

**Liliana Burlibaşa
Mihai Toma
Remus Iulian Nica
Lavinia Mariana Berca
Alina Nicu
Matei Ioan Nica
Gheorghe Dănuţ Cimponeriu**

**PREDISPOZIȚIA
PENTRU INFERTILITATEA
MASCULINĂ:
boli multifactoriale și gene candidate**

2.

Mutațiile în ADN mitochondrial asociate cu alterarea fertilității

Mitocondriile sunt organite prezente în toate celulele nucleate și sunt implicate în desfășurarea proceselor de fosforilare oxidativă și în producerea de energie necesară pentru funcționarea celulelor și organismului, menținerea potențialului de membrană și reglarea apoptozei. Mitocondriile se transmit pe linie maternă, la toți descendenții, indiferent de sex. În mod obișnuit, mitocondriile paterne sunt eliminate din zigot, după fecundație (mitofagie), iar transmiterea paternală la om este extrem de rară. Mutațiile în ADNmt din spermă afectează calitatea și motilitatea spermatozoizilor și de regulă nu sunt transmise descendenților.

Numărul mitocondriilor din celulele umane este corelat cu necesarul lor energetic și în general este cuprins între câteva sute și câteva mii/celulă. Celulele care au cerințe energetice mari (ex. hepatocitele, cardiomiocitele) și ovocitele umane (ex. $1-6 \times 10^5$) conțin un număr mult mai mare de mitocondrii. Spermatozoizii mamiferelor conțin 50-80 de mitocondrii care sunt dispuse helicoidal în piesa intermediară. Reacțiile de fosforilare oxidativă desfășurate în aceste mitocondrii și procesele de glicoliză care se produc în piesa principală furnizează ATP necesar pentru motilitatea flagelului. Contribuția relativă a acestor surse de energie prezintă diferențe interspecifice ⁽¹⁾.

Mitocondriile contribuie la menținerea funcției spermatice și prin participarea la procesele de homeostazie redox (stresul oxidativ crescut predispune la fragmentarea ADN spermatic), reglarea apoptozei (cu

impact asupra numărului de gameți viabili) și menținerea potențialului de membrană (²).

Disfuncțiile mitocondriale pot fi clasificate în funcție de mai multe criterii: localizarea mutațiilor, impactul metabolic și manifestările clinice. În fertilitatea masculină, bolile mitocondriale primare rezultă din mutații în ADNmt sau în gene nucleare care afectează sistemul OXPHOS sau biogeneza mitocondriilor (ex. POLG, TK2, DGUOK). Disfuncțiile mitocondriale secundare sunt consecința alterării funcției mitocondriale în absența unui defect genetic primar (ex. sunt cauzate de expunerea la medicamente, hipoxie, stres oxidativ, inflamație, varicocel). Unele sindroame cauzate de mutații în ADNmt se pot manifesta și prin afectarea motilității spermatozoizilor. În această categorie sunt incluse sindroamele MELAS (encefalo-miopatie mitocondrială cu acidoză lactică și episoade asemănătoare accidentului vascular cerebral), MERRF (epilepsie mioclonică cu fibre roșii neregulate) și LHON (neuropatie optică ereditară Leber). Disfuncțiile mitocondriale izolate ale spermatogenezei au un impact direct asupra calității spermei fără să determine și manifestări sistemice; aceste disfuncții sunt asociate cu scăderea potențialului de membrană mitocondrială, creșterea nivelurilor speciilor reactive de oxigen (ROS) și a gradului de fragmentare a ADN spermatic.

Evaluarea funcției mitocondriale include: măsurarea potențialului de membrană mitocondrială (ex. cu ajutorul unui fluorofor) (^{3,4}), determinarea nivelurilor ROS (ex. chemiluminiscență, fluorescență), analiza fragmentării și a numărului de copii de ADNmt (ex. qPCR). Analiza expresiei genelor mitocondriale (inclusiv gene nucleare OXPHOS) este utilizată ca instrument de cercetare, dar nu este considerată test standard în laboratoarele de andrologie. În cazul bolilor mitocondriale se poate utiliza testarea genetică (ex. testarea țintită a unei mutații, testarea mutațiilor dintr-o genă sau dintr-un panel de gene, secvențierea ADNmt sau a genelor

nucleare care sunt asociate cu patologia). Rezultatele obținute la aceste teste sunt corelate și interpretate în funcție de gradul de heteroplasmie, parametrii spermatici și de datele clinice specifice fiecărui subiect.

Integritatea genomică a spermatozoizilor este esențială pentru dezvoltarea embrionară normală a viitorului făt. Deteriorarea ADN spermatic poate avea consecințe variate, inclusiv anomalii genetice, oprirea dezvoltării embrionare, avort spontan, rate scăzute de implantare și rezultate suboptimale la procedurile de fertilizare *in vitro*.

