



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

DIPARTIMENTO STRUTTURA CLINICA MEDICA-PATOLOGIA MEDICA

DOTTORATO DI RICERCA IN

FISIOPATOLOGIA MEDICA

XXI CICLO

Coordinatore Prof. Nicola Glorioso

**Ruolo del polimorfismo *HindIII*
nella regolazione della pressione arteriosa e
nell'invecchiamento**

Relatore:

Prof. Nicola Glorioso

Tesi della

Dott.ssa . Renata Rossi

Correlatore:

Prof. Luca Deiana

Anno Accademico 2007-2008



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

DIPARTIMENTO STRUTTURA CLINICA MEDICA-PATOLOGIA MEDICA

DOTTORATO DI RICERCA IN

FISIOPATOLOGIA MEDICA

XXI CICLO

Coordinatore Prof. Nicola Glorioso

**Ruolo del polimorfismo *HindIII*
nella regolazione della pressione arteriosa e
nell'invecchiamento**

Relatore:

Prof. Nicola Glorioso

Tesi della

Dott.ssa Renata Rossi

Correlatore:

Prof. Luca Deiana

Anno Accademico 2007-2008

INDICE

<u>1. Riassunto</u>	pag.1
<u>2. Introduzione</u>	pag.2
2.1 Evoluzione del cromosoma Y	pag.2
2.2 Il cromosoma Y umano	pag.7
2.3 Polimorfismi del cromosoma Y	pag.15
2.4 Marcatori biallelici	pag.15
2.5 VNTRs e STRs	pag.18
<u>3. Ruolo funzionale del cromosoma Y</u>	pag.20
3.1 Determinazione del sesso	pag.20
3.2 Determinazione della spermatogenesi	pag.22
3.3 Filogenesi	pag.24
<u>4. Pressione sanguigna e invecchiamento</u>	pag.27
<u>5. Cromosoma Y e pressione</u>	pag.30
5.1 Polimorfismo centromerico HindIII, pressione sanguigna e lipidi sierici	pag.33

<u>6. Peculiarità genetica della popolazione sarda</u>	pag.34
<u>7. Scopo del lavoro</u>	pag.36
<u>8. Materiali e Metodi</u>	pag.37
8.1 Progetto AkeA	pag.37
8.1 Validazione anagrafica	pag.38
8.3 La storia della popolazione dai Quinque Libri	pag.38
8.4 Coorte	pag.40
8.5 Determinazione mediante RFLP del polimorfismo HindIII	pag.41
8.6 Analisi statistica	pag.43
<u>9. Risultati</u>	pag.44
<u>10. Discussione</u>	pag.49
<u>Bibliografia</u>	pag.51

1. Riassunto

L'ipertensione umana essenziale rappresenta uno dei principale fattori di rischio nello sviluppo delle patologie cardiovascolari e renali. La determinazione della pressione sanguigna è multifattoriale, essendo il risultato dell'interazione di fattori genetici e ambientali. Diversi geni, markers e regioni cromosomiche sono state associate o poste in relazione con tale patologia. La differenza tra i due sessi a questo riguardo è ampiamente documentata e dimostrata scientificamente. Il Victorian Family Heart Study, condotto su una popolazione generale di 2959 individui, ha evidenziato che gli uomini presentano una pressione sistolica e diastolica significativamente maggiore se confrontata con quella delle donne rispettivamente di 7 mm e 2 mm di Hg (P,0.00001). La causa di tale differenza non è completamente chiarita, ma di sicuro i cromosomi sessuali giocano un ruolo rilevante nel dimorfismo che caratterizza il rischio cardiovascolare.

In tale contesto il cromosoma Y rappresenta un sistema nucleare aploide altamente informativo e uno strumento di indagine indispensabile dato l'elevato numero di polimorfismi che lo caratterizza, tra cui un polimorfismo biallelico centromerico denominato *HindIII* in virtù del sito di taglio per l'enzima omonimo presente nella sua regione non-ricombinante. Diversi studi condotti su modelli animali hanno evidenziato un'associazione significativa tra tale SNP (*Single-Nucleotide-Polymorphism*) e la pressione sanguigna. Nel nostro studio l'indagine è stata condotta su una coorte di 666 soggetti reclutati all'interno del progetto di studio sulla longevità AkeA, al fine di evidenziare un'eventuale associazione tra tale polimorfismo e i valori pressori e lipidici dei soggetti in esame, con particolare riferimento, vista la peculiarità della coorte analizzata, a un possibile ruolo del cromosoma Y sull'invecchiamento

2. Introduzione

2.1. Evoluzione del cromosoma Y

Le 22 paia di cromosomi delle nostre cellule sono formate da 2 bastoncelli pressoché identici: un cromosoma di ogni coppia proviene dalla madre e l'altro dal padre, ma di solito entrambi hanno le stesse dimensioni e contengono gli stessi geni. In netto contrasto, il cromosoma Y è molto più piccolo dell'X: contiene solo alcune decine di geni in confronto ai 2000-3000 contenuti nel cromosoma X (Figura 1). Un certo numero di geni dell'Y non possiede geni omologhi sull'X. Per di più, l'Y è pieno di DNA "spazzatura": sequenze di nucleotidi che non codificano per nessuna molecola proteica (Jegalian K., Lahn B., 2001).

La pubblicazione nel 2003 della sequenza completa del DNA del cromosoma Y ha permesso di leggerne direttamente la storia e capire i meccanismi alla base della determinazione del sesso nell'uomo. Il cromosoma Y, come tutti i cromosomi, è costituito da sequenze di DNA che codificano per proteine (geni), e da sequenze ripetute anche milioni di volte che organizzano le varie parti strutturali del cromosoma, come ad esempio il centromero.

La lettura della sequenza del DNA del cromosoma Y ha permesso di stabilire che i due cromosomi sessuali, X (lungo 150 milioni di basi, è tra i cromosomi più grandi), e Y (lungo 23 milioni di basi), si sono evoluti a partire da autosomi simili di un antenato primordiale. Per puro caso, in un'epoca vicina all'origine dei mammiferi, una mutazione verificatasi in una piccola regione dell'autosoma che sarebbe diventato l'Y fece sì che gli embrioni che ereditavano quel cromosoma mutato diventassero individui di sesso maschile.

Nel 1990 i genetisti individuarono la regione del cromosoma Y responsabile dei tratti maschili. Si tratta di un singolo gene chiamato SRY codificante per una proteina che determina la formazione dei testicoli. In seguito, il testosterone e altre sostanze prodotte nei testicoli hanno il compito di modellare i caratteri maschili.

Si è giunti alla conclusione che i cromosomi sessuali umani in origine formassero una coppia di omologhi, questo perché le estremità dell'X e dell'Y sono tutt'ora molto simili e possono dar luogo al processo di ricombinazione. Durante la meiosi i cromosomi omologhi si appaiano con precisione e si scambiano alcuni frammenti; dopodiché una copia di ogni autosoma, assieme a un cromosoma sessuale, viene distribuita uniformemente in ogni cellula germinale.

Sebbene oggi la maggior parte dell'Y mostri ben poca somiglianza con il cromosoma X, nei maschi le estremità di questi due cromosomi si allineano durante la meiosi e si scambiano reciprocamente frammenti, come se si trattasse ancora di una coppia di cromosomi omologhi.

Un'altra prova del fatto che l'X e l'Y fossero un tempo molto simili è stata ricavata dalla regione del cromosoma Y che non ricombina con l'X. Molti dei geni distribuiti lungo questa regione possiedono ancora oggi una controparte sul cromosoma X.

L'esistenza della regione non soggetta a ricombinazione, che rappresenta il 95 per cento di tutto il cromosoma Y, ha offerto un'indicazione su come questo cromosoma sia divenuto l'ombra di ciò che era in origine. Sia in natura che in laboratorio, la ricombinazione aiuta a mantenere l'integrità dei cromosomi. Viceversa, la sua assenza provoca l'accumulo di mutazioni deleterie nei geni situati nella regione che non ricombina, fino a che essi si deteriorano e scompaiono. Pertanto sembra ragionevole supporre che un qualche evento abbia fatto cessare i processi di ricombinazione di DNA fra ampie zone dell'X e dell'Y, in seguito al quale i geni della regione che non si ricombinava dell'Y sono andati perduti.

Negli ultimi decenni si è dimostrato come il cromosoma Y abbia perso la sua capacità di scambiare frammenti di DNA con l'X per tappe successive: coinvolgendo inizialmente una zona di DNA che circondava il gene, ed estendendosi quindi, a blocchi ben distinti, per tutta la lunghezza del cromosoma. Tuttavia, solo il cromosoma Y si è deteriorato in seguito alla perdita dei meccanismi di ricombinazione con l'X, che ha invece continuato ad andare

incontro a ricombinazione ogni volta che due sue copie si incontravano nella donna al momento della meiosi.

Confrontando sequenze di DNA di specie diverse, si può calcolare approssimativamente l'epoca in cui i geni un tempo omologhi hanno iniziato a divergere. I confronti hanno rivelato che i precursori autosomici di X e Y erano ancora simili fra loro e intatti nei rettili che esistevano prima che la linea evolutiva dei mammiferi incominciasse a svilupparsi pienamente. Tuttavia i monotremi, che furono i primi a staccarsi dagli altri mammiferi, possiedono sia il gene SRY, sia una regione adiacente che non si ricombina. Queste differenze implicano che il gene SRY sia comparso, e che la ricombinazione nei suoi pressi si sia interrotta in un'epoca vicina all'emergere della linea evolutiva dei mammiferi, circa 300 milioni di anni fa (Jegalian K., Lahan B., 1998).

Analisi simili rivelano che l'inversione successiva si verificò fra 13 e 170 milioni di anni fa, poco prima che i marsupiali si staccassero dalla linea evolutiva che avrebbe dato origine a tutti i mammiferi placentati. La terza inversione avvenne fra 80 e 130 milioni di anni fa, prima della diversificazione dei mammiferi placentati. E l'ultima inversione ha sconvolto il cromosoma Y fra 30 e 50 milioni di anni fa: ossia dopo che le scimmie si erano avviate lungo il proprio cammino evolutivo, ma prima che scimmie antropomorfe e ominidi si separassero.

Opponendosi alla tendenza generale valida per la coppia X-Y, alcuni geni nella regione che non si ricombina dell'Y codificano per proteine molto simili a quelle codificate dalla loro controparte sull'X, persino nelle regioni che hanno subito precedentemente l'inversione. Una simile conservazione può essere spiegata probabilmente da una semplice regola evolutiva: se un gene è cruciale per la sopravvivenza di un organismo, tenderà a mantenersi. In effetti i geni di Y che sono rimasti pressoché uguali sono principalmente quelli "housekeeping", ovvero geni la cui presenza è necessaria per l'integrità della maggior parte delle cellule dell'organismo.

Una gran mole di dati sperimentali indicano che la mancata ricombinazione tra i cromosomi X e Y, e il conseguente deterioramento di molti geni della Y devono esser stati seguiti da un terzo processo che ha compensato l'evento degenerativo. Questo perché non tutti i geni sono attivi in tutte le cellule. Ma al momento del bisogno una cellula in genere attiva entrambi le copie, paterna e materna, del gene in questione. Perciò man mano che i geni sul cromosoma Y iniziarono a scomparire, la produzione delle proteine loro associate si sarebbe ridotta drasticamente se le specie colpite dall'evento non avessero sfruttato strategie compensative. Nella *Drosophila*, ad esempio, tale disparità viene colmata raddoppiando sulla X l'attività dei geni corrispondenti a quelli perduti nella Y del maschio. Altri animali ancora aumentano l'attività dei geni sull'X sia nel maschio che nella femmina, ripristinando il livello proteico nei maschi, ma creando un eccesso di espressione proteica nelle femmine. Nei mammiferi si ricorre per ovviare a questo problema a un processo noto come "inattivazione della X". In una femmina di mammifero cioè, in un certo stadio dello sviluppo, uno dei due cromosomi X di una cellula somatica viene inattivato e diventa eterocromatico. A partire da quel momento tutte le cellule figlie ereditano lo stesso cromosoma inattivo.

La regione che non ricombina dell'Y possiede non solo un certo numero di geni indispensabili che hanno la loro controparte sull'X, ma anche geni che determinano la fertilità maschile che codificano per proteine sintetizzate solo nei testicoli. Uno dei quesiti a riguardo si interroga sulle motivazioni che hanno spinto il cromosoma Y a divenire sede di questo tipo di geni. Alcune ipotesi sostengono che una specie nel suo complesso può trarre beneficio dal fatto di relegare nei maschi geni che potrebbero danneggiare le femmine o comunque non essere vantaggiosi per loro. È anche plausibile pensare che il fatto di essere collocati sulla Y protegga i geni maschili della fertilità, assicurandone la trasmissione da maschio a maschio senza dover passare per individui di sesso femminile che potrebbero ad esempio eliminarli senza subire alcun danno.

È inoltre importante osservare come tali geni, pur in assenza di ricombinazione, possano prosperare. In realtà, quasi ogni gene per la fertilità presente sul cromosoma Y esiste in più

copie: questa ridondanza potrebbe limitare gli effetti di mutazioni nocive. Anche se alcune copie accumulano mutazioni e vengono danneggiate, le rimanenti conservano la capacità riproduttiva dell'individuo e fungono da stampo per la loro stessa moltiplicazione.

