



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA
FACOLTÀ DI SCIENZE MM.FF.NN.

Dottorato di Ricerca in Biochimica e Biologia Molecolare
XXI ciclo 2006-2008

**RUOLO DEL GENE PER IL RECETTORE DEGLI
ANDROGENI NELL'EZIOPATOGENESI
DELL'IPOSPADIA**

Coordinatore:

Prof. Gian Luigi Rossi

Tutor:

Prof.ssa Lucia Ghizzoni

Dottorando

Dott. Francesco Tassi

INDICE

Introduzione	1
Definizione di Ipospadi	1
Embriologia della malformazione	1
Incidenza	3
Classificazione	4
Terapia	5
Eziologia	6
Recettore degli Androgeni	8
Scopo	15
Risultati e Metodi	16
Determinazione delle triplette CAG	16
Analisi della Metilazione del DNA	17
Quantificazione del DNA metilato mediante PCR	17
Analisi semiquantitativa del recettore degli androgeni mediante Western Blotting	18
Studio in vitro su fibroblasti stimolati con T e DHT	19
Analisi statistica	20
Risultati	21
Analisi delle triplette CAG	21
Analisi della metilazione del DNA	21
Western Blotting: analisi semiquantitativa del recettore degli androgeni	24
Studio in vitro	25
Discussione	27
Bibliografia	30
Riassunto	39

Introduzione

Definizione di ipospadia

Per ipospadia si intende un'anomalia congenita del pene, dovuta ad un incompleto sviluppo dell'uretra maschile. In questi soggetti il meato urinario si localizza lungo la linea mediana della faccia ventrale del pene, in posizione variabile dal glande sino al perineo (1). La parola ipospadia deriva dai termini greci *ipo*, sotto, e *spadon*, apertura.

L'asta presenta un incurvamento ventrale, che assume una gravità maggiore quanto più prossimale è la posizione del meato. L'incurvamento è conseguente alla presenza di tessuto fibroso (corda) situato a ridosso della porzione ventrale dei corpi cavernosi, distalmente al meato urinario. A questo si associa una sovrabbondanza dorsale e laterale del prepuzio, che invece manca ventralmente. Il rivestimento cutaneo dell'asta sul suo versante inferiore è costituito da un epitelio particolarmente sottile, adeso ai tessuti sottostanti.

Embriologia della malformazione

La virilizzazione dei genitali esterni maschili avviene durante il secondo mese di gestazione, sotto l'influenza del testosterone sintetizzato dal testicolo fetale (2).

L'uretra peniena si forma come risultato della fusione delle estremità mediali dei ripiegamenti uretrali endodermici (3). Il prepuzio invece si sviluppa in seguito ad una crescita epiteliale, che dà luogo ad una riflessione di tessuto ventrale denominata piega epiteliale. Questa, dopo essersi introflessa, creerà la cavità prepuziale (Fig. 1).

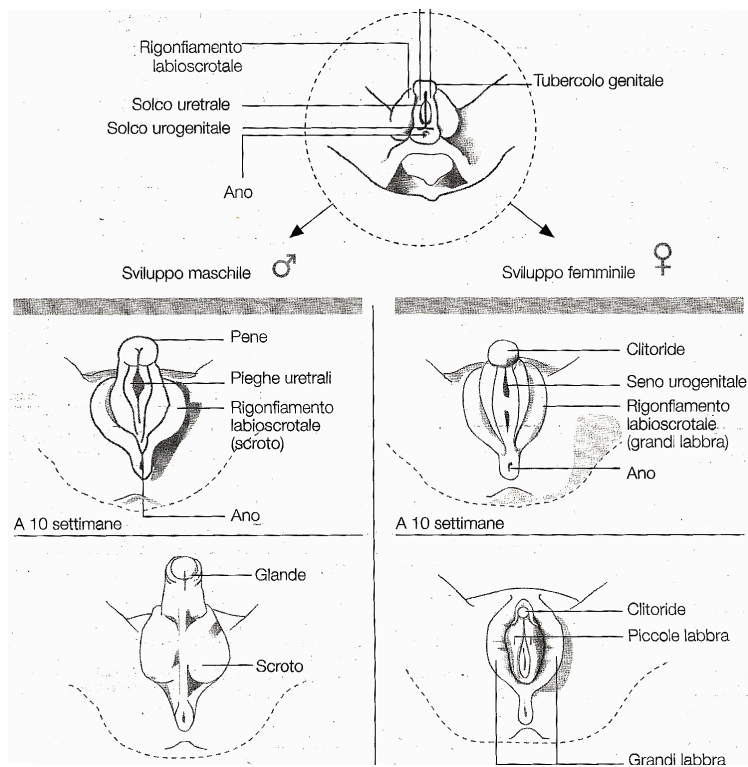


Figura 1

Sviluppo embriologico fisiologico degli apparati genitali maschile e femminile.

(da Faglia G: *Malattie del Sistema Endocrino e del Metabolismo*. 3°edizione. Mc Graw-Hill, 1992).

Una mancata fusione dei ripiegamenti endodermici porta all'ipospadia. La curvatura ventrale dell'asta è interpretabile come risultante di un deficit di sviluppo generale della parte antero-ventrale del solco uretrale e degli abbozzi laterali che andranno a ricoprire la futura uretra matura. La presenza di uno scroto bipartito sarà spiegabile come un difetto di migrazione delle pliche labio-scrotali (Fig. 2).

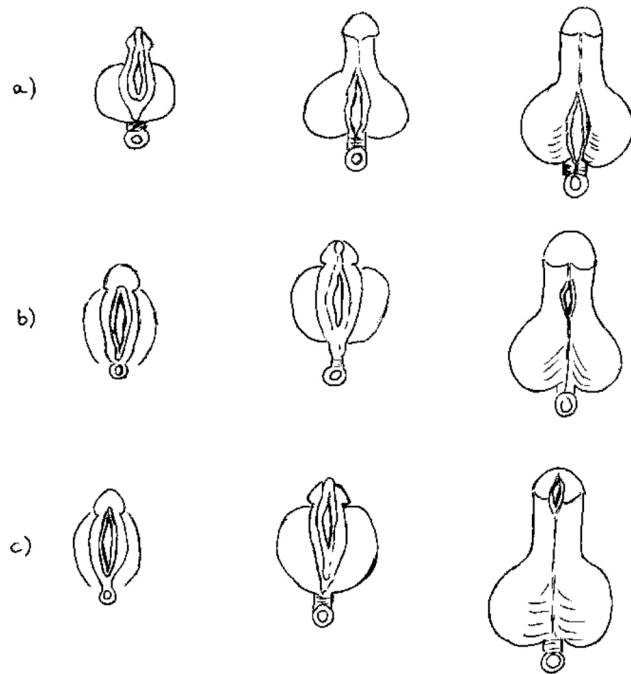


Figura 2

Alterazioni dello sviluppo embrionale nel paziente ipospadico.

L'immagine mostra l'aspetto dei genitali esterni nell'embrione di 42 giorni, nel feto di 70 giorni e nel neonato.

- a) ipospadia scrotale
- b) ipospadia peniena
- c) ipospadia glandulare

Incidenza

L'ipospadia è una delle più comuni malformazioni congenite nel sesso maschile e presenta un'incidenza di 0.4–8.2 casi ogni 1000 maschi nati vivi (4).

Questa condizione è più comune nella razza Caucasica, rispetto a quelle Ispanica e Afro-Americana.

Negli ultimi venticinque–trenta anni si è assistito ad un incremento del numero di casi di ipospadia sia in Europa che in Nord America (5).

Ciò potrebbe essere conseguente all'aumento del numero di parti prematuri con nascita di neonati di basso peso, o all'esposizione a progestinici o a composti con attività estrogenica o anti-androgenica durante la vita intrauterina (teoria degli endocrine disruptors).

Non si è invece assistito ad un aumento dell'incidenza di questa malformazione nei paesi meno sviluppati.

Classificazione

Nell'ambito delle ipospadie si possono distinguere forme distali e forme prossimali (Fig. 3,4).

L'ipospadia distale comprende circa il 65% dei casi e viene comunemente indicata come quella forma in cui il meato uretrale esterno è situato in prossimità del solco coronale o a livello glandulare.

Il pene di questi soggetti è di dimensioni normali per l'età gestazionale o minimamente ridotte. L'asta presenta una curvatura minima o assente e l'uretra peniena è di morfologia sostanzialmente normale. Le ipospadie distali possono essere isolate o talora possono costituire manifestazioni di una sindrome polimalformativa o di un'anomalia della differenziazione sessuale.

L'altra popolazione di pazienti ipospadici include soggetti con malformazioni prossimali, cioè ipospadie medio-peniene, peniene prossimali, scrotali e perineali, che complessivamente costituiscono circa il 25-30% del totale. Queste forme sono in genere associate ad una maggiore curvatura ventrale del pene (corda) e, nei casi più severi, lo scroto può essere bifido.

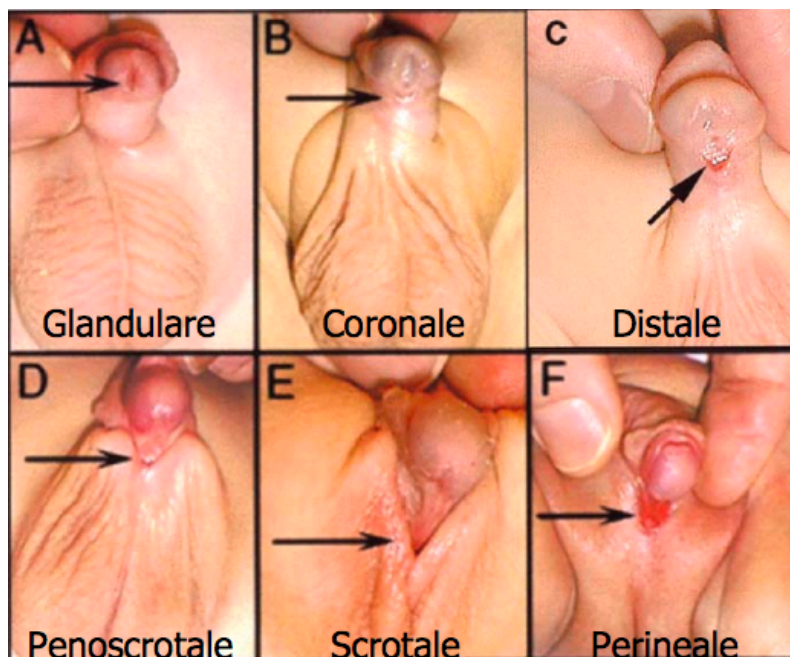


Figura 3

Classificazione delle diverse forme di ipospadia (da Baskin LS, Himes K, Colborn T, 2001)

Terapia

La terapia dell'ipospadia è chirurgica. L'intervento consente di correggere le anomalie funzionali, sessuali ed estetiche che la malformazione comporta, attraverso il posizionamento del meato uretrale in cima al pene, la ricostruzione dell'uretra mancante e la correzione della corda (8). Lo scopo è quello di creare un aspetto del pene, del meato e del glande simili alla normalità e di garantire negli anni successivi una normale attività sessuale. La correzione chirurgica dovrebbe essere effettuata anche in bambini con forme distali di ipospadia associate a malformazioni minime, in quanto i benefici psicologici che queste persone possono trarre dall'intervento sono sostanziali. L'età ideale per la correzione chirurgica è compresa tra 6 e 12 mesi.

