



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
FIRENZE

DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE BIOMEDICHE

CICLO XXVII

COORDINATORE Prof. Persio Dello Sbarba

*Frammentazione del DNA nella frazione vitale
degli spermatozoi eiaculati: studi clinici e aspetti
biologici*

Settore Scientifico Disciplinare MED/13

Dottorando

Dott.ssa Marta Cambi

Tutore

Prof.ssa Elisabetta Baldi

Coordinatore

Prof. Gianni Forti

Anni 2012/2014

*A Matteo,
per il suo amore e
per aver creduto in me, sempre.
Alla mia famiglia, al mio fianco ogni
giorno.*

Sommario

1	INTRODUZIONE	5
1.1	CITOLOGIA DEL GAMETE MASCHILE	5
1.2	GENESI DELLO SPERMATOZOO MATURO:.....	9
1.3	INTERAZIONE TRA SPERMATOZOO ED OVOCITA E PROCESSO DI FERTILIZZAZIONE.....	14
1.4	IL FATTORE MASCHILE NELL'INFERTILITA'	15
1.5	LA FRAMMENTAZIONE DEL DNA NEGLI SPERMATOZOI UMANI.....	18
1.6	ORIGINE DELLA FRAMMENTAZIONE DEL DNA SPERMATICO.....	19
1.7	I DATI DEL LABORATORIO DI ANDROLOGIA DI FIRENZE	24
1.8	TECNICHE PER LA RILEVAZIONE DEL DANNO AL DNA DEGLI SPERMATOZOI	25
1.9	LA TECNICA PER VALUTARE LA SDF NEL NOSTRO LABORATORIO: LA TUNEL/PI.....	29
1.10	RELAZIONE FRA LA FRAMMENTAZIONE DEL DNA E L'ESITO DELLA PROCREAZIONE NATURALE: I RISULTATI DEL NOSTRO STUDIO.....	37
1.11	RELAZIONE FRA LA FRAMMENTAZIONE DEL DNA E L'ESITO DELLA PROCREAZIONE MEDICALMENTE ASSISTITA.....	38
1.12	LA FRAMMENTAZIONE DEL DNA NEGLI SPERMATOZOI VIVI	43
2	SCOPO DELLA TESI	45
3	MATERIALI E METODI	47
3.1	RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI DI LIQUIDO SEMINALE PER ANALISI DI IMMUNOFLUORESCENZA TRIPARAMETRICHE.....	47
3.2	RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI DI LIQUIDO SEMINALE PER ANALISI DI SDF DURANTE LE TECNICHE DI SELEZIONE	48
3.3	RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI DI LIQUIDO SEMINALE PER ANALISI DI SDF IN SPERMATOZOI VIVI DI SOGGETTI FERTILI ED INFERTILI	49
3.4	DETERMINAZIONE DELLA FRAMMENTAZIONE DEL DNA MEDIANTE TECNICA TUNEL	50
3.5	PROVE DI TOSSICITÀ PER L10120.....	52
3.6	RILEVAZIONE STRESS OSSIDATIVO (8-OHDG E MDA) E SDF.....	52
3.7	RILEVAZIONE DELL'ATTIVITÀ CASPASICA E SDF	53
3.8	RILEVAZIONE DELL'ATTIVITÀ CASPASICA E 8-OHDG.....	54
3.9	LA CITOMETRIA A FLUSSO.....	54
3.10	ANALISI CITOFLUORIMETRICA AL FACSARIA.....	57
3.11	ANALISI STATISTICA DEI RISULTATI.....	58
4	RISULTATI	60
4.1	CONFRONTO TRA I LIVELLI DI SDF PRIMA E DOPO LA PROCEDURA DI SELEZIONE SPERMATOZOARIA ADOTTATA DAI LABORATORI DI PMA	60
4.2	IMPATTO DELLA SDF TOTALE E BRIGHTER SUGLI OUTCOME RIPRODUTTIVI	65
4.3	VALUTAZIONE SIMULTANEA DELLA SDF E DELLA VITALITÀ CELLULARE	75
4.4	VALUTAZIONE DELLA SDF NEGLI SPERMATOZOI VITALI, PRIMA E DOPO LA SELEZIONE CON CGD	80
4.5	VALUTAZIONE DELLA SDF NEGLI SPERMATOZOI VITALI PRIMA E DOPO LA SELEZIONE MEDIANTE SWIM UP DIRETTO ED INDIRETTO.....	83
4.6	VALUTAZIONE DELLA SDF IN SPERMATOZOI VITALI DI SOGGETTI FERTILI ED INFERTILI.....	88
4.7	ASSOCIAZIONE DI SDF CON 8-OHDG, MDA E ATTIVITÀ CASPASICA IN SPERMATOZOI VITALI	90
4.8	ASSOCIAZIONE DI SDF CON 8-OHDG E ATTIVITÀ CASPASICA IN SPERMATOZOI VITALI DURANTE INCUBAZIONE IN VITRO.....	93
5	DISCUSSIONE	99

5.1	SIGNIFICATO CLINICO DELLA FRAMMENTAZIONE DEL DNA NEGLI SPERMATOZOI	99
5.1.1	<i>FRAMMENTAZIONE DEL DNA DURANTE LA PREPARAZIONE DEGLI SPERMATOZOI PER LE TECNICHE DI FECONDAZIONE ASSISTITA</i>	99
5.1.2	<i>FRAMMENTAZIONE DEL DNA NEGLI SPERMATOZOI ED ESITI DELLA FECONDAZIONE ASSISTITA</i>	103
5.2	FRAMMENTAZIONE DEL DNA DEGLI SPERMATOZOI E CONCEPIMENTO NATURALE.....	105
5.3	FRAMMENTAZIONE DEL DNA NEGLI SPERMATOZOI VITALI: MECCANISMI DI GENESI IN VITRO	106
5.4	CONCLUSIONE.....	108
6	BIBLIOGRAFIA	110
7	APPENDICE	121

1 INTRODUZIONE

1.1 CITOLOGIA DEL GAMETE MASCHILE

Lo spermatozoo è la cellula germinale maschile matura. E' una cellula altamente differenziata, mobile e flagellata.