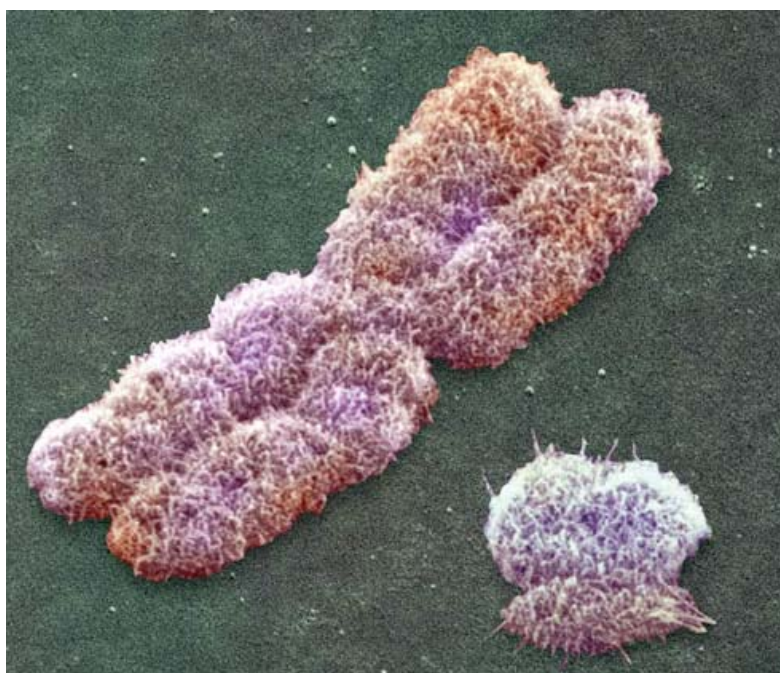


Figura 1. I cromosomi Y ed X umani.

2.2. Il cromosoma Y umano

Inizialmente si riteneva che il cromosoma Y fosse vuoto, privo di geni fondamentali. Nel 1959 invece da studi su maschi con Sindrome di Klinefelter (XXY) e su femmine con Sindrome di Turner (XO) si concluse senza ombra di dubbio che il cromosoma Y conteneva un gene fondamentale che determina il sesso maschile. Solo recentemente, attraverso le tecnologie del DNA ricombinante è stato possibile svelare la quasi totalità della sequenza e conoscere finalmente l'organizzazione dei geni sul cromosoma e la storia evolutiva del cromosoma stesso.

Il cromosoma Y rappresenta solo il 2% del genoma umano ed è costituito da circa 58 Mb (Figura 2), organizzato in un braccio corto (Yp) di circa 11 Mb e un braccio lungo (Yq) di circa 47 Mb, separati da un centromero, con due regioni pseudoautosomiche localizzate in corrispondenza delle porzioni distali del braccio lungo e corto del cromosoma stesso. Queste regioni sono responsabili del corretto appaiamento tra i due cromosomi sessuali durante la meiosi nell'uomo. Tuttavia la gran parte, circa il 95%, del cromosoma Y è costituita da una regione, inizialmente definita come "regione non-ricombinante", o NRY per essere poi in seguito rinominata come "porzione maschio specifica" (*Male Specific Y* - MSY). Questo perché si è successivamente scoperto che tale regione non è esente da ricombinazione, semplicemente non si tratta di ricombinazione omologa reciproca, ma di conversione genica, un tipo di ricombinazione genica non specifica (Skaletsky et al., 2003), (Fig. 3).

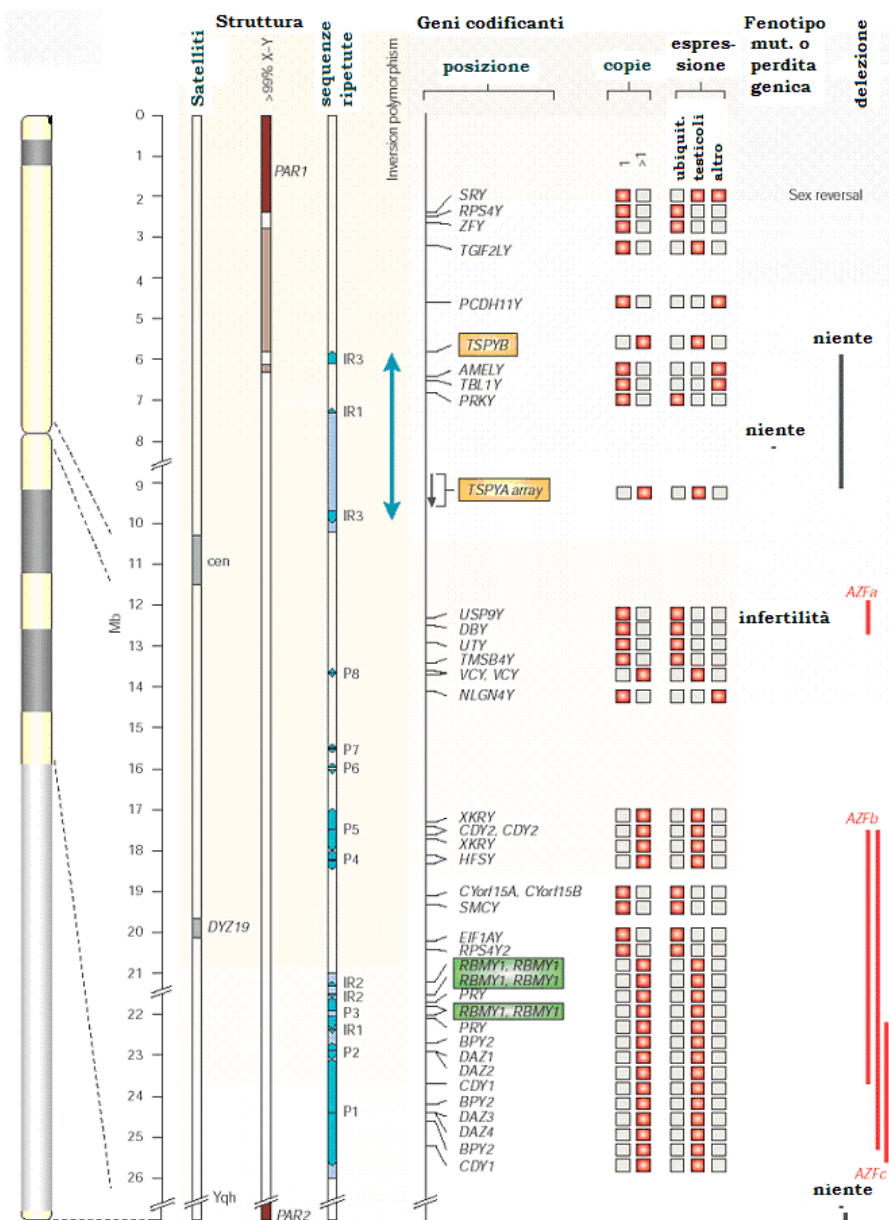
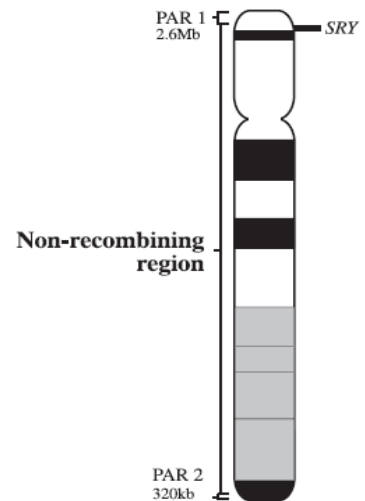


Figura 2. Rappresentazione strutturale del cromosoma Y.

Figura 3. Rappresentazione strutturale del cromosoma Y: sono evidenziate le 2 regioni pseudoautosomiche e la regione non-ricombinante



Il cromosoma Y ha un ruolo biologico fondamentale nell'uomo determinando la formazione dei testicoli e la fertilità. I diversi geni e i fenotipi associati presenti nelle regioni pseudoautosomiche e nella NRY sono elencati in **Tabella 1**.

Tabella 1. geni identificati nelle regioni PAR1, PAR2 e NRY del cromosoma Y

Gene symbol	Gene name	Location	Comments	Associated pathology	X-homologue
<i>PGPL</i>	Pseudoautosomal GTP-binding protein-like	PAR1	Putative GTP-binding protein	Unknown	+
<i>SHOX</i>	Short stature homebox-containing	PAR1	Homeodomain transcription factor	Short stature, Leri-Weill syndrome	+
<i>CSFR2Rα</i>	GM-CSF receptor α -subunit	PAR1	Cytokine receptor	Unknown	+
<i>IL3RA</i>	Interleukin-3 receptor α -subunit	PAR1	Interleukin 3 receptor	Unknown	+
<i>ANT3</i>	Adenine nucleotide translocase	PAR1	Cellular energy metabolism	Unknown	+
<i>ASMTL</i>	Acetylserotonine methyltransferase-like	PAR1	Putative methyltransferase	Unknown	+
<i>ASMT</i>	Acetylserotonine methyltransferase	PAR1	Catalyst for melatonin synthesis	Unknown	+
<i>XE7</i>	X-escape inactivation 7	PAR1	Encodes two hydrophilic proteins of unknown function	Unknown	+
<i>TRAMP</i>	TRAMP	PAR1	Sequence homology with transposases, maybe involved in transposition	Unknown	+
<i>MIC2</i>	MIC2	PAR1	Encodes 12E7 antigen	Unknown	+
<i>SRY</i>	Sex reversal Y	Yp: 1A1A	Testis determining transcription factor	Y + XX male, 46, XY gonadal dysgenesis	-
<i>RP54Y</i>	Ribosomal protein S4, Y	Yp: 1A1B	Component of the ribosome	Turner syndrome?	+
<i>ZFY</i>	Zinc-finger Y	Yp: 1A2	Transcription factor of unknown function	Turner syndrome?	+
<i>PRKY</i>	Protein kinase, Y	Yp: 3C - 4A	Kinase, unknown function	Unknown	+
<i>TSPY^a</i>	Testis-specific protein, Y-encoded	Yp: 3C + 5	Related to SET oncogene, function unknown but may interact with cyclin B	Gonadoblastoma?	-
<i>AMELY</i>	Amelogenin, Y	Yp: 4A	Encodes a tooth enamel protein	Unknown	+
<i>PRY</i>	Putative tyrosine phosphatase protein-related Y	Y: 4A, 6E	Putative membrane transport protein	Infertility?	-
<i>USP9Y</i> (or <i>DDFRY</i>)	Ubiquitin-specific protease, Y (or <i>Drosophila</i> face facets related Y)	Yq: 5C	Putative deubiquitinating enzyme, encodes an H-Y antigen epitope	Azoospermia	+
<i>DBY</i>	DEAD box, Y	Yq: 5C	Putative RNA helicase	Infertility?	+
<i>UTY</i>	Ubiquitous tetratricopeptide repeat motif, Y	Yq: 5C	Function unknown, encodes an H-Y antigen epitope	Infertility?	+
<i>TB4Y</i>	Thymosin β 4, Y isoform	Yq: 5D	May sequester actin	Infertility?	+
<i>VCY1^a</i>	Variably charged protein, Y1	Yq: 5G	Unknown function	-	+
<i>CDY^a</i>	Chromodomain, Y	Yq: 5L, 6F	Chromodomain protein that may be involved in chromatin modification	Infertility?	-
<i>XKRY^a</i>	XK-related, Y	Yq: 5L	Putative membrane transport protein	Infertility?	-
<i>RBMV^a</i>	RNA-binding motif, Y	Yp + q	RNA-binding protein	Infertility?	-
<i>SMCY</i>	Selected mouse cDNA, Y	Yq: 5P	Function unknown, encodes two H-Y antigen epitopes	Unknown	-
<i>EIF1AY</i>	Translation initiation factor 1A, Y	Yq: 5Q	Initiation of translation	Infertility?	+
<i>DAZ^a</i>	Deleted in azoospermia	Yq: 6F	RNA-binding protein	Infertility?	-
<i>VCY2^a</i>	Variably charged protein, Y2	Yq: 6A	Unknown function	Infertility?	-
<i>HSPRY3</i>	Human sprouty3	PAR2	Putative intracellular modulator of FGF and EGF receptor tyrosine kinase activity which antagonises ras/MAP kinase signalling	Unknown	+
<i>SYBL1</i>	Synaptobrevin-like 1	PAR2	Putative membrane protein, may be involved in synaptic signalling	Unknown	+
<i>IL9R</i>	Interleukin 9 receptor	PAR2	Cytokine receptor	Unknown	+
<i>CXYorf1</i>	CXYorf1	PAR2	Unknown function	Unknown	+

La regione MSY, occupa la porzione compresa tra le regioni PAR1 e PAR2. La sequenza della regione MSY è nota per il 97% e può essere, a sua volta, suddivisa in due regioni diverse per costituzione cromatinica e contenuto-struttura delle unità trascrizionali: la porzione eucromatica e quella eterocromatica (Figura 4). I risultati degli studi di espressione condotti da Skaletsky et al. tramite metodiche di RT-PCR e successivo sequenziamento hanno individuato nella porzione MSY almeno 156 unità trascrizionali localizzate nelle sequenze eucromatiche, metà delle quali probabilmente codificanti per proteine. Nessun dato invece riguarda la trascrizione ad opera della regione eterocromatica. Di circa 78 unità codificanti, 60 sono risultate membri di 9 differenti famiglie MSY-specifiche, ciascuna caratterizzata da un'identità di sequenza superiore al 98%, sia a livello esonico che intronico. I rimanenti 18 geni codificanti proteine sono presenti in singola copia. Tali evidenze sperimentali sembrano indicare come la MSY codifichi per almeno 27 diverse proteine o famiglie di proteine.