I vantaggi della chirurgia precoce sono: una più semplice gestione del bambino nel periodo che segue l'intervento, minori disturbi emotivi post-operatori ed una ridotta necessità di somministrare farmaci analgesici.

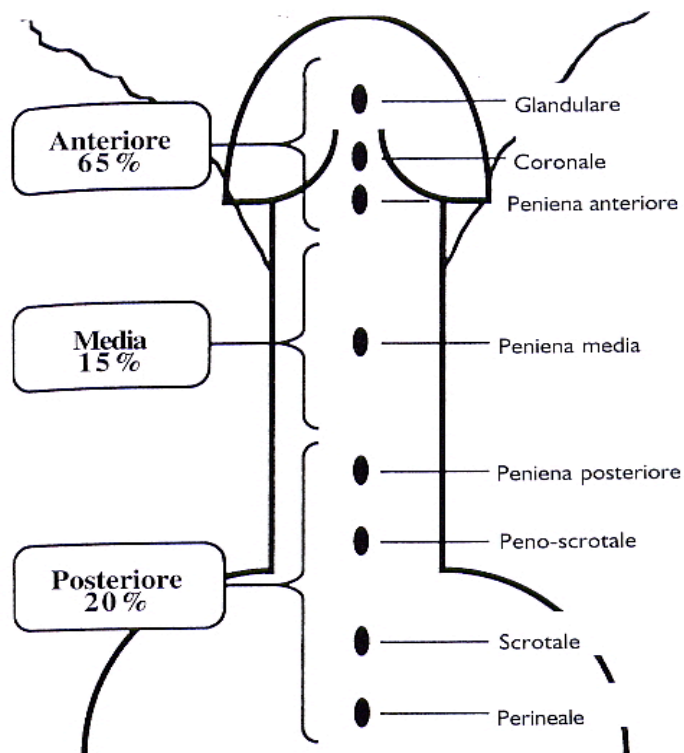


Figura 4

Rappresentazione grafica della forme anteriori, medie e posteriori di ipospadia.

Eziologia

L'ipospadia presenta un'eziopatogenesi multifattoriale. Molti casi sono sporadici, senza una causa sottostante definita.

Tra i fattori di rischio riportati in letteratura, un ruolo importante è assegnato all'esposizione fetale ad endocrine disruptors, composti chimici ad azione estrogenica o antiandrogenica in grado di interferire col sistema endocrino, con conseguenze sullo sviluppo e sulla funzione del tratto riproduttivo.

In questa categoria rientrano numerosi pesticidi, tra cui procimidone, procloraz, linuron, e vinclozolina, insetticidi, ad esempio il DDE, derivato del DDT, e farmaci, come la flutamide. Tutte queste sostanze sono in grado di legarsi con variabile affinità al recettore per gli androgeni. Questi composti chimici o i loro metaboliti attivi competono con gli androgeni per il legame ad AR, interferendo con l'espressione genica androgeno-dipendente *in vivo* ed *in vitro* e determinando un alterato sviluppo embriologico dell'apparato genitale maschile in modelli murini (9). Linuron e Procloraz sono inoltre in grado di inibire la sintesi di testosterone da parte della gonade fetale nel topo (10).

L'effetto anti-androgenico di queste sostanze chimiche può essere amplificato dall'esposizione contemporanea a più inquinanti ambientali, che risultano agire con meccanismo additivo (11).

Anche composti estrogenici sono coinvolti nell'alterazione dell'embriogenesi dell'apparato genitale maschile. Molteplici studi segnalano l'esistenza di un'associazione tra l'esposizione ad estrogeni durante la vita intrauterina e un aumento dell'incidenza di ipospadia (12, 13). Dati esistenti in letteratura evidenziano un ruolo rilevante del dietilstilbestrolo (DES), un estrogeno sintetico prescritto in passato alle donne gravide per prevenire aborti ricorrenti e parti pretermine. Questo farmaco a posteriori si è dimostrato responsabile di numerosi effetti sul sistema riproduttivo delle madri (aumentata incidenza di carcinomi a cellule chiare della vagina) e dei nascituri (incremento dei casi di ipospadia, criptorchidismo e micropene), che hanno comportato il suo ritiro dal commercio (14). Un'importante fonte di esposizione agli estrogeni è poi rappresentata dalla dieta. Residui di pesticidi possono contaminare frutta e verdura e, nelle donne gravide, accumularsi a livello placentare. Numerosi funghi e piante, in

particolare la soia, contengono inoltre fitoestrogeni. Tra questi l'estrogeno vegetale genisteina, presente in prodotti a base di soia, si è dimostrato in grado di elicitare la comparsa di ipospadia nel ratto (15). L'effetto di questo composto aumenta se associato all'esposizione a pesticidi, in particolare a vinclozolina, anche se l'antifungino viene somministrato a dosaggi inferiori a quelli generalmente tossici. Esistono ipotesi relative al meccanismo attraverso cui gli estrogeni esercitano un'azione di endocrine disruptors. Studi su modelli murini hanno dimostrato che questi ormoni sono in grado di inibire la replicazione di precursori delle cellule di Leydig, riducendone il numero (16).

Le cellule di Leydig sono responsabili della sintesi di testosterone, fondamentale per la mascolinizzazione del tratto riproduttivo e dei genitali esterni. Di conseguenza elevati livelli di estrogeni potrebbero determinare una riduzione dei livelli di androgeni e favorire quindi lo sviluppo di malformazioni genitali (17).

Importanti fattori di rischio sono poi rappresentati dal ritardo di crescita intrauterino (IUGR) e dal basso peso alla nascita (SGA) (18,19). Il rischio di presentare ipospadia è inversamente proporzionale al peso raggiunto ed è indipendente dall'età gestazionale (20).

Si è inoltre dimostrata un'augmentata incidenza di questa malformazione in gemelli maschi, sia omozigoti che dizigoti, che potrebbe essere correlata ad un'insufficienza placentare, con ridotta produzione di gonadotropina corionica (21). Ciò potrebbe anche giustificare l'associazione riscontrata tra ipospadia e basso peso alla nascita. Tuttavia non è stato ancora chiarito se l'elevata ricorrenza nei gemelli e il basso peso alla nascita siano fattori associati o indipendenti nella patogenesi dell'ipospadia (18).

Esiste inoltre una predisposizione familiare per questa malformazione, probabilmente su base multifattoriale (4,18). Il rischio di ricorrenza per i fratelli minori di individui colpiti è del 12-14% e può arrivare fino al 26% in caso in cui sia il padre che il fratello maggiore presentino la malformazione. In generale, il rischio che il secondo figlio maschio sia ipospadico aumenta in maniera proporzionale alla severità dell'ipospadia nel fratello maggiore.

L'ipospadia può anche essere associata a numerose sindromi genetiche tra cui la Silver–Russel, la Denys–Drash, la Wolf–Hirschhorn e si riscontra frequentemente nei soggetti che presentano genitali ambigui per ermafroditismo o disgenesia gonadica mista.

Nella genesi di questa malformazione potrebbero assumere un ruolo importante anche fattori di natura endocrinologica. Una ridotta produzione di testosterone da parte delle ghiandole surrenaliche e dei testicoli, un difetto di conversione del testosterone in diidrotestosterone, una riduzione del numero di recettori per gli androgeni, o un ridotto legame del diidrotestosterone al recettore per gli androgeni potrebbero essere implicati nella comparsa di ipospadia (22). Alcuni dati disponibili in letteratura ipotizzano l'esistenza di un'associazione tra la lunghezza delle triplette CAG/GCC presenti nell'esone 1 del recettore degli androgeni e la comparsa di ipospadia (23, 24).

Recettore degli Androgeni

Il recettore degli androgeni (AR) è un membro della superfamiglia dei recettori steroidei nucleari. Esso esercita un ruolo cruciale nella differenziazione sessuale maschile, mediando gli effetti biologici degli androgeni. Dal punto di vista strutturale si tratta di una proteina contenente un dominio centrale di legame con il DNA, un ligand-binding domain situato all'estremità carbossiterminale e una sequenza aminoacidica di lunghezza variabile all'estremità aminoterminale, importante per garantire una piena attività trascrizionale al recettore (25). Il gene che codifica per il recettore degli androgeni è localizzato sul cromosoma Xq 11–12 e consiste di otto esoni.

Il recettore degli androgeni (AR) appartiene alla superfamiglia dei recettori nucleari che mediano le azioni di tutti gli ormoni steroidei come ad esempio gli ormoni tiroidei e altri ligandi che si stanno identificando.

All'interno della superfamiglia dei recettori nucleari esistono altri tre recettori per glucocorticoidi, mineralcorticoidi, progesterone che sono strettamente correlati e possono attivare la trascrizione del gene attraverso una comune risposta allo stimolo ormonale.

La regione proteica codificante comprende un open reading frame di 2750 nucleotidi ed è composta da 8 esoni i quali codificano per una

proteina di 919 residui aminoacidici. Il recettore degli androgeni condivide con tutti gli altri recettori nucleari lo stesso numero di domini funzionali, ma ha anche una caratteristica aggiuntiva unica per il recettore degli androgeni (fig. 5). Ci sono quattro maggiori domini funzionali consistenti in un dominio di transattivazione N-terminale (NTD) codificato dall'esone 1, il dominio centrale altamente conservato di legame con il DNA (DBD) codificato dagli esoni 2 e 3, una grande regione che connette il DBD con il dominio di legame con il ligando C-terminale (LBD) codificata dagli esoni 4-8. Il DBD è un dominio altamente conservato in tutti i recettori nucleari e contiene nove residui di cisteina, otto dei quali coordinano due atomi di zinco per formare la caratteristica forma chiamata zinc fingers di tutti i recettori nucleari e di molti altri fattori di trascrizione. Il primo zincfinger contiene un P-box il quale riconosce gli androgen response elements (ARE) per il legame diretto con il DNA. La seconda zinc finger, chiamata D-box, è coinvolta nell'interazione proteina-proteina e inoltre stabilizza le unità per la dimerizzazione dei recettori. Attraverso l'interazione con il solco maggiore dell'elica di DNA, le zinc fingers sono in grado di legare il recettore degli androgeni ai suoi geni bersaglio.

