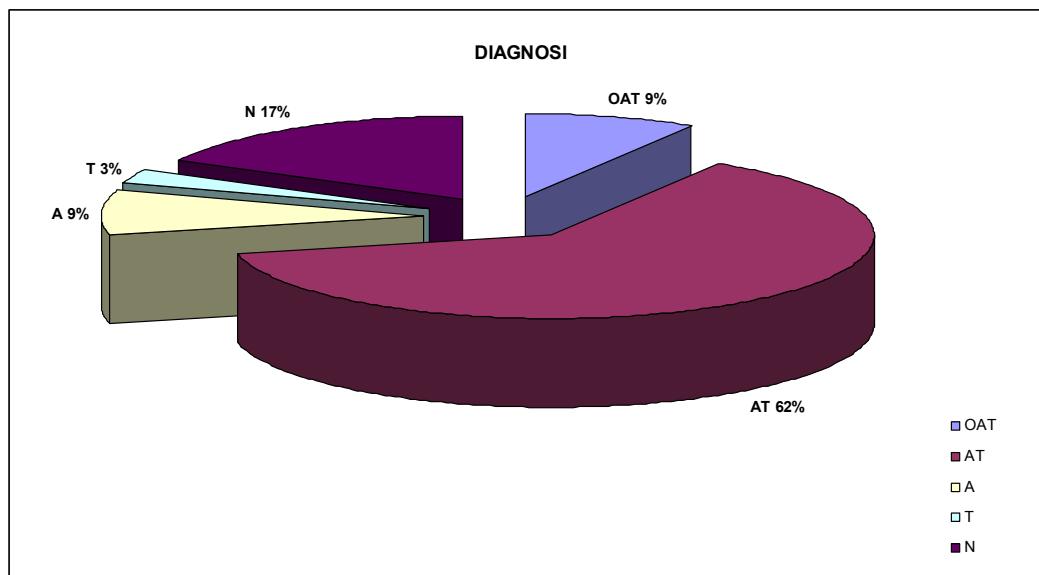
Il campione va incubato per 15 minuti a 37 °C e, nel frattempo si preparano i vetrini per effettuare l'osservazione. I vetrini vengono sgrassati con alcool, si depongono 10 µl di campione trattato, si effettua lo striscio, si lascia asciugare, si fissa e infine si colora con Giemsa. A questo punto i vetrini sono pronti per essere osservati con l'obiettivo ad immersione 100x.

Questo test permette la distinzione degli spermatozoi in cui la cromatina è correttamente condensata, in cui si vede il nucleo ben colorato e ben distinto dall'acrosoma, che rimane molto chiaro, quasi trasparente, dagli spermatozoi in cui invece il nucleo non è ben compattato, in questi casi la testa dello spermatozoo appare molto ingrossata e colorata in modo uniforme senza distinzione tra nucleo e acrosoma. Si definisce normale un campione con almeno il 50% di spermatozoi con condensazione corretta della cromatina (FONTE BIBLIOGRAFICA KIT).

RISULTATI

Nel periodo di svolgimento della presente tesi, sono stati inseriti nello studio 35 pazienti provenienti da coppie con problemi di fertilità; di questi pazienti 6 sono risultati normozoospermici e 29 con alterazioni variamente associate dei parametri seminali, e precisamente:

DIAGNOSI	N°
OAT (oligoastenoteratozoospermici)	3
AT (astenoteratozoospermici)	22
OT (oligoteratozoospermici)	0
OA (oligoastenozoospermici)	0
A (astenozoospermici)	3
T (teratozoospermici)	1
O (oligozoospermici)	0
Totali	29



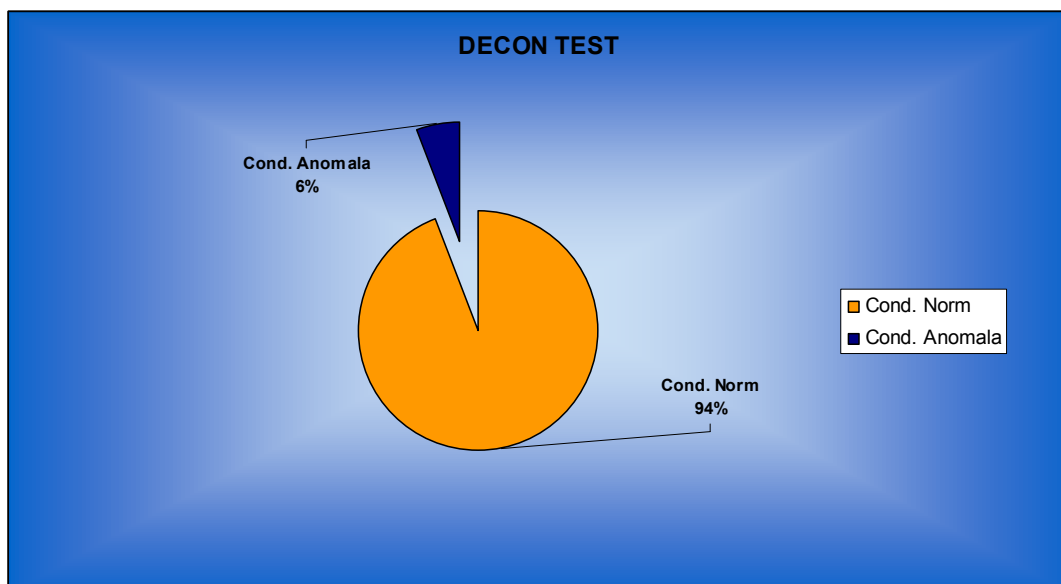
RISULTATI

	Professione	Età	Anamnesi Patologica	Fattori di Rischio	Volume ml	pH	Numero milion/ml	Motilità		Morf. % normali	% di spermatozoi		Diagnosi
								% a+b	% c		normali	normali	
1	Studente	21	varicocele 2 grado		1,5	7,8	172	30	52	14	42	AT	
2	Grafico	27			2,5	8,1	240	51	40	35	79	N	
3	Commerciante	45	epatite A	fumo	3	8	120	10	50	14	48	AT	
4	Impiegato	35	prostatite cronica		1,5	8	50	2	18	8	89	AT	
5	Perito Elettronico	48	HCV regressa	fumo	3	8	29	11	34	30	85	A	
6	Commerciante	32		bicicletta	6	8	8	31	31	14	75,4	OAT	
7	Impiegato	40			3	8	81	4	15	13	89,4	AT	
	Bracciante												
8	Agricolo	35		lavoro in serra	1,5	8,2	23	15	30	6	91,5	AT	
9	Commerciante	34	ernia inguinale	Fitofarmaci	2,5	7,8	49	10	59	3	88	AT	
10	Magazziniere	20	Varicocele	fumo	1,5	8	59	29	41	38	80,7	A	
11	Operaio	28			4	7,8	80	52	27	35	83	N	
12	Impiegato	33			2	8,2	129	45	29	32	89,6	A	
13	Impiegato	41			2,5	7,8	29	14	27	13	90	AT	
14	Studente	29			3	8	52	55	25	30	68	N	
15	Studente	18	Varicocele		3,5	7,6	46	45	22	23	76,5	AT	
16	Agente P.S	39	HCV		4,5	8,2	98	12	63	8	92	AT	
17	Impiegato	40			2,5	8	35	1	13	10	87,8	AT	
18	Agente PS	28			3,5	8	55	15	55	9	78,8	AT	
19	Commerciante	31			2,5	8	3,3	30	33	10	80	OAT	
20	Commerciante	34			1	8,2	190	19	28	7	86,6	AT	
21	Impiegato	40			4	8	150	56	33	34	79	N	
22	Impiegato	41			5,5	8	113	26	42	9	80,7	AT	
23	Impiegato	36			4	8	38,4	10	27	5	76	AT	
24	Impiegato	41	Ernia inguinale		4	8	112	8	74	25	73,5	AT	

	Professione	Età	Anamnesi Patologica	Fattori di Rischio	Volume	pH	Numero	Motilità		Morf.	Decon Test	Diagnosi
25	Geometra	32			5	7,8	120	57	28	36	88	N
26	Fabbro	33	varicocele	fumo	3	8	42,6	3	57	16	75	AT
27	Grafico	32	Varicocele		2	8	49	28	41	20	81,6	AT
28	Imprenditore Edile	34	varicocele		3	7,8	58	35	48	11	75,7	T
29	Consulente	31		fumo	3,5	8	25	14	50	2	89,6	AT
30	Bracciante agricolo	35		sostanze tossiche	3	7,8	71	6	47	5	91	AT
31	Impiegato	46			3,5	7,6	35	40	30	23	83	AT
32	Geometra	33		fumo	2,2	8	29	22	45	4	85,7	AT
33	Commerciante	30	Varicocele		3	8	26	25	50	12	83,2	AT
34	Parrucchiere	42		prodotti chimici	2,2	8,5	5,5	13	58	7	80,4	OAT
35	Impiegato	35			3	7,8	48	52	30	32	90	N