Inoltre, la MSY comprenderebbe almeno 78 unità trascrizionali, molte delle quali probabilmente non-codificanti. Di queste 78 unità, 13 sono presenti in singola copia e le rimanenti 65 appartenerebbero alle 15 famiglie MSY-specifiche .

Considerando insieme sia le unità codificanti che le non-codificanti, la regione MSY sembra essere caratterizzata da 24 famiglie specifiche che insieme costituiscono 125 delle 156 unità trascrizionali identificate fino ad oggi (Skaletsky H., et al., 2003).

Sulla base dei dati presenti in letteratura, la gran parte dei geni di questa regione si può raggruppare in due classi funzionali distinte: un primo gruppo di geni espressi ubiquitariamente, e un secondo gruppo di geni espressi principalmente o esclusivamente nei testicoli.

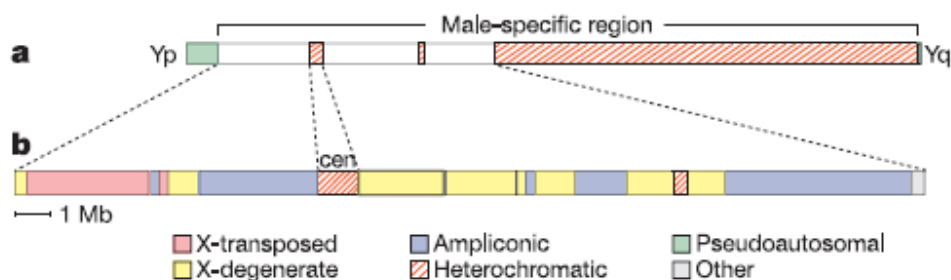


Figura 4. LA regione MSY

La regione euromatica della MSY viene divisa nelle tre sottoregioni: 1) X-trasposte, 2) X-degenerata e 3) ampliconica le cui caratteristiche principali sono riassunte in **Tabella 2**.

- 1) Le sequenze X-trasposte (3,4 Mb) presentano un'omologia di sequenza del 99% con sequenze omologhe localizzate nel braccio lungo del cromosoma X. Sono il risultato di una massiva trasposizione X-Y avvenuta 3-4 milioni di anni fa dopo la divergenza uomo-scimpanzè. Successivamente, un'inversione a livello del braccio corto ha suddiviso la regione X-trasposta in 2 blocchi non contigui. Questa regione è caratterizzata dalla presenza di soli 2 geni omologhi ai corrispettivi sul cromosoma X e da un'alta densità di sequenze ripetute (Skaletsky H., et al., 2003).
- 2) Il segmento X-degenerato è una regione lunga 8,6 Mb e contiene geni a singola copia e pseudogeni, omologhi a 27 geni X-linked, i quali probabilmente sono un retaggio degli antichi cromosomi autosomici da cui si sono evoluti i cromosomi sessuali moderni. Tutti i 12 geni della regione MSY che hanno espressione ubiquitaria sono localizzati nel segmento X-degenerato, fatta eccezione per il gene SRY, determinante il sesso maschile, espresso unicamente nel testicolo.

3) La terza classe di sequenze eucromatiche, il segmento ampliconico, è invece localizzato in sette segmenti dispersi lungo la regione eucromatica e rappresenta la zona con più alta densità di geni. Sono state identificate al suo interno nove famiglie geniche codificanti per proteine il cui numero di copie varia da 2 a 35 e la cui espressione è limitata principalmente o esclusivamente al testicolo, mentre scarso è il numero di sequenze ripetute intersperse. La caratteristica principale di questa regione risiede nella presenza di otto palindromi, i cui bracci sono altamente simmetrici con un'omologia nucleotica del 99,94-99,97%. Sei degli otto palindromi racchiudono geni codificanti per proteine che risultano espresse esclusivamente nel testicolo. Di ognuno di questi geni esiste una copia identica o quasi identica sul braccio opposto del palindromo. Delle nove famiglie geniche codificanti proteine, presenti in molteplice copia nella regione MSY, otto hanno membri nei palindromi, mentre sei sono localizzate esclusivamente all'interno dei palindromi stessi. Tipici della regione ampliconica sono inoltre cinque set di ripetizioni invertite (IR) di lunghezza variabile tra 62 e 298 Kb. Tre di questi, IR1, IR2 e IR3 presentano un'elevata omologia nucleotidica e in particolare l'inversione di IR3, diretta conseguenza di un evento evolutivo molecolare, ha determinato la separazione delle sequenze X-trasposte in due segmenti non contigui.

Tabella 2. Le tre classi di sequenze nella porzione eucromatica della MSY

Sequence class	Defining characteristics	Evolutionary origins	Distribution	Aggregate length (Mb)	No. of coding genes	No. of non-coding transcription units	No. of transcription units per Mb	Nucleotides in interspersed repeats (%)
X-transposed	99% identity to X	Single transposition from X	2 blocks on Yp	3,4	2	0	0,6	60
X-degenerate	Single-copy gene or pseudogene homologues of X-linked genes	Relics of ancient autosomes from which X and Y evolved	8 blocks on Yp and Yq	8,6	16, most expressed widely	4	2,2	57
Ampliconic	Lengthy similarity to other MSY sequences	Acquired from diverse sources, then amplified	7 blocks on Yp and Yq	10,2	60 (in 9 families), expressed mainly or only in testes	74 (9 single-copy; 65 in 15 families), expressed mainly or only in testes	13,3	36

Regione eterocromatica

È la regione più estesa (costituisce i 2/3 del cromosoma Y) ed è formata da tre blocchi (Figura 4): la regione centromerica di circa 1 Mb, la regione Yq13 di circa 40 Mb e un'isola di 400 pb all'interno della regione eucromatica del braccio lungo. In questa regione la cromatina, costitutivamente condensata, è composta principalmente da due sequenze ripetute, dette DYZ1 e DYZ2 (Kunkel et al., 1977).

2.3 Polimorfismi del cromosoma Y

I polimorfismi del cromosoma Y comprendono sostituzioni nucleotidiche, riarrangiamenti (come inserzioni e delezioni) e differenze di lunghezza di elementi ripetuti (microsatelliti e minisatelliti). I polimorfismi più comunemente usati negli studi evolutivi del cromosoma Y umano sono i marcatori biallelici (chiamati anche SNPs, da “*Single Nucleotide Polymorphisms*”) e i microsatelliti (STR, “*Short Tandem Repeats*”). Queste categorie di polimorfismi hanno diversi tassi mutazionali, che li rendono particolarmente utili nello studio di differenti periodi evolutivi.

2.4 Marcatori Biallelici

Gli SNPs rappresentano i più comuni tipi di polimorfismi, costituendo più del 90% dei polimorfismi totali del DNA. Il tasso di mutazione degli SNPs è molto basso, circa nell'ordine di 10^{-7} - 10^{-8} per generazione (Shen et al, 2000). Al 2008, nella regione NRY del cromosoma Y sono stati descritti più di 400 marcatori biallelici polimorfici (<http://www.isogg.org/tree/Main06.html>). Per la loro stabilità sono utilizzati per studiare i processi macroevolutivi e hanno trovato proficuo impiego nelle indagini di genetica evolutiva e di antropologia molecolare. Questi eventi mutazionali, che si accumulano durante le generazioni, possono essere considerati unici, con la conseguenza che ogni polimorfismo definisce un gruppo di cromosomi (chiamato aplogruppo) accomunati da un antenato comune: il cromosoma in cui la mutazione è apparsa originariamente. Lo stato ancestrale di ogni marcatore biallelico viene dedotto dalla sequenza del suo omologo nello scimpanzé o in altre scimmie; comunque, persistono alcune incertezze soprattutto per quei marcatori che sono formati da sequenze ripetute dove non è sempre semplice identificare il locus corrispondente nel genoma delle scimmie. Il basso tasso mutazionale degli SNPs permette di identificare delle linee evolutive stabili, chiamate aplogruppi, che possono essere correlate in una maniera parsimoniosa per ricostruire un albero filogenetico. Studiando la distribuzione geografica

di ognuna di queste linee è possibile considerare l'evoluzione umana da una prospettiva filogeografica con l'assunzione che tale distribuzione possa essere la conseguenza dei movimenti di un individuo o di una popolazione da una regione a un'altra. Nella figura 5 è mostrato l'albero filogenetico del cromosoma Y basato sugli SNPs con la nomenclatura proposta dal Consorzio del Cromosoma Y nel 2002, e modificata poi da Jobling e Tyles nel 2003 (YCC; Y Chromosome Consortium, 2002) .

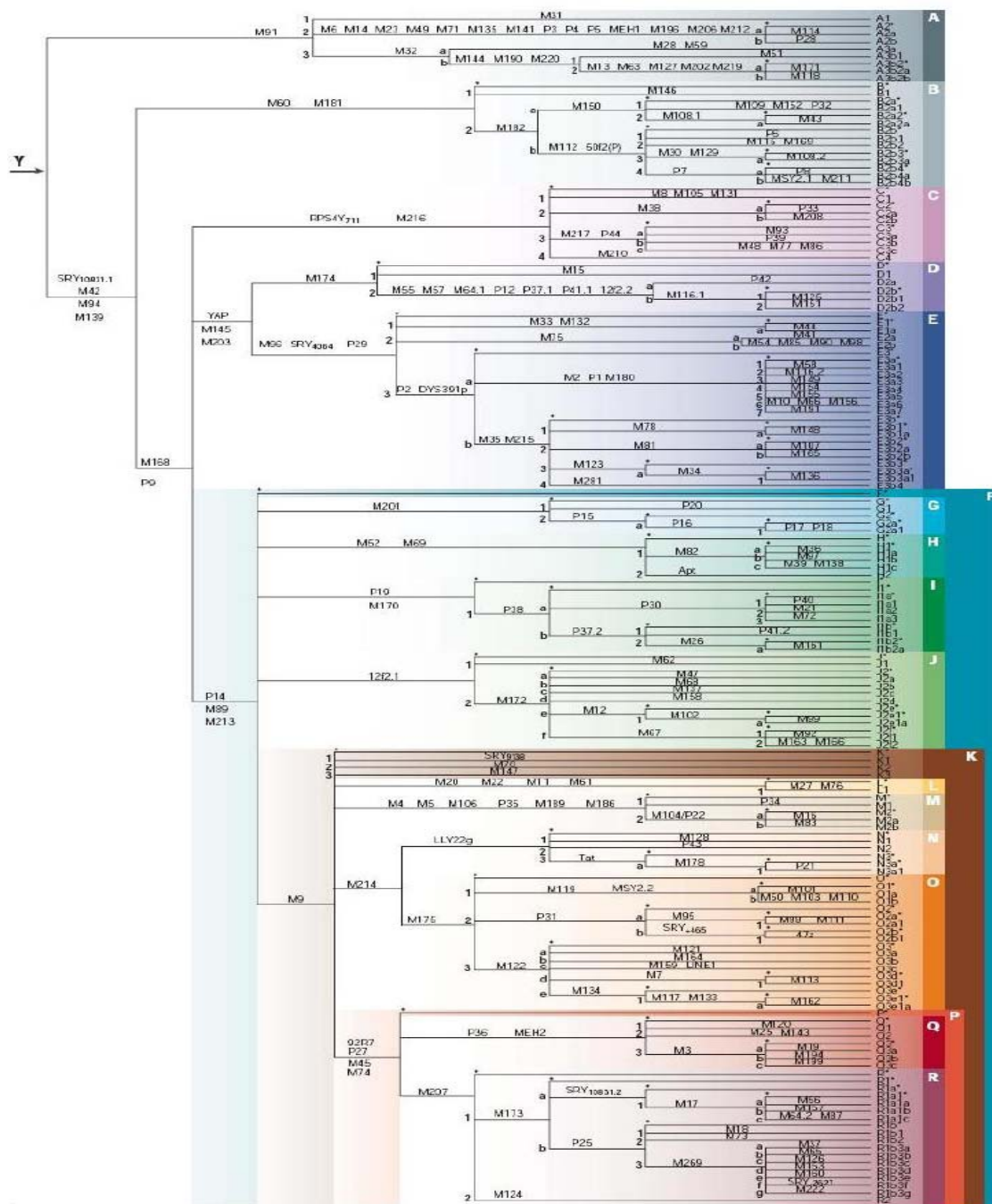


Figura 5. Albero filogenetico degli aplogruppi del cromosoma Y proposto da YCC (Y Chromosome Consortium) nel 2002 e modificato da Jobling and Tyler-Smith nel 2003. La radice dell'albero è indicata da una freccia. Gli aplogruppi principali sono indicati da una lettera maiuscola e ombreggiati in colore. I nomi delle mutazioni sono indicati lungo ogni ramo

2.5 VNTRs e STRs

Sono polimorfismi ricorrenti con tassi di mutazione elevati in cui lo stesso allele può essersi originato più volte indipendentemente. Essi sono rappresentati dai minisatelliti (*Variable Number of Tandem Repeats*, VNTRs) e microsatelliti (*Short Tandem Repeats*, STRs); presentano quasi esclusivamente alleli multipli che differiscono per il numero di ripetizioni in tandem di un'unità ripetuta, la cui lunghezza varia da 10 a 60 bp per i minisatelliti e da 1 a 6 bp per i microsatelliti (Figura 6). Il DNA ripetuto in tandem è soggetto infatti a polimorfismi da delezione e inserzione, per cui i diversi alleli differiscono per il numero di copie dell'unità ripetuta. Sono caratterizzati da un tasso di mutazione maggiore rispetto ai marcatori biallelici, nell'ordine di 10^{-2} /generazione per i minisatelliti e 10^{-3} - 10^{-4} / generazione per i microsatelliti, e per questo motivo rappresentano lo strumento più utile negli studi filogenetici per investigare eventi demografici avvenuti in tempi relativamente recenti.