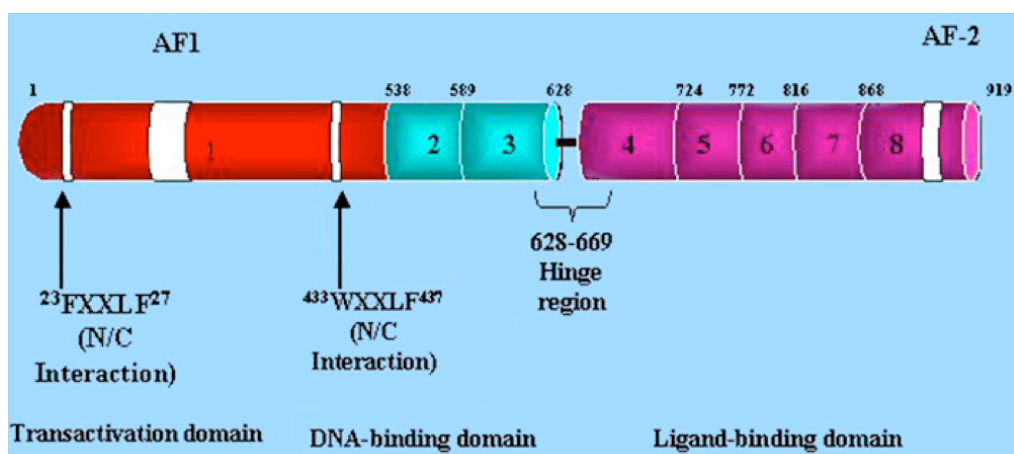


Figura 5: dominio funzionale e struttura del sottodominio del recettore degli androgeni. I numeri si riferiscono alla posizione degli aminoacidi, le lettere alla abbreviazione (X indica ogni aminoacido). Numeri 1-8 si riferiscono agli esoni.

Le funzioni sussidiarie operate da questi domini sono illustrate in figura e includono la dimerizzazione, legame con proteine co-regolatorie, interazione con heat-shock proteins e regolatori trascrizionali. I due sottodomini maggiormente coinvolti

nell'attivazione della trascrizione sono il motivo activation function-1 (AF1) nella parte N-terminale e il motivo activation function-2 (AF2) nel LBD. AF1 è ligando-indipendente, mentre AF2 è ligando-dipendente e inoltre interagisce con p160 dei coattivatori dei recettori steroidei come ad esempio SRC1, SRC2/TIF2, SRC3. Nel caso del recettore degli androgeni il sottodominio AF2 interagisce in maniera intramolecolare con il motivo AF1 nella regione N-terminale. Questa interazione N/C è una caratteristica relativamente unica del recettore degli androgeni ed è mediata dall'interazione con il motivo FXXLF nel sottodominio AF1 comprendente gli aminoacidi 23-27. L'interazione N/C stabilizza il recettore e rallenta la dissociazione con il suo ligando.

La Figura 6 illustra le interazioni degli androgeni con il recettore degli androgeni quando entrano all'interno delle cellule bersaglio. Un singolo recettore lega gli androgeni, con DHT che risulta essere biologicamente più potente rispetto al testosterone a causa della minor velocità di dissociazione dal suo recettore. Il recettore degli androgeni nello stato non legato è situato nel citoplasma complessato con heat shock protein (HSPs) come ad esempio HSP70 e HSP90. Queste a rotazione sono inoltre complessate con co-chaperonine come ad esempio FKBP52. Il legame del ligando con il suo recettore inizia con la dissociazione di questo complesso che permette la traslocazione del recettore degli androgeni nel nucleo dove si lega sotto forma di omodimero al DNA nella zona chiamata hormone response element.

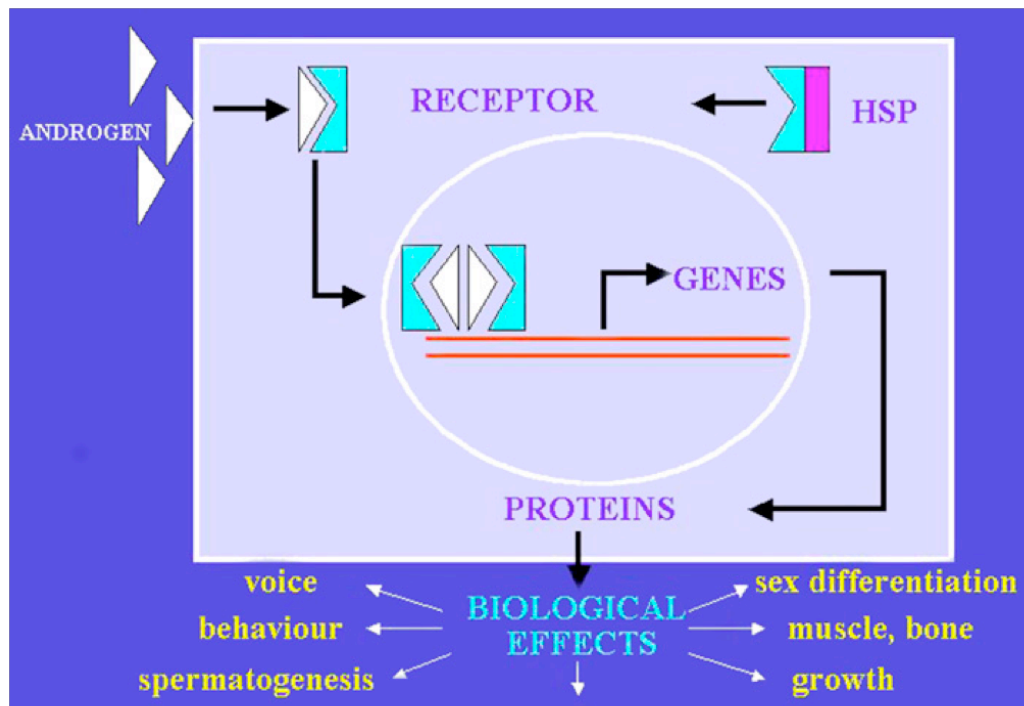


Figura 6: Azione degli effetti biologici degli androgeni. HSP, heat shock protein

L'azione del recettore degli androgeni è maggiormente modulata dall'interazione con proteine co-regolatorie la cui funzione può essere di co-attivatori o co-repressori.

La struttura cristallina dell'intero recettore nucleare è già stata completamente caratterizzata. Però molto è ancora da conoscere riguardo alla struttura del DBD e LBD. La struttura tridimensionale del recettore nucleare comprende 12 alfa eliche associate con beta-foglietti anti paralleli arrangiati nella forma di un sandwich tripartito. Una tasca idrofobica è formata dalle eliche 3, 4, 5, 7, 11, e 12, con la quale il ligando è legato in contatto con la seconda molecola di recettore (fig. 7).

L'elica 12 è un'alfa elica periferica, il cui piegamento sulla parte superiore della tasca idrofobica permette di chiudere il sito di legame per il ligando. Questo "movimento" è stato denominato "mousetrap" per catturare il ligando e per trattenerlo in modo da rallentare il tempo di dissociazione. Questo effetto-trappola dell'elica 12 inoltre permette l'interazione tra LBD e il sottodominio AF2 e il motivo LXXLL nelle proteine co-regolatorie associate.

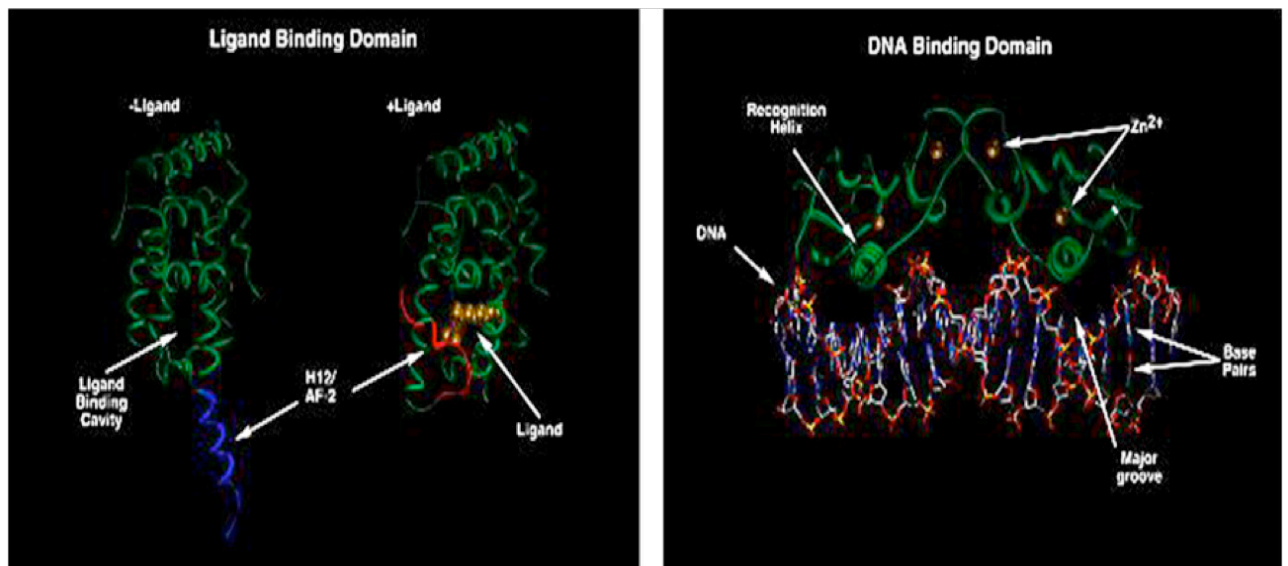


Figura 7: Diagrammi strutturali di LBD e DBD del recettore degli androgeni. La tasca idrofobica è mostrata prima e dopo il legame con il ligando. Le zinc fingers che mediano il legame con il DNA sono mostrate nel riquadro di destra.