Funcționarea mitocondriilor depinde de producția codificată de gene localizate în ADNmt și în ADN nuclear; integritatea celor două genomuri și cooperarea dintre producții pe care îi codifică sunt necesare pentru menținerea homeostaziei celulare.

Fiecare mitocondrie conține una sau mai multe copii de ADNmt. La oameni genomul mitocondrial este reprezentat de o moleculă circulară mică de ADN (aproximativ 16,5 kb), care codifică 13 polipeptide esențiale pentru funcționarea lanțului respirator mitocondrial, precum și două molecule de ARN ribozomal (ARNr) și 22 de molecule de ARN de transfer (ARNt) care sunt necesare pentru sinteza proteinelor mitocondriale (⁵). Rata estimată de producere a mutațiilor în ADNmt este de 5-10x mai mare comparativ cu rata estimată pentru ADN nuclear (⁶). La această rată contribuie particularitățile structurale ale ADN mitocondrial (ex. absența proteinelor histonice și a unei anvelope protectoare), capacitatea limitată a mecanismelor de protecție și reparare a erorilor (ex. activitatea exonucleazică a POL γ contribuie la corectarea erorilor; mecanismul de reparare prin excizia bazelor azotate - BER, ligarea capetelor mediată de microomologie - MMEJ) (^{7,8}), eficiența redusă a mecanismelor implicate în repararea leziunilor din ADN și expunerea constantă a materialului genetic mitocondrial la ROS generate în timpul metabolismului oxidativ (^{9,10,11}).

2.1. Patologia mitocondrială

Alterarea ADNmt, indiferent dacă este vorba despre mutații punctiforme sau despre mutații de dimensiuni mai mari, poate compromite funcția mitocondrială și, implicit, calitatea spermei. Aceste modificări sunt asociate cu multiple disfuncții celulare, inclusiv cu activarea căilor apoptotice, fragmentarea ADN nuclear, scăderea potențialului de membrană la nivel mitocondrial și creșterea producției de ROS. ROS generate în timpul proceselor de fosforilare oxidativă pot interacționa cu ADN și pot determina mutații sau modificări ale bazelor azotate și rupturi ale catenelor de ADN, care sunt reparate cu eficiență redusă. Disfuncțiile cauzate de mutații se manifestă preponderent în celulele care au un necesar energetic crescut (¹²).

În mod fiziologic, există un echilibru între sursele de ROS și sistemele cu rol antioxidant (¹³). Creșterea producției de ROS la nivelul sistemului reproducător masculin favorizează mutageneza și poate afecta spermatogeneza sau caracteristicile spermatozoizilor (¹⁴), cum se întâmplă în unele sindroame mitocondriale (ex. sindromul Kearns-Sayre) (¹⁵). În ultimii ani, stresul oxidativ a fost recunoscut ca un factor major implicat în diminuarea fertilității masculine (¹⁶). De asemenea, factorii externi pot contribui la stresul oxidativ și pot influența parametrii spermatici. Spre exemplu, s-a observat că expunerea spermatozoizilor umani la H₂O₂ determină creșterea concentrației intracelulare de Ca²⁺ și deschiderea porului de tranziție al permeabilității mitocondriale. Aceste procese alterează potențialul membranei mitocondriale, reduc producția de ATP și cresc nivelurile de ROS, scad motilitatea și activează factorii proapoptotici (¹⁷).

Delețiile de mari dimensiuni din ADNmt (ex. delețiile de 4977 pb, 7345 pb și 7599 pb) au fost asociate cu astenozoospermie și cu scăderea fertilității (¹⁸). Ulterior au fost identificate și alte mutații mitocondriale:

deleția de 15 pb în MT-CO3 (Cytochrome C Oxidase III, OMIM 516050), deleția a 2 pb în MT-CO2 (Complex IV, Cytochrome C Oxidase Subunit II) și substituția m.3243A>G în MT-TL1 (ARNt Leu(UUR)) (identificată în sindromul MELAS) (¹⁹, ²⁰).

Unele studii populaționale au raportat frecvențe crescute ale deleției de 4977 pb la bărbați astenozoospermici, iar comorbiditățile (ex. infecția cronică cu *Toxoplasma gondii*) pot modifica fenotipul asociat. Un studiu realizat în Iordania pe 120 de bărbați infertili și 80 de bărbați fertili a identificat o asociere semnificativă între deleția de 4977 pb din ADNmt și infertilitatea masculină. Mutația a fost prezentă la 79,2% dintre pacienții cu astenozoospermie și la 10% dintre bărbații fertili (²¹).

Într-un studiu efectuat pe bărbați căsătoriți (100 infertili și 100 fertili) frecvența deleției de 4977 pb din ADNmt a fost mai mare la pacienții infertili care au avut anticorpi IgG anti-Toxoplasma. Acești pacienți au avut numărul total de spermatozoizi semnificativ statistic mai redus, procentul de spermatozoizi cu morfologie anormală a fost mai mare iar alterarea motilității spermatozoizilor a fost ușor crescută. Deleția nu a fost detectată în probele prelevate de la bărbați fertili (²²).

