

La valutazione della frammentazione del DNA spermatico nei soggetti infertili

Federica Cariati¹, Francesca Borrillo^{2,3}, Valeria D'Argenio^{1,2,3}, Rossella Tomaiuolo^{1,3}

¹KronosDNA s.r.l., spin-off dell'Università Federico II, Napoli

²CEINGE-Biotecnologie Avanzate scrl, Napoli

³Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università Federico II, Napoli

ABSTRACT

The laboratory assessment of sperm DNA fragmentation in infertile patients.

Over 15% of couples worldwide suffer from infertility and in 50% of cases a male factor is found. According to the World Health Organization, sperm analysis is the most appropriate test to assess male infertility. Since quite often, the conventional semen parameters are related to sperm DNA damage, the integration of this evaluation with sperm DNA fragmentation (SDF) could independently predict the sperm reproductive potential. Unfortunately, this analysis has not entered into routine clinical practice. The aim of this review is to discuss the importance of the SDF analysis and its clinical implication and to evaluate the extrinsic and intrinsic factors that affect the DNA fragmentation. In addition, principles and protocols of different methods used to evaluate and quantify the SDF are reviewed; advantages and disadvantages of different methods are reported.

INTRODUZIONE

L'infertilità maschile, riscontrata nel 7% della popolazione, è alla base del 50% dei casi d'infertilità di coppia (1). Sono note cause pre-testicolari (riconducibili a disfunzione dell'asse ipotalamo-ipofisi), testicolari (patologie prevalentemente testicolari) e post-testicolari (ostruzioni urogenitali, vasectomia, fattori delle ghiandole accessorie) con possibili alterazioni della produzione, maturazione, vitalità e liberazione degli spermatozoi (2). Nel 30-40% dei casi, in cui la causa rimane inspiegata e quindi idiopatica, si presume che questa condizione sia determinata dalla coesistenza di fattori diversi o non ben identificabili, quali ad esempio danno da stress ossidativo, disturbi genetici o epigenetici e inquinamento ambientale (3).

Secondo le linee guida dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), il principale esame diagnostico per valutare l'infertilità maschile è lo spermogramma che, convenzionalmente, comprende l'analisi del fluido seminale (colore, volume, pH e viscosità) e della parte corpuscolare (concentrazione, motilità, vitalità e morfologia degli spermatozoi) (4). Il riscontro di una o più alterazioni dei parametri che riguardano la concentrazione, la motilità e la morfologia degli spermatozoi in almeno uno spermogramma su due,

eseguito a distanza di 1 e 4 settimane, è suggestivo di infertilità maschile (5). Tra questi, sono considerati parametri particolarmente significativi l'oligospermia, l'astenospermia e la teratospermia. Nonostante queste importanti indicazioni, il potere predittivo dello spermogramma sull'esito riproduttivo è relativamente basso poiché non fornisce informazioni sulla funzionalità spermatica (6). Inoltre, i valori di riferimento dello spermogramma secondo linee guida del WHO sono determinati usando il 5° percentile come valore limite; questo potrebbe giustificare il fatto che nel 15% dell'infertilità maschile clinicamente conclamata non siano riscontrate alterazioni dello spermogramma (6). Pertanto, le indicazioni ottenute dallo spermogramma non devono essere considerate come parametro assoluto della fertilità maschile, ma devono essere rapportate al quadro clinico dell'individuo e soprattutto della coppia nel suo complesso (2).

Con lo scopo di integrare le informazioni ottenute negli ultimi anni dallo spermogramma, numerosi studi sono stati focalizzati sulla valutazione dell'integrità del DNA dello spermatozoo, compresa l'identificazione di parametri (e relativi valori soglia) che possano fungere da biomarcatori di integrità funzionale del DNA spermatico (7).

Corrispondenza a: Federica Cariati, Università Federico II di Napoli, E-mail federica.cariati@unina.it

Ricevuto: 11.10.2019

Revisionato: 14.11.2019

Accettato: 27.11.2019

Publicato on-line: 15.01.2020

DOI: 10.19186/BC_2020.010

Danni al DNA dello spermatozoo sono associati ad esiti negativi sullo sviluppo embrionale, a poliabortività e ad un aumentato rischio di malattie genetiche nella prole (8-10). È importante ricordare che, durante la spermiogenesi, il DNA dello spermatozoo va incontro ad un fisiologico processo di frammentazione facilitando la riorganizzazione della cromatina; in seguito, l'intervento delle topoisomerasi ne permette la riparazione. Tuttavia, in condizioni patologiche (difetti della condensazione cromatinica, processi apoptotici e stress ossidativo) questo processo di riparazione potrebbe essere inefficace (11).

Partendo, quindi, dal presupposto che nel liquido seminale dei soggetti infertili è stata riscontrata una frammentazione del DNA spermatico (sperm DNA fragmentation, SDF) maggiore, rispetto a quella riscontrata nei soggetti fertili, la valutazione dell'integrità del genoma dello spermatozoo è stata proposta come parametro indipendente e aggiuntivo della qualità spermatica e del potenziale riproduttivo (12).