L'esone 1, che codifica per il dominio di transattivazione, contiene due catene polimorfiche di glutamine e glicine codificate rispettivamente dalle sequenze $(CAG)_nCAA$ e da $(GGT)_3GGG(GGT)_2GGC_n$ (26).

La lunghezza della catena poliglutaminica presenta una distribuzione normale nella popolazione, con un range compreso tra 8 e 31 ripetizioni, con una media di 20. Esiste una correlazione inversa tra la lunghezza della sequenza $(CAG)_nCAA$ e l'attività trascrizionale del recettore per gli androgeni *in vitro* (27, 28).

E' noto che le triplette possono essere sede di instabilità genetica. La loro espansione in molti geni è stata associata a malattie genetiche umane come la sindrome dell'X fragile (29) e la distrofia miotonica (30). In particolare, nel caso del recettore per gli androgeni, un'abnorme espansione del numero di triplette CAG, superiore a 40, è stata correlata con la malattia di Kennedy, anche nota come atrofia muscolare spinale e bulbare (SBMA) (31). Questa patologia è caratterizzata da un esordio nell'età adulta e da una progressiva degenerazione del motoneurone. I pazienti affetti da SBMA, sebbene siano fenotipicamente maschi, frequentemente mostrano segni di parziale resistenza agli androgeni, quali ginecomastia, ridotta fertilità, atrofia testicolare (32). In accordo con ciò una minore funzione del

recettore per gli androgeni è stata riportata in soggetti con malattia di Kennedy ⁽³³⁾.

Al contrario, un ridotto numero di triplette CAG è stato associato ad un aumentato rischio di cancro prostatico ⁽³⁴⁾. Una ripetizione del trascritto CAG più corta, indicativa di un'aumentata attività recettoriale, è stata inoltre correlata, nella donna, all'aumentato rischio di comparsa di pubarca prematuro e conseguente iperandrogenismo ovarico ⁽³⁵⁾ e, in entrambi i sessi, a disordini androgenici della pelle (acne, alopecia). Minori informazioni sono disponibili sul ruolo del polimorfismo $(GGT)_3GGG(GGT)_2GGC_n$. Nella popolazione normale la lunghezza della sequenza poliglicinica ha un intervallo compreso tra 10 e 30 ripetizioni ⁽³⁶⁾. Nella razza Caucasica, si è evoluto un allele dominante di 23 (GGN23), che è espresso dalla maggioranza dei soggetti. Invece, nella maggior parte dei pazienti affetti da criptorchidismo o da ipospadia peniena, il numero di ripetizioni GGN riscontrate è maggiore o uguale a 24 ^(23,37). Studi *in vitro* hanno dimostrato che alleli GGN con lunghezza diversa da 23 si associano con una minore capacità di transattivazione dell'AR in risposta agli androgeni ^(38,39).

Numerosi altri studi hanno trovato una relazione tra l'espressione genica e lo stato di metilazione del DNA ^(40,41). Sequenze in prossimità di geni silenti sono generalmente metilate, mentre quelle vicino a regioni attive non lo sono. In particolare, un'ipermetilazione delle aree ricche di citosine (CpG) nella regione del promotore dei geni per i recettori degli steroidi è stata associata all'inattivazione trascrizionale di questi geni e considerata funzionalmente equivalente a mutazioni inattivanti. Inoltre, un'anomala metilazione delle regioni CpG è stata osservata frequentemente nei tumori ⁽⁴²⁾.

Poiché la metilazione è un importante meccanismo atto a silenziare l'espressione genica, e visto che è stato dimostrato come la metilazione in prossimità delle triplette CAG nell'esone 1 del recettore per gli androgeni correla con l'inattivazione del cromosoma X ⁽⁴³⁾, la metilazione del gene per il recettore degli androgeni è considerata un indicatore dell'inattivazione del cromosoma X.

Un'inattivazione non random del cromosoma X favorente l'espressione degli alleli corti del gene per il recettore degli androgeni è stata

riportata in leucociti periferici di pazienti irsute non iperandrogeniche (44). Poiché è stato escluso un coinvolgimento del numero di triplette nell'anomala crescita pilifera di queste pazienti, è stato ipotizzato che il fenomeno dell'inattivazione non random del cromosoma X potesse giocare un ruolo nel determinare un'ipersensibilità del recettore per gli androgeni in donne con irsutismo idiopatico. In queste pazienti è stata dimostrata un'alterazione dell'inattivazione del cromosoma X in leucociti di sangue periferico con metilazione preferenziale dell'allele lungo del recettore per gli androgeni e conseguente sua inattivazione funzionale. In questo modo l'allele corto e più attivo verrebbe maggiormente espresso, determinando un'ipersensibilità agli androgeni. Questa rimane però al momento un'ipotesi confermata da alcuni studi ma non da altri.

Fino ad ora comunque non vi sono dati in letteratura sul pattern di metilazione gene AR nei tessuti target. Sebbene sia plausibile credere che lo stato di metilazione nei leucociti periferici rifletta quello in un altro tessuto, esiste la possibilità che un pattern di metilazione distinto caratterizzi il recettore per gli androgeni a livello dei propri tessuti target.

Scopo

Lo scopo del presente studio è quello di valutare se alterazioni del gene del recettore per gli androgeni siano presenti in bambini con ipospadia, per cercare di chiarire i meccanismi responsabili della patologia stessa.

Risultati e metodi

Lo studio del numero di triplette e dello stato di metilazione è stato effettuato su DNA estratto dal sangue periferico e da tessuto prepuziale di venti bambini con ipospadia (età 3.5 ± 1.9 anni, media \pm DS; range 1.6 ± 6.5 anni) e di un uguale numero di bambini di pari età sottoposti ad intervento chirurgico per motivi non correlati all'ipospadia (circoncisione, fimosi) e che costituiscono il gruppo di controllo (età 5 ± 2.5 anni, media \pm DS; range 2 ± 8.9 anni).

Non sono state evidenziate differenze significative tra l'età dei pazienti dei due gruppi studiati.

Determinazione delle triplette CAG

Il DNA genomico è stato estratto dai leucociti del sangue periferico e dal tessuto prepuziale mediante l'utilizzo di un kit di estrazione commerciale (QIAamp kit, Qiagen, Chatsworth, CA). L'amplificazione delle triplette CAG è stata effettuata mediante PCR usando primers fluorescenti che comprendessero la regione di interesse [AR PCR 1.1 (sense): 5'-TCC AGA ATC TGT TCC AGA GCG TGC-3' e AR PCR 1.2 (antisense): 5'- GCT GTG AAG GTT GCT GTT CCT CAT-3']. Circa 100 ng di DNA sono stati amplificati in un volume di 15- μ l ciascuno contenente 1 X PCR di buffer di reazione, 2.5 mM di MgCl₂, 0.2 mM di desossinucleotidi, 10 pmol di ciascun primer e 1 U di polimerasi Ampli Taq Gold™ (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

L'amplificazione è stata effettuata utilizzando il sistema GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) secondo le seguenti condizioni: denaturazione iniziale a 95° C per un periodo di 5 minuti, amplificazione per 35 cicli con denaturazione a 95° C per un periodo di 45 secondi, "annealing" a 60° C per un periodo di 45 secondi, ed estensione a 72°C per un periodo di 1 minuto; estensione finale a 72°C per un periodo di 10 minuti. I prodotti sono stati letti tramite l'ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) ed analizzati utilizzando uno strumento Genescan al fine di determinare le lunghezze delle triplette. Le varie lunghezze CAG sono state validate tramite un sequenziamento diretto, usando primer di senso (5'-GTG CGC GAA GTG ATC CAG AA-3') e di antisenso (5'-TCT GGG ACG CAA CCT CTC TC-3'). Le condizioni di amplificazione consistono in una fase iniziale di denaturazione a 95° C per un periodo di 5 minuti,

seguita da 40 cicli a 95° C per un periodo di 1 minuto, a 57° C per un periodo di 1 minuto, ed a 72° C per un periodo di 1 minuto.

L'estensione finale e' stata fatta a 72° C per un periodo di 5 minuti. Il sequenziamento diretto ha confermato le dimensioni delle triplette determinato con l'altro metodo.

Analisi della Metilazione del DNA

Estrazione di DNA. Il DNA genomico è stato estratto dai leucociti del sangue periferico e dal tessuto prepuziale come precedentemente descritto.

Reazioni con bisolfito di sodio. 1 µg di DNA ottenuto dai PBLs e dai fibroblasti è stato modificato con il bisolfito di sodio. Ogni campione, in un volume di 50 µl, è stato denaturato da NaOH (concentrazione finale, 0.2 M) per 10 minuti a 37° C. A questa soluzione sono stati poi addizionati 30 µl di Idrochinone 10 mM (Sigma) e 520 µl di 3 M di Bisolfito di sodio (Sigma) a pH 5. I campioni sono stati incubati a 50° C per 16 ore. Il DNA modificato è stato quindi purificato usando un kit specifico per la purificazione del DNA (Promega, Madison, WI) e diluito in 50 µl di acqua distillata. Le modificazioni sono state completate da un trattamento con NaOH (concentrazione finale 0.3 M) per 5 minuti a temperatura ambiente, seguito da precipitazione in etanolo. I campioni di DNA estratti sia dai PBLs che dai fibroblasti sono stati infine risospesi in 50 µl di acqua distillata in modo da ottenere una concentrazione di 20 ng/µl.

Quantificazione del DNA metilato mediante PCR

Per l'individuazione e la quantificazione della metilazione del DNA, abbiamo sviluppato un sistema di PCR Real-Time metilazione-specifico che interessasse la regione del promotore del gene AR. A questo scopo, abbiamo disegnato due diverse sonde fluorescenti che riconoscessero rispettivamente il DNA metilato da quello non metilato. Queste sonde sono state utilizzate unitamente ad un set di primers specifici che comprendesse la regione di interesse. La scelta delle sonde è stata fatta dopo sequenziamento del DNA dei gruppi di controllo, in modo da individuare il loro pattern di metilazione. Le sonde sono state testate utilizzando DNA di controllo metilato e non metilato del gene AR. Seguendo il protocollo per la PCR Real-Time le

reazioni sono state preparate in triplicato usando 100 ng di ogni DNA ottenuto dai PBLs e dai fibroblasti. Le condizioni di amplificazione sono state le seguenti: 1 x TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 150 nM di primers, e 100 nM di sonda metilata e non metilata. Le reazioni sono state tenute a 95° C per 10 minuti in modo da attivare l'enzima polimerasi e sono state fatte correre per 50 cicli a 95° C per 15 secondi e a 60° C per 1 minuto. Campioni negativi sono stati inclusi in tutte le analisi di amplificazione. Le reazioni di amplificazione sono state eseguite con ABI PRISM 7700 Sequence Detection System ed è stata calcolata la percentuale di metilazione.