I marcatori multiallelici per la maggior parte si trovano in regioni del genoma non codificanti, e quindi vengono considerati marcatori neutrali in quanto non risentono delle pressioni selettive. In minor misura sono localizzati nelle regioni codificanti dei geni, in segmenti regolatori o in regioni centromeriche o telomeriche ritenute componenti funzionali importanti dei cromosomi; alcune VNTR contengono interi geni e la loro struttura ripetitiva può giocare un ruolo importante nell'espressione del gene stesso.

Y STR Positions along Y Chromosome

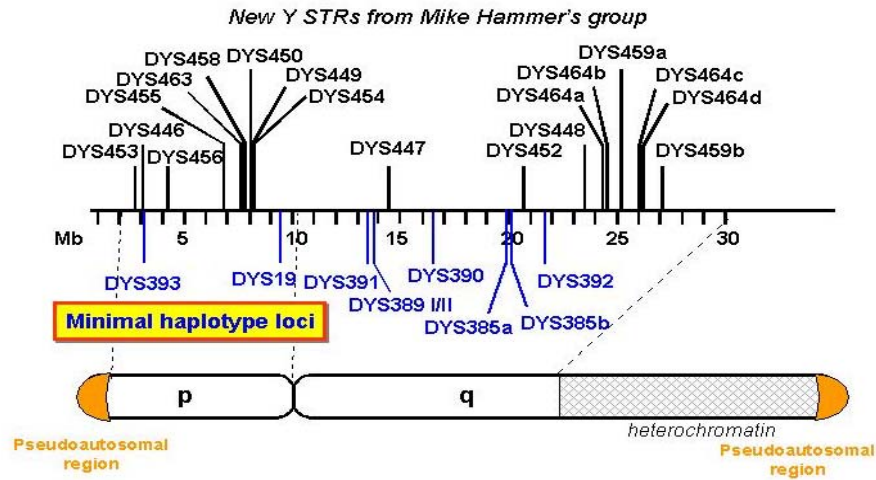


Figura 6. . Principali microsatelliti sul cromosoma Y

Table 1. Areas of use in Y-chromosome testing

Use	Advantage
Forensic casework on sexual assault evidence	Male-specific amplification (can avoid differential extraction to separate sperm and epithelial cells)
Paternity testing	Male children can be tied to fathers in motherless paternity cases
Missing persons investigations	Patrilineal male relatives may be used for reference samples
Human migration and evolutionary studies	Lack of recombination enables comparison of male individuals separated by large periods of time
Historical and genealogical research	Surnames usually retained by males; can make links where paper trail is limited

3. Ruolo funzionale del cromosoma Y

Il cromosoma Y è caratterizzato da diversi geni che intervengono in differenti processi funzionali. Tra quelli localizzati sulla regione MSY, alcuni sono coinvolti nella determinazione del sesso maschile (*Sex-determining Region Y* - SRY) e nella spermatogenesi (*Azoospermia factors* - AZF). Di conseguenza, delezioni o mutazioni di questi geni possono portare ad un inversione del sesso (“*sex-reversal*”) o a difetti della spermatogenesi.

3.1 Determinazione del sesso

Il gene per lo sviluppo del testicolo è stato isolato analizzando gli individui con inversione del sesso, vale a dire maschi XX (anziché XY) e femmine XY (anziché XX). I maschi XX, risultarono portatori di un piccolo frammento proveniente dall'estremità del braccio corto del cromosoma Y probabilmente dovuta a una ricombinazione al di fuori della regione PAR alla meiosi maschile. Un certo numero di femmine XY presenta delezioni della stessa regione del cromosoma Y. Questi dati suggerirono che il gene per il fattore di determinazione del testicolo fosse localizzato in quel piccolo frammento dell'Y. Una più accurata analisi molecolare del DNA dei maschi XX e delle femmine XY ha portato all'identificazione di una sequenza genica specifica del maschio, localizzata vicino all'estremità del braccio corto. Questo DNA è presente nei maschi XY e nei maschi XX, ed è assente nelle femmine XX e nelle femmine XY. Questo gene SRY, si trova all'interno del *locus* TDF (*Testis Determining Factor*), ed è stato isolato nel 1990 dal gruppo di ricerca di Sinclair e collaboratori. Esso è molto particolare perché:

- è espresso nei precursori delle gonadi (cioè in quelle cellule che possono differenziarsi sia in testicoli sia in ovaie) e nei testicoli adulti con tracce anche in fegato, cuore e reni (Clepet et al., 1993);
- ha un cDNA (DNA complementare all'mRNA) perfettamente identico al DNA genomico e sembra essere formato da un unico esone;
- pur essendo tessuto-specifico, è a singola copia e mappa nella regione X degenerata;
- il prodotto proteico di tale gene (204 amminoacidi) appartiene alla famiglia di proteine a dominio HMG (*High Mobility Group*), fattori di trascrizione così definiti poiché presentano un'elevata mobilità su gel di poliacrilammide. Sono proteine non istoniche di piccole dimensioni associate alla cromatina. SRY presenta un unico dominio HMG che interagisce in maniera sequenza specifica con il solco minore del DNA (Figura 7) e che ha alta affinità per le strutture cruciformi, come ad esempio le giunzioni di *Holliday*.

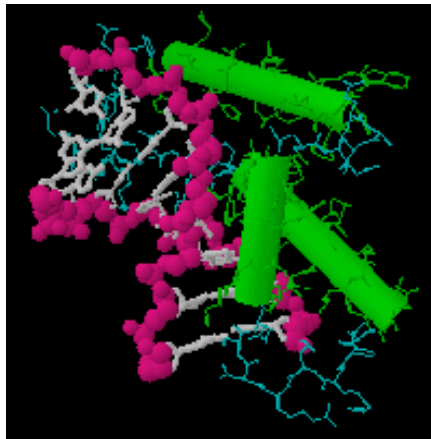


Figura 7. Schema di interazione tra la proteina regolatrice SRY (verde) e DNA (rosa). Il legame al DNA di SRY determina l'alterazione della doppia elica che è responsabile della regolazione del gene che controlla lo sviluppo dei testicoli.

Questo provoca forti ripiegamenti della molecola di DNA e probabilmente tale proteina assume un ruolo strutturale nell'organizzazione della cromatina, favorendo o inibendo l'interazione con altri fattori che legano promotori o “*enhancers*”. Numerosi sono i geni implicati nella determinazione del sesso (Veitia *et al.*, 2001; Knowler *et al.*, 2003) e sembra che lo sviluppo delle gonadi nei primi stadi dipenda da una serie di interazioni parallele piuttosto che da una cascata lineare di fenomeni. Inoltre, sembra che un ruolo non marginale nello sviluppo dei testicoli sia ricoperto dalla via di trasduzione del segnale dell'insulina. Questo è stato dimostrato nei topi maschi mutanti per la famiglia dei recettori insulinici tirosin chinasi, infatti in questi animali si formano le ovaie e si ha ridotta espressione di SRY (Nef *et al.*, 2003).

3.2 Determinazione della spermatogenesi

Le microdelezioni del cromosoma Y sono la causa genetica e molecolare più frequente dell'infertilità maschile (Krausz *et al.*, 2003, 2006, 2007). In seguito allo studio di sequenze specifiche (*Sequence Tagged Site*- STS) del cromosoma Y sono state studiate tre regioni distinte coinvolte nella spermatogenesi; tali regioni (Figura 8), che contengono geni ed unità trascrizionali e un'espressione specifica testicolare, sono dette *Azoospermia Factor* (AZFa, AZFb e AZFc) (Tiepoli e Zuffardi, 1976; Vogt *et al.*, 1996).

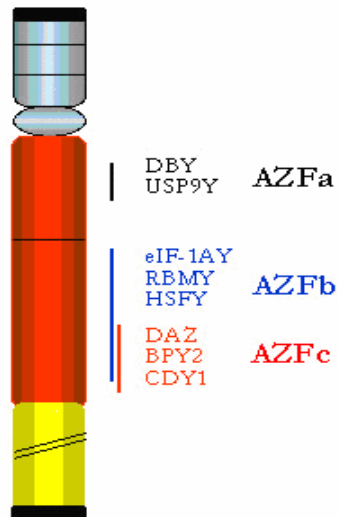


Figura 8. Rappresentazione schematica della struttura del cromosoma Y con i principali geni delle regioni AZF. (Da Krausz *et al.*, 2003)

La relativa alta incidenza delle delezioni del cromosoma Y è legata alla sua struttura, ricca di sequenze ripetute, che rendono il braccio lungo di questo cromosoma particolarmente suscettibile a delezioni che insorgono per ricombinazione omologa intracromosomica tra regioni con elevata omologia di sequenza. Infatti, studi condotti su diversi soggetti hanno mostrato che i punti di rottura e il frammento di DNA rimosso sono comuni in ciascun tipo di microdelezione.

3.3 Filogenesi

Fin dall'identificazione del primo marcatore polimorfico del DNA sul cromosoma Y, questo cromosoma è stato utilizzato per la ricostruzione delle affinità e della dispersione delle popolazioni umane nei 5 continenti. L'accumulo progressivo di mutazioni nella porzione maschio-specifica del cromosoma senza il riassorbimento provocato dalla ricombinazione, rende possibile la ricostruzione di una filogenesi univoca per le 25 Mb che costituiscono la porzione eucromatica del cromosoma. Nella sua forma più aggiornata l'albero filogenetico della MSY è formato da circa 160 rami terminali definiti da oltre 110 marcatori terminali (Figura 9).

Tutta la letteratura sull'argomento concorre ad indicare che le frequenze di ciascuno di tali rami variano fortemente sia all'interno che tra popolazioni. I motivi di tali variazioni sono molteplici e comprendono:

- 1) La storia delle popolazioni: la distribuzione geografica delle linee evolutive della MSY rappresenta una traccia della dispersione umana nei continenti; ciascun episodio di popolamento ha coinvolto un sottoinsieme dell'intera popolazione maschile mondiale e ciò può aver contribuito alla disomogeneità delle frequenze;
- 2) Un effettivo di popolazione ridotto: l'effettivo di popolazione per il cromosoma Y è un quarto di quello degli autosomi. Ciò moltiplica gli effetti di deriva e del fondatore, con il risultato di accelerare il tasso di estinzione di alcune linee e di creare un eccesso di picchi di alte frequenze in alcune località (Di Giacomo et al., 2003; 2004);

- 3) La demografia della popolazione: una crescita demografica rapida implica che le copie geniche del presente hanno un unico antenato comune più recente rispetto a popolazioni di dimensione costante. Conseguentemente nelle popolazioni in crescita vi è una maggior similitudine delle forme alleliche (Nordborg, 2001);
- 4) La varianza nella dimensione della prole: differenze nel successo riproduttivo tra maschi dovute a fattori biologici e/o sociali possono portare alla rapida produzione di copie del cromosoma Y identiche per discesa (Zerjal et al., 2003), le quali rimangono confinate in regioni geograficamente limitate;
- 5) I particolare pannelli di soggetti utilizzati per la ricerca di nuovi polimorfismi: la ricerca sistematica di nuovi polimorfismi del tipo SNP del cromosoma Y si è finora basata su pannelli di individui rappresentativi di tutti i continenti (Underhill et al., 2000; Hammer et al., 2003; Wilder et al., 2004). La dimensione di tali pannelli è il fattore limitante per l'individuazione di mutazioni identificative di linee che potrebbero ben caratterizzare popolazioni non rappresentate nei pannelli stessi.

In conclusione, l'intero insieme dei marcatori terminali necessari per assegnare ciascun maschio ad uno dei rami terminali dell'albero filogenetico include varianti comuni, rare e private.

Conseguentemente la situazione di poche linee che includono una vasta proporzione della popolazione rappresenta la regola anziché l'eccezione. In tutto l'albero si trovano numerosi casi di linee che sono sovra-rappresentate e che potrebbero essere ulteriormente suddivise; ciò è particolarmente comune nelle popolazioni in cui queste linee sono state identificate per la prima volta.