In soggetti normozoospermici e fertili, circa il 5-15% degli spermatozoi risulta avere il DNA frammentato rispetto ad un valore >30% nei soggetti con infertilità. In particolare, livelli di SDF compresi tra il 30% e il 40% sono associati negativamente con la qualità dello sperma e livelli di SDF >26% sembrano implicati nella poliabortività (13-15). Sulla base delle osservazioni che mettono in relazione l'integrità del DNA spermatico e gli esiti della gravidanza, la valutazione dell'SDF nell'iter diagnostico della coppia infertile sta assumendo una importanza sempre maggiore.

Scopo di questa rassegna è quello di analizzare e confrontare le metodiche attualmente in uso per la sua valutazione esaminando le cause più note del danno al DNA spermatico nonché i metodi utilizzati per determinarlo.

CAUSE INTRINSECHE ED ESTRINSECHE DI FRAMMENTAZIONE DEL DNA SPERMATICO

La SDF è stata attribuita ad una varietà di cause innescate da fattori intrinseci ed estrinseci di origine patologica, ambientale o riconducibili a stili di vita scorretti.

Fattori intrinseci

Un danno del DNA spermatico, che può coinvolgere uno o entrambi i filamenti, può avvenire durante la maturazione a livello testicolare o durante il transito post-testicolare (8).

Nella spermatogenesi possono essere identificate 3 fasi principali: la differenziazione delle cellule staminali spermatogoniali; le divisioni meiotiche per produrre spermatozoi aploidi; lo scambio istone-protamina a favore della motilità e della maturazione degli spermatozoi.

In ogni ciclo di spermatogenesi, fino al 75% delle cellule germinali che entrano in meiosi I viene rimosso per apoptosi, al fine di bilanciare il rapporto tra cellule di

Sertoli e cellule germinali (16-18). Tuttavia, alcune cellule germinali apoptotiche danneggiate sfuggono a questo processo, continuando a rimodellarsi e apparendo normali all'analisi morfologica dell'eiaculato (un processo denominato "apoptosi abortiva") (19).

Durante il transito nell'epididimo si verificano, invece, eventi di maturazione, tra cui l'attivazione dell'iperomotilità, la sostituzione degli istoni con le protamine e la formazione di ponti disolfuro protamina-protamina per ulteriore condensazione della cromatina. Mediante questo processo, grazie alla compattazione del genoma, si ottiene una struttura protetta; al contrario, a seguito di un deficit di protamina, il DNA è scarsamente condensato e vulnerabile al danno (20-23).

Un altro fattore che contribuisce al danno del DNA spermatico è lo stress ossidativo. Sebbene le specie reattive dell'ossigeno (ROS) siano essenziali per gli eventi di maturazione, i loro livelli sono ottimizzati dagli enzimi antiossidanti del plasma seminale e la rottura di questo equilibrio redox ottimale ha conseguenze deleterie per l'integrità della cromatina (24, 25). Nel 30-80% dei casi di infertilità maschile è stato identificato un livello significativo di stress ossidativo (26-28). La sovraesposizione innesca una cascata di segnali di stress ossidativo che guidano la cellula verso l'apoptosi, con conseguente danno al DNA (29, 30). Gli antiossidanti del liquido seminale, principalmente il superossido e la glutatione perossidasi, regolano questo stato redox (31,32). Gli spermatozoi sono particolarmente vulnerabili nella fase post-testicolare, a causa dell'incapacità di rimuovere il danno al DNA con i sistemi di riparazione o clearance apoptotica (33). Studi *in vivo* condotti su animali dimostrano che le regioni associate agli istoni sono attaccate preferenzialmente dal danno mediato da ROS (34).

Fattori estrinseci

I fattori esterni correlati con elevati livelli di danno al DNA spermatico e, quindi, al potenziale di fertilità maschile sono molteplici: i più ricorrenti sono lo stile di vita scorretto (obesità, fumo e alcol) e le cause ambientali (inquinamento, esposizione a radiazioni e a temperature elevate) (3, 35,36). Studi sperimentali e clinici hanno dimostrato che il consumo di alcol, il fumo di sigaretta e una dieta errata causano carenza di vitamine e di agenti antiossidanti, contribuendo all'aumento dei livelli di stress ossidativo (37, 38). Anche un eccessivo consumo di caffeina provoca l'aumento del livello di ROS attraverso la riduzione del rame (Cu^{++} in Cu^+); ed ancora, è stata riscontrata una correlazione tra fumo di sigaretta attivo con ridotta qualità seminale, aumento della frammentazione del DNA spermatico e alterazioni della membrana plasmatica dello spermatozoo (39,40). Recenti studi hanno dimostrato che fattori fisici, come le radiazioni elettromagnetiche a radiofrequenza e le alte temperature, possono colpire il sistema riproduttivo maschile direttamente causando un aumento della produzione di ROS o indirettamente, coinvolgendo il sistema endocrino, provocando uno

squilibrio ormonale (41).