Analisi semiquantitativa del recettore degli androgeni mediante Western Blotting

In primo luogo si è proceduto all'estrazione della proteina: il contenuto proteico è stato ottenuto dalla lisi cellulare dei fibroblasti prepuziali, provocata mediante un buffer di lisi e successiva centrifugazione. La concentrazione proteica di ogni campione è stata poi determinata da BCA Protein Assay Reagent (PIERCE, Rockford, IL) usando siero di albumina (BSA) come standard. L'analisi di Western blot è stata eseguita su 50 µg di proteine estratte.

L'analisi di Western blotting è stata effettuata con uno specifico anticorpo policlonale anti-recettore degli androgeni (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), che riconosce una banda di 110 Kda. Cinquanta µg di proteine sono stati applicati su gel 4-12% precast NuPAGE (Novex, San Diego, CA, USA) e fatti migrare in parallelo con markers prestabiliti (SeeBlue e MagicMark XP, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) per valutarne il peso molecolare. Le proteine sono state trasferite sulle membrane di nitrocellulosa e fissate in latte non grasso al 5% per 3 ore. L'immunoblotting è stato eseguito a 4°C durante la notte, utilizzando l'anticorpo primario specifico anti-recettore degli androgeni alla concentrazione di 1:1000. Dopo il lavaggio, gli aggregati sono stati incubati a temperatura ambiente unitamente ad anticorpi perossidasi-coniugati anti-immunoglobuline di coniglio (Dako, Carpenteria, CA) con diluizione 1: 4000. I "blots" sono infine stati lavati ed esposti ad una soluzione di chemiluminescenza per 1 minuto (ECL kit, Amersham LifeScience, Piscataway, NJ, USA, seguito

da esposizione a X-OMAT AR films; Eastman Kodak Co, Rochester, NJ, USA).

Studio *in vitro* su fibroblasti stimolati con T e DHT

Sono state allestite colture primarie di fibroblasti ottenuti dal gruppo dei bambini normali secondo il seguente protocollo:

1. dopo aver prelevato il campione tessutale, quest'ultimo è stato posizionato in una piastra petri sterile e sezionato con il bisturi in piccoli frammenti (circa 3mm X 3mm);
2. sono stati effettuati due lavaggi con PBS direttamente nella piastra e successivamente i pezzettini sono stati distribuiti uniformemente sulla superficie della piastra in modo da mantenerli ben aderenti;
3. sono stati aggiunti 3 ml di terreno D-MEM addizionato con il 10% di siero fetale bovino (FBS) e 15 mM di HEPES senza NaHCO₃ in modo da coprire tutti i pezzettini di tessuto;
4. le colture sono state lasciate nell'incubatore con 5% di CO₂ alla temperatura costante di 37°C per almeno una settimana, tempo sufficiente per la formazione di piccoli tappeti di cellule;
5. una volta raggiunta la semiconfluenza, sono stati eliminati i frammenti di tessuto ed è stato aggiunto un terreno di coltura D-MEM al 10% di FBS senza HEPES ma con bicarbonato 15 mM;
6. raggiunta la confluenza, le cellule sono state tripsinizzate e distribuite alla concentrazione di 5×10^5 in piastra da 6 pozzetti.

Dopo 24 ore il terreno di coltura è stato sostituito con 1 ml di medium privo di siero e le cellule sono state lasciate in incubatore per altre 24 ore. I fibroblasti sono stati quindi di nuovo incubati per 24 ore con concentrazioni crescenti di DHT e T (10^{-10} - 10^{-6} mol/L). Come controllo sono state utilizzate cellule incubate unicamente con il terreno di coltura, in assenza di ormoni. Dopo 72 ore di incubazione le cellule sono state raccolte ed è stato estratto il DNA genomico come descritto precedentemente per testare il grado di metilazione e verificare eventuali variazioni legate alla stimolazione ormonale delle cellule.

Analisi statistica

Tutti gli esperimenti sono stati ripetuti almeno tre volte in diverse occasioni. I valori sono riportati come media \pm DS. Un test di normalità è stato eseguito su tutti i dati ottenuti. La significatività statistica in ogni gruppo è stata determinata tramite l'impiego del T-test, Mann-Whitney Rank Sum Test o del Test Anova ad una via.

RISULTATI

Analisi delle triplette CAG

Il range del numero di triplette CAG è risultato di 18–30 e 13–30, rispettivamente, nel sangue e nel prepuzio dei pazienti affetti da ipospadia. Il gruppo di controllo presentava un range del numero di triplette CAG di 16–24 e 16–29, rispettivamente, nel sangue e nel tessuto prepuziale. (Figura 8). Nonostante i pazienti con ipospadia mostrassero il valore più basso di triplette CAG, il valore medio non è risultato significativamente diverso da quello riscontrato nei bambini normali, sia per quanto riguarda il sangue che per il tessuto prepuziale (sangue pazienti 23.0 ± 5.1 contro 20.7 ± 3.9 sangue controlli; tessuto pazienti 21.3 ± 4.6 contro 22.0 ± 4.8 tessuto controlli, media \pm DS), rimanendo all'interno del range di normalità per la popolazione generale (11–31) in entrambi i gruppi.

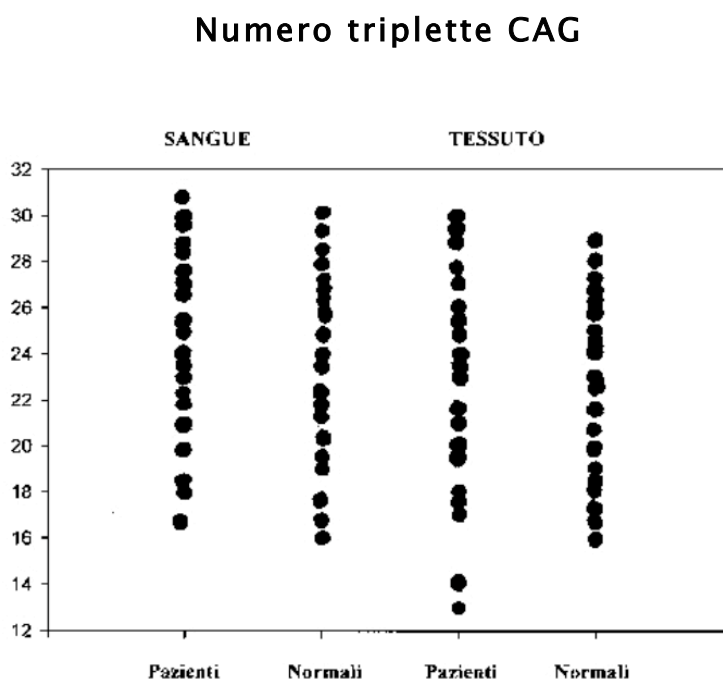


Figura 8

Analisi del numero di triplette CAG nei pazienti con ipospadia e nei bambini normali.

Analisi della metilazione del DNA

I pazienti con ipospadia hanno mostrato un grado di metilazione del gene AR nei fibroblasti ottenuti dal tessuto prepuziale

significativamente più alto rispetto a quello dei bambini del gruppo di controllo ($69.3 \% \pm 7.7 \%$ vs $50.8 \% \pm 7.0 \%$, rispettivamente in pazienti con ipospadia e controlli, media \pm DS, $P < 0.006$) (Figura 9). Nessuna differenza significativa tra pazienti e controlli è emersa dall'analisi del grado di metilazione del gene AR nei leucociti del sangue periferico ($98.2 \% \pm 1.0 \%$ vs $96.4 \% \pm 2.8 \%$, rispettivamente in pazienti con ipospadia e controlli, media \pm DS) (Figura 10). In entrambi i campioni studiati il gene AR è risultato altamente metilato nei leucociti del sangue periferico e sia nel gruppo di pazienti che in quello dei controlli abbiamo trovato una differenza significativa tra il grado di metilazione del sangue e quello tissutale (sangue pazienti $98.2 \% \pm 1.0 \%$ vs $69.3 \% \pm 7.7 \%$ tessuto pazienti, media \pm DS, $P < 0.001$; sangue controlli $96.4 \% \pm 2.8 \%$ vs $50.8 \% \pm 7.0 \%$, media \pm DS, $P < 0.007$).

Percentuale di metilazione in fibroblasti prepuziali di pazienti e controlli

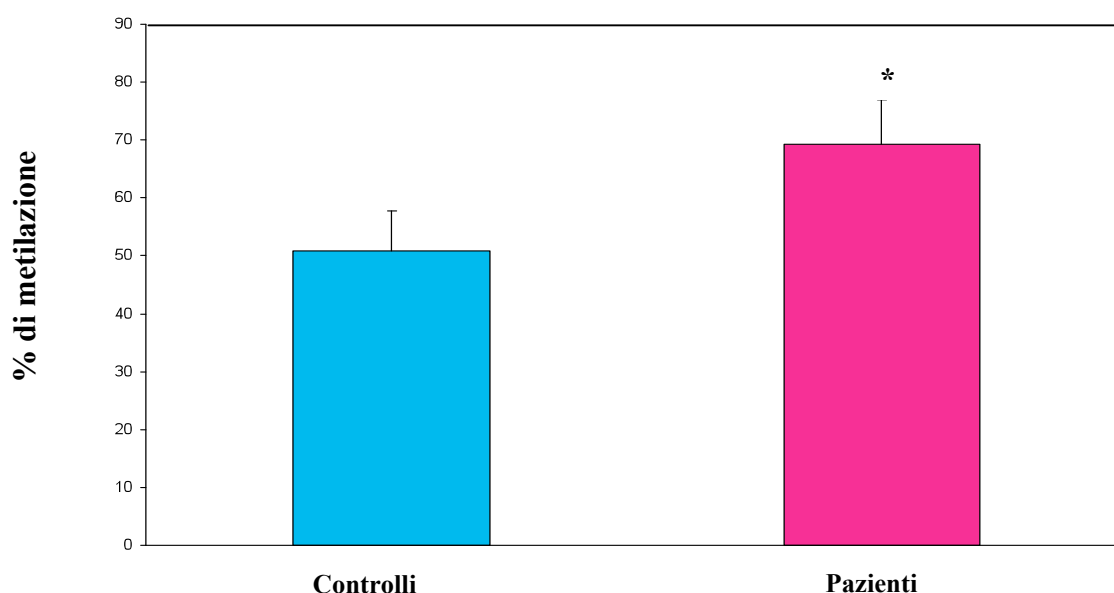


Figura 9

Metilazione del gene AR nei fibroblasti estratti dal tessuto prepuziale di bambini con ipospadia e dei controlli. Media \pm SD.