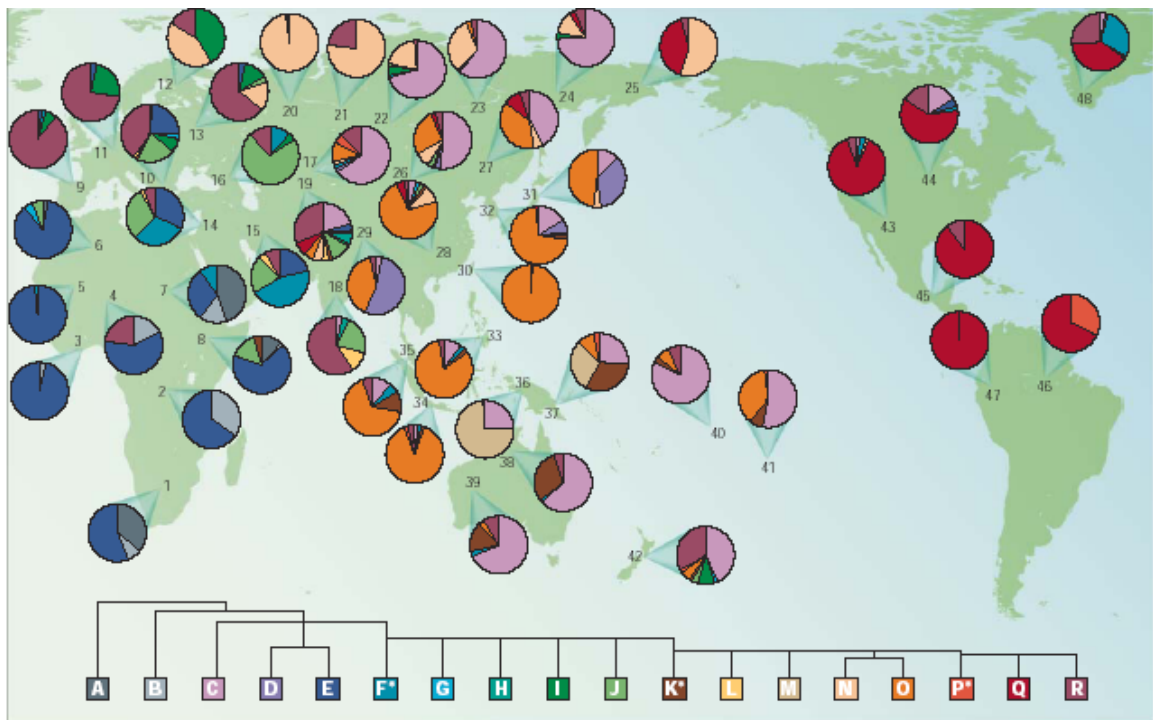


Figura 9 Distribuzione globale degli Aplogruppi del cromosoma Y.

4. Pressione sanguigna e invecchiamento

Nei paesi industrializzati, l'aspettativa di vita alla nascita è notevolmente aumentata dai 47 anni agli inizi del ventesimo secolo a circa 80 anni all'inizio del ventunesimo secolo. Questo cambiamento nel pattern di sopravvivenza è da attribuire principalmente alla diminuzione della mortalità infantile e all'eradicazione delle patologie infettive, eventi questi strettamente correlati al miglioramento delle condizioni di vita e ai progressi della medicina moderna. Anche se in misura inferiore, anche il progresso nella diagnosi, trattamento e prevenzione del cancro e delle patologie cardiovascolari (CVD) ha contribuito in maniera importante a incrementare l'età media di vita. D'altro canto tale fenomeno ha generato un vasto numero di persone anziane, non autosufficienti. Da tale dato scaturisce quindi la necessità da parte della medicina moderna di aumentare da un lato l'aspettativa di vita e dall'altro di evitare il decadimento fisico e cognitivo tipico dell'età avanzata.

Poche informazioni sono presenti in letteratura riguardo al ruolo dell'ipertensione nell'invecchiamento.

La pressione arteriosa (PA) elevata rappresenta uno dei principali fattori di rischio modificabili per le patologie cardiovascolari e la mortalità. Una PA sub-ottimale (pressione sistolica PAS > 115 mmHg) si ritiene sia responsabile per il 62% delle patologie cerebrovascolari e per il 49% delle CVD (World Organization. *World Heart Report 2002*).

La relazione tra pressione sanguigna e patologie cardiovascolari è indipendente da altri fattori di rischio. Da evidenze sperimentali si è visto che il controllo della PA risulta essere fondamentale nel ridurre le CVD e la mortalità. Comunque pochi dati presenti in letteratura hanno esaminato il ruolo della pressione sulla durata della vita in presenza e in assenza di patologie cardiovascolari. Sebbene la risposta a questo interrogativo possa sembrare ovvia gli studi condotti su altri fattori di rischio hanno fornito evidenze in apparenza inaspettate. Ad esempio, l'obesità è associata con un'aspettativa di vita più

corta e al tempo stesso con un incremento della estensione della vita in presenza di patologie cardiovascolari, con il risultato quindi che il controllo dell'obesità potrebbe portare a una diminuzione della morbilità cardiovascolare (M. Pardo Silva, unpublished data, 2003).

Anche il fumo è correlato con una minore aspettativa di vita ma con un numero di anni affetti da CVD inferiore. Questo perché i fumatori muoiono giovani per altre cause, e non raggiungono quindi l'età avanzata in corrispondenza della quale l'incidenza delle patologie cardiovascolari risulta maggiore. Ne consegue che una diminuzione del fumo conduce sì a un incremento nell'aspettativa di vita totale, ma al tempo stesso anche a una maggiore morbilità per patologie cardiovascolari.

I risultati dello studio condotto da Franco e al. evidenziano quindi un'importante associazione tra un incremento della pressione sanguigna e l'aspettativa di vita totale. Se ne deduce quindi che ottimizzando il controllo della PA per condurla a valori normali e evitando l'ipertensione si potrebbe potenzialmente aumentare la durata della vita, e nonostante il conseguente invecchiamento della popolazione, ridurre l'incidenza delle CVD nella popolazione generale (Franco et al., 2005).

L'ipertensione essenziale è strettamente correlata al processo di invecchiamento negli umani. La pressione sistolica (PAS) aumenta continuamente con l'età, mentre la diastolica (PAD) cresce fino alla sesta decade di vita per poi stabilizzarsi o diminuire nell'età avanzata. Tali cambiamenti età-dipendenti sia nella pressione sistolica che nella diastolica sono da correlare all'indurimento delle arterie tipico della vecchiaia.

Soggetti che presentano un eccessivo incremento dell'indurimento delle arterie con l'età sono sottoposti a un accelerato invecchiamento arterioso e presentano un maggior rischio per morbilità e mortalità cardiovascolare (Bentos A., 2005). Diversi studi hanno evidenziato che un incremento della pressione sanguigna in età intermedia è associato con manifestazioni di invecchiamento arterioso accelerato in età avanzata. Tali dati confermano i risultati dello Studio Framingham secondo cui i soggetti con PA elevata presenteranno un eccessivo incremento della PAS e un decremento della PAD in età avanzata (Franklin et al., 2004). Si instaura quindi un circolo vizioso tra l'aumento della

pressione sanguigna e l'indurimento delle arterie. Un incremento cronico nella PAS e nella PAD in individui di età media è responsabile delle modificazioni strutturali e funzionali a carico della parete vascolare che conducono in ultima analisi all'indurimento dei vasi età-dipendente.

Quest'ultimo induce inoltre un incremento nella pressione sistolica, con una contemporanea riduzione della pressione diastolica. Si può quindi ipotizzare che l'invecchiamento precoce vascolare causato dall'ipertensione a livello delle piccole e grandi arterie determini una squilibrata perfusione dei diversi organi e quindi contribuisca non solo alle complicanze cardiovascolari, ma anche al declino funzionale di differenti organi e sistemi, facilitando di conseguenza l'instaurarsi di patologie correlate all'età.

5 Cromosoma Y e pressione

L'ipertensione essenziale rappresenta un classico esempio di patologia complessa, multifattoriale e poligenica, sessualmente dimorfica, avendo gli uomini una pressione sanguigna significativamente più alta rispetto alle donne di pari età prima della menopausa.

Wiinber e colleghi in uno studio su 352 uomini e donne danesi normotesi, scelti in un range di età da 20 a 79 anni, ha osservato che la pressione sanguigna andava aumentando con l'età sia per gli uomini che per le donne, ma che gli uomini presentavano nell'arco delle 24 ore una pressione media più elevata, di circa 6-10 mmHg, rispetto alle donne di pari età (Wiinber N., Hoegholm A., et al., 1995).

Anche l'incidenza dell'ipertensione non-controllata è maggiore negli individui di sesso maschile rispetto alle donne. Successivamente alla menopausa le donne presentano una PA più elevata degli uomini, indicando come gli ormoni sessuali possano contribuire in maniera significativa alle differenze nella pressione sanguigna tra i due sessi (Reckelhoff J.F., 2001).

Da tale dato emerge una maggiore morbilità e mortalità per patologie cardiovascolari negli uomini rispetto alle donne. La presenza del cromosoma Y rappresenta il fattore discriminante e può quindi contribuire in maniera importante alla dicotomia sessuale osservata nel rischio cardiovascolare. È ormai accertato che i geni presenti sul cromosoma Y, oltre ad essere responsabili della differenziazione sessuale maschile, sono coinvolti anche in altre funzioni, tra cui la regolazione della pressione sanguigna.

Tali risultati emergono da studi condotti su ratti spontaneamente ipertesi (SHR) e ratti spontaneamente ipertesi soggetti a ictus (SHRSP). I maschi SHR e SHRSP mostrano livelli di PA più elevati rispetto alle femmine (Ely D.L., Turner M.T., 1990).

Il cromosoma Y del ceppo SHR è quindi ritenuto essere parzialmente responsabile per l'aumento della pressione sanguigna in questi topi. I dati successivi derivati da incroci tra ratti SHR/SHRSP e ratti normotesi appartenenti al ceppo Wistar – Kyoto (WKY) hanno

confermato tale ipotesi. Infatti, la discendenza maschile con un cromosoma Y ipertensivo (padre SHR/SHRSP x madre WKY) presenta una PA significativamente più alta rispetto ai maschi con un cromosoma Y normotensivo (padre WKY x madre SHR/SHRSP). Nessuna differenza è stata invece osservata tra femmine nate dagli stessi incroci. (Turner M.T., et al., 1991).

Al fine di esplorare ulteriormente il ruolo del cromosoma Y, sono stati prodotti ratti di ceppi consomici immettendo il cromosoma Y del ceppo normotensivo WKY nel background genetico (autosomi e cromosoma X) del ceppo ipertensivo SHRSP (ceppo SP.WKYGlaY_w) e viceversa (ceppo WKY.SPGlaY_s). È stata quindi misurata la pressione arteriosa dei ceppi consomici e confrontata con quella della controparte parentale prima e dopo un carico di sale all'1%. La pressione del ceppo WKY.SPGlaY_s era significativamente più alta di quella del ceppo parentale WKY, mentre la pressione del ceppo SP.WKYGlaY_w risultava inferiore rispetto a quella del genitore SHRSP. Questo dimostra come il cromosoma Y SHRSP sia fondamentale per la completa espressione dell'ipertensione in ratti maschi SHRSP.

Il meccanismo responsabile della differenza di pressione tra i sessi non è ancora del tutto noto, ma esiste una chiara evidenza secondo cui gli androgeni, e quindi il testosterone, giocano un ruolo rilevante nella regolazione della PA.

A conferma di tale ipotesi, studi condotti attraverso tecniche di monitoraggio della pressione nei bambini hanno mostrato come questa aumenti con l'età sia nei ragazzi che nelle ragazze. Con l'inizio della pubertà, i ragazzi hanno una pressione più elevata rispetto alle ragazze della stessa età. Dai 13 ai 15 anni la pressione sistolica è approssimativamente di 4 mmHg superiore nei ragazzi rispetto alle ragazze, mentre in corrispondenza dei 16-18 anni tale differenza va da 10 a 14 mm Hg (Harshfield G.A., Alpert B.S., et al., 1994).

Un'altra evidenza del ruolo del testosterone nella regolazione della pressione sanguigna deriva da esperimenti condotti su ratti maschi castrati. La castrazione in giovane età (3-5 settimane) attenua lo sviluppo dell'ipertensione in ceppi SHR. Inoltre il blocco cronico del recettore degli androgeni con l'antagonista flutamide determina una diminuzione

della pressione sanguigna nei maschi SHR a livelli analoghi a quelli delle femmine SHR (Reckelhoff J.F., Zhang H., et al., 1999).

Incrementi nei livelli di androgeni sia negli uomini che negli animali determinano un aumento parallelo della pressione sanguigna. Donne con ovaio policistico o adenomi secernenti che determinano un aumento dei livelli di testosterone, sono soggette ad ipertensione (Sorano D., Prasad V., et al., 1999). In studi su modelli animali il trattamento con testosterone aumenta la PA nelle femmine ovariectomizzate e nei maschi castrati SHR (Reckelhoff J.F., Zhang H., et al., 1998).

5.1 Polimorfismo centromerico *HindIII*, pressione sanguigna e lipidi sierici

La correlazione tra cromosoma Y e pressione sanguigna negli animali è stata ampiamente dimostrata, mentre ancora pochi e discordanti sono i dati presenti in letteratura riguardo il ruolo del cromosoma Y nella regolazione della pressione negli uomini.