La bărbații care au avut infertilitate idiopatică (care nu au deleții în cromozomul Y) au fost identificate mutații în gene care codifică proteine implicate în fosforilarea oxidativă (ex. MT-ATP6, MT-ATP8 și MT-CO2) (²³). Într-un alt studiu s-a constatat că aproximativ 85% dintre probele de spermatozoizi analizate au prezentat 2-7 deleții în ADNmt.

O cercetare efectuată în două etape a scanat ADNmt provenit de la 921 bărbați cu infertilitate și oligoastenospermie și 766 de subiecți control. Prelucrarea statistică a datelor obținute a arătat că polimorfismul C16179T a fost asociat cu alterarea numărului și a motilității spermatozoizilor (O.R. = 3,17, p = 0,003) și cu infertilitatea masculină (O.R. = 3,10, p = 0,003).

Pentru alte polimorfisme mitocondriale (ex. A12361G) s-au obținut rezultate similare (²⁴).

Cercetătorii au analizat parametri fizici și biochimici ai spermei (ex. motilitate, viabilitate, morfologie, niveluri de malondialdehidă, fructoză și capacitatea antioxidantă totală) prelevate de la 75 de bărbați (normozoospermici și astenozoospermici) din Egipt. Astenozoospermia a fost asociată cu motilitate redusă, niveluri crescute de stres oxidativ și cu o activitate antioxidantă diminuată. Aceste rezultate susțin implicarea dezechilibrelor redox în afectarea celulară. La nivel molecular, s-au identificat 31 de mutații în genele MT-ND1, MT-ND2 și MT-ATPase 6, dintre care 10 determină modificarea secvenței proteinei codificate. Dintre aceste mutații patru au avut efecte deleterii asupra funcției proteinelor implicate în producția de energie (ATP) și implicit asupra motilității spermatozoizilor (²⁵).

Leucocitospermia se asociază cu un grad mai mare de fragmentare a ADN nuclear, un număr mai mare de mutații în ADNmt și valori mai mari ale markerilor pentru stresul oxidativ (ex. malondialdehida și glutationul). Dintre enzimele antioxidante studiate, doar catalaza a avut concentrații semnificativ mai reduse. Nivelurile interleukinei IL-8 s-au corelat pozitiv cu fragmentarea ADN și negativ cu vitalitatea spermatozoizilor. Aceste rezultate au asociat inflamația și stresul oxidativ cu disfuncția mitocondrială (²⁶).

Varicocelelul cauzează stres termic și hipoxie în testicule și predispune la diminuarea potențialului de membrană mitocondrială, creșterea nivelurilor ROS și modificarea semnificativă a numărului de copii de ADNmt. De asemenea, au fost identificate modificări epigenetice în gene nucleare (ex. TOMM22, MIC60/IMMT, UQCRC2, LETM1) care codifică pentru proteine mitocondriale. Administrarea de antioxidanți și mai ales varicocelelectomia au fost asociate cu ameliorarea parametrilor

seminali și a profilului epigenetic. Aceste rezultate arată că tratamentele aplicate ar putea reduce stresul oxidativ (²⁷).

Numărul de copii de ADNmt/ celulă, localizarea mutațiilor și haplogrupurile mitocondriale nu au fost asociate cu motilitatea spermatozoizilor în toate studiile (²⁸). Relația dintre numărul de copii de ADNmt și potențialul de dezvoltare embrionară nu este clară. Într-un centru privat de medicină reproductivă au fost analizați 314 embrioni obținuți prin fertilizare *in vitro* pentru a corela numărul de copii de ADNmt din embrioni cu potențialul lor de dezvoltare. S-a identificat o cantitate mai mare de ADNmt la embrionii aneuploizi comparativ cu cei euploizi, dar nu au fost observate asocieri semnificative cu morfologia, sexul embrionului, vârsta donatoarei sau capacitatea de implantare (²⁹). În prezent, numărul de copii de ADNmt nu reprezintă un biomarker clinic standard pentru selecția embrionilor.

2.2. Concluzii

Disfuncțiile mitocondriale reprezintă un determinant major al calității spermei și al fertilității masculine, prin rolul esențial pe care mitocondriile îl au în producerea energiei necesare motilității spermatozoizilor, în menținerea echilibrului redox și în reglarea apoptozei. Alterarea funcției mitocondriale a fost asociată cu scăderea motilității spermatozoizilor, modificarea morfologiei și creșterea fragmentării ADN spermatic. Aceste modificări contribuie semnificativ la infertilitatea masculină idiopatică și susțin rolul mitocondriilor în fiziologia reproductivă masculină.

Heterogenitatea cauzelor genetice implicate în disfuncțiile mitocondriale (ex. mutații ale ADN mitocondrial, modificări ale genelor nucleare implicate în biogeneza și funcția mitocondrială) evidențiază complexitatea etiologiei acestor afecțiuni. Unele sindroame mitocondriale