È ormai noto che infezioni genito-urinarie, ad esempio da *Chlamydia trachomatis* e *Mycoplasma* inducono la frammentazione del DNA degli spermatozoi; ne deriva quindi la necessità di eseguire un'attenta analisi microbiologica del liquido seminale e di ripeterla al termine di un'eventuale terapia (42). Inoltre, di recente interesse nell'ambito nella medicina della riproduzione, è l'infezione da papilloma virus (HPV). I soggetti affetti risultano avere un'alterazione della motilità degli spermatozoi e un'elevata frammentazione del DNA con esiti negativi sia in caso di concepimento naturale che in tecniche di fecondazione assistita (43,44). Garolla et al nel 2018 hanno pubblicato uno studio retrospettivo su circa 151 coppie infertili in cui era stata riscontrata infezione da HPV nel liquido seminale. 79 pazienti sottoposti al vaccino per HPV *versus* 72 non sottoposti a vaccino, monitorati nel tempo, hanno mostrato un miglioramento significativo di concepimento naturale e di bambini nati (45).

Le principali patologie a cui viene associata l'infertilità maschile sono diabete e cancro. Facendo riferimento alla frammentazione del DNA, è stato dimostrato che il diabete induce frammentazione del DNA nucleare e delezioni del DNA mitocondriale; studi *in vivo* su animali dimostrano che trattamenti chemioterapici hanno effetti chemiotossici sull'integrità cromatinica e sul profilo proteico della testa degli spermatozoi (46,47).

Tra le patologie più frequenti che interessano l'apparato riproduttivo in giovani pazienti, il varicocele è correlato con un aumento significativo della frammentazione del DNA spermatico (48).

Le principali conseguenze di queste alterazioni sull'esito riproduttivo sono la diminuzione della formazione di blastocisti e l'aumento dei tassi di abortività spontanea (46-48).

METODI PER LA DETERMINAZIONE DELLA FRAMMENTAZIONE DEL DNA SPERMATICO

Per la determinazione della frammentazione del DNA spermatico sono stati messi a punto vari test basati su metodiche diverse. Alcuni esempi, citati in ordine di trattazione, sono: il terminal deoxyuridine nick end labeling assay, (TUNEL) e la sua variante l'*in-situ* nick translation; lo Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA); il Comet assay (single-cell gel electrophoresis, SCGE); lo Sperm Chromatin Dispersion (SCD) test e il DNA breakage detection-fish (DBD-FISH) (49-54).

Ad oggi, i metodi più comunemente usati sono il TUNEL assay, il SCGE, l'SCD e l'SCSA, pertanto di questi sarà descritta la metodica di base, i vantaggi e gli svantaggi.

Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labelling

Il TUNEL assay è un metodo che misura direttamente il danno del DNA spermatico; si basa

sull'azione della deossinucleotidil transferasi (Terminal deoxynucleotidyl Transferase, TdT) che incorpora nucleotidi (desossiridinatrifosfato, dUTPs) marcati a livello dei gruppi 3'-OH terminali resi accessibili dalla rottura del filamento del DNA (55). I nucleotidi che vengono legati dalla TdT sono evidenziabili poiché marcati con un tag identificabile in fluorescenza o enzimaticamente (nick end labelling).

Il metodo più comunemente usato per la marcatura dei nucleotidi è la coniugazione diretta con un colorante fluorescente (solitamente FITC); alternativamente si utilizzano marcatori fluorescenti, biotinilati, digossigenilati. La rilevazione avviene mediante microscopia a fluorescenza (valutazione qualitativa) oppure utilizzando i tag fluorescenti mediante citometria a flusso (valutazione quantitativa); gli spermatozoi con un segnale di maggiore intensità sono quelli in cui c'è stata una maggiore incorporazione di nucleotidi marcati in corrispondenza del DNA danneggiato (56).

Per questa metodica sono stati riportati diversi valori soglia rapportati allo stato di fertilità maschile ma resta ancora controversa la sensibilità e la specificità (55). Inoltre, sono stati pubblicati numerosi studi che riportano una correlazione negativa tra i valori di SDF superiori al 12% e il tasso di gravidanza (57-60).

I principali vantaggi sono: la possibilità di eseguire l'analisi su una piccola quantità di campione, poiché gli spermatozoi possono essere distinti l'uno dall'altro singolarmente e la possibilità di utilizzare microscopi già presenti in laboratorio. Tra gli svantaggi, bisogna segnalare che: il metodo presenta delle limitazioni nella valutazione degli spermatozoi immaturi, e che i risultati risentono di un'elevata variabilità intra-analitica e inter-laboratorio (61).

Sperm Chromatin Structure Assay

Sviluppata negli anni '70, l'SCSA fu la prima tecnica in grado di rilevare la frammentazione del DNA spermatico nell'uomo. Da allora ha subito alcune modifiche grazie alle quali è il test commerciale più comunemente utilizzato per indagare il danno del DNA e le anomalie della cromatina negli spermatozoi.