Il primo studio in merito è stato condotto da Ellis et al nel 2000 su una casistica di 409 australiani. Al fine di esaminare l'associazione tra cromosoma Y e pressione sanguigna è stato analizzato un polimorfismo biallelico centromerico, *HindIII*, localizzato nella regione non ricombinante (NRY). I risultati di tale studio hanno mostrato che nella coorte in esame il polimorfismo era associato con una significativa differenza nella pressione diastolica, ovvero gli individui che presentavano il polimorfismo (genotipo **A** o *HindIII*+) avevano una pressione diastolica più bassa rispetto a quelli col genotipo più frequente (genotipo **B** o *HindIII*-). Tale risultato è stato confermato successivamente in popolazioni polacche e scozzesi in cui la presenza del polimorfismo si accompagnava a un incremento statisticamente significativo sia della pressione sistolica che diastolica (Charchar et al., 2002).

Tuttavia l'effetto genotipico di *HindIII* sulla pressione sanguigna si è rivelato opposto negli australiani di origine caucasica quando confrontati con i polacchi e gli scozzesi. Inoltre, nessuna differenza statisticamente significativa è stata osservata in pazienti spagnoli con infarto miocardio, né in individui coreani.

Un unico lavoro analizza l'associazione tra il polimorfismo *HindIII* del cromosoma Y e i livelli di colesterolo in una popolazione di 1288 uomini polacchi. Gli individui con la variante *HindIII*- presentano dei livelli di colesterolo totale e LDL significativamente più elevati rispetto ai soggetti con genotipo *HindIII*+ (Charchar F.J., Tomaszewski M., et al., 2004).

6. Peculiarità genetica della popolazione sarda

La popolazione sarda ha da sempre suscitato un notevole interesse in genetica umana sia per la peculiare distribuzione delle diverse varianti genetiche, sia per le numerose malattie su base genetica particolarmente frequenti nell'isola. Oggi è possibile stilare un primo bilancio delle evidenze accumulate nel corso degli ultimi anni e tentare di ricostruire alcuni avvenimenti della storia evolutiva di questa popolazione. Dall'analisi dei vari sistemi genetici analizzati si evince che la popolazione sarda, pur collocandosi nell'ambito della variabilità europea, manifesta tutta una serie di caratteristiche di unicità. Alcune varianti genetiche particolarmente frequenti in Sardegna sono rare o assenti in altre popolazioni, mentre altre varianti comuni al di fuori della Sardegna sono rare nell'isola. Queste caratteristiche peculiari si spiegano solo attraverso un isolamento plurimillenario rispetto alle altre popolazioni. Esistono inoltre numerose informazioni sulla distribuzione della variabilità all'interno dell'isola. In Sardegna esiste quindi una notevole variabilità genetica interindividuale ma non esiste una significativa eterogeneità genetica nella distribuzione di tale variabilità quando si confrontano le principali macro-regioni dell'isola. Il fatto che macro-regioni come la Barbagia non si differenzino significativamente rispetto a regioni costiere come l'area di Cagliari o di Oristano, indica che l'apporto genetico delle varie popolazioni che hanno occupato la Sardegna, Fenici, Punici, Romani, Bizantini etc, è stato sostanzialmente marginale. Questa osservazione si spiega tenendo conto dei rapporti demografici fra invasori e sardi nativi, rapporti che erano decisamente a favore dei secondi. Infatti in base ai reperti archeologici e in particolare in base ai 3.000 nuraghi presenti nell'isola si è calcolato che circa 3.000 anni fa la popolazione sarda fosse pari a circa 200.000-300.000 individui. Un altro aspetto interessante è rappresentato dal fatto che la notevole variabilità presente nella popolazione sarda generale suggerisce un numero relativamente alto di fondatori e/o una serie di eventi di fondazione in un arco di tempo sufficientemente lungo.

L'elevata variabilità interindividuale spiega inoltre anche una certa micro-differenziazione osservata comparando piccoli paesi dell'interno. Tale ridotta variabilità è legata al ridotto numero di persone che hanno fondato quei paesi che determinava una perdita casuale della variabilità presente in quei "micro-isolati". L'analisi del cromosoma Y è particolarmente adatta agli studi di genetica di popolazioni. Infatti, mentre i cromosomi autosomici vanno incontro durante la formazione dei gameti a continui rimescolamenti con scambi di materiale genetico paterno e materno, il cromosoma Y viene trasmesso per la maggior parte della sua grandezza in blocco da maschio a maschio. Questa peculiare modalità di trasmissione semplifica la ricostruzione di una serie di processi del passato. Nel loro insieme le evidenze sperimentali derivanti dallo studio del cromosoma Y nella popolazione sarda sembrano fornire una linea interpretativa orientata verso l'esistenza di due ondate di popolazioni fondatrici: una principale pre-Neolitica, l'altra tardo neolitica.

In seguito dopo l'arrivo in Sardegna delle varie tribù di fondatori e nel corso dei millenni si sarebbero verificati scambi e flusso interno alla Sardegna che avrebbero contribuito al processo di omogeneizzazione intra-regionale nella distribuzione di tali varianti. La conoscenza dell'assetto genetico delle popolazioni non solo permette di capire la loro origine, ma è anche essenziale per la ricerca dei geni coinvolti nella suscettibilità nei confronti di determinati tipi di patologie.

7. Scopo del lavoro

Questo studio si prefigge i seguenti obiettivi:

- Valutare la frequenza del genotipo A e B del polimorfismo centromerico del cromosoma Y *HindIII* nei confronti della pressione arteriosa.
- Valutare la frequenza dei due genotipi con il progredire dell'età in una coorte di pazienti campionati per decenni di età.

8. Materiali e Metodi

8.1 Progetto AkeA

Lo studio AkeA, diretto dal Prof. Luca Deiana, è uno studio epidemiologico nato nel 1997 con il censimento dei 377 comuni della Sardegna alla ricerca di longevi e ultralongevi certificati anagraficamente, con lo scopo di investigare le cause genetiche e non dell'eccezionale presenza di ultracentenari in Sardegna. Nell'isola, infatti, è stata constatata la presenza di numerosi ultracentenari (nel luglio 2007 sono più di 330), in media circa 22 ogni centomila abitanti (ciò è valso alla Sardegna l'appellativo di "Isola dei Centenari"), contro una media tra gli 8 e 10 in altre parti del mondo. Questo rapporto risulta in crescita col passare del tempo, dal momento che nel periodo '97-'99 la media è di 13,5 ultracentenari (in questa prima fase lo studio non era comprensivo di tutti i paesi della Sardegna), e nel 2000 è salita a 19.

Sono state individuate delle zone interne ad alta concentrazione di longevi, e si è scoperto che il rapporto maschi/femmine ultracentenari in Sardegna è notevolmente diverso da quello presente altrove. Se nel resto d'Italia ed in Occidente il rapporto è di 1 a 4, se non addirittura di 1 a 7, nell'isola è generalmente al di sotto di 1 a 2, per diventare paritetico nelle aree interne (Deiana L., Ferrucci L., et al., 1999; Poulain M., Pes G.M., et al., 2004.).

Il progetto AkeA si avvale di un'equipe di medici, biologi e demografici che raccolgono e integrano al fine di una visione d'insieme del fenomeno "longevità" i risultati delle analisi genetiche, con i dati anamnestici delle cartelle cliniche, somministrate in seguito a previo consenso ai soggetti reclutati, con i dati anagrafici.

8.2 Validazione dei dati anagrafici

Per il processo di validazione e per ricostruire gli alberi genealogici sono stati utilizzati i dati di stato civile e i registri parrocchiali. I dati di stato civile includono i registri di tutti gli eventi di nascita, morte e matrimonio verificatisi in ciascun comune a partire dal 1866. Sono stati presi in considerazione anche i registri dell'Anagrafe, composti da schede individuali. Per completare la procedura di validazione si è ricorso anche all'atto di nascita, l'atto (o gli atti) di matrimonio, il foglio anagrafico del centenario, il certificato di nascita, di matrimonio e di morte dei genitori, il certificato di nascita di ciascun figlio del centenario, i loro fogli anagrafici, e il certificato di nascita, di morte e il foglio anagrafico dei fratelli del centenario. La validazione è completa se c'è coerenza tra le informazioni raccolte nei diversi documenti. Per gli anni precedenti al 1866, si sono utilizzati i registri parrocchiali (*Quinque Libri*): i "Libri dei Battesimi", i "Libri dei Matrimoni", i "Libri dei Defunti", e gli Status Animarum (una sorta di censimento della popolazione delle parrocchie).

8.3 La storia della popolazione dai *Quinque Libri*

La storia della popolazione nel Settecento ha come fonti i *Quinque Libri* delle chiese parrocchiali. Come risaputo l'anagrafe comunale, istituita nel Regno Sardo con legge del 1855, entra in vigore nel 1856, per cui i libri parrocchiali sono le uniche fonti attraverso le quali è possibile ricostruire con una certa attendibilità il movimento demografico di un paese prima di tale data.

Queste fonti, così come quelle di ogni parrocchia, appaiono lacunose in quanto non coprono tutto il secolo al quale si estende la nostra ricerca.

I *Quinque Libri*, oggi custoditi negli archivi vescovili, erano i registri nei quali, nel regno di Sardegna, i parroci annotavano i cinque atti fondamentali dell'esistenza di ciascun loro

parrocchiano: il battesimo, la cresima, il matrimonio, lo stato delle anime (cioè la composizione del nucleo familiare dei cui componenti a cominciare dal capofamiglia, venivano registrati il nome, il grado di parentela e il mestiere), infine la morte ed eventualmente il testamento.

I registri parrocchiali furono il solo documento che certificasse le vicende di ciascun sardo, e quindi, la consistenza demografica della comunità cui apparteneva, fino al 1865, quando fu istituito il servizio di stato civile, del quale il potere civile si assunse in modo esclusivo i compiti.

È del tutto evidente che per un genetista i *Quinque Libri* costituiscono un patrimonio d'informazioni di altissimo valore, poiché permettono di ricostruire, generazione dopo generazione, le linee di discendenza di tutti coloro i quali appartengono a una determinata popolazione.

La registrazione degli atti si interrompe in occasione delle visite pastorali per consentire la trascrizione dell'elenco dei cresimati. Le ultime pagine, infine, riportano decreti e suggerimenti del vescovo che invita i sacerdoti a recitare in <<idioma materno >>, prima della messa solenne, l'atto di fede, di speranza e di carità.. Normalmente gli atti riportano la data del battesimo, il nome del battezzato, quelli dei genitori, dei padrini e la loro provenienza. In caso di battezzati illegittimi viene riportato il nome e il cognome della madre e per i neonati abbandonati è usata la formula << sus padre se ignoran >>. A partire dal 1799 vengono indicati anche l'ora e il giorno della nascita oltre che, logicamente, la data del battesimo. La firma del sacerdote che ha officiato il rito appare negli atti a partire dal 1742; e prima di tale data il nome dell'officiante si legge inserito nell'atto stesso. La lingua con la quale l'atto è redatto è la sarda fino al 1758, poi prevale il casigliano.

8.4 Coorte

Tutti i soggetti genotipizzati in questo studio appartengono al progetto AkeA (sotto autorizzazione del direttore scientifico del progetto Prof. Luca Deiana).

Per questo studio sono stati reclutati 666 soggetti di età compresa tra i 60 e i 108 anni. Per ciascun soggetto sono state effettuate tre misurazioni della pressione arteriosa sistolica (PAS) e diastolica (PAD) e poi calcolati i valori medi di entrambe, la pressione differenziale (PP), e la MAP ($= PAD + 1/3 PP$). I soggetti sono stati sottoposti a misurazione del peso corporeo e dell'altezza e l'IMC è stato calcolato [$\text{Peso (Kg)}/\text{Altezza}^2 \text{ (m)}$].

I dati relativi alla storia clinica (patologie cardiovascolari, storia di ipertensione arteriosa), al trattamento farmacologico e l'abitudine al fumo di sigaretta sono stati raccolti per tutti i pazienti.

Campioni di sangue venoso sono stati sottoposti alle analisi per la determinazione dell'esame emocromocitometrico, il profilo lipidico, renale ed epatico.

L'estrazione del DNA è stata effettuata tramite la metodica con fenolo-cloroformio e i campioni di DNA sono stati conservati a -20°C fino al loro utilizzo.

8.5 Determinazione del polimorfismo HindIII

Sono stati utilizzati approssimativamente 100 ng di DNA per ciascuna reazione di amplificazione condotta secondo la metodica descritta da Ellis et al. (Hypertension, 2000), con l'utilizzo dei seguenti primers:

(forward) 5'-TCTGAGACACTTCTTTGTGGTA-3'

(reverse) 5'-CGCTCAAAATATCCACTTTCAC-3'

Le condizioni di amplificazione sono riportate nelle tabelle sottostanti.

Reagenti	Concentraz. finale	Quantità (μl)
Buffer 10X	1X	2,5
dNTPs	0,1 mM	0,25
primer (F)	0,2 μM	0,5
primer (R)	0,2 μM	0,5
Taq	1 U	1
H2O		15,25
DNA		5

Temperatura	Tempo	Cicli
95°	5 ^I	1
95°	30 ^{II}	35
60°	30 ^{II}	35
72°	1 ^I	35
72°	10 ^I	1
4°	∞	1

In questo modo entrambe le copie della sequenza alfoide vengono amplificate, ma solo una contiene il sito di restrizione per l'enzima *HindIII*. In presenza del sito di taglio (designato come genotipo A o *HindIII+*) la sequenza viene tagliata in due frammenti di 250 e 35 bp. Ne consegue che la presenza del polimorfismo determina la formazione di tre frammenti di 285, 250 e 35 bp rispettivamente, mentre il genotipo B o *HindIII-* corrisponde a una singola banda di 285bp.

La separazione dei frammenti è stata effettuata su gel d'agarosio al 2%.

8.6 Analisi statistica

L'analisi della coorte e' stata effettuata stratificando la stessa per decenni di eta': l'analisi delle medie delle variabili nei sottogruppi e' stata eseguita tramite analisi della varianza (ANOVA) con correzione 'post-hoc' di Bonferroni. Il genotipo e' stato valutato in relazione a variabili categoriche (classi di eta', status iperteso/normoteso) tramite test χ^2 , e a variabili continue (fattori di rischio) tramite Student t-test (variabili distribuite normalmente) o Wilcoxon rank-sum test (variabili distribuite non normalmente).

L'analisi di sopravvivenza e' stata eseguita per valutare la probabilita' di evento (decesso) in relazione al genotipo dell'*HindIII*.

Per tutti i test il valore di $p < 0.05$ e' stato considerato come significativo; il software Stata 9.2 e' stato usato per l'analisi.

9. Risultati

Le caratteristiche generali della coorte divisa per decenni sono illustrate in **Tab.1**. Nel nostro campione sono stati considerati come normotesi i soggetti con una PA <140/90 non sottoposti a terapia anti-ipertensiva. Tra i soggetti ipertesi (PA \geq 140 e/o \geq 90), 165 erano in terapia.

Con l'avanzare dell'età l'indice di massa corporea (IMC) tende a diminuire, e sia il colesterolo totale che i trigliceridi presentano valori significativamente più elevati nella fascia al di sotto dei 70 anni rispetto alle altre classi di età ($p<0.001$). La pressione arteriosa sistolica mostra una sostanziale stabilità fino alla decade con età compresa fra 80 e 89 anni per avere poi una diminuzione statisticamente significativa e stabile nella fascia di età compresa fra 90 e 99 anni e da 100 anni in poi. Facciamo notare, in aggiunta, che la numerosità delle fasce di età esaminate si è mantenuta sufficiente alla corretta esecuzione della analisi statistica anche nelle fasce di età più avanzate, garantendo quindi una corretta informatività della coorte di studio.

Tab.1

	<70	70-79	80-89	90-99	>100
N.	119	125	141	172	116
IMC	27.1[24.5-29.2]	27.2[24.8-30.3]	26.4[23.8-29.1]	24.7[22.2-27.9]	23.9[20.8-26.8]*
PAS	140[130-154]	135[123-150]	140[125-150]	130[120-145]	130[120-140]*
PAD	87[80-94]	80[76-90]	80[75-85]	80[70-85]	70[69-80]*
Colesterolo totale	217[193-248]	195[168-218]	203[181-228]	189[162-220]	181[153-203]*
Colesterolo HDL	47[40-55]	46[40-56]	49[42-60]	48[39-58]	43[36-52]*
Trigliceridi	139[95-196]	97[81-120]	102[79-136]	104[83-129]	100[80-148]*
Terapia [n (%)]	23 (22.7)	64 (58.1)	81 (59.5)	98 (58.7)	41 (35.3)
Normotensione [n (%)]	30	24	28	37	51

mediana [range interquartile]; * $p<0.001$; (IMC indice di massa corporea, PAS pressione arteriosa sistolica, PAD pressione arteriosa diastolica).

La presenza del genotipo A (*HindIII*+) è stato accertata nel 74,2% della coorte globale (**Tab.2**), con una frequenza nettamente superiore rispetto al genotipo B per ogni classe di età esaminata. La frequenza relativa dell'allele A risulta significativamente differente nelle diverse fasce di età ($\chi^2= 13.2$, $p=0.010$): abbiamo osservato un progressivo aumento della frequenza del genotipo A (dal 63 all'84%) fino alla fascia di età comprendente i soggetti di 80-89 anni, mostrando poi valori costanti intorno al 77% nelle fasce di età successive. In sostanza, il genotipo A appare più presente con l'avanzare dell'età raggiungendo valori di significatività statistica dopo gli 80 anni.

Tab.2

Decadi di età	HindIII		Totale
	A (<i>HindIII</i>+) 	B (<i>HindIII</i>-) 	
<70	72 (62.6%)	43 (37.4%)	115
70-79	87 (70.7%)	36 (29.3%)	123
80-89	113 (80.7%)	27 (19.3%)	140
90-99	133 (77.3%)	39 (22.7%)	172
>100	89 (76.7%)	27 (23.3%)	116
Totale	494 (74.2%)	172 (25.8%)	666

Al fine di valutare quindi se l'allele B, maggiormente rappresentato nella fascia di età al di sotto dei 70 anni, fosse associato a un tasso di mortalità più elevato abbiamo associato i principali fattori di rischio cardiovascolari ai due genotipi A e B. Come illustrato in **Tab.3 e Tab.4** nessuno di essi risulta correlato al genotipo in esame. Anche l'analisi della relazione fra pressione arteriosa e "ricchezza" di uno dei due genotipi valutati non ha mostrato significatività di sorta in nessuna delle fasce di età analizzate.

Tab.3

	A	B	p
PAS	132 [129-135]	135 [120-150]	0.45
PAD	73 [70-78]	80 [70-89]	0.17
Frequenza cardiaca	70 [64-76]	70 [64-80]	0.39
Colesterolo totale	194 [168-223]	197 [176-223]	0.85
Colesterolo HDL	47.0 [39.0-57.0]	46.0 [40.0-55.0]	0.54
Trigliceridi	104 [81-142]	104 [83-138]	0.91
IMC	25.9 [23.3-28.9]	26.4 [23.3-29.1]	0.42

Mediana + range interquartile (Wilcoxon Rank-sum test); (IMC indice di massa corporea, PAS pressione arteriosa sistolica, PAD pressione arteriosa diastolica).

Tab. 4 Profilo lipidico nelle 2 categorie genotipiche della coorte in esame

	Genotipo A	Genotipo B	p
colesterolo	197 ±1.9	197 ±3.3	0.97 (t-test)
hdl	49.5 ±0.7	48.3 ±1.1	0.41 (t-test)
tg	121 ±3.0	120 ±5.0	0.78 (t-test)

Analisi PA/Genotipo

Sia con l'analisi quantitativa che qualitativa non abbiamo osservato alcuna associazione tra genotipo in esame e pressione sanguigna.

Analisi Qualitativa negli ipertesi/o trattati per IPT o con PA>140/90

Tab.5 La tabella riporta l'analisi qualitativa per la dicotomia ipertesi-normotesi (ipertensione = pazienti in trattamento anti-ipertensivo o con pressione arteriosa>140/90)

Hind_g	0	1	Total
(A) 1	125	345	470
(B) 2	40	121	161
Totale	165	466	631

$$\text{Pearson } \chi^2(1) = 0.1904 \quad \text{Pr} = 0.663$$

Analisi Quantitativa nei soli non trattati

Tab.6 La tabella riporta l'analisi quantitativa dei pazienti non in trattamento anti-ipertensivo nella nostra coorte

Genotipo	A/HindIII+	B/HindIII-	p
PAS	134±1.35	133±2.3	0.56
PAD	79.9±0.8	80.2±1.30	0.88

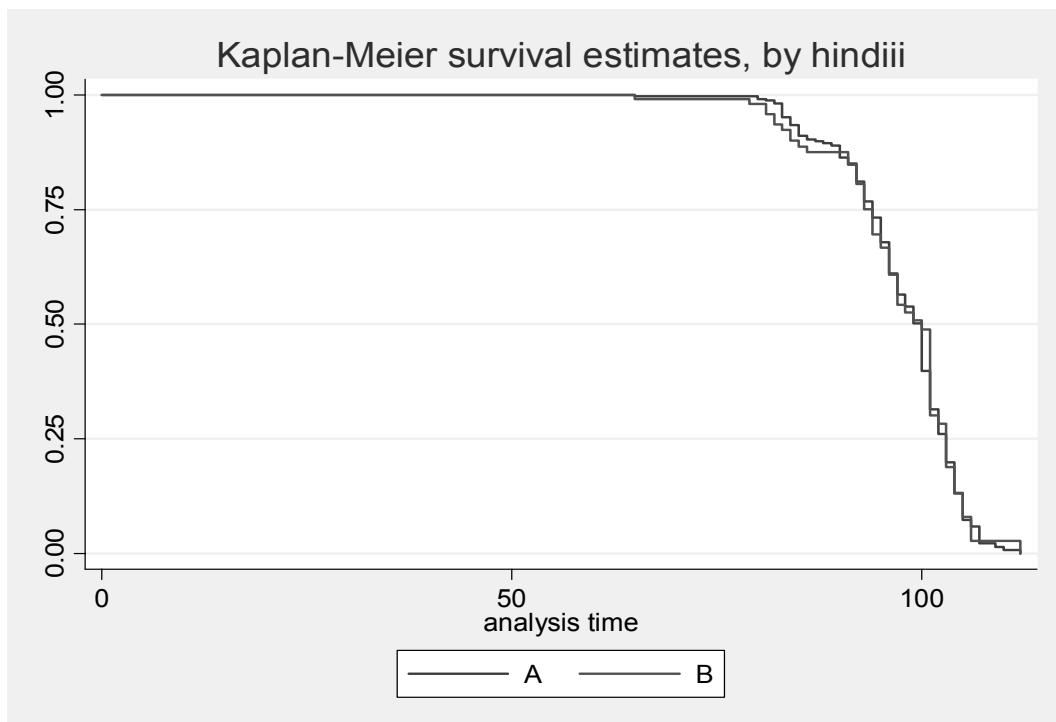
Risultati analisi di sopravvivenza

Totale 673 soggetti

La frequenza degli eventi era simile nei 2 genotipi (chi2):

	HindIII		Totale
	A	B	
viventi	155 44.16 %	44 41.90%	199 43.64
deceduti	196 55.84 %	61 58.10%	257 56.36
Totale	351	105	456

Pearson $\chi^2(1) = 0.1671$ Pr = 0.683



10. Discussione

I risultati del nostro studio hanno indicato che il genotipo *HindIII*+/A:

1). è presente con frequenza maggiore, statisticamente significativa, nelle persone con età superiore ad 80 anni e presenta una frequenza crescente dalla età di 60 anni a quella di 80 anni; 2). non si associa ai livelli di pressione arteriosa nell'età superiore a 60 anni; 3). non si associa con i parametri lipidici nè con la funzione renale nè con i principali indicatori antropometrici al variare delle fasce di età considerate; 4). non implica un maggior rischio cardiovascolare come dimostrato dalla assoluta eguaglianza delle curve di sopravvivenza valutate per i due genotipi in funzione del progredire della età.

Il nostro studio è stato condotto su una coorte di soggetti la cui età andava dai 60 ai 108 anni: la coorte mostra in se stessa caratteristiche rare e peculiari in quanto ogni fascia di età, anche quelle più avanzate, presenta una numerosità pressochè simile ed assolutamente adeguata alle valutazioni statistiche oggetto dello studio stesso.

L'aumento netto della frequenza del genotipo A di *HindIII* osservato a partire dall'età di 80 anni non si accompagna a variazioni significative dei parametri funzionali studiati ed anche il profilo di rischio cardiovascolare dei pazienti rimane pressochè invariato e sovrapponibile a quello presentato dai pazienti di genotipo A. Coerentemente, anche la valutazione delle caratteristiche di sopravvivenza dei due sottogruppi della nostra coorte (genotipo A vs genotipo B) effettuata per mezzo delle curve di Kaplan-Meyer, non evidenzia alcuna differenza statisticamente significativa. Per la valutazione delle curve di sopravvivenza abbiamo preso in considerazione il decesso dovuto ad eventi maggiori cardiovascolari o per ogni altra causa "acuta". Su questa base si può quindi affermare che la mancanza di associazione di *HindIII* (A o B) con gli eventi escluda un ruolo di questo gene nella definizione del rischio CV. Concorde con ciò è anche l'evidenza di mancanza di associazione con la pressione arteriosa: degno di nota è il dato della diminuzione della media delle pressioni arteriose sia sistolica sia diastolica con l'avanzare della età a partire dal 90° anno di età. Nelle due decadi più avanzate infatti la pressione appare

statisticamente inferiore a quella delle decadi precedenti. Questo fatto può essere spiegato sia con la perdita graduale di controllo del circolo con l'aumentare dell'età che comporta un globale deterioramento delle funzioni vitali del paziente, sia con il fatto che, in realtà, alle decadi più avanzate arrivino, ovviamente, solo i sopravvissuti, cioè, in definitiva, gli individui più sani.

Sulla base di quanto detto in precedenza, possiamo quindi ipotizzare che l'effetto di *HindIII*, genotipo A, si possa esprimere su numerosi fattori di "qualità biologica" dell'organismo premettendo a quest'ultimo una maggiore sopravvivenza rispetto ai portatori di genotipo B. Ovviamente non possiamo escludere che fattori confondenti rimasti indeterminati nella nostra coorte, inclusi fattori ambientali non evidenziati, possano aver giocato un ruolo nel determinare almeno in parte i risultati da noi osservati. Studi futuri di carattere funzionale potranno sciogliere i dubbi su un possibile ruolo di *HindIII* genotipo A nell'invecchiamento.

Bibliografia

- Aitken R.J., Baker M.A., “Reactive oxygen species generation by human spermatozoa: a continuing enigma”. *Int. J. Androl.*; **25** (4): 191-4, 2002.
- Almagor M., Dan-Goor M., Hovav Y, Yaffe H., “Spontaneous pregnancies in severe oligoasthenozoospermia”. *Hum. Reprod.*; 16 (8): 1780-1, 2001.
- Bentos A., “Does blood pressure control contribute to a more successful aging?”, *Hypertension*, 46: 261-262, 2005.
- “A Nomenclature System for the Tree of Human Y-Chromosomal Binary Haplogroups” The Y Chromosome Consortium; *Genome Res.*; **12**: 339-348, 2002.
- Charchar F.J., Tomaszewski M., Lacka B., et al., “association of the human Y chromosome with cholesterol levels in the general population”, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*; **24**: 308-312, 2004.
- Charchar FJ, Tomaszewski M, Padmanabhan S, Lacka B, Upton MN, Inglis GC, Anderson NH, McConnachie A, Zukowska-Szczechowska E, Grzeszczak W, Connell JM, Watt GC, Dominiczak AF. “The Y Chromosome Effect on Blood Pressure in Two European Populations” *Hypertension.*; **39**:353-6, 2002.

- Charchar FJ, Tomaszewski M, Strahorn P, Champagne B, Dominiczak AF “Y is there a risk to being male?” *Trends Endocrinol Metab.*; **14** (4):163-8, 2003.
- Clepet, C., Schafer, A. J., Sinclair, A. H., Palmer, M. S., Lovell-Badge, R., and Goodfellow, P. N., *Hum. Mol. Genet.* **2**, 2007–2012, 1993.

- Curtis J.J., Luke H.P., Dustan H.P., et al., “Remission of hypertension after renal transplantation”. *N. Engl. J. Med.*; **309**: 1009-1015, 1983.

- Deiana L., Ferrucci L., Pes G.M., Carru C., “AKEntannos. The Sardinia study of extreme longevity” *Aging Clin. Exp. Res.*; **11**: 142-149; 1999.

- De Llanos M., Ballescà J.L., Gazquez C., et al., “High frequency of gr/gr chromosome Y deletions in consecutive oligospermic ICSI candidates” . *Hum. Reprod.*; **20** (1): 216-20, 2005.

- Di Giacomo F., Luca F., Anagnou N., et al., “Clinical patterns of human Y chromosomal diversity in continental Italy and Greece are dominated by drift and founder effects”. *Mol. Phylogenet. Evol.* ; **28** (3): 387-95, 2003.

- Di Giacomo, Luca F., Popa L.O., et al., “Y chromosomal haplogroup J as a signature of the post-neolithic colonization of Europe”. *Hum. Genet.*; **115** (5): 357-71, 2004.

- Dumas P. et al. “Identification and chromosomal localization of ecogenetic components of electrolyte excretion”. *J. Hypertens.*; **20**: 209-217, 2002.

- Ellis J.A., Stebbing M., Harrap S.B., “Association of the human Y chromosome with high blood pressure in the general population”. *Hypertension*, 2000; **36**: 731-733.

- Ellison K.E., Ingelfinger J.R., Pivor M., Dzau V.J., “Androgen regulation of rat renal angiotensinogen messenger RNA ezpression”. *J. Clin. Invest.*, 1989; **83**: 1941-1945.

- Ely D.L., Turner M.T., “Hypertension in the spontaneously hypertensive rat is linked to the Y chromosome”. *Hypertension*; 16: 277-281, 1990.

- Ely D.L., et al. “The spontaneously hypertensive rat Y chromosome produce san early testosterone rise in normotensive rats”. *J. Hypertens.*; **12**: 769-774, 1994.

- Ely D.L., et al. “Spontaneously hypertensive rat Y chromosome increases indexes of sympathetic nervous system activity”. *Hypertension*; **29**: 613-618, 1997.

- *Fadi J. Charchar; Maciej Tomaszewski; Beata Lacka; Jaroslaw Zakrzewski; Ewa Zukowska-Szczechowska*; “Association of the Human Y Chromosome with

Cholesterol Levels in the General Population” *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2004; **24**:308.

- Franco O.H., Peeters A., Bonneux L., de Laet C., “Blood pressure in adulthood and life expectancy with cardiovascular disease in men and women”. *Hypertension*; **46**: 280-286, 2005.

- Franklin S.S., Gustin W. IV, Wong N.D., “Hemodynamic patterns of age-related changes in blood pressure.the Framingham Heart Study”. *Circulation*; **96**: 308-315, 1997.

- Giachini C., Guarducci E., Longepied G., et al., “The gr/gr deletion(s): a new genwtic test in male infertility?”. *J. Med. Genet.*; **42** (6): 497-502, 2005.

- Harshfield G.A., Alpert B.S., Pulliam D.A., “Ambulatory blood pressure recordings in children and adolescents” *Pediatrics*; **94**: 180-184, 1994.

- Hammer MF., Blackmer F., Garrigan D., et al., “Human population structure and its effects on sampling Y chromosome sequence variation”. *Genetics*; **164** (4): 1495-509, 2003.

- Harrap S.B., Wang B.Z., MacClellan D.G., “Renal transplantation between male and female spontaneously hypertensive rats”. *Hypertension*, 1992; **19**: 431-434.

- Hucklenbroich K., Gromoll J., Heinrich M., et al., “Partial deletions in the AZFc region of the Y chromosome occur in men with impaired as well as normal spermatogenesis”. *Hum.Reprod.*; **20** (1): 191-7, 2005.

- James G.D., Sealy J.E., Muller F., et al., « Renin relationship to sex, race and age in normotensive population ». *J. Hypertens.*, 1986; **4**: S387-S389.

- Jegalian K., Lahan B.T., “Le stranezze del cromosoma Y”. *Le Scienze*; **393**: 4-9, 2001.

- Jegalian K., Lahan B.T., “La strana coppia”. *Le Scienze Dossier*; **15**: 76-81, 1998.

- Knowler K.C., Kelly S., Harley V.R., “Turning on the male SRY, SOX9 sex determination in mammals”. *Cytogenet. Genome Res.*; **101**: 3-4, 2003.

- Krausz C., Fellous M., “Chromosome Y and infertility in men”. *Ann. Endocrinol. (Paris)*; **64** (5Pt): 403-12, 2003.

- Krausz C., Forti G., “Clinical aspects of male infertility”. *Results Probl. Cell. Differ.*; **28**: 1-21, 2000.

- Krausz C., Quintana-Murci L., Barboux S., et al., “A high frequency of Y chromosome deletions in males with nonidiopathic infertility”. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*; **84** (10): 3606-12, 1999.

- Krausz C., Quintana-Murci L., Rajpert- De Meyts E., et al., “Identification of a Y chromosome haplogroup associated with reduced sperm counts”. *Hum. Mol. Genet.*; **10** (18): 1873-7, 2001.

- Kunkel L., Smith K.D., Boyer S.H., et al. “ Analysis of human Y-chromosome-specific reiterated DNA in chromosome variants (mutants/sex determination)”. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; **74** (3): 1245-1249, 1977.

- Kuroda-Kawaguchi T., Skaletsky H., Brown L.G., et al., “The AZFc region of the Y chromosome features massive palindromes and uniform recurrent deletions in infertile men”. *Nat. Genet.*; **29** (3): 279-86, 2001.

- Nef S., Verma-Kurvari S., Merenmies J., et al., “Tesis determination requires insulin receptor family function in mice”. *Nature*; **426** (6964), 2003.

- Nordborg C., Nordborg E., Petursdottir V., Fyhr I.M., “ Calcification of the internal elastic membrane in temporal arteries: its relation to age and gender”. *Clin. Exp. Rheumatol.*; **19** (5): 565-8, 2001.

- Paracchini S., Stuppia L., Gatta V., et al., “Relationship between Y-chromosomal DNA haplotype and sperm count in Italy”; *J. Endocrinol. Invest.*; **25** (11): 993-5, 2002.

- Patsalis P.C., Sismani C., Quintana-Murci L., “Effects of transmission of Y chromosome AZFc deletions”. *Lancet*; **360** (9341): 1222-4, 2002.

- Poulain M., Pes G.M., Grasland C., Carru C., “Identification of a geographic area characterized by extreme longevity in the Sardinia island: the AKEA study”. *Experimental Gerontology*; **39**: 1423-1429, 2004.

- Previdere C., Stuppia L., Gatta V., et al., “Y-chromosomal DNA haplotype differences in control and infertile Italian subpopulations”. *Eur. J. Hum. Genet.*; **7** (6): 733-6, 1999.

- Reckelhoff J.F., “Gender differences in the regulation of blood pressure” *Hypertension*; **37**: 1199-1208, 2001.

- Reckelhoff J.F., Zhang H., Granger J.P., “Testosterone exacerbates hypertension and reduce pressure-natriuresis in male spontaneously hypertensive rats”. *Hypertension*; **31**: 435-439, 1998.

- Reckelhoff J.F., Zhang H., Srivastava K., “Gender difference in hypertension in spontaneously hypertensive rats: role of androgens and androgen receptor”. *Hypertension*; **34**: 920-923, 1999.

- Repping S., de Vries J.W., van Daalen S.K., et al., “The use of sperm_HALO-FISH to determine DAZ gene copy number”. *Mol. Hum. Reprod.*; **9** (4): 183-8, 2003.

- Repping S., Korver C.M., Oates R.D., et al., “Are sequence family variants useful for identifying deletions in the human Y chromosome?”. *Am. J. Hum. Genet.*; **75** (3): 514-9, 2004.

- Repping S., Skaletsky H., Brown L., et al., “Polymorphism for a 1.6 Mb deletion of the human Y chromosome persists through balance between recurrent mutation and haploid selection”. *Nat. Genet.*; **35** (3): 247-51, 2003.

- Repping S., Skaletsky H., Lange J., et al., “Recombination between palindromes P5 and P1 on the human Y chromosome causes massive deletions and spermatogenic failure”. *Am. J. Genet.*; **71** (4): 906-22, 2002.

- Repping S., van Daalen S.K., Korver C.M., et al., “A family of human Y chromosome has dispersed throughout northern Eurasia despite a 1.8 Mb deletion in the azoospermia factor c region”. *Genomics*; **83** (6): 1046-52, 2004.

- Rodriguez S, Chen XH, Miller GJ, Day I.N. “Non-recombining chromosome Y haplogroups and centromeric HindIII RFLP in relation to blood pressure in 2,743 middle-aged Caucasian men from the UK”. *Hum Genet.* 2005 Mar;**116** (4):311-8, 2005.

- Rossato M., Ferlin A., Garolla A., “Case report: high fertilization rate in conventional in vitro fertilization utilizing spermatozoa from an oligozoospermic subject presenting microdeletions of the Y chromosome long arm”. *Mol. Hum. Reprod*; **4** (5): 473-6, 1998.

- Simoni M., Bakker E., Krausz C., “EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of y-chromosomal microdeletions. State of the art 2004”. *Int. J. Androl.*; **27** (4): 240-9, 2004.

- Skaletsky H., Kuroda-Kawaguchi T., Minx P.J., et al., “The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes”. *Nature*; **423**: 825-837, 2003.

- Slee R., Grimes B., Speed R.M., et al., “A human DAZ transgene confers partial rescue of the mouse Dazl null phenotype”; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; **96** (14): 8040-5, 1999.

- Sorano D., Prasad V., Oberfield D.R., et a., “Hypertension and virilization caused by a inique dexamethasone and androgen-secreting adrenal adenoma”. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.*; **12**: 215-220, 1999.

- Tiepolo L. Zuffardi O., “Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm”. *Hum. Genet.*; **34** (2): 119-24, 1976.

- Turner M.T., et al., “Separate sex – influenced and genetic components in spontaneously hypertensive rats hypertension”. *Hypertension*; **17**: 1097-1103, 1991.

- Underhill P.A., , Shen P., Lin A.A., Jin L., Passarino G., “Y chromosome sequence variation and the history of human populations” *Nature Genetics*; **26**: 358-361, 2000.

- Veitia R.A., Salas-Cortes L., Ottolenghi C., et al., “Testis determination in mammals: more questions than answers”. *Molecular and Cellular Endocrinology*; **179**: 3–16, 2001.

- Vogt P.H., Edelman A., Kirsch S., Henegariu O., et al., “Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11”. *Hum. Genet.*; **5** (7): 933-43, 1996.

- Wiinber N., Hoegholm A., Christensen H.R., et al. “24-h Ambulatori blood pressure in 352 normal Danish subjects, related to age and gender”. *Am. J. Hypertens.*; **8**: 978-986, 1995.

- World Organization. *World Heart Report 2002: Reducing Risks, Promoting Healthy Life*, Geneva, Switzerland: World Health *Organization*; 2002.