% di Metilazione: percentuale di metilazione rispetto alla quantità totale del DNA.

*: $P < 0.006$ vs controlli

Percentuale di metilazione in leucociti di pazeinti e controlli

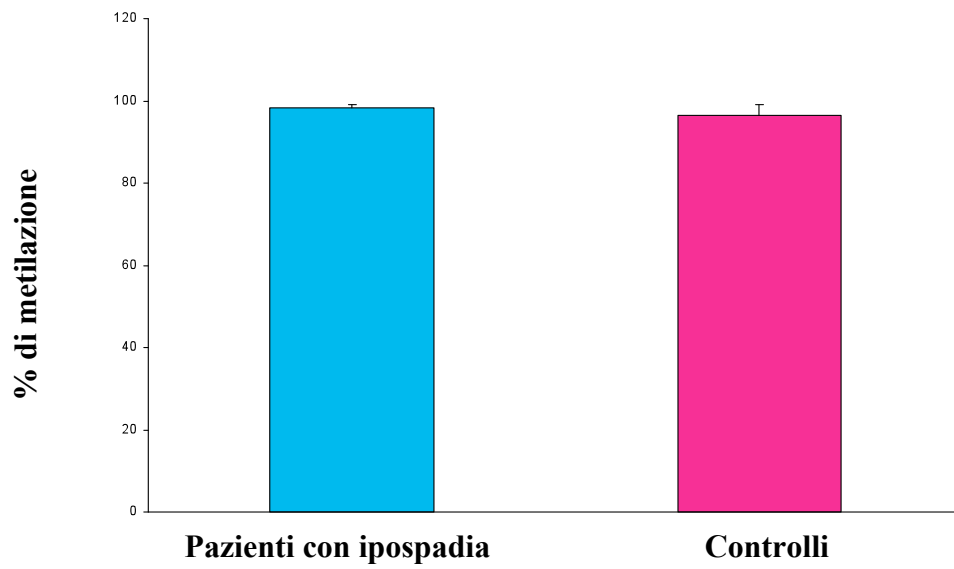


Figura 10

Percentuale di metilazione del gene AR nei leucociti del sangue periferico di bambini con ipospadia e dei controlli. Media \pm SD.

% di metilazione: percentuale di DNA metilato rispetto al totale del DNA.

Western Blotting: analisi semiquantitativa del recettore degli androgeni

I risultati dell'analisi di immunoblotting sono rappresentati in Figura 11A. La proteina di 110 kDa era espressa a livelli inferiori nei fibroblasti dei bambini affetti da ipospadia rispetto a quelli normali (32510 ± 14925 vs 95650 ± 11701 , media OD \pm DS; $P < 0.001$) (Figura 11B).

WESTERN BLOTTING CON ANTICORPO ANTI-RECETTORE DEGLI ANDROGENI

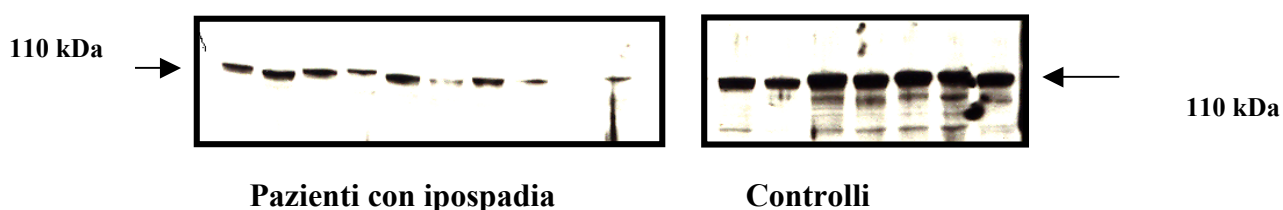


Figura 11A

Risultati dell'analisi di Western Blotting che mostrano i diversi livelli di espressione della proteina di 110 kDa, codificata dal gene AR, nei fibroblasti ottenuti dal tessuto prepuziale dei bambini affetti da ipospadia e dei controlli.

WESTERN BLOTTING CON ANTICORPO ANTI-RECETTORE DEGLI ANDROGENI

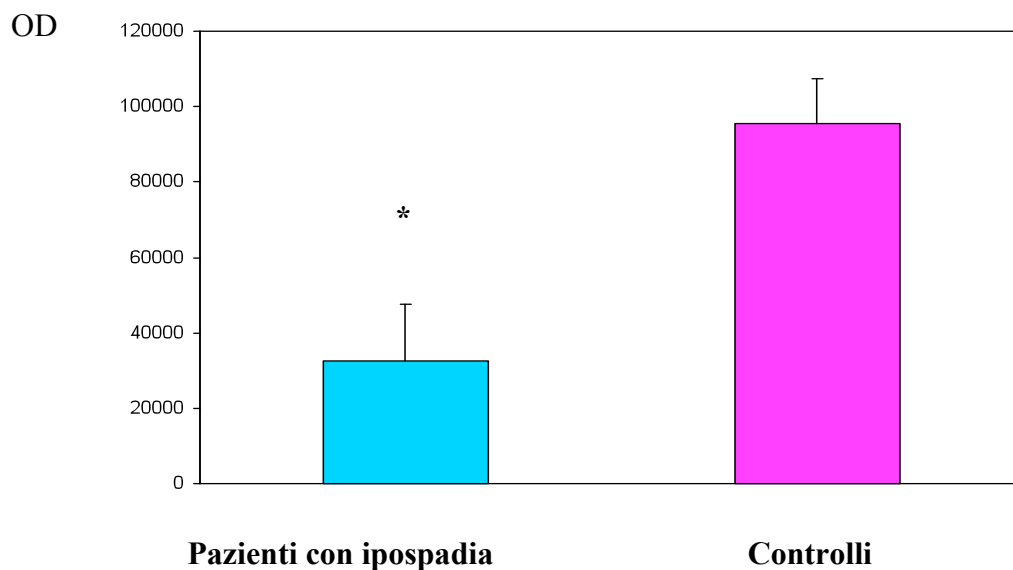


Figura 11B

Espressione della proteina di 110 kDa codificata dal gene AR nei fibroblasti ottenuti dal tessuto prepuziale dei bambini affetti da ipospadia e dei controlli, Media \pm SD.

* : $P < 0.001$ vs controlli

Studio *in vitro*

Dall'analisi *in vitro* su fibroblasti ricavati dal tessuto prepuziale dei controlli e trattati con dosi crescenti di DHT e T è risultato che sia il DHT (Figura 12) che il T (Figura 13) riducono significativamente il grado di metilazione del gene per il recettore degli androgeni (ANOVA ad una via, $P < 0.001$). Questa riduzione sembra essere dose-dipendente. La riduzione massima del grado di metilazione è stata registrata quando il T ed il DHT sono stati usati alle dosi di 10^{-7} M e 10^{-6} M, rispettivamente, determinando una riduzione dell'85% e del 73%.

Stimolazione dei fibroblasti con DiidroTestosterone (DHT)

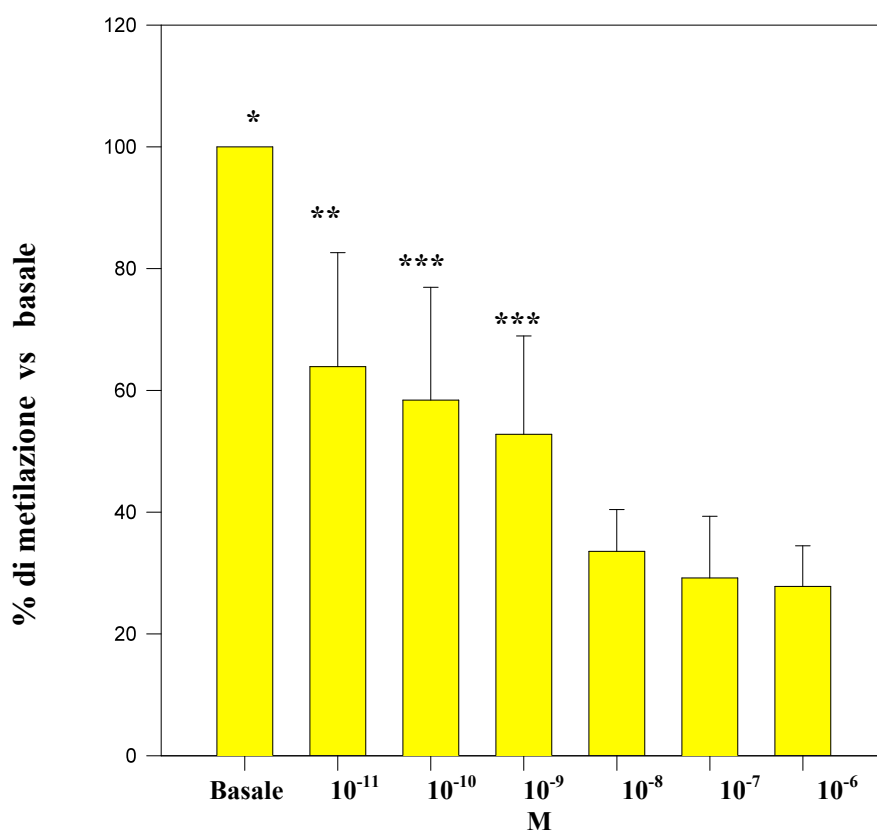


Figura 12

Riduzione del grado di metilazione del gene AR in seguito all'esposizione a dosi crescenti di DHT.

* vs tutti

** vs 10^{-10}

*** vs 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6}

Stimolazione dei fibroblasti con Testosterone

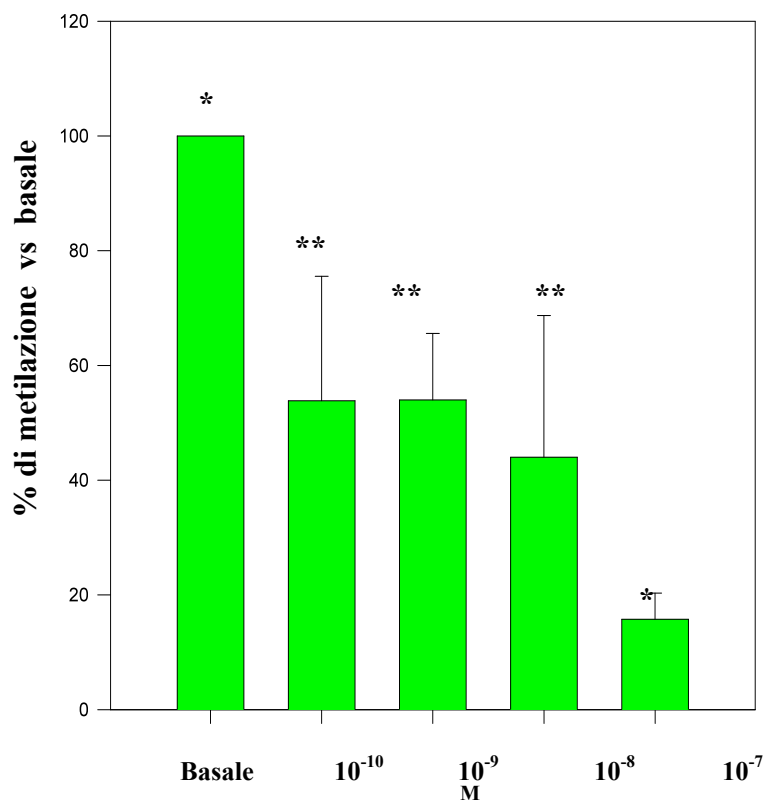


Figura 13

Riduzione del grado di metilazione del gene AR in seguito all'esposizione a concentrazioni crescenti di testosterone (T).

* vs tutti i gruppi

** vs 10^{-7}

Discussione

I risultati del presente studio hanno evidenziato un maggiore grado di metilazione del gene AR nei fibroblasti dei pazienti con ipospadia rispetto ai controlli, rispecchiante una ridotta attività del recettore stesso. Unitamente a ciò è stata rilevata una ridotta espressione del gene AR nei fibroblasti di bambini affetti da ipospadia. La metilazione del gene AR nei PBLs dei pazienti con ipospadia è simile a quella dei soggetti normali. Inoltre, non sono state riscontrate differenze significative tra i due gruppi esaminati nel numero di triplette CAG.

Un primo dato che emerge dallo studio è che, mentre la metilazione del gene AR nei PBLs dei pazienti con ipospadia è simile a quella dei soggetti normali, il grado di metilazione differisce in modo significativo nei fibroblasti ottenuti dal tessuto prepuziale. La differenza riscontrata indica che l'attività del gene AR nei PBLs non necessariamente rispecchia l'attività a livello del tessuto bersaglio e che il pattern di metilazione nei due tessuti non è costituzionalmente lo stesso. Dunque i risultati ottenuti nei due diversi tessuti non sono direttamente comparabili. Questo è un dato importante che deve essere tenuto in debita considerazione in studi futuri che si prefiggano la valutazione della metilazione dei geni in tessuti diversi.

I meccanismi alla base dell'alterato pattern di metilazione del gene AR nei soggetti con ipospadia non sono noti. I risultati del nostro studio *in vitro* hanno dimostrato come gli androgeni determinino una riduzione del grado di metilazione del gene AR, che si accompagna ad un'augmentata attività trascrizionale del gene stesso. In presenza di ridotti livelli di androgeni durante la vita fetale, in particolare nelle fasi precoci della gestazione, critiche per la differenziazione sessuale, il gene AR potrebbe subire un aumentato processo di metilazione che a sua volta avrebbe come conseguenza una ridotta espressione del gene e quindi una ridotta attività recettoriale. Questo potrebbe costituire il meccanismo attraverso il quale i ridotti livelli ematici di androgeni fetali contribuiscono alla genesi dell'ipospadia.

Lo sviluppo dell'uretra è un processo ormone-dipendente che avviene tra l'ottava e la quattordicesima settimana di gestazione. In questa fase dello sviluppo la maggior parte della sintesi e secrezione di testosterone fetale sono sotto il controllo dell'hCG, prodotta dalla

placenta. Di conseguenza una disfunzione placentare precoce o un'alterazione dell'unità materno-placentare con conseguente insufficiente secrezione di hCG determinerebbero dei ridotti livelli di androgeni fetali e quindi potrebbero essere fattori cruciali per lo sviluppo di ipospadia (21). Ciò potrebbe giustificare l'associazione riscontrata tra ipospadia e una serie di quadri clinici caratterizzati da insufficienza placentare quali anomalie cromosomiche, mosaicismo tessuto-specifico (45, 46) e placente piccole. Per lo stesso motivo la presenza di insufficienza placentare potrebbe spiegare l'aumentata incidenza di ipospadia segnalata nei gemelli monozigoti.

Dati epidemiologici (18-20) mettono inoltre in risalto un'aumento dei casi di ipospadia in bambini nati piccoli per l'età gestazionale (SGA). Analizzando le placente dopo la loro espulsione, è comune in questi casi il riscontro di emangiomi placentari, placenta membranosa e infarti placentari (47). Gli infarti, riducendo il volume placentare funzionante, potrebbero limitare la produzione di hCG e la nutrizione del feto. Ciò potrebbe giustificare la contemporanea occorrenza di ipospadia e di una ridotta crescita intrauterina, che esiterebbe nel quadro dello SGA.

Un ruolo patogenetico nella riduzione dei livelli androgenici potrebbe anche essere esercitato dall'esposizione intrauterina ad endocrine disruptors dotati di attività anti-androgenica. Numerosi studi su modelli animali hanno dimostrato che l'esposizione a questi tossici si associa ad un'aumentata incidenza di ipospadia. Questi composti possono agire con molteplici meccanismi d'azione. Alcuni di essi quali ftalati (DEHP e DBP) e pesticidi (procloraz) possono inibire la sintesi fetale di testosterone (10), determinando una deprivazione androgenica nel feto, che si assocerebbe all'ipospadia con il duplice meccanismo di riduzione dei livelli di androgeni ed il secondario aumento della metilazione di AR. E' dunque molto probabile l'esistenza di una correlazione tra l'incremento dei casi di ipospadia che è stato segnalato negli ultimi venticinque-trenta anni nei paesi industrializzati ed i crescenti livelli di inquinamento ambientale presenti in queste aree. Ulteriori studi sono comunque necessari per definire con precisione quali siano i livelli di tossicità degli endocrine disruptors, se siano in grado di determinare la comparsa di malformazioni genitali nel feto e nel neonato e con quali meccanismi.

In conclusione, poiché la metilazione di regioni regolatrici correla negativamente con l'attività di trascrizione, l'aumento della metilazione del gene AR osservata nei soggetti con ipospadia e la sua ridotta espressione nel tessuto prepuziale di pazienti ipospadici suggeriscono che il gene AR sia meno attivo in questi soggetti rispetto ai bambini normali. Deve essere ancora definito se questa alterazione epigenetica rappresenti la causa dell'ipospadia o sia secondaria ad un alterato milieu steroideo fetale. Attualmente non si può infatti escludere un'azione diretta degli endocrine disruptors sui processi di metilazione del gene AR, anche se questa ipotesi deve essere validata da studi attualmente non disponibili in letteratura.

BIBLIOGRAFIA

- 1 **Leung AKC, Robson WLM.** (2007) Hypospadias: an update. Asian J Androl; 9 (1): 16–22.
- 2 **Strokowski LA.** (2004) Hypospadias in the neonate. Adv Neonatal Care; 4: 206–215.
- 3 **Baskin LS, Ebbers MB.** (2006) Hypospadias: anatomy, etiology and technique. J Pediatr Surg; 41: 463–472.
- 4 **Gallentine ML, Morey AF, Thompson IM Jr.** (2001) Hypospadias: a contemporary epidemiologic assessment. Urology; 57: 788–790.
- 5 **Paulozzi LJ, Erickson JD, Jackson RJ.** (1997) Hypospadias trends in two US surveillance systems. Pediatrics; 100: 831–834.
- 6 **Khuri FJ, Hardy BE, Churchill BM.** (1981) Urologic anomalies associated with hypospadias. Urol Clin North Am; 8: 565–571.
- 7 **Smith EP, Wacksman J.** (1997) Evaluation of severe hypospadias. J Pediatr 131: 344–346.

- 8 **Manzoni G, Bracka A, Palminteri E, Marrocco G.** (2004) Hypospadias surgery: when, what and by whom? *BJU*; 94: 1188–1195.
- 9 **Ostby J, Kelce WR, Lambright C, Wolf CJ, Mann P, Gray LE Jr.** (1999) The fungicide procymidone alters sexual differentiation in the male rat by acting as an androgen–receptor antagonist *in vivo* and *in vitro*. *Toxicol Ind Health*; 15: 80–93.
- 10 **Wilson VS, Blystone CR, Hotchkiss AK, Rider CV, Gray LE Jr.** (2008) Diverse mechanisms of anti–androgen action: impact on male rat reproductive tract development. *Int J Andr*; 31: 178–187.
- 11 **Christiansen S, Scholze M, Axelstad M, Boberg J, Kortenkamp A, Hass U.** (2008) Combined exposure to anti–androgens causes markedly increased frequencies of hypospadias in the rat. *Int J Androl*; 31 (2): 241–248.
- 12 **Kim KS, Torres CR Jr, Yucel S, Raimondo K, Kunha GR, Baskin LS.** (2004) Induction of hypospadias in a murine model by maternal exposure to synthetic estrogens. *Environ Res*; 94: 267–275.

- 13 **Fernandez MF, Olmos B, Granada A, Lòpez-Espinosa MJ, Molina-Molina JM, Fernandez JM, Cruz M, Olea-Serrano F, Olea N.** (2007) Human exposure to endocrine-disrupting chemicals and prenatal risk for cryptorchidism and hypospadias: a nested case-control study. *Environ Health Perspect*; 115 (1): 8-14.
- 14 **Acerini CL, Hughes IA.** (2006) Endocrine disrupting chemicals: a new and emerging public health problem?. *Arch Dis Child*; 91: 633-641.
- 15 **Vilela ML, Willingham E, Buckley J, Liu BC, Agras K, Shiroyanagi Y, Baskin LS.** (2007) Endocrine disruptors and hypospadias: role of genistein and the fungicide vinclozolin. *Urology*; 70 (3): 618-621.
- 16 **Sharpe RM.** (1993) Falling sperm counts in men, is there an endocrine cause? *F Endocrinol*; 137: 357-360.
- 17 **Sharpe RM, Skakkebaek NE.** (1993) Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? *Lancet*; 341 (8857): 1392-1395.