Applicando il test di decondensazione ai liquidi seminali campionati e fissando, come da indicazioni della ditta produttrice del kit diagnostico, valori normali per percentuali di spermatozoi correttamente condensati superiori al 50%, abbiamo riscontrato i seguenti risultati:

RISULTATI DECON TEST (V.N. >50%)	N°
CONDENSAZIONE CORRETTA	33
CONDENSAZIONE NON CORRETTA	2
TOTALI	35



n° paziente	Età	Volume	pH	Numero	Motilità	Morf.	Decon Test	Diagnosi
		ml		mil./ml	A+B%	% normali	% normali	
1	21	1,5	7,8	172	30	14	42	AT
3	45	3	8	120	10	14	48	AT
9	34	2,5	7,8	49	10	3	88	AT
29	31	3,5	8	25	14	2	89,6	AT
11	28	4	7,8	80	52	35	83	N
21	40	4	8	150	56	34	79	N

Dall'analisi dei dati su riportati si potrebbe pensare di associare una anomala condensazione cromatinica a parametri seminali alterati (teratozoospermia), ma si evidenzia, in campioni con altrettante alterazioni seminali, una percentuale di condensazione corretta e sovrapponibile ai campioni normali.

Sottoponiamo i dati ottenuti ad un test di significatività statistica, includendo nell'analisi i liquidi seminali presentanti teratozoospermia (Percentuale di Spz. morfologicamente normali < 30%), e ipotizzando:

H_0 (absurdo): spermatozoi con nucleo decondensato sono associati ad una buona morfologia.

$$\alpha = 5\% = 0,05$$

Tabella Pivot			
Condizione	Condensazione buona	Condensazione anomala	Totale complessivo
Morf. Norm.	9	0	9
Morf. Anorm.	24	2	26
Totale complessivo	33	2	35

Avendo dati qualitativi nominali applichiamo test χ^2 ottenendo:

- P value = 0,98

Essendo $P > \alpha$, non si rifiuta H_0 , quindi: test non significativo.

Per il limitato numero di dati si applica anche il test esatto di Fisher ottenendo P value = 1 confermando la non significatività del test.

CONCLUSIONI

L'ipotesi di una associazione tra alterazioni nella morfologia spermatozoaria ed inadeguata condensazione cromatinica non è stata confermata dalla significatività dei tests statistici applicati al presente lavoro.

Tale conclusione è molto probabilmente da attribuirre alla inadeguatezza della dimensione campionaria, ma si può supporre anche che i due aspetti siano non associati o che, nei difetti della spermioistogenesi, intervengano altre variabili.

BIBLIOGRAFIA

1. Anatomia dell'uomo - di Paolo Castano e Rosario F. Donato
2. Istituto Superiore di Sanità
3. Fisiologia generale e umana – di R. Rhoades e R. Pflanzner
4. Istologia di Monesi – v edizione – Piccin. Di S. Adamo, P. Carinci, M. Molinaro, G. Siracusa, M. Stefanini e E. Ziparo
5. Gametes – The Spermatozoon – di C.L.R. Barrat
6. Biologia molecolare del Gene - di James D. Watson
7. Identification and evaluation of a novel sperm protamine abnormality in a population of infertile males – di Vincent W. Aoki, *at al*2005
8. Manuale WHO esame seminale 2001
9. Protamines and male infertility – Raffael Oliva, 2006
10. Chromatin status in human ejaculated spermatozoa from infertile patients and relationship to seminal parameter – J.Molina, *at al.* 2001
11. Transition from a nucleosome-based to a protamine-based chromatin configuration during spermiogenesis in *Drosophila* – Christina Rathke, *at al.* 2007
12. Mauro Mattioli e Barbara Barboni: Seminario Università degli Studi di Teramo 2006

RINGRAZIAMENTI

Per lo svolgimento del seguente lavoro ringrazio la Prof.ssa Renata Viscuso per avermi dato l'opportunità di compiere questo stage in un settore delle scienze in notevole espansione e di particolare impatto clinico.

Ringrazio inoltre il Dott. Salvatore Pacini Direttore Sanitario della Casa di Cura Clinica del Mediterraneo, per avermi dato la possibilità di accedere alla struttura ospedaliera e di usufruire del laboratorio Diagnosi e Cura della Sterilità.

Ringrazio inoltre il correlatore, Dottore Giovanni Bracchitta, per la preziosa collaborazione, disponibilità e per il sostegno che mi ha fornito durante tutto il periodo di svolgimento del lavoro.

Infine un prezioso ringraziamento va al Dottore Nunzio Minniti che mi ha seguita durante tutto il lavoro svolto in laboratorio e nella stesura della presente tesi.