Nei mammiferi, la sua struttura può essere schematicamente suddivisa in testa e flagello (o coda) uniti tra loro dal collo (regione di connessione). Sebbene tutti gli spermatozoi di mammifero possiedano queste caratteristiche generali, esistono differenze specie-specifiche sia per quanto riguarda le dimensioni e la forma della testa sia per la lunghezza delle varie componenti del flagello. In particolare, gli spermatozoi umani sono lunghi complessivamente circa 65 μm , comprensivi della testa (3 - 5 μm), appiattita dorsoventralmente, e del flagello (50 - 60 μm) che inizia con uno spessore iniziale maggiore di 1 μm e che si assottiglia progressivamente procedendo verso la sua porzione terminale (Baccetti, 1984; **Figura 1**).

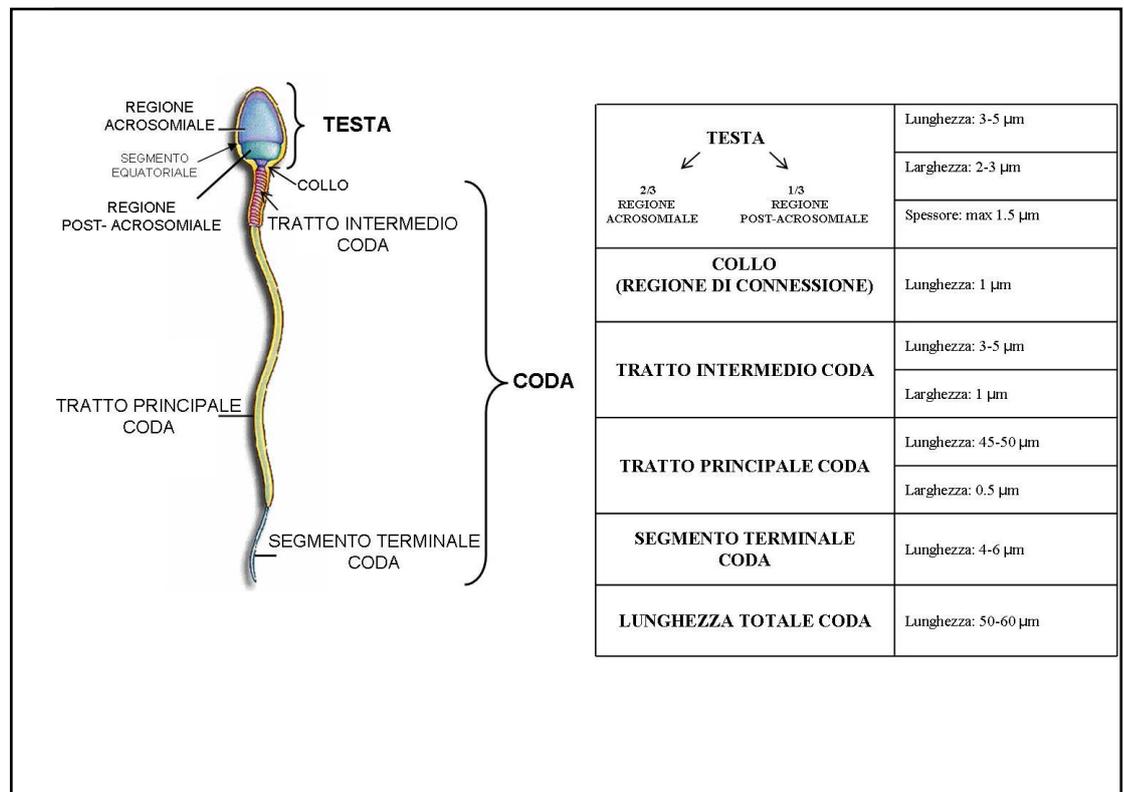


Figura 1. Le diverse componenti dello spermatozoo umano normale e le loro dimensioni.

LA TESTA

La testa è formata dall'acrosoma, dal nucleo, da strutture citoscheletriche e dal citoplasma, ed è delimitata da una membrana plasmatica simile a quella delle altre cellule. Tuttavia, l'organizzazione e la composizione della membrana plasmatica variano tra le diverse regioni della superficie dello spermatozoo costituendo dei domini che riflettono funzioni specifiche e che possono subire dei cambiamenti durante la vita della cellula. I principali domini della membrana plasmatica della testa sono rappresentati dalla regione acrosomiale e quella post-acrosomiale.

La regione acrosomiale è suddivisa, a sua volta, in segmento principale e segmento equatoriale (locato nella regione equatoriale della testa). La maggior parte dei domini membranari si stabilizza durante la spermiogenesi, anche se cambiamenti ulteriori di forma e superficie possono avvenire durante la maturazione epididimale. Inoltre, durante quest'ultima, nuove proteine, di origine epididimale, appaiono sulla superficie di specifici domini dello spermatozoo o domini preesistenti possono distribuirsi in modo diverso.

La membrana plasmatica contiene elevate quantità di plasmalogeni e altri fosfolipidi e lipidi con lunghe catene alifatiche polinsature. Sia durante la maturazione epididimale che il processo di capacitazione i componenti della membrana vanno incontro a profonde modificazioni, sia per quanto riguarda le cariche superficiali (la carica negativa di superficie è maggiore nella cauda dell'epididimo che nel caput), che per la distribuzione di particelle intramembranarie, la fluidità di membrana e la composizione lipidica e proteica.

L'acrosoma è localizzato nella porzione anteriore della testa, compreso tra la faccia inferiore della membrana plasmatica e la porzione anteriore del nucleo. Deriva dall'apparato del Golgi dello spermatide (lo stadio differenziativo precedente descritto nel paragrafo successivo); ha una struttura a cappuccio che ricopre più dei due terzi anteriori del nucleo ed è delimitato da due membrane denominate membrana acrosomiale interna e membrana acrosomiale esterna. Durante la reazione acrosomiale la membrana acrosomiale esterna e la membrana plasmatica si fondono e vescicolano riversando la maggior parte dei contenuti acrosomiali, soprattutto enzimi litici ad elevato potere proteo- e glicolitico, quali ialuronidasi, esterasi, peptidasi, fosfolipasi e

acrosina, la cui funzione è quella di favorire l'attraversamento dei rivestimenti dell'ocita e consentendo l'interazione dello spermatozoo con l'oolemma e la successiva penetrazione al momento della fecondazione. La proacrosina è il costituente dell'acrosoma maggiormente caratterizzato, è un membro della superfamiglia delle serino-proteasi ed è espressa solo nelle cellule spermatogenetiche.

Il nucleo spermatico contiene un corredo cromosomico aploide, ottenuto grazie alle due divisioni meiotiche della spermatogenesi. E' relativamente piccolo rispetto a quello delle cellule somatiche e molto denso in quanto costituito da cromatina fortemente impacchettata. La sua forma è ovale, leggermente schiacciata con la porzione anteriore conica e la posteriore convessa a determinare una fossa di impianto ove sorge il flagello.

I componenti citoscheletrici della testa sono confinati nello stretto spazio compreso tra l'acrosoma ed il nucleo e tra l'acrosoma e la membrana plasmatica. Il ruolo di questa struttura citoscheletrica, sebbene non completamente chiarito, è di promuovere e mantenere la forma della testa e di favorire la penetrazione dei rivestimenti della cellula uovo al momento della fertilizzazione (O'Brian and O'Brian, 1994).

Il citoplasma è ridotto ad un velo che circonda il nucleo e l'acrosoma. Gran parte di questo, infatti, viene perso durante la spermiogenesi sotto forma di residuo o droplet.

IL FLAGELLO

Il flagello è formato da quattro segmenti: il collo o regione di connessione, il tratto intermedio, il tratto principale ed il segmento terminale.

La regione di connessione è lunga circa 1 μm e unisce la testa e la coda. In questo tratto, nello spermatide, sono presenti due centrioli: uno prossimale, orientato parallelamente alla base del nucleo ed un altro distale, perpendicolare al precedente. Il centriolo prossimale è conservato durante la maturazione a spermatozoo; il centriolo distale scompare invece dopo aver originato la tipica struttura assonemale "9+2".

Nel tratto intermedio il flagello è costituito, procedendo dall'interno verso l'esterno, da: struttura assonemale "9+2", fibre accessorie, guaina mitocondriale e guaina fibrosa (O'Brian and O'Brian, 1994).

L'assonema è costituito da nove doppietti di microtubuli periferici più un doppietto centrale. I doppietti periferici sono formati dal tubulo A che è completo e dal tubulo B che si completa condividendo una parte della parete del tubulo A ed è leggermente più grande. Dal tubulo A si protendono verso il tubulo B del doppietto adiacente due serie di appendici che ricordano due bracci. Oltre ai bracci, i doppietti hanno anche dei raggi. Da ciascun tubulo A infatti si diparte, centripetamente, una serie longitudinale di raggi, o legami radiali, terminanti con un bottone detta testa del raggio in vicinanza dei due tubuli centrali. Le fibre accessorie sono nove, essendo ciascuna corrispondente ad un doppietto dell'assonema. Formate da materiale elettrondenso, si interrompono solo nella regione terminale del flagello.

La guaina mitocondriale è costituita da mitocondri allineati in una lunga fila disposta ad elica ad avvolgere le strutture interne. Questo rivestimento mitocondriale si interrompe nel tratto successivo, cioè nel tratto principale, che ha, per il resto, struttura simile a quello intermedio.

La guaina fibrosa è una doppia serie di coste arcuate semicircolari, che circondano la coda dai due lati e sono unite da due colonne longitudinali costituite da materiale fibroso strettamente impacchettato.

Nel segmento terminale si ha infine la perdita delle fibre accessorie; questo determina un ulteriore assottigliamento del flagello.

Il flagello fornisce la propulsione necessaria affinché lo spermatozoo raggiunga la cellula uovo e la possa fecondare. La struttura "9+2" dell'assonema, cui la guaina fibrosa esterna assicura stabilità, consente la flessione laterale del flagello mediante un meccanismo di scorrimento delle doppiette periferiche rispetto alla coppia centrale. In tal modo i veloci spostamenti laterali della coda assicurano l'avanzamento progressivo dello spermatozoo, che si accompagna anche ad un movimento di rotazione attorno all'asse longitudinale della cellula.

1.2 GENESI DELLO SPERMATOOZOO MATURO: SPERMATOGENESI E SPERMIOGENESI

Lo spermatozoo maturo è il prodotto finale della gametogenesi maschile che si verifica all'interno dei tubuli seminiferi del testicolo (O'Brian and O'Brian, 1994; Yanagimachi et al, 1994). La gametogenesi, che nell'uomo impiega circa 70 giorni per completarsi, è un processo maturativo che si può suddividere in due fasi principali: la spermatogenesi seguita dalla spermioinesi (spermioistogenesi).

La *spermatogenesi* (**Figura 2**), è un processo che porta alla formazione di spermatidi a partire dagli spermatogoni, tipiche cellule germinali indifferenziate. Tale trasformazione consta di una fase iniziale, detta di moltiplicazione, in cui gli spermatogoni subiscono ripetute divisioni mitotiche costituendo un pool di riserva di cellule germinali; solo una parte di esse, grazie all'azione di fattori endocrini sistemici e locali, si differenzia in spermatociti primari. Questi vanno incontro alla prima divisione meiotica dando origine a spermatociti secondari; tali cellule raggiungono la condizione aploide ($23n$) dopo la seconda divisione meiotica, trasformandosi così in spermatidi. Nella spermatogenesi si assiste al fenomeno di citodieresi incompleta, per cui cellule germinali derivanti dallo stesso spermatogonio risultano unite da ponti citoplasmatici poi eliminati nella spermioinesi successiva. Gli spermatidi sono piccole cellule sferoidali in strettissimo rapporto con le cellule dell'epitelio del tubulo seminifero o cellule del Sertoli le quali costituiscono un sostegno trofico e meccanico (Bardin et al, 1994) agli spermatidi stessi. E' questo tipo cellulare che va incontro a quel complesso processo di differenziazione definito spermioistogenesi, grazie al quale gli spermatidi vengono trasformati in spermatozoi maturi (Balhorn, 1982).

La *spermioinesi* implica cambiamenti morfologici e funzionali significativi senza però ulteriori divisioni cellulari (**Figura 3**). Le trasformazioni fondamentali a cui va incontro lo spermatide sono la formazione dell'assonema e delle altre strutture del flagello, la genesi, a partire dall'apparato del Golgi, dell'acrosoma e del suo corredo enzimatico, la condensazione serrata e l'impacchettamento della cromatina che conferiscono estrema resistenza e stabilità al nucleo spermatico, l'eliminazione di gran parte

del citoplasma sotto forma di residuo o droplet citoplasmatico successivamente fagocitato dalle cellule del Sertoli ed infine il rilascio degli spermatozoi nel lume dei tubuli seminiferi (Bardin et al, 1994).

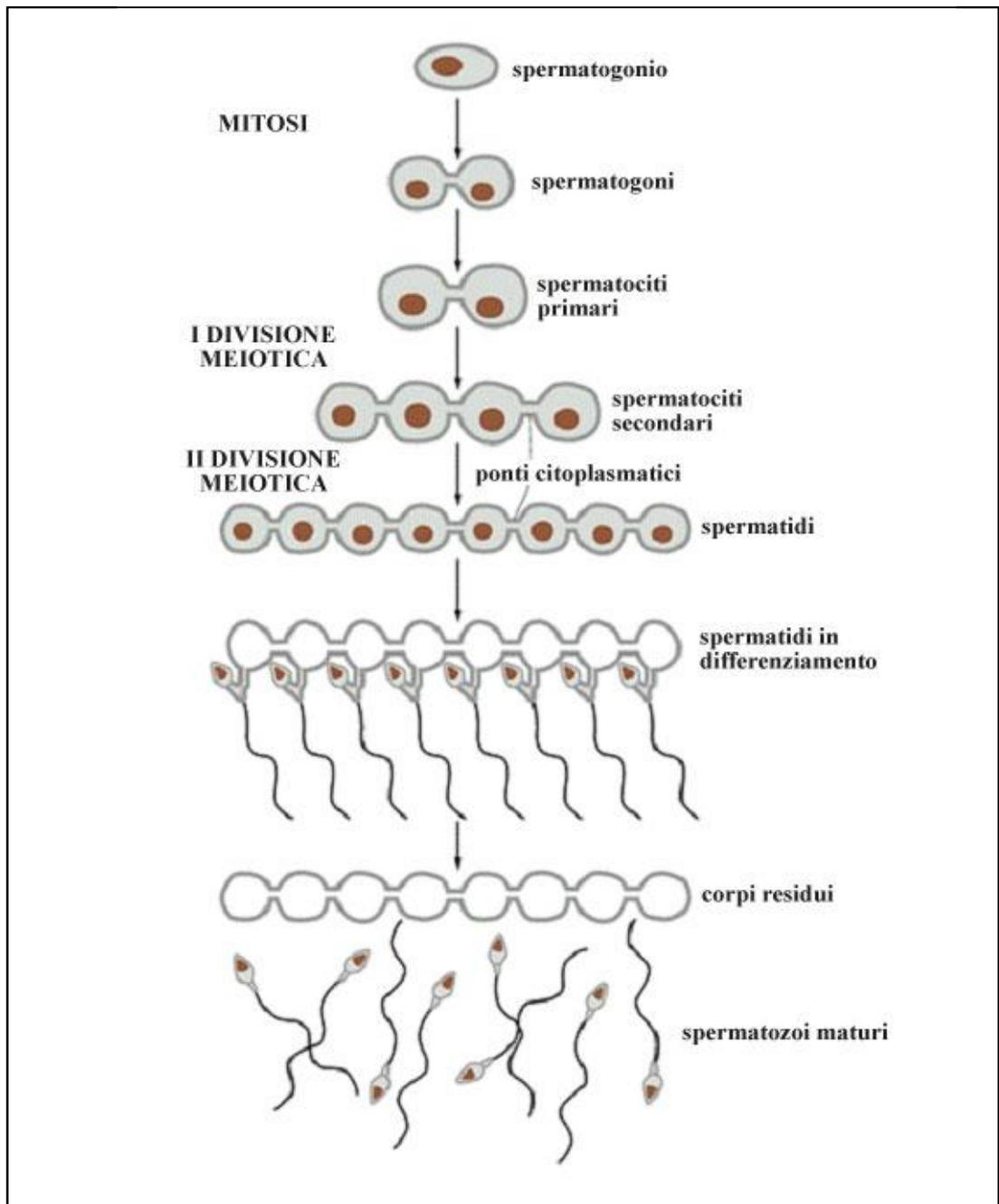


Figura 2. Successione delle divisioni cellulari durante la spermatogenesi.

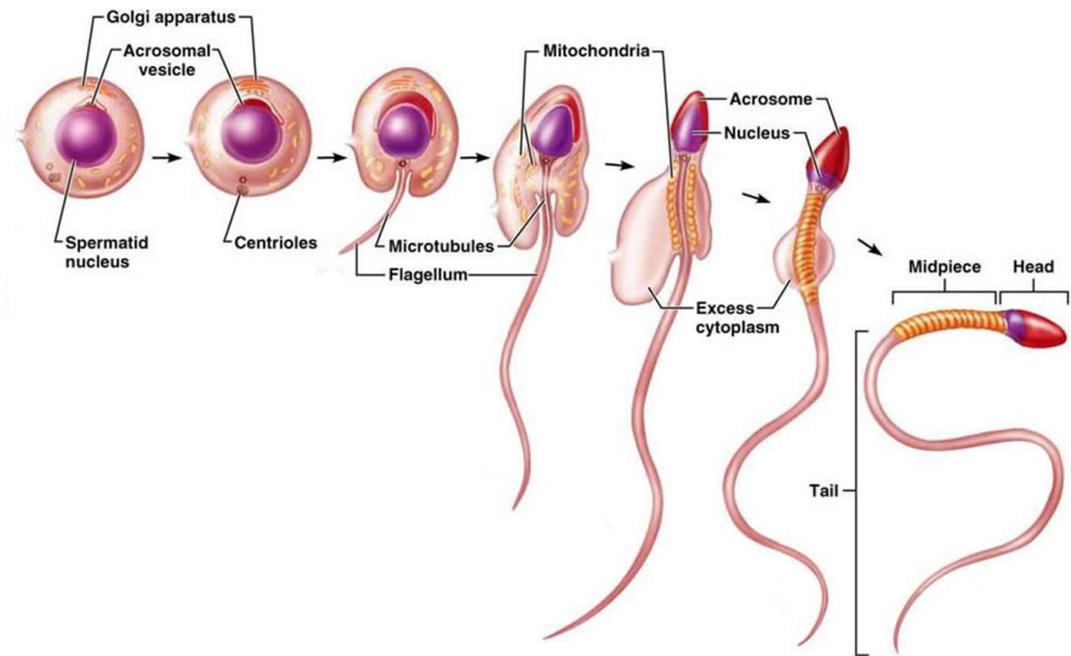


Figura 3. *Principali cambiamenti che avvengono durante la spermiogenesi.*

In questa sede è particolarmente significativa la trasformazione a carico della cromatina la cui organizzazione finale è profondamente diversa da quella delle cellule somatiche.

La struttura altamente organizzata e condensata della cromatina spermatica non solo serve a proteggere l'integrità genetica durante il trasporto del genoma paterno attraverso le vie genitali maschili e femminili, ma permette anche che il DNA paterno arrivi a destinazione nella forma sterica migliore, favorendo la corretta fusione dei genomi dei due gameti (Poccia, 1986). Il processo di riarrangiamento della cromatina inizia con la sintesi e la deposizione di protamine (proteine relativamente piccole e ricche in residui di arginina e cisteina) che sostituiranno quasi completamente le proteine istoniche. Questo passaggio richiede il rilassamento cromatinico che avviene tramite iperacetilazione istonica, nonché l'introduzione di tagli al DNA ad opera della Topoisomerasi II. Durante il transito epididimale l'integrità genomica viene ristabilita e si completa l'impacchettamento cromatinico attorno al neo formato core di protamine (Laberge et al, 2005). Il complesso DNA-protamine è fortemente stabilizzato da ponti disolfuro intra e

intermolecolari fra gruppi-SH dei residui di cisteina delle protamine (Ward et al, 1991).

Attualmente, i dettagli dell'organizzazione sopramolecolare della cromatina spermatica non sono noti, ma sono stati proposti alcuni modelli per spiegare come la doppia elica del DNA associata alle protamine raggiunga il caratteristico arrangiamento altamente condensato. Tra questi modelli, uno dei più accreditati è quello a doughnut-loop (Ward, 1993), illustrato nella **Figura 4** che confronta ciascun ordine di organizzazione con quello corrispondente nelle cellule somatiche. Negli spermatozoi le protamine si dispongono longitudinalmente, una molecola dopo l'altra, lungo uno dei solchi della doppia elica del DNA (**Figura 4F**). Nel successivo livello di organizzazione (**Figura 4G**), corrispondente al solenoide del DNA somatico (**Figura 4C**), il complesso DNA-protamine si avvolge su se stesso come le spire di una molla, formando ampie e concentriche circonferenze che si sovrappongono strettamente le une alle altre. A differenza del solenoide, la struttura ha solo un debole superavvolgimento negativo ed è stabilizzata da forze di Van der Waals fra una spira e l'altra. Questo è reso possibile dalla perdita della carica polianionica (dei residui fosforici) della catena del DNA dovuta al controbilanciamento delle protamine cariche positivamente. Nell'ulteriore livello organizzativo (**Figura 4H**), di nuovo in analogia con le cellule somatiche, la cromatina è arrangiata in loops ancorati alla matrice nucleare. Negli spermatozoi, tali loops sono visti come il risultato del collasso delle spire concentriche a dare delle strutture toroidali o a ciambella (doughnut) di dimensioni molto più piccole rispetto ai corrispondenti elementi del DNA somatico (**Figura 4D**).

A questo stadio di maturazione, gli spermatozoi, pur essendo già completamente differenziati, sono quasi del tutto immobili, per cui vengono trasportati passivamente dai tubuli seminiferi fino alla rete testis la quale si continua nell'epididimo; tale spostamento è dovuto a secrezioni fluide che scorrono dai tubuli del testicolo verso l'epididimo, dall'attività delle cellule luminali ciliate e dalle contrazioni delle cellule muscolari lisce dei dotti efferenti. E' nell'epididimo che gli spermatozoi acquisiscono la capacità di muoversi in modo progressivo mentre la capacità di fertilizzare la cellula uovo è un processo complesso che si verifica dopo la deposizione del seme in vagina durante il transito nelle vie genitali femminili (Harper,1994).

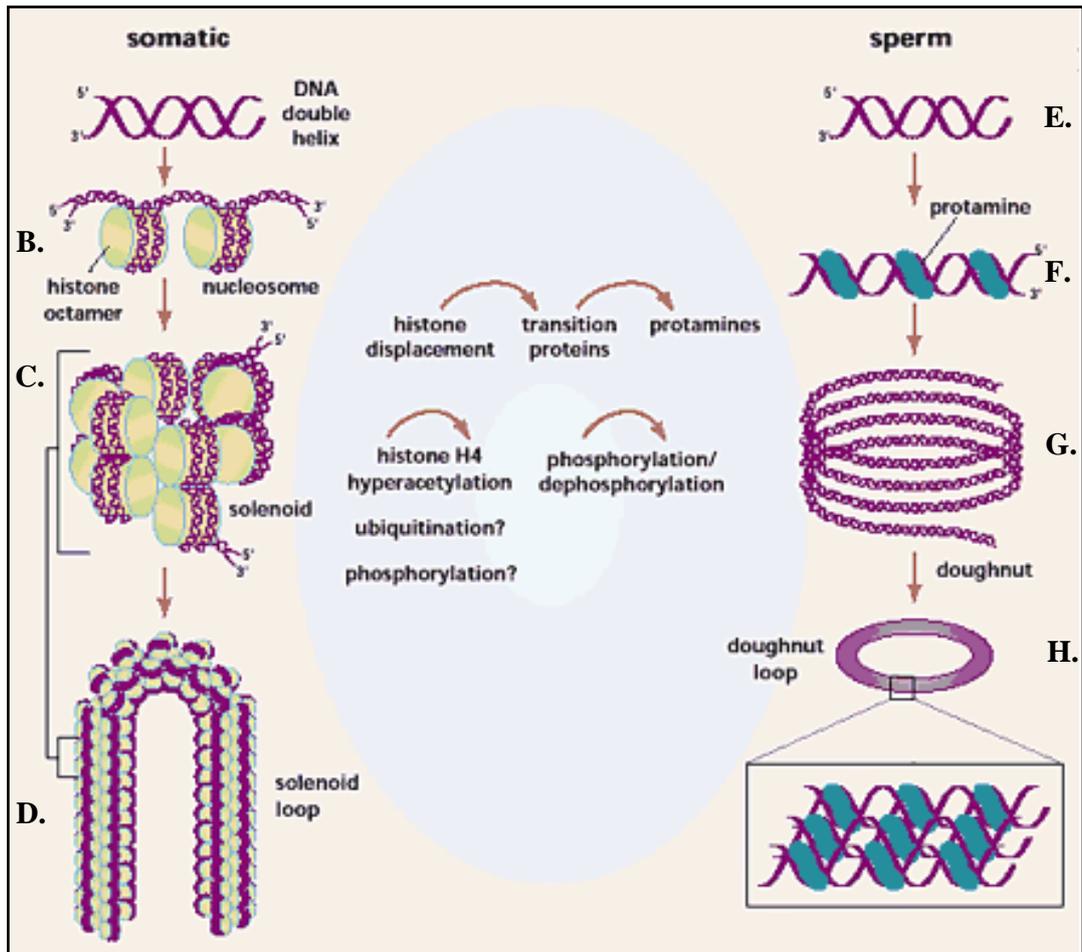


Figura 4. Confronto fra corrispondenti livelli organizzativi della cromatina nelle cellule somatiche (a sinistra) e negli spermatozoi (a destra). Nelle cellule somatiche il DNA si avvolge 1,65 volte attorno all'ottamero di istoni a formare il nucleosoma (B). I nucleosomi provvedono alla progressiva spiralizzazione del DNA e si organizzano in fibre di 30nm di diametro:solenioide (C). I solenoidi sono ancorati, ad intervalli, alla matrice nucleare e si ripiegano a formare anse (D).

Lo schema dell'impacchettamento della cromatina spermatozoaria è basato sul modello del doughnut-loop. Nel nucleo spermatico, le protamine rimpiazzano gli istoni (F) e il complesso DNA-protamine è strettamente impacchettato in una struttura a forma di ciambella (H). La sostituzione degli istoni è facilitata da modificazioni post traduzionali delle proteine tra cui: acetilazione dell'istone H4, ubiquitinazione e fosforilazione.

1.3 INTERAZIONE TRA SPERMATOZOO ED OVOCITA E PROCESSO DI FERTILIZZAZIONE

Una volta acquisita la capacità fertilizzante nelle vie genitali femminili, attraverso l'ultimo step maturativo dello spermatozoo noto come "capacitazione" che determina numerose modificazioni biochimiche (Tamburrino,2012), lo spermatozoo può andare incontro alla reazione acrosomiale, che consiste nella fusione e nella formazione di fenestrature tra la membrana acrosomiale esterna e quella plasmatica, attraverso le quali viene riversato il contenuto acrosomiale. Questo processo, relativamente lento, oltre ad essere mediato da un largo influsso di calcio all'interno della testa dello spermatozoo prevede anche l'attivazione di chinasi (Tamburrino,2012). Studi in vitro hanno dimostrato che la reazione acrosomiale può essere indotta da numerosi fattori presenti nelle vie genitali femminili tra cui steroidi, fosfolipidi, piccoli peptidi, fattori di crescita e le proteine che costituiscono la zona pellucida dell'ovocita. Studi recenti hanno evidenziato un ruolo preminente del progesterone, presente ad alte concentrazioni nel cumulo ooforo, identificato quale sito fisiologico della reazione acrosomiale nei mammiferi (Jin et al, 2011).

Liberato l'acrosoma, lo spermatozoo si ancora alla zona pellucida stessa legandosi verosimilmente mediante un meccanismo recettoriale. Resta ancora ignoto il recettore responsabile dell'attacco alla zona pellucida, anche se numerose molecole sono state indicate quali possibili mediatori di questo attacco (Chen,2014). Usando, poi, i vigorosi battiti del flagello caratteristici della motilità iperattivata, lo spermatozoo attraversa la zona pellucida e giunge nello spazio perivitellino, accostandosi poi alla membrana plasmatica dell'ovocita con la quale si fonderà (**Figura 5**). Anche il meccanismo di fusione delle membrane di spermatozoo e oocita è poco noto, sebbene esistano dei principali candidati tra quelli indicati a svolgere questa importante funzione, come la proteina Izumo negli spermatozoi e la glicoproteina CD9 negli oociti (Bailey, 2010).

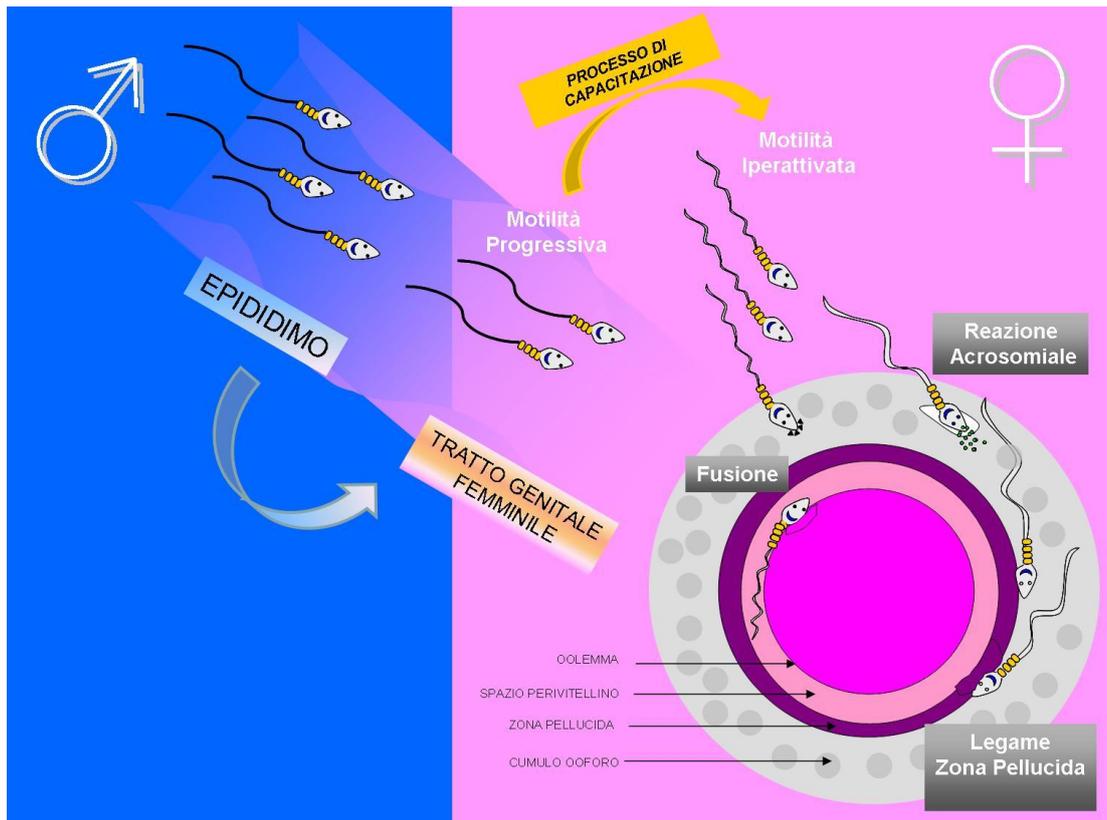


Figura 5. Schema riassuntivo del processo di fertilizzazione.

1.4 IL FATTORE MASCHILE NELL'INFERTILITA'

Per infertilità di coppia si intende l'incapacità di ottenere un concepimento dopo 12-18 mesi di rapporti sessuali non protetti e finalizzati alla procreazione (WHO, 1987). Si stima, nella popolazione occidentale, che l'incidenza dell'infertilità sia circa del 15% e tale valore aumenta considerando il totale delle coppie che necessitano di aiuto medico per il conseguimento della maternità (De Mouzon et al, 2010). Sebbene il concetto di infertilità sia da estendere alla coppia, si può identificare un fattore maschile e un fattore femminile.

Il fattore maschile incide sull'infertilità di coppia per circa il 40% (**Figura 6**), esso può manifestarsi mediante alterazioni a carico degli spermatozoi presenti nell'eiaculato (alterazioni a carico del numero, motilità e morfologia) oppure mediante alterazioni chimico-fisiche del liquido seminale.

o ancora nell'incapacità di deporre il seme in vagina (disfunzioni erettili e eiaculazione precoce) .

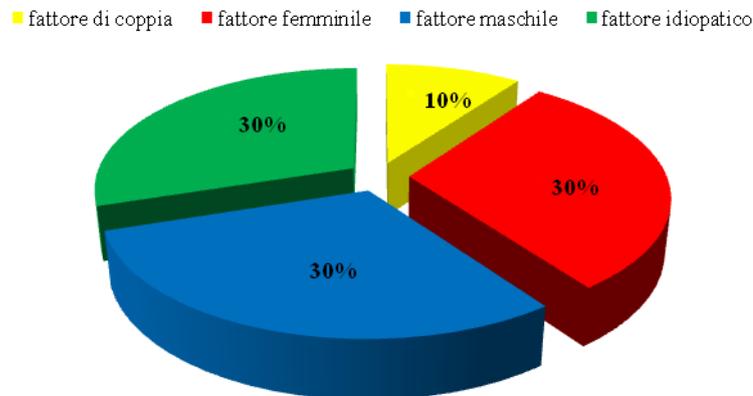


Figura 6. Incidenza dei vari fattori responsabili dell'infertilità di coppia. Il fattore maschile (dato dalla combinazione del fattore maschile puro e combinato) rappresenta il 40% delle cause di infertilità di coppia.

I valori di riferimento per i diversi parametri seminali sono stati stabiliti dalla World Health Organization nel 1999 e ad oggi aggiornati mediante l'ultima edizione del manuale WHO (WHO, 2010); tuttavia gli studi presenti in questa tesi sono stati effettuati assegnando le categorie di appartenenza in riferimento ai parametri del manuale del 1999. L'esame standard del liquido seminale è rappresentato dallo "spermiogramma", ma nessuno dei parametri seminali rilevabili attraverso questa analisi, saggia la reale capacità fertilizzante dello spermatozoo. Tale analisi consiste sia in una valutazione macroscopica dell'eiaculato (aspetto, volume, viscosità, pH, etc), sia in una microscopica (numero, motilità, morfologia, vitalità, etc).

Le possibili alterazioni numeriche degli spermatozoi sono:

- assenza totale (azoospermia);
- riduzione della loro concentrazione al di sotto dei valori minimi di riferimento (20 milioni per ml o di 40 milioni/eiaculato) (oligozoospermia).

Una diminuzione degli spermatozoi mobili progressivi, rapidi e lenti, che interessa oltre il 50% della loro quantità totale viene detta "astenozoospermia", mentre la riduzione al di sotto del 15% di spermatozoi con morfologia normale è chiamata "teratozoospermia".

Nella maggior parte dei pazienti infertili le alterazioni di questi parametri seminali si presentano simultaneamente e si parla, quindi, di “oligoastenoteratozoospermia” (WHO, 1999).

L’eziologia dell’infertilità maschile può essere di diversa natura e non necessariamente si identifica con un difetto della spermatogenesi; essa può essere classificata sulla base del livello d’insorgenza della disfunzione. Si possono infatti distinguere varie cause:

- pre-testicolari (10%), nel caso in cui la disfunzione sia determinata da ipogonadotropismo (da causa centrale o da assunzione di anabolizzanti) o da disordini del coito (disfunzioni di erezioni e/o dell’ejaculazione);
- post-testicolari (15%), come nel caso delle forme ostruttive congenite o acquisite, infezioni delle ghiandole accessorie e cause immunologiche,
- testicolari (75%), quando la disfunzione è a carico dei testicoli ed è riconducibile a disordini congeniti (anorchia, criptorchidismo), genetici (sindrome di Klinefelter, delzioni del cromosoma Y, anomalie monogeniche) e ad altri quadri clinici come, ad esempio il varicocele, la torsione del testicolo e l’orchite. In particolar modo il varicocele è tra i diversi fattori testicolari quello maggiormente diffuso, ne rappresenta infatti circa il 15%, per tale ragione esso risulta già da tempo motivo di indagine e studio a livello clinico.

Infine nel restante 35-50% dei casi l’eziologia dell’infertilità maschile risulta sconosciuta e si parla di forme “idiopatiche”. Infatti si può avere una ridotta o assente capacità fecondante in assenza di cause accertate, in particolare in individui con valori dello spermioγραμμα nei limiti della norma. I valori dei parametri seminali, infatti, mostrano una correlazione debole con la capacità fecondante, nel caso di fecondazioni in vitro (Liu et al, 2002) . Questo potrebbe essere dovuto alla variabilità dei diversi parametri nello stesso individuo: eseguendo lo spermioγραμμα più volte, in tempi diversi, si ottengono valori anche molto differenti (WHO, 2010). Resta comunque il fatto che lo spermioγραμμα è, ad oggi, l’unico test validato per la diagnosi dell’infertilità maschile, ma, per i grossi limiti evidenziati, per la soggettività della metodica utilizzata e per la grande variabilità intra ed inter-osservatore, è chiaro che gli andrologi mirino a trovare nuovi parametri predittivi del potere fecondante

degli spermatozoi, parametri più precisi e più potenti di quelli ad oggi disponibili.

1.5 LA FRAMMENTAZIONE DEL DNA NEGLI SPERMATOZOI UMANI

E' noto da tempo che gli spermatozoi umani eiaculati presentano, in proporzioni variabili, una serie di anomalie genomiche. Tali anomalie consistono in difetti nel numero di cromosomi (aneuploidia, Shi and Martin, 2001) difetti nella condensazione della cromatina (Evenson et al, 1986; Foresta et al, 1992), ridotta deposizione delle protamine (Manicardi et al, 1995 e 1998), aumentata sensibilità alla denaturazione in situ del DNA indotta da trattamento con acidi o con calore (Evenson et al, 1980; Sailer et al, 1995; Aravindan et al, 1997), presenza di tagli a singolo e a doppio filamento nella doppia elica del DNA (Gorczyca et al, 1993; Lopes et al, 1998; Sun et al, 1997; Muratori et al, 2000), sostituzioni di basi azotate modificate, tra cui la 8-idrossideossiguanosina (8-OHdG), considerata un marker del danno ossidativo al DNA (Kodama et al, 1997; Shen et al, 1999).

Tra le anomalie genomiche menzionate, la frammentazione della doppia elica del DNA rappresenta un danno massivo, che si ritrova frequentemente negli spermatozoi dei pazienti subfertili (Host et al, 1999). Questo fenomeno, che indicheremo con l'acronimo SDF (Sperm DNA Fragmentation), negli ultimi dieci anni ha focalizzato l'attenzione dei ricercatori in campo andrologico per due ragioni.

La prima ragione si inserisce nella ricerca di parametri predittivi dello stato di fertilità maschile, che siano di maggior valore, sia clinico che statistico, di quelli attualmente in uso, cioè dei parametri seminali standard determinati dallo spermioγραμμα, secondo le direttive del WHO del 1999. A tal riguardo, i dati finora raccolti indicano che la frammentazione del DNA potrebbe rappresentare un buon candidato. In effetti, i livelli di questo tipo di danno correlano con la ridotta qualità del seme, ma le correlazioni sono deboli (Irvine et al, 2000; Muratori et al, 2000), ad indicare che la SDF è parzialmente indipendente dai parametri standard e potrebbe dunque fornire un dato

diagnostico e prognostico addizionale e/o alternativo a quello dello spermogramma. Inoltre, sebbene esistano dati contrastanti, la SDF sembra correlare negativamente con l'esito della fecondazione sia naturale che assistita (O'Brien and Zini, 2005; Li et al, 2006).

La seconda ragione risiede nel fatto che le tecniche di fecondazione assistita (ART, *Assisted Reproductive Technology*) rappresentano spesso l'unica opzione terapeutica proprio per quei pazienti in cui la SDF raggiunge livelli più elevati. Poiché queste tecniche, sia quelle meno invasive come la FIVET¹ che quelle più invasive come la ICSI², prevedono il superamento di molte delle barriere esistenti alla fecondazione naturale, è possibile supporre che spermatozoi con DNA danneggiato possano partecