

La Citofluorimetria e gli spermatozoi, cellule sempre “in Flow”

Costanza Calamai¹, Oumaima Ammar¹, Monica Muratori¹

¹Dipartimento di Scienze Biomediche Sperimentali e Cliniche “M Serio”, sezione Fisiopatologia, Università degli studi di Firenze

e-mail: monica.muratori@unifi.it

Abstract

Cytometry and spermatozoa, cells continuously “In Flow”

Spermatozoa are highly differentiated cells with the role to deliver paternal genome to the oocyte. As cells continuously in flow, spermatozoa represent a very suitable sample for flow cytometry. On the other hand, due to its ability to identify subpopulations in heterogeneous samples, flow cytometry is a particularly suitable tool to study both semen and spermatozoa.

Flow cytometry is frequently used in the research on spermatozoa. This review presents some typical applications of flow cytometry in andrological field and examples of multi-parametric analyses. Spermatozoa are very compartmentalized cells, where localization of fluorescence is of utmost importance to understand sperm function. Hence, the potentiality of image-based flow cytometry in studying spermatozoa is also shown.

In clinical field, flow cytometry is underused with respect to its potentialities. Currently, only two flow cytometric tests are used in male infertility work up: SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay) and TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling), both employed for detection of sperm DNA Fragmentation, a sperm anomaly impacting both natural and assisted reproduction and increasing miscarriage risk. Since male infertility is multifactorial and flow cytometry is able to simultaneously reveal many parameters, hopefully, flow cytometry will be able to offer a powerful help in future diagnostic tests for infertile patients.

Introduzione

Gli spermatozoi sono cellule altamente differenziate con il compito di trasportare e consegnare principalmente il genoma paterno all’oocita. Per questo, a partire dalla spermiazione, ovvero la loro liberazione dall’epitelio seminifero, sono cellule la cui vita è interamente “in flow”. Questo aspetto rende gli spermatozoi un campione elettivo per la citofluorimetria a flusso che, d’altra parte, risulta particolarmente adatta per le analisi seminali o spermatiche, grazie alla sua abilità di distinguere sottopopolazioni all’interno di matrici eterogenee, quali sono appunto il seme e le preparazioni spermatiche. Al contrario, altri approcci metodologici (ad esempio il western blotting e i saggi ELISA), producendo valori mediati nell’intero campione del parametro in studio, rischiano di mascherare informazioni importanti e/o produrre risultati fuorvianti.

Come accennato, la componente cellulare del liquido seminale è piuttosto eterogenea, potendo contenere, oltre agli spermatozoi maturi, anche elementi immaturi della linea germinale e cellule somatiche (essenzialmente leucociti). Inoltre, soprattutto nei pazienti sub/infertili, è normalmente presente una quantità variabile di corpi

apoptotici con dimensioni uguali o superiori a quelle della testa degli spermatozoi (Marchiani et al, 2007; Lotti et al, 2012; Figura 1). Acquisendo in scala lineare i parametri FSC e SSC di un campione di liquido seminale, è possibile tracciare, nel citogramma morfometrico, una tipica regione a forma di fiamma contenente sia gli spermatozoi che una parte dei corpi apoptotici seminali (Marchiani et al, 2007). Tale regione: i) fu originariamente stabilita con un back gate in FSC/SSC dal picco della colorazione nucleare, in una preparazione ottenuta con la tecnica del swim-up che seleziona la popolazione di soli spermatozoi (Muratori et al, 2000); ii) elimina i detriti e le cellule non spermatiche del campione (Marchiani et al, 2014) e iii) solo in un secondo tempo si è rivelata contenere parzialmente anche i corpi apoptotici seminali, che possono comunque essere eliminati aggiungendo una colorazione nucleare alla quale risultano negativi (Figura 1)

Anche gli spermatozoi isolati dalle altre componenti cellulari del seme, sono piuttosto eterogenei, sia per quanto riguarda il livello maturativo che quello morfologico e funzionale. Infatti in un eiaculato coesistono diverse generazioni di spermatozoi e, anche all’interno di una stessa generazione, lo stato funzionale e morfologico possono essere diversi. Ad esempio, solo una piccola frazione degli spermatozoi eiaculati andrà incontro a capacitazione, quel complesso di modifiche cellulari e di membrana che rendono i gameti competenti all’interazione con l’oocita. Questo scenario sottolinea di nuovo l’importanza della misura individuale per l’identificazione di un particolare stato maturativo/morfologico/funzionale dello spermatozoo.

Un altro aspetto che supporta l’utilizzo della citofluorimetria a flusso in campo andrologico è legato al fatto che i processi che lo spermatozoo deve sperimentare per acquisire la capacità di fertilizzare l’oocita sono molti e difetti in solo uno di essi possono essere causa di infertilità. In questo scenario, per lo sviluppo dei futuri test diagnostici per il maschio infertile, saranno sempre più necessari gli approcci in grado di misurare simultaneamente più tratti spermatici, come offre appunto la citofluorimetria.

La capacità della citofluorimetria di individuare sottopopolazioni omogenee per una particolare colorazione, ha consentito nel nostro laboratorio di scoprire gli M540 bodies, corpuscoli ben visibili al microscopio ottico ma non ancora identificati nella loro vera natura di corpi apoptotici seminali (Marchiani et al, 2007; Figura 1). Questo risultato fu prodotto nel tentativo di replicare nell’uomo una tecnica citofluorimetrica per l’identificazione della frazione spermatica capacitata, sviluppata in alcune specie di mammiferi. La tecnica utilizzava la M540 (Merocyanine 540) per rilevare le modifiche di membrana che si verificano durante la capacitazione e lo Yo-Pro1, un colorante nucleare che entra nelle cellule

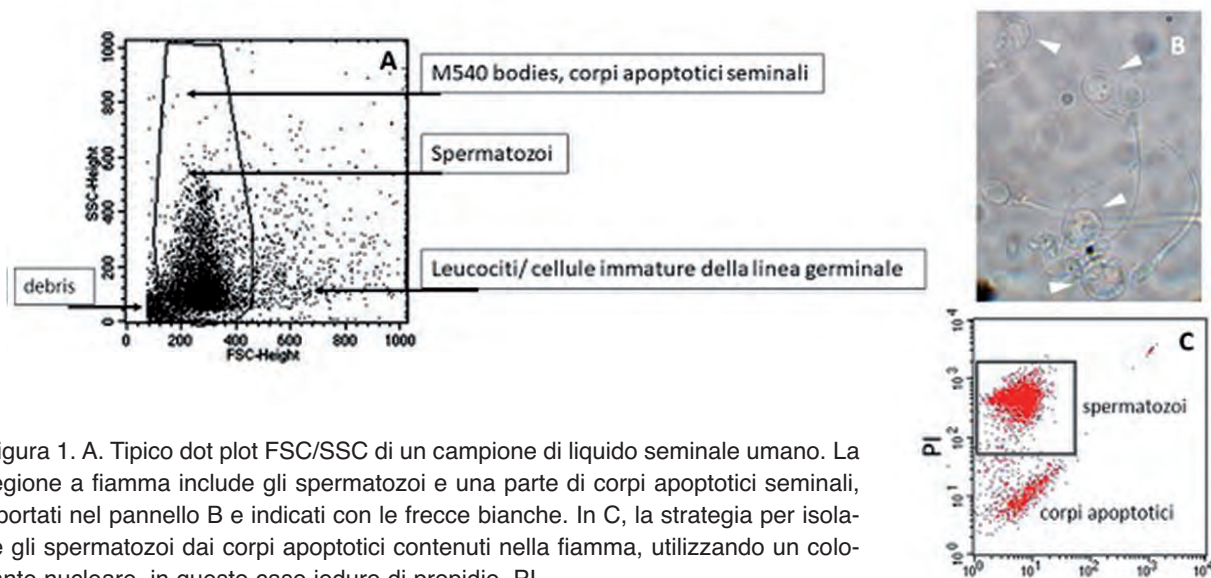


Figura 1. A. Tipico dot plot FSC/SSC di un campione di liquido seminale umano. La regione a fiamma include gli spermatozoi e una parte di corpi apoptotici seminali, riportati nel pannello B e indicati con le frecce bianche. In C, la strategia per isolare gli spermatozoi dai corpi apoptotici contenuti nella fiamma, utilizzando un colorante nucleare, in questo caso ioduro di propidio, PI.

con membrana danneggiata e che quindi identificava le cellule vitali (Gadella et al, 2000). Effettivamente anche nell'uomo questa doppia colorazione individuava una sottopopolazione colorata con M540 e negativa allo Yo-Pro1, che tuttavia non risentiva delle condizioni capacitanzi ed era anzi particolarmente rappresentata in campioni con scarsa qualità seminale (Muratori et al, 2004). Infatti gli esperimenti effettuati per chiarire la natura di tale popolazione, indicarono che si trattava di elementi privi di nucleo (e quindi Yo-Pro1 negativi) con modifiche di membrana caratteristiche delle cellule apoptotiche e quindi evidenziate dalla M540 (Marchiani et al, 2007).

1 Applicazioni della citofluorimetria nello studio degli spermatozoi

L'utilizzo del citofluorimetro in spermatozoologia dipende dalla disponibilità degli opportuni fluorocromi e quindi riflette l'espansione di questi ultimi nelle decadi recenti. Tratteremo quindi, a titolo di esempio, alcuni parametri spermatici che, nel corso degli anni, sono stati studiati con la citofluorimetria.

Vitalità. Si tratta di un parametro la cui valutazione (con test dell'eosina) è previsto, quando la motilità spermatica è sotto al 40% (WHO, 2021), dallo spermogramma, il test cardine per la diagnosi del maschio infertile. In citofluorimetria, uno degli approcci più affidabili per la rivelazione della vitalità è la doppia colorazione con SYBR-14, che entra e colora tutte le cellule nucleate e ioduro di propidio (PI) che colora esclusivamente le cellule con membrana danneggiata (Garber et al, 1995). Un'alternativa a questa colorazione è quella che sostituisce al SYBR14, lo Yo-Pro1, in quanto in grado di rivelare più precocemente il danneggiamento alla membrana (Peña et al, 2018). Un'importante innovazione per la rivelazione della vitalità spermatica è stata offerta dai coloranti fissabili che si legano in maniera covalente alle ammine, sono disponibili in un'ampia gamma di colori e in grado di discriminare fra cellule vitali e non vitali, anche in procedure che prevedono la fissazione e/o la permeabilizzazione cellulare. Ad esempio con uno di questi coloranti, nel nostro laboratorio, abbiamo allestito una nuova versione del TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) per la valuta-

zione della frammentazione del DNA spermatico (FDS), in grado di valutare il danno al DNA negli spermatozoi vitali e in quelli non vitali (LiveTUNEL, Figura 2) (Muratori et al, 2020). Con questa nuova tecnica citofluorimetrica è stato possibile testare l'ipotesi secondo la quale la FDS (vedi anche paragrafo 4) predicesse meglio il concepimento naturale quando misurata negli spermatozoi vitali, essendo i non vitali incapaci di raggiungere l'oocita e quindi di impattare sulla riproduzione. In realtà lo studio ha, al contrario, mostrato che anche la FDS degli spermatozoi non vitali è predittiva del concepimento naturale, suggerendo che essa possa essere indice di un danno più generale che riguarda tutta la popolazione spermatica (Muratori et al, 2020).

Stress ossidativo. Un altro parametro spermatico molto studiato in citofluorimetria è lo stress ossidativo, quella condizione per cui la produzione di ROS sovrasta le capacità antiossidanti della cellula. La valutazione dello stress ossidativo seminale è di particolare importanza perché si ritiene che sia alla base di molti casi di infertilità idiopatica e/o non spiegata, una condizione che riguarda circa il 40% dei maschi infertili (Corsini et al, 2022). Attualmente nessuna tecnica per la valutazione dello stress ossidativo è entrata ancora nella pratica clinica routinaria, tuttavia le tecniche citofluorimetriche sono molto usate in ricerca dove utilizzano una gamma relativamente ampia di sonde. Le tecniche citofluorimetriche impiegate a questo scopo in genere sono applicate a popolazioni spermatiche selezionate, con procedure come lo swim-up o la centrifugazione su gradiente di densità, che hanno il vantaggio di essere costituite da soli spermatozoi altamente vitali. Lo svantaggio di lavorare con le preparazioni selezionate è tuttavia che esse costituiscono un campione poco rappresentativo del campione nativo, oltre alla possibilità che la procedura di selezione induca di per sé stessa un insulto ossidativo (Muratori et al, 2019; Aitken et al, 2014). Per questo motivo, nel nostro laboratorio, recentemente abbiamo sviluppato una tecnica in grado di valutare lo stress ossidativo nella frazione vitale spermatica di campioni nativi, con l'aiuto essenziale della citofluorimetria. Si tratta di una doppia colorazione con MitoSOX Red e LIVE DEAD Fixable Green Dead Cell Stain, in grado di esclu-

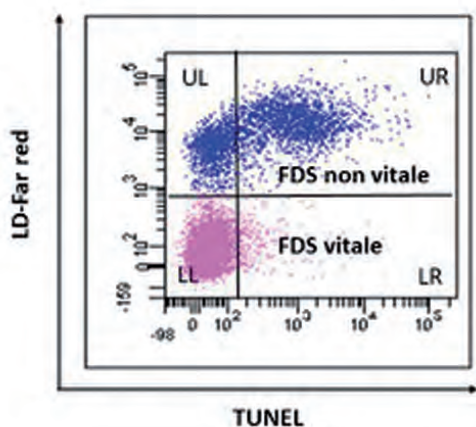


Figura 2. LiveTUNEL. Dopo aver tracciato la regione FSC/SSC a fiamma (figura 1) e, all'interno di questa, quella contenente gli spermatozoi (marcati con DAPI), la tecnica è in grado di evidenziare la FDS distinguendo fra spermatozoi vitali (quadranti LL+LR) e non vitali (quadranti UL+UR) grazie al colorante fissabile LIVE DEAD Fixable Far Red Dead Cell Stain (LD-Far red).

dere sia gli spermatozoi non vitali che i corpi apoptotici seminali e rilevare quindi lo stress ossidativo nei soli spermatozoi vitali (Riley et al, 2021; Figura 3). Con questa tecnica abbiamo studiato l'aumento dei ROS dopo crioconservazione del liquido seminale (Arciero et al, 2022) e evidenziato i livelli drammatici di stress ossidativo spermatico nei pazienti oncologici (Calamai et al, 2023), prima che si sottopongano alle terapie indicate, notoriamente gonadotossiche. Attualmente la tecnica, che ha l'ambizione di trovare applicazione nella clinica, è impiegata nella valutazione dello stress ossidativo seminale in pazienti infertili e nella costruzione di valori di riferimento in soggetti sani.

Reazione acrosomiale. La reazione acrosomiale è un processo a cui vanno incontro gli spermatozoi capacitati e consiste nella fusione della membrana acrosomiale esterna con quella plasmatica e nel conseguente rilascio del contenuto acrosomiale. Rappresenta un requisito per la capacità fertilizzante in quanto espone le proteine della membrana acrosomiale interna che sono richieste per il binding e la fusione con l'oolemma (Barboux et al, 2020). La valutazione della reazione acrosomiale in citofluorimetria viene effettuata con doppia colorazione con una lectina, in genere coniugata alla FITC (PNA-FITC), e con PI per la discriminazione fra cellule vitali e non. La lectina si lega specificatamente alla membrana acrosomiale esterna producendo, nello spermatozoo reatto, una diminuzione dell'intensità di fluorescenza, rispetto agli spermatozoi con membrana acrosomiale integra (Esteves et al, 2007). In alcuni studi, la PNA-FITC è sostituita da un anticorpo marcato e diretto contro CD46, un antigene espresso nella membrana acrosomiale interna (Carver-Ward et al, 1994). Come conseguenza, e al contrario di quanto accade con la PNA-FITC, gli spermatozoi reatti mostreranno un aumento della fluorescenza dovuto al legame con CD46, smascherato dalla reazione acrosomiale stessa.

2 Analisi multiparametriche sugli spermatozoi

L'avvento dei citofluorimetri multi-laser ha consentito di aumentare anche in questo campo di ricerca il numero di

fluorocromi che possono essere visualizzati simultaneamente. Naturalmente, tale numero deve tener conto delle relative procedure di colorazione che, se lunghe e invasive, producono dei risultati poco affidabili in quanto relativi ad una popolazione spermatica, quella processata, piuttosto lontana da quella di partenza. Al netto di questa riserva, riportiamo di seguito due esempi di analisi multiparametrica di popolazioni spermatiche, uno sull'uomo e l'altro sul bovino

Studio dell'associazione fra la FDS e danno ossidativo nella frazione vitale dell'ejaculato. L'esempio è tratto da uno studio sui meccanismi che originano la FDS (Muratori et al, 2015), i cui risultati indicavano come tali meccanismi potessero essere diversi a seconda che si considerasse la frazione spermatica vitale oppure quella non vitale. In Figura 4A è mostrata la procedura di gating per identificare la popolazione vitale spermatica, attraverso l'intersezione della regione a fiamma con il gate degli eventi nucleati (DAPI-positivi) e con quello delle cellule vive (LIVE DEAD Fixable Far Red Dead Cell Stain-negative), mentre la figura 4B riporta l'associazione, in questa popolazione, fra l'FDS, rivelato come TUNEL-TMR (Tetramethylrhodamine) e la presenza dell'8-idrossidesossiguanosina (8-OHdG, rivelata in immunofluorescenza con un anticorpo secondario coniugato con FITC). Questi esperimenti consentirono di mostrare come il ruolo dello stress ossidativo nella genesi della FDS si evidenziasse solo nella frazione vitale spermatica, mentre nel campione nativo, prevalessero i meccanismi apoptotici e/o di deragliamenti della maturazione cromatinica (Muratori et al, 2015).

Un secondo esempio è tratto dal recente studio di Bucher et al, teso allo sviluppo di un'analisi multiparametrica che valutasse la qualità di seme bovino e che predicesse lo stato di fertilità dell'animale (Bucker et al, 2019). Gli Autori utilizzarono per questi scopi un pannello di 5 fluorocromi: calceina-AM come indicatore della vitalità; PI per la discriminazione delle cellule vitali e non; lectina PNA marcata con PE (Phycoerythrin) per la rivelazione dello stato acrosomiale; Fluo4 AM per la misurazione del calcio intracellulare e la sonda mitocondriale DiIC1(5) (hexamethylindodicarbocyanine iodide) per la rivelazione di sottopopolazioni a diverso potenziale della membrana mitocondriale. Per quanto preliminare, lo studio mostra che l'analisi di un solo campione consente di classificare l'animale nelle categorie a bassa ed alta fertilità nei 2/3 dei casi.

3 Applicazioni cliniche

Nella pratica clinica la citofluorimetria è impiegata per ora solo nella determinazione della FDS, un parametro predittivo del concepimento naturale (Muratori et al, 2015b) e della gravidanza clinica nelle coppie trattate con le tecniche della Procreazione Medicalmente Assistita (Cissen et al, 2016) e associato al rischio di aborto (McQueen et al, 2019; Tan et al, 2019). Ci sono due tecniche citofluorimetriche utilizzate allo scopo, l'SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay) diffusa anche in ambiente zootecnico e il TUNEL. L'SCSA si avvale dell'arancio di acridina in campioni precedentemente trattati con una blanda acidificazione per indurre denaturazione del DNA. L'arancio di acridina ha la particolarità di emettere nel verde o nel rosso a seconda che sia legato, rispettivamente, al DNA a doppia o singola

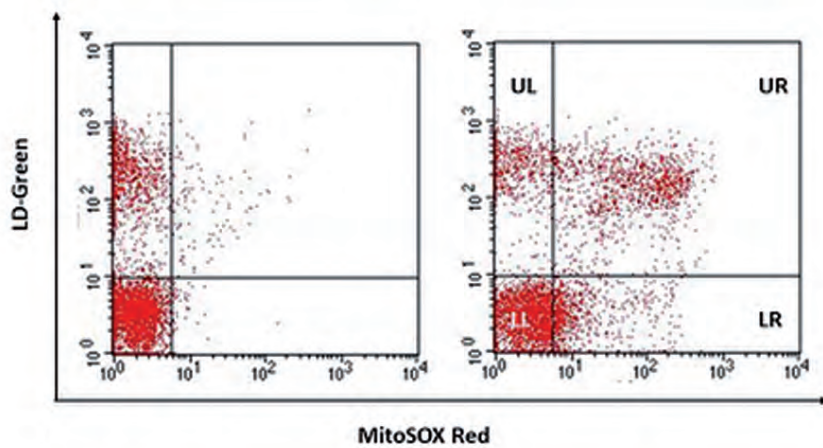


Figura 3. Doppia colorazione con MitoSOX Red e Live DEAD Fixable Green Dead Cell Stain (LD-Green) in un campione di liquido seminale nativo (non selezionato). All'interno della regione a fiamma riportata in Figura 1, la colorazione è in grado di separare i corpi apoptotici seminali e gli spermatozoi non vitali (quadranti UL e UR rispettivamente) dagli spermatozoi vitali (LL+LR), in cui misurare quelli con produzione eccessiva di ROS (LR).

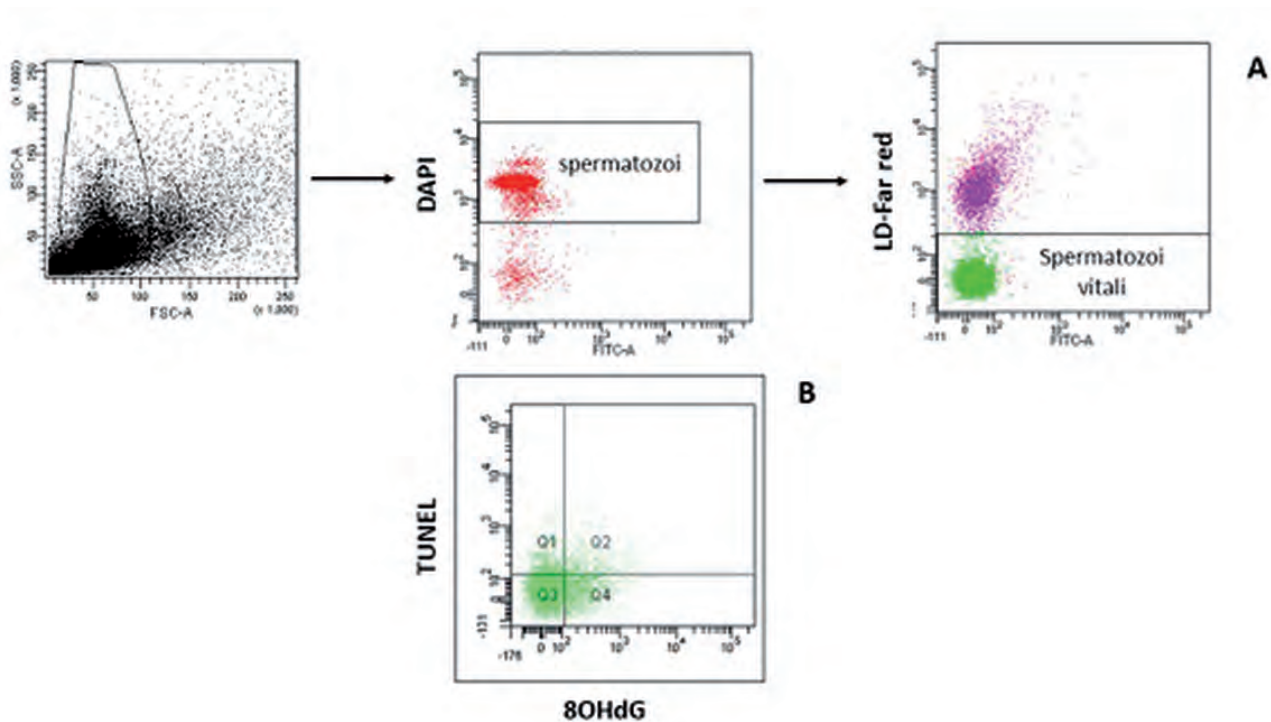


Figura 4. A, strategia di gating per isolare la frazione vitale degli spermatozoi in cui studiare (B) l'associazione fra FDS (TUNEL-TMR) e presenza dell'8 idrossi deossiguanosina (8OHdG, rivelata in immunofluorescenza con FITC).

elica. Per ogni spermatozoo è quindi calcolato il DFI (DNA Fragmentation Index), ovvero il rapporto fra la fluorescenza rossa (DNA denaturato) e fluorescenza totale (DNA totale). Il DFI è poi riportato come istogramma di distribuzione nella popolazione spermatica, dove si individuano le percentuali di spermatozoi con frammentazione del DNA (Evenson 2022). Il saggio in realtà non rileva i tagli veri e propri al DNA, ma piuttosto la suscettibilità della cromatina spermatica alla denaturazione indotta, che comunque è favorita dalla presenza di frammentazione. Il TUNEL invece evidenzia direttamente le rotture al DNA, aggiungendo nucleotidi marcati alle estremità 3'OH dei tagli (Muratori et al, 2010). La caratteristica saliente di questo saggio è la TdT (Terminal deoxynucleotidyl transferase), una polimerasi stampo- e primer-indipendente che opera non solo sui tagli a singola ma anche su quelli a doppia elica, compresi quelli con "blunted ends", tipici delle endonucleasi apoptotiche. La versione citofluorimetrica del TUNEL usata nel nostro laboratorio e nel servizio offerto ai

pazienti infertili dall'AOU Careggi (Firenze) è indicata come TUNEL/PI. Infatti la tecnica combina la rivelazione dei tagli del DNA alla colorazione nucleare effettuata con PI al fine di definire esattamente la popolazione spermatica, eliminando i corpi apoptotici seminali (Figura 1).

4 Citofluorimetria a flusso d'immagini e spermatozoi

La citofluorimetria a flusso d'immagine combina il potere di visualizzazione del microscopio con la velocità e la sensibilità di un citofluorimetro. Questa tecnologia offre allo studio dello spermatozoo, cellula fortemente compartimentalizzata, la possibilità di localizzare subcellularmente un segnale di fluorescenza e al contempo fornire delle stime quantitative affidabili. Un recente studio sulla capacitazione, ed in particolare sull'incremento di fosforilazione tirosinica che l'accompagna, esemplifica questa possibilità (Bulkeley et al, 2023). Nello studio gli Autori mostrano chiaramente che in spermatozoi incuba-

ti in mezzo capacitante, il segnale dovuto alla comparsa dei residui tirosinici fosforilati aumenta sia nel flagello che nella testa dello spermatozoo, ma che l'aumento è soprattutto nel segmento principale del flagello. Con la stessa tecnologia, lo studio mostra che le tirosino-chinasi che operano nella testa durante la capacitazione sono diverse da quelle che operano nel flagello (Bulkeley et al, 2023). Un altro studio che ha impiegato questa tecnologia, compiuto sullo stallone, ha mostrato che c'è una relazione fra particolari anomalie morfologiche della cellula spermatica e la produzione di ROS (Love et al, 2011). Secondo questo studio, i ROS sono prodotti in eccesso quando le anomalie interessano la testa, la coda ed il mid-piece dello spermatozoo. Questi risultati potrebbero spiegare la relazione negativa, precedentemente riportata, fra anomalie morfologiche e fertilità dell'animale.

Conclusioni

La citofluorimetria è una tecnologia che particolarmente si adatta alla valutazione degli spermatozoi, per la quale rappresenta una risorsa irrinunciabile. Tuttavia, le sue potenzialità non si sono ancora manifestate a pieno soprattutto nella clinica andrologica, dove invece potrebbe fornire un importante contributo alla diagnostica. In particolare, l'incontro fra la caratteristica multifattoriale dell'infertilità maschile, anche declinata a livello spermatico, e la capacità multiparametrica della citofluorimetria potrebbe auspicabilmente produrre nuovi test diagnostici in pazienti dove l'infertilità idiopatica raggiunge percentuali altissime.

Bibliografia

- Aitken RJ, Finnie JM, Muscio L, Whiting S, Connaughton HS, Kuczera L, Rothkirch TB, De Iulius GN. Potential importance of transition metals in the induction of DNA damage by sperm preparation media. *Hum Reprod.* 2014 29:2136-47.
- Arciero V, Ammar O, Maggi M, Vignozzi L, Muratori M, Dabizzi S. Vapour fast freezing with low semen volumes can highly improve motility and viability or DNA quality of cryopreserved human spermatozoa. *Andrology.* 2022 Sep;10(6):1123-1133. doi: 10.1111/andr.13208. Epub 2022 Jun 27. PMID: 35712876; PMCID: PMC9544568.
- Barboux S, Ialy-Radio C, Chalbi M, Dybal E, Homps-Legrand M, Do Cruzeiro M, Vaiman D, Wolf JP, Ziyat A. Sperm SPACA6 protein is required for mammalian Sperm-Egg Adhesion/Fusion. *Sci Rep.* 2020 Mar 24;10(1):5335.
- Bucher K, Malama E, Siuda M, Janett F, Bollwein H. Multicolor flow cytometric analysis of cryopreserved bovine sperm: A tool for the evaluation of bull fertility. *J Dairy Sci.* 2019 Dec;102(12):11652-11669.
- Bulkeley E, Santistevan AC, Varner D, Meyers S. Imaging flow cytometry to characterize the relationship between abnormal sperm morphologies and reactive oxygen species in stallion sperm. *Reprod Domest Anim.* 2023 Jan;58(1):10-19.
- Calamai C, Ammar O, Rosta V, Farnetani G, Zimmiti S, Giovannelli L, Vignozzi L, Krausz C, Muratori M. Testicular and Haematological Cancer Induce Very High Levels of Sperm Oxidative Stress. *Antioxidants (Basel).* 2023 May 24;12(6):1145.
- Carver-Ward JA, Jaroudi KA, Einspinner M, Parhar RS, al-Sedairy ST, Sheth KV. Pentoxifylline potentiates ionophore (A23187) mediated acrosome reaction in human sperm: flow cytometric analysis using CD46 antibody. *Hum Reprod.* 1994 Jan;9(1):71-6.
- Cissen M, Wely MV, Scholten I, Mansell S, Bruin JP, Mol BW, Braat D, Repping S, Hamer G. Measuring Sperm DNA Fragmentation and Clinical Outcomes of Medically Assisted Reproduction: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One.* 2016 Nov 10;11(11):e0165125.
- Corsini C, Boeri L, Candela L, Pozzi E, Belladelli F, Capogrosso P, Fallara G, Schifano N, Cignoli D, Ventimiglia E, D'Arma A, Alfano M, Montorsi F, Salonia A. Is There a Relevant Clinical Impact in Differentiating Idiopathic versus Unexplained Male Infertility? *World J Mens Health.* 2022 Sep 2.
- Esteves SC, Sharma RK, Thomas AJ Jr, Agarwal A. Evaluation of

acrosomal status and sperm viability in fresh and cryopreserved specimens by the use of fluorescent peanut agglutinin lectin in conjunction with hypo-osmotic swelling test. *Int Braz J Urol.* 2007 May-Jun;33(3):364-74; discussion 375-6.

- Evenson DP. Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA®) for Fertility Assessment. *Curr Protoc.* 2022 Aug;2(8):e508.
- Gadella BM, Harrison RA. The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipid transbilayer behavior in the sperm plasma membrane. *Development.* 2000 Jun;127(11):2407-20.
- Garner DL, Johnson LA. Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. *Biol Reprod.* 1995 Aug;53(2):276-84.
- Lotti F, Tamburrino L, Marchiani S, Muratori M, Corona G, Fino MG, Degl'Innocenti S, Forti G, Maggi M, Baldi E. Semen apoptotic M540 body levels correlate with testis abnormalities: a study in a cohort of infertile subjects. *Hum Reprod.* 2012 Dec;27(12):3393-402.
- Love, C. C. (2011). Relationship between sperm motility, morphology and the fertility of stallions. *Theriogenology*, 76(3), 547-557
- Marchiani S, Tamburrino L, Maoggi A, Vannelli GB, Forti G, Baldi E, Muratori M. Characterization of M540 bodies in human semen: evidence that they are apoptotic bodies. *Mol Hum Reprod.* 2007 Sep;13(9):621-31.
- Marchiani S, Tamburrino L, Olivito B, Betti L, Azzari C, Forti G, Baldi E, Muratori M. Characterization and sorting of flow cytometric populations in human semen. *Andrology.* 2014 May;2(3):394-401.
- McQueen DB, Zhang J, Robins JC. Sperm DNA fragmentation and recurrent pregnancy loss: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril.* 2019 Jul;112(1):54-60.e3.
- Muratori M, Marchiani S, Tamburrino L, Cambi M, Lotti F, Natali I, Filimberti E, Noci I, Forti G, Maggi M, Baldi E. DNA fragmentation in brighter sperm predicts male fertility independently from age and semen parameters. *Fertil Steril.* 2015b Sep;104(3):582-90.e4.
- Muratori M, Pellegrino G, Mangone G, Azzari C, Lotti F, Tarozzi N, Boni L, Borini A, Maggi M, Baldi E. DNA Fragmentation in Viable and Non-Viable Spermatozoa Discriminates Fertile and Subfertile Subjects with Similar Accuracy. *J Clin Med.* 2020 May 4;9(5):1341.
- Muratori M, Piomboni P, Baldi E, Filimberti E, Pecchioli P, Moretti E, Gambera L, Baccetti B, Biagiotti R, Forti G, Maggi M. Functional and ultrastructural features of DNA-fragmented human sperm. *J Androl.* 2000 Nov-Dec;21(6):903-12.
- Muratori M, Porazzi I, Luconi M, Marchiani S, Forti G, Baldi E. AnnexinV binding and merocyanine staining fail to detect human sperm capacitation. *J Androl.* 2004 Sep-Oct;25(5):797-810.
- Muratori M, Tamburrino L, Marchiani S, Cambi M, Olivito B, Azzari C, Forti G, Baldi E. Investigation on the Origin of Sperm DNA Fragmentation: Role of Apoptosis, Immaturity and Oxidative Stress. *Mol Med.* 2015a Jan 30;21(1):109-22.
- Muratori M, Tamburrino L, Tocci V, Costantino A, Marchiani S, Giachini C, Laface I, Krausz C, Meriggiola MC, Forti G, Baldi E. Small variations in crucial steps of TUNEL assay coupled to flow cytometry greatly affect measures of sperm DNA fragmentation. *J Androl.* 2010 Jul-Aug;31(4):336-45.
- Muratori M, Tarozzi N, Carpentiero F, Danti S, Perrone FM, Cambi M, Casini A, Azzari C, Boni L, Maggi M, Borini A, Baldi E. Sperm selection with density gradient centrifugation and swim up: effect on DNA fragmentation in viable spermatozoa. *Sci Rep.* 2019 9:7492.
- Peña FJ, Ortiz Rodriguez JM, Gil MC, Ortega Ferrusola C. Flow cytometry analysis of spermatozoa: Is it time for flow spermetry? *Reprod Domest Anim.* 2018 Sep;53 Suppl 2:37-45.
- Riley L, Ammar O, Mello T, Giovannelli L, Vignozzi L, Muratori M. Novel methods to detect ROS in viable spermatozoa of native semen samples. *Reprod Toxicol.* 2021 Dec;106:51-60. doi: 10.1016/j.reprotox.2021.10.004. Epub 2021 Oct 9. PMID: 34637913.
- Tan J, Taskin O, Albert A, Bedaiwy MA. Association between sperm DNA fragmentation and idiopathic recurrent pregnancy loss: a systematic review and meta-analysis. *Reprod Biomed Online.* 2019 Jun;38(6):951-960.
- WHO. World Health Organization Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. Geneva: WHO Press; 2021.