Il DNA di campioni, freschi o congelati, viene denaturato in condizioni lievemente acide; in questo modo è facilitata la denaturazione solo del DNA danneggiato. Successivamente, le cellule spermatiche vengono colorate con arancio acridina (AO), un fluorocromo metacromatico, specifico per gli acidi nucleici. Esso emette fluorescenza nel verde quando viene intercalato nella doppia elica del DNA e nel rosso quando viene legato all'esterno della singola elica di DNA. Dal rapporto fra la fluorescenza rossa (DNA danneggiato) sulla fluorescenza totale (DNA integro e DNA danneggiato), determinato con citometria a flusso o microscopia a fluorescenza, si ricava la quota del DNA frammentato, ossia il DNA Fragmentation Index (DFI) (62). In particolare, un DFI <30% correla con una buona integrità cromatinica, al contrario un DFI ≥30% correla con anomalie della struttura cromatinica (62). L'SCSA

determina anche la quota di spermatozoi immaturi con difetti nella transizione istone-protamina (HDS); quindi, un DFI $\geq 30\%$ e un HDS del 15% correlano con bassissime probabilità di riuscita della fecondazione *in vivo* (63-65). I vantaggi di questo test sono la capacità di analizzare rapidamente un numero statisticamente significativo di spermatozoi (circa 5 000 spermatozoi per campione), l'elevata riproducibilità e la possibilità di utilizzare campioni congelati (65-67). Gli svantaggi risiedono nei costi elevati, dovuti soprattutto alle apparecchiature richieste (66,68).

Comet Assay o test della cometa

Il test della cometa (single-cell gel electrophoresis, SCGE), introdotto per la prima volta nel 1984, viene così definito, poiché, in presenza di DNA frammentato, la cellula assume un'immagine somigliante a una cometa, in cui il DNA integro occupa la testa e i frammenti si posizionano a formare la coda. Di conseguenza, la scia della cometa sarà proporzionale al danno del DNA come lunghezza e come intensità di segnale (69). Questa tecnica, basata sulla diversa mobilità elettroforetica dei frammenti di DNA a seconda della loro dimensione, prevede l'elettroforesi degli spermatozoi inclusi su gel di agarosio e, grazie all'impiego di un colorante nucleare intercalante, la successiva visualizzazione con microscopio a fluorescenza (56). Il test eseguito in condizioni di pH neutro permette di evidenziare danni al doppio filamento di DNA, mentre in condizioni alcaline può rilevare sia i danni al singolo che al doppio filamento, così come i siti alcalino-labili (69). Il fatto che molti Autori ne riconoscano la significatività è sicuramente un elemento di vantaggio; inoltre, grazie al fatto che può essere effettuato su poche cellule, risulta particolarmente indicato nei pazienti oligospermici (70-72). Tuttavia, è richiesto personale specializzato per l'esecuzione di questo protocollo laborioso e non del tutto standardizzato.

Sperm Chromatin Dispersion Test

L'SCD è una tecnica basata sul fatto che, in seguito a denaturazione acida, la dispersione della cromatina crea un alone, la cui grandezza è inversamente proporzionale al danno del DNA dello spermatozoo (73). I campioni diluiti e adagiati su microgel di agarosio su vetrino, sono prima trattati con una soluzione acida per la denaturazione del DNA e poi con una soluzione lisante per rimuovere le proteine nucleari. Quindi, grazie al tipo d'intercalante, è possibile osservare gli spermatozoi in microscopia ottica in campo chiaro o in fluorescenza e, distinguere i "non frammentati" (presenza di un alone causato dalla cromatina dispersa) dai "frammentati" (presenza di un alone piccolo o totale assenza di alone); inoltre, gli spermatozoi che presentano il caratteristico alone a fantasma sono definiti "degradati". La percentuale di frammentazione del DNA spermatico di ciascun campione è determinata dalla somma degli spermatozoi frammentati e degradati rispetto al numero totale degli spermatozoi osservati, dopo aver osservato

almeno 100 spermatozoi. Questo è il metodo più comunemente usato nei laboratori poiché è semplice, veloce, economico, ha un'alta riproducibilità e non richiede strumenti complessi. Tuttavia, tra gli svantaggi bisogna riportare che quando il bordo periferico dell'alone presenta bassa densità di cromatina può talvolta non essere distinguibile; inoltre, non tutti gli aloni si trovano sullo stesso piano focale, il che può farne sottostimare la presenza; ed infine la coda dello spermatozoo non è sempre preservata, e quindi non è sempre distinguibile dalle altre cellule eventualmente presenti, che si configurano come contaminanti.

DISCUSSIONE

L'aspetto più importante da tener presente riguardo i metodi per la valutazione della frammentazione del DNA degli spermatozoi è la condizione di pH in cui si opera per rilevare il danno del DNA *in vitro*. I test in cui è prevista una fase di denaturazione iniziale (pH acido/alcalino) permettono di evidenziare siti acido/alcalini, mentre, quando questa fase non è prevista, si evidenziano danni nel singolo o nel doppio filamento di DNA. *In vivo*, il pH intracellulare di circa 7,0 dell'ovocita permette di riparare le rotture del DNA a singolo filamento o i siti acido/alcalini, ma non il danno del doppio filamento (11).

In particolare, TUNEL, (particolarmente nella sua variante *in situ-nick translation* che quantifica dUTP biotinilato intercalato nelle rotture del DNA a singolo filamento attraverso la DNA polimerasi) e il test della cometa a pH neutro effettuano la valutazione diretta dell'integrità del DNA spermatico, mentre, il saggio della struttura della cromatina spermatica (SCSA), il test della dispersione della cromatina spermatica (SCD) e il test della cometa a pH alcalino effettuano la valutazione indiretta.