- 18 Fredell L, Kockum I, Hansson E, Holmner S, Lundquist L, Lackgren G, *et al.* (2002) Heredity of hypospadias and the significance of low birth weight. *J Urol*; 167: 1423–1427.
- 19 Gatti JM, Kirsch AJ, Troyer WA, Perez-Brayfield MR, Smith EA, Scherz HC. (2001) Increased incidence of hypospadias in small-for-gestational age infants in a neonatal intensive-care unit. *BJU Int*; 87: 548–550.
- 20 Weidner IS, Møller H, Jensen TK, Skakkebaek NE. (1999) Risk factors for cryptorchidism and hypospadias. *J Urol*; 161: 1606–1609.
- 21 Fujimoto T, Suwa T, Kabe K, Adachi T, Nakabayashi M, Amamiya T. (2008) Placental insufficiency in early gestation is associated with hypospadias. *J Pediatr Surg*; 43: 358–361.
- 22 Alberts N, Ulrichs C, Gluer S, Hiort O, Sinnecker GH, Mildemberger H *et al.* (1997) Etiologic classification of severe hypospadias: implications for prognosis and management. *J Pediatr*; 131: 386–392.
- 23 Rapdour R, Rezaee M, Tavasoly A, Solati S, Saleki A. (2007) Association of long polyglycine tracts (GGN repeats) in

- exon 1 of the androgen receptor gene with cryptorchidism and penile hypospadias in Iranian patients. *J Androl*; 28: 164– 169.
- 24 **Lim HN, Nixon RM, Chen H, Hughes IA, Hawkins JR.** (2001) Evidence that longer androgen receptor polyglutamine repeats are a causal factor for genital abnormalities. *J Clin Endocrinol Metab*; 86: 3207–3210.
- 25 **McPhaul M.** (2002) Molecular defects of the androgen receptor. *Recent Progr Horm Res*; 57: 181–194.
- 26 **Lubahn DB, Tan JA, Quarmby VE, Sar M, Joseph DR, French FS, Wilson EM.** (1989) Structural analysis of the human and rat androgen receptor and expression in male reproductive tract tissues. *Ann NY Acad Sci*; 546: 48–56.
- 27 **Kazemi-Esfrjani P, Trifiro MA, Plinsky L.** (1995) Evidence for a repressive function of the long polyglutamine tract in the human androgen receptor: possible pathogenetic relevance for the (CAG)_n-expanded neuronopathies. *Hum Mol Genet*; 4: 523–527.
- 28 **Chamberlain NL, Driver ED, Miesfeld L.** (1994) The length and location of CAG trinucleotide repeats in the androgen

- receptor N-terminal domain affect transactivation function.
Nucleic Acid Res; 22: 3181–3186.
- 29 Kremer EJ, Pritchard M, Lynch M, Yu S, Holman K, Basker E, Warren ST, Schlessinger D, Sutherland GR, Richards RI. (1991) Mapping DNA instability at the fragile X to a trinucleotide repeat sequence p(CCG)_n ; Science 252: 1711–1714.
- 30 Fu YH, Pizzuti A, Fenwick RGJ, King J, Rajnarayan S, Dunne PW, Dubel J, Nasser GA, Ashizawa T, de Jong P. (1992) An unstable triplet repeat in a gene related to myotonic muscular dystrophy; Science 255: 1256–1258.
- 31 La Spada AR, Wilson EM, Lubahn DB, Harding AE, Fischbeck KH. (1991) Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. Nature; 352: 77–79.
- 32 Quigley CA, De Bellis A, Marschke KB, El-Awady MK, Wilson EM, French FS. (1995) Androgen receptor defects: historical, clinical and molecular perspectives. Endocrine Reviews; 16: 271–321.

- 33 **MacLean HE, Choi WT, Rekaris G, Warne GL, Zajac JD.** (1995) Abnormal androgen receptor binding affinity in subjects with Kennedy's disease (spinal and bulbar muscular atrophy). *J Clin Endocrinol Metab*; 80: 508–516.
- 34 **Beilin J, Ball EMA, Favaloro JM, Zajac JD.** (2000) Effect of the androgen receptor CAG repeat polymorphism on transcriptional activity: specificity in prostate and non-prostate cell lines. *Journ Mol Endocrinol*; 25: 85–96.
- 35 **Ibanez L, Ong KK, Mongan N, Jaaskelainen J, Marcos MV, Hughes IA, de Zegher F, Dunger DB.** (2003) Androgen receptor gene CAG repeat polymorphism in the development of ovarian hyperandrogenism. *J Clin Endocrinol Metab*; 88: 3333–3338.
- 36 **Sleddins HFBM, Oostra BA, Brinkmann AO.** (1993) Trinucleotide (GNN) repeat polymorphism in the androgen receptor gene. *Hum Mol Genet* 2: 273
- 37 **Aschim EL, Nordenskjold A, Giwercman A, Lundin KB, Ruhayel Y, Haugen TB, Gromtøl T, Giwercman YL.** (2004) Linkage between cryptorchidism, hypospadias and GGN repeat

- length in the androgen receptor gene. *J Clin Endocrinol Metab*; 89: 5105–5109.
- 38 **Lundin KB, Giwercman A, Dizeyi N, Giwercman YL.** (2007) Functional *in vitro* characterisation of the androgen receptor GNN polymorphism. *Molecular and Cellular Endocrinology*; 264: 184–187.
- 39 **Gao T, Marcelli M, McPhaul MJ.** (1996) Transcriptional activation and transient expression of the human androgen receptor. *J Steroid Biochem Molec Biol*; 59: 9–20.
- 40 **Bird A.** (1992) The essentials of DNA methylation. *Cell* 70: 5–8.
- 41 **Rizwana R, Hahn PJ.** (1999) CpG methylation reduces genomic instability. *J Cell Sci*; 112: 4513–4519.
- 42 **Sasaki M, Tanaka Y, Perinchery G, Dharra A, Kotcherguina I, Fujimoto SI, Dahiya R.** (2002) Methylation and inactivation of Estrogen, Progesterone and Androgen receptors in prostate cancer. *J Natl Cancer Inst*; 94: 384–390.
- 43 **Heard E, Clerc P, Avner P.** (1997) X-chromosome inactivation in mammals. *Annu Rev Genet*; 31: 571–610.

- 44 **Vottero A, Stratakis CA, Ghizzoni L, Langui CA, Karl M, Chrousos GP.** (1999) Androgen receptor mediated hypersensitivity to androgens in women with nonhyperandrogenic hirsutism: skewing of X-chromosome inactivation. *J Clin Endocrinol Metab* 84: 1091–1095.
- 45 **Bryans J, Peters M, Pritchard G et al.** (2002) A second case of intrauterine growth retardation and primary hypospadias associated with a trisomy 22 but with biparental inheritance of chromosome 22 in the fetus. *Prenat Diagn*; 22: 137–140.
- 46 **Boisen KA, Chellakooty M, Schmidt IM, Kai CM, Damgaard IN, Suomi AM, Toppari J, Skakkebaek NE, Main KM.** (2005) Hypospadias in a cohort of 1072 Danish newborn boys: prevalence and relationship to placental weight, anthropometrical measurements at birth and hormone levels at three months of age. *J Clin Endocrinol Metab*; 90 : 4041–4046.
- 47 **Baskin LS.** (2004) Hypospadias. In: Baskin L, editor. *Hypospadias and genital development*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publisher; p. 3–22.

RIASSUNTO

Si definisce ipospadia un'anomalia del pene dovuta ad un incompleto sviluppo dell'uretra maschile ad eziopatogenesi multifattoriale. Tra i fattori di rischio riportati in letteratura sono compresi il ritardo di crescita intrauterino, un basso peso alla nascita, l'esposizione ad endocrine disruptors o fito-estrogeni durante la vita fetale e fattori endocrinologici. Tra questi ultimi sono da annoverare un'alterata produzione di testosterone, una sua ridotta conversione in DHT o un alterato legame degli androgeni al loro recettore. Alcuni studi ipotizzano poi l'esistenza di un'associazione tra la lunghezza delle triplette CAG/GCC situate nell'esone 1 del gene per il recettore degli androgeni (AR) e la comparsa di ipospadia. Lo scopo di questo studio è valutare se alterazioni del numero delle triplette CAG o dello stato di metilazione del gene AR siano presenti nei fibroblasti e nel sangue periferico ottenuti da bambini con ipospadia, nel tentativo di chiarire i meccanismi patogenetici alla base di questa malformazione.

I risultati del presente studio hanno evidenziato un maggiore grado di metilazione del gene AR nei fibroblasti dei pazienti con ipospadia rispetto ai controlli, rispecchiante una ridotta attività del recettore stesso. Unitamente a ciò è stata rilevata una ridotta espressione del gene AR nei fibroblasti di bambini affetti da ipospadia, mentre non sono state riscontrate differenze significative tra i due gruppi esaminati nel numero di triplette CAG. I risultati dello studio *in vitro* hanno dimostrato come gli androgeni determinino una riduzione del grado di metilazione del gene AR, che si accompagna ad un'aumentata attività trascrizionale del gene stesso.

Poiché la metilazione di regioni regolatrici correla negativamente con l'attività di trascrizione, l'aumento della metilazione del gene AR osservata nei soggetti con ipospadia e la sua ridotta espressione nel tessuto prepuziale di pazienti ipospadici suggeriscono che il gene AR è meno attivo in questi soggetti rispetto ai bambini normali. Deve essere ancora definito se questa alterazione epigenetica rappresenti la causa dell'ipospadia o sia secondaria ad un alterato milieu steroideo fetale. Un ruolo rilevante nell'alterazione del milieu ormonale potrebbe essere giocato dagli endocrine disruptors, composti chimici con attività estrogenica o antiandrogenica presenti in alcuni alimenti e in agenti inquinanti, in grado di interagire col sistema endocrino e di determinare alterazioni dello sviluppo embrionale dell'apparato genitale maschile. Inoltre, non si può neanche escludere un'azione diretta degli endocrine disruptors sui processi di metilazione del gene AR, anche se questa ipotesi deve essere validata da studi attualmente non disponibili in letteratura.