Queste considerazioni metodologiche potrebbero, in parte, essere ricondotte ai risultati contrastanti ottenuti sulla correlazione tra esiti di gravidanza e frammentazione del DNA analizzata con metodiche diverse, com'è stato riscontrato per il TUNEL e l'SCSA (60-74). Difatti, le differenti metodiche misurano aspetti diversi del danno al DNA: mentre il TUNEL e il test della cometa a pH neutro rivelano il danno utilizzando reagenti che si legano al DNA danneggiato, l'SCSA, l'SCD e il test della cometa a pH alcalino valutano l'integrità cromatinica e la suscettibilità del DNA attraverso la denaturazione (Tabella 1) (69). Inoltre, è necessario ribadire che un fattore confondente potrebbe essere il campione di partenza utilizzato per l'analisi SDF ed in particolare spermatozoi analizzati da eiaculato oppure selezionati attraverso *swim up* o gradiente. È, infatti, noto come le diverse tecniche di selezione degli spermatozoi influenzano l'analisi della frammentazione del DNA spermatico. Nell'ottica di una valutazione oggettiva dei risultati è quindi necessario una standardizzazione della preparazione del campione di partenza (75).

La valutazione della frammentazione del DNA

Tabella 1

Metodi più comunemente utilizzati per la valutazione del danno al DNA negli spermatozoi.

	Denaturazione iniziale	Evidenza di danno al singolo filamento di DNA	Evidenza di danno al doppio filamento di DNA	Quantità del campione (numero di cellule)	Metodica di base	Strumentazione necessaria x rivelazione	Bibliografia
Tunel assay	X	✓*	✓*	2 x 10 ⁶	nick end labeling	microscopia, a fluorescenza/ citofluorimetria	55
Cometa a pH neutro	X	X	✓	0,5-10 × 10 ⁶	elettroforesi su singola cellula	microscopia a fluorescenza	51,69
Cometa a pH alcalino	✓	✓	✓	0,5-10 × 10 ⁶	elettroforesi su singola cellula	microscopia a fluorescenza	51,69
SCSA	✓	✓	✓	1-2 × 10 ⁶	colorazione con arancio di acridina	citofluorimetria/ microscopia a fluorescenza	62
SCD	✓	✓*	✓*	5-10 × 10 ⁶	decondensazione cromatinica	microscopia a campo chiaro	71

* , non è possibile distinguere se è il danno è al singolo o al doppio filamento.

potrebbe inquadrare il paziente a livello molecolare, tuttavia, a causa delle limitazioni descritte, l'utilizzo nella pratica clinica non è diffuso. Il Laboratorio di Medicina della Riproduzione, che già riveste un ruolo essenziale in molte fasi del percorso riproduttivo, in questo ambito può avere l'obiettivo di standardizzare i protocolli di analisi e di definire un valore decisionale univoco in grado di discriminare i diversi livelli di danno del DNA spermatico (75,76). Pur non essendo possibile trarre conclusioni definitive in merito al valore predittivo della frammentazione del DNA degli spermatozoi, da quanto si evince dalla letteratura recente, sembrerebbe che, in presenza di un elevato indice di frammentazione del DNA spermatico, i tassi di successo di gravidanza rimangono bassi mentre quelli di abortività sono elevati, anche ricorrendo a procedure di procreazione medicalmente assistita (14, 80-83).

La presenza di frammentazione del DNA degli spermatozoi potrebbe essere un importante incentivo per modificare lo stile di vita, poiché agenti fisici (radiazioni, calore, fumo di sigaretta, inquinanti atmosferici), agenti chimici (farmaci antitumorali), infezioni trasmesse sessualmente e fattori biologici (l'aumento dell'età maschile, indice di massa corporea elevato e diabete) sono noti per influenzare l'integrità del DNA spermatico (80,81).

CONCLUSIONI

Nonostante le numerose evidenze dell'impatto della frammentazione non-fisiologica del DNA sulla qualità degli spermatozoi, rimane controversa la valutazione dell'SDF nell'iter diagnostico della coppia infertile o dell'infertilità maschile (68). Nessuna tra le metodiche

oggi disponibili è in grado di differenziare le rotture del DNA patologiche (ossia, il DNA frammentato rilevante ai fini dell'esito riproduttivo), dalle rotture fisiologiche (ossia, quelle che avvengono durante il processo di condensazione cromatinica).

Oltre al fattore metodologico, il valore predittivo dei test di frammentazione del DNA spermatico dipende da una serie di fattori, alcuni relativi al danno stesso degli spermatozoi (ad esempio, percentuale di spermatozoi danneggiati, estensione del danno al DNA per spermatozoo, combinazione di frammentazione del DNA e danno nucleotidico) e altri legati alla capacità dell'ovocita di riparare il danno al DNA dello spermatozoo (l'ovocita può riparare i danni a singola elica mentre quelli a doppia elica sono irreversibili).

Una volta effettuata la standardizzazione dei protocolli e dei valori decisionali, i test di frammentazione del DNA potrebbero essere introdotti nella diagnostica dell'infertilità maschile, in quanto informativi di un ulteriore parametro non visibile con lo spermogramma.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Kumar N, Singh AK. Trends of male factor infertility, an important cause of infertility: A review of literature. *J Hum Reprod Sci* 2015;8:191-6.
2. Cariati F, D'Argenio V, Tomaiuolo R. The evolving role of genetic tests in reproductive medicine. *J Transl Med* 2019;17:267.
3. Cariati F, D'Uonno N, Borrillo F, et al. Bisphenol A: an

- emerging threat to male fertility. *Reprod Biol Endocrinol* 2019;17:6
4. Guzik DS, Overstreet JW, Factor-Litvak P, et al. Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. *N Engl J Med* 2001;345:1388-93.
 5. Barratt CL, Mansell S, Beaton C, et al. Diagnostic tools in male infertility-the question of sperm dysfunction. *Asian J Androl* 2011;13:53-8.
 6. Chen X, Zhang W, LuoY, et al. Predictive value of semen parameters in vitro fertilisation pregnancy outcome. *Andrologia* 2009;41:111-7.
 7. Aitken RJ. Whither must spermatozoa wander? The future of laboratory seminology. *Asian J Androl* 2010;12:99-103.
 8. Champroux A, Torres Carreira J, Gharagozloo P, et al. Mammalian sperm nuclear organization: resiliencies and vulnerabilities. *Basic Clin Androl* 2016;26:7.
 9. Cariati F, Jaroudi S, Alfarawati S, et al. Investigation of sperm telomere length as a potential marker of paternal genome integrity and semen quality. *Reprod Biomed Online* 2016;33:404-11.
 10. Zini A, Bielecki R, Phang D et al. Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men. *Fertil Steril* 2001;75:674-7.
 11. Sakkas D, Alvarez JG. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertil Steril*. 2010;93:1027-36.
 12. Sergerie M, Laforest G, Bujan L, et al. Sperm DNA fragmentation: threshold value in male fertility. *Hum Reprod* 2005;20:3446-51.
 13. Osman A, Alsomait H, Seshadri S, et al. The effect of sperm DNA fragmentation on live birth rate after IVF or ICSI: a systematic review and meta-analysis. *Reprod Biomed Online* 2015;30:120-7.
 14. Simon L, Zini A, Dyachenko A. A systematic review and meta-analysis to determine the effect of sperm DNA damage on in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection outcome. *Asian J Androl* 2017;19:80-90.
 15. Evenson DP, Wixon R. Data analysis of two in vivo fertility studies using Sperm Chromatin Structure Assay-derived DNA fragmentation index vs. pregnancy outcome. *Fertil Steril* 2008;90:1229-31.
 16. D'Argenio V, Borrillo F, Cariati F, et al. Glossary of molecular biology and clinical molecular biology. Part I: general terms. *Biochim Clin* 2019;43:90-105.
 17. Huckins C. The morphology and kinetics of spermatogonial degeneration in normal adult rats: an analysis using a simplified classification of the germinal epithelium. *Anat Rec* 1978;190:905-26.
 18. Rodriguez I, Ody C, Araki K, et al. An early and massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis. *EMBO J* 1997;16:2262-70.
 19. Sakkas D, Mariethoz E, St John JC. Abnormal sperm parameters in humans are indicative of an abortive apoptotic mechanism linked to the Fas-mediated pathway. *Exp Cell Res* 1999;251:350-5.
 20. De Lamirande E, Gagnon C. Capacitation-associated production of superoxide anion by human spermatozoa. *Free Radic Biol Med* 1995;18:487-95.
 21. Gong S, San Gabriel MC, Zini A, et al. Low amounts and high thiol oxidation of peroxiredoxins in spermatozoa from infertile men. *J Androl* 2012;33:1342-51.
 22. Simon L, Castillo J, Oliva R, et al. Relationships between human sperm protamines, DNA damage and assisted reproduction outcomes. *Reprod Biomed Online* 2011;23:724-34.
 23. De lullis GN, Thomson LK, Mitchell LA, et al. DNA damage in human spermatozoa is highly correlated with the efficiency of chromatin remodeling and the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, a marker of oxidative stress. *Biol Reprod* 2009;81:517-24.
 24. De Lamirande E, Gagnon C. Capacitation-associated production of superoxide anion by human spermatozoa. *Free Radic Biol Med* 1995;18:487-95.
 25. Potts RJ, Jefferies TM, Notarianni LJ. Antioxidant capacity of the epididymis. *Hum Reprod* 1999;14:2513-6.
 26. Agarwal A, Virk G, Ong C, et al. Effect of oxidative stress on male reproduction. *World J Mens Health* 2014;32:1-17.
 27. Koppers AJ, De lullis GN, Finnie JM, et al. Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:3199-207.
 28. Lobascio AM, De Felici M, Anibaldi M, et al. Involvement of seminal leukocytes, reactive oxygen species, and sperm mitochondrial membrane potential in the DNA damage of the human spermatozoa. *Andrology* 2015;3:265-70.
 29. Koppers AJ, Mitchell LA, Wang P, et al. Phosphoinositide 3- kinase signalling pathway involvement in a truncated apoptotic cascade associated with motility loss and oxidative DNA damage in human spermatozoa. *Biochem J* 2011;436:687-98.
 30. Aitken RJ, Jones KT, Robertson SA. Reactive oxygen species and sperm function- in sickness and in health. *J Androl* 2012;33:1096-106.
 31. Bergamo P, Volpe MG, Lorenzetti S, et al. Human semen as an early, sensitive biomarker of highly polluted living environment in healthy men: A pilot biomonitoring study on trace elements in blood and semen and their relationship with sperm quality and RedOx status. *Reprod Toxicol* 2016;66:1-9.
 32. Alviggi C, Cariati F, Conforti A et al. The effect of FT500 Plus® on ovarian stimulation in PCOS women. *Reprod Toxicol* 2016;59:40-4.
 33. Aitken RJ, Koopman P, Lewis SE. Seeds of concern. *Nature* 2004;432:48-52.
 34. Noblanc A, Damon Soubeyrand C, Karrich B, et al. DNA oxidative damage in mammalian spermatozoa: where and why is the male nucleus affected? *Free Radic Biol Med* 2003;65:719-23.
 35. Bosco L, Notari T, Ruvolo G et al. Sperm DNA fragmentation: An early and reliable marker of air pollution. *Environ Toxicol Pharmacol* 2018;58:243-9.
 36. Radwan M, Jurewicz J, Merez-kot D, et al. Sperm DNA damage-the effect of stress and everyday life factors. *Int J Impot Res* 2016;28:148-54.
 37. Sen S, Chakraborty R. The role of antioxidants in human health. In: *Oxidative stress: diagnostics, prevention, and therapy*. ACS Symposium Series 2011:1-37.
 38. Talebi AR, Sarcheshmeh AA, Khalili MA, et al. Effects of ethanol consumption on chromatin condensation and DNA integrity of epididymal spermatozoa in rat. *Alcohol* 2011;45:403-9.
 39. Azam S, Hadi N, Khan NU, et al. Antioxidant and prooxidant properties of caffeine, theobromine and xanthine. *Med Sci Monitor* 2003;9:325-30.
 40. Hamad M, Shelko N, Kartarius S, et al. Impact of cigarette smoking on histone (H2B) to protamine ratio in human spermatozoa and its relation to sperm parameters. *Andrology* 2014;2:666-77.
 41. Boggia B, Carbone U, Farinara E, et al. Effects of working posture and exposure to traffic pollutants on sperm quality. *J Endocrinol Invest* 2009;32:430-4.
 42. Gallegos G, Ramos B, Santiso R, et al. Sperm DNA fragmentation in infertile men with genitourinary infection

- by Chlamydia trachomatis and Mycoplasma. *Fertil Steril* 2008;90:328-34.
43. Boeri L, Capogrosso P, Ventimiglia E, et al. High-risk human papillomavirus in semen is associated with poor sperm progressive motility and a high sperm DNA fragmentation index in infertile men. *Hum Reprod* 2019;34:209-17.
 44. Garolla A, Engl B, Pizzol D, et al. Spontaneous fertility and in vitro fertilization outcome: new evidence of human papillomavirus sperm infection. *Fertil Steril* 2016;105:65-72.
 45. Garolla A, De Toni L, Bottacin A, et al. Human Papillomavirus Prophylactic Vaccination improves reproductive outcome in infertile patients with HPV semen infection: a retrospective study. *Sci Rep* 2018;8:912.
 46. Agbaje I, Rogers D, McVicar C, et al. Insulin dependent diabetes mellitus: implications for male reproductive function. *Hum Reprod* 2007;22:1871-7.
 47. Maselli J, Hales BF, Chan P, Robaire B. Exposure to bleomycin, etoposide, and cis-platinum alters rat sperm chromatin integrity and sperm head protein profile. *Biol Reprod* 2012;86:166.
 48. Smith R, Kaune H, Parodi D, et al. Increased sperm DNA damage in patients with varicocele: relationship with seminal oxidative stress. *Hum Reprod* 2006;21:986-93.
 49. Gorczyca W, Traganos F, Jesionowska H, et al. Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA in situ to denaturation in abnormal human sperm cells: analogy to apoptosis of somatic cells. *Exp Cell Res* 1993;207:202-5.
 50. Gold R, Schmied M, Rothe G et al. Detection of DNA fragmentation in apoptosis: application of in situ nick translation to cell culture systems and tissue sections. *J Histochem Cytochem* 1993;41:1023-30.
 51. Hughes C, Lewis S, McKelvey-Martin V, Thompson W. A comparison of baseline and induced DNA damage in human spermatozoa from fertile and infertile men, using a modified comet assay. *Mol Hum Reprod* 1996;2:613-9.
 52. Fernandez JL, Vazquez-Gundin F, Delgado A, et al. DNA breakage detection-FISH (DBD-FISH) in human spermatozoa: technical variants evidence different structural features. *Mutat Res* 2000;453:77-82.
 53. Evenson DP, Larson KL, Jost LK. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J Androl* 2002;23:25-43.
 54. Fernandez JL, Muriel L, Rivero MT, et al. The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J Androl* 2003;24:59-66.
 55. Sharma R, Ahmad G, Esteves SC, et al. Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) assay using bench top flow cytometer for evaluation of sperm DNA fragmentation in fertility laboratories: protocol, reference values, and quality control. *J Assist Reprod Genet* 2016;33:291-300.
 56. Di Maggio F, Borrillo F, Cariati F, et al. Glossario di biologia molecolare e biologia molecolare clinica. Parte II: metodologie di biologia molecolare. *Biochim Clin* 2019;43:435-48.
 57. Sergerie M, Laforest G, Bujan L, et al. Sperm DNA fragmentation: threshold value in male fertility. *Hum Reprod* 2005;20:3446-51.
 58. Sun JG, Jurisicova A, Casper RF. Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. *Biol Reprod* 1997;56:602-7.
 59. Duran EH, Morshedi M, Taylor S, et al. Sperm DNA quality predicts intrauterine insemination outcome: a prospective cohort study. *Hum Reprod* 2002;17:3122-8.
 60. Borini A, Tarozzi N, Bizzaro D, et al. Sperm DNA fragmentation: paternal effect on early post-implantation embryo development in ART. *Hum Reprod* 2006;21:2876-81.
 61. Tarozzi N, Bizzaro D, Flamigni C, et al. Clinical relevance of sperm DNA damage in assisted reproduction. *Reprod Biomed Online* 2007;14:746-57.
 62. Luchetti F, Canonico B, Biagiarelli L, et al. Indagini citofluorimetriche nella vitalità e morte cellulare. I. Necrosi, apoptosi e proliferazione cellulare. *Biochim Clin*, 2009;33:83-92.
 63. Evenson DP, Larson KL, Jost LK. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J Androl* 2002;23:25-43.
 64. Fraser L. Structural damage to nuclear DNA in mammalian spermatozoa: its evaluation techniques and relationship with male infertility. *Pol J Vet Sci* 2004;7:311-21.
 65. Spano M, Kolstad AH, Larsen SB, et al. The applicability of the flow cytometric sperm chromatin structure assay in epidemiological studies. *Asclepius Hum Reprod* 1998;13:2495-505.
 66. Evgeni E, Charalabopoulos K, Asimakopoulos B. Human sperm DNA fragmentation and its correlation with conventional semen parameters. *J Reprod Infertil* 2014;15:2-14.
 67. Boe-Hansen GB, Ersboll AK, Christensen P. Variability and laboratory factors affecting the sperm chromatin structure assay in human semen. *J Androl* 2005;26:360-8.
 68. Fernandez JL, Muriel L, Goyanes V, et al. Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. *Fertil Steril* 2005;84:833-42.
 69. Manesh KPS, Ashok A. A systematic review on sperm DNA fragmentation in male factor infertility: Laboratory assessment. *Arab J Urol* 2018;16:65-76.
 70. Simon L, Murphy K, Shamsi MB et al. Paternal influence of sperm DNA integrity on early embryonic development. *Hum Reprod* 2014;29:2402-12.
 71. Donnelly ET, Steele EK, McClure N et al. Assessment of DNA integrity and morphology of ejaculated spermatozoa from fertile and infertile men before and after cryopreservation. *Hum Reprod* 2001;16:1191-9.
 72. Singh NP, McCoy MT, Tice RR et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 1988;175:184-91.
 73. Fernandez JL, Muriel L, Rivero MT, et al. The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J Androl* 2003;24:59-66.
 74. Bungum M, Humaidan P, Axmon A, et al. Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome. *Hum Reprod* 2007;22:174-9.
 75. Sá R, Cunha M, Rocha E, et al. Sperm DNA fragmentation is related to sperm morphological staining patterns. *Reprod Biomed Online* 2015;31:506-15.
 76. Tomaiuolo R, Panteghini M. Il laboratorio nella medicina della riproduzione. *Biochim Clin*, 2017;41:292-3.
 77. Cariati F, Savarese M, D'Argenio V, et al. The SEeMORE strategy: Single-tube electrophoresis analysis-based genotyping to detect monogenic diseases rapidly and effectively from conception until birth. *Clin Chem Lab Med* 2017;56:40-50.
 78. Tomaiuolo R, Fausto M, Elce A, et al. Enhanced frequency of CFTR gene variants in couples who are candidates for

- assisted reproductive technology treatment. *Clin Chem Lab Med* 2011;49:1289-93.
79. D'Argenio V, Nunziato M, D'Uonno N, et al. Indicazioni e limiti della diagnosi genetica preimpianto. *Biochim Clin* 2017;41:314-21.
 80. Zini A, Sigman M. Are tests of sperm DNA damage clinically useful? Pros and cons. *J Androl* 2009;30:219-29.
 81. Khadem N, Poorhoseyni A, Jalali M, et al. Sperm DNA fragmentation in couples with unexplained recurrent spontaneous abortions. *Andrologia* 2014;46:126-30.
 82. Gosálvez C, Lopez Fernandez C, Fernandez JL, et al. Unpacking the mysteries of sperm DNA fragmentation: Ten frequently asked questions. *J Reprod Biotechnol Fertil* 2015;4:1-16.
 83. Sivanarayana T, Rava Krishna T, Jaya Prakah G, et al. Sperm DNA fragmentation assay by sperm chromatin dispersion (SCD): correlation between DNA fragmentation and outcome of intracytoplasmic sperm injection. *RMB* 2014;13:87-94.
 84. De Angelis C, Galdiero M, Pivonello C, et al. The role of vitamin D in male fertility: A focus on the testis. *Rev Endocr Metab Disord* 2017;18:285.
 85. Pacey AA. Environmental and lifestyle factors associated with sperm DNA damage. *Hum Fertil* 2010;13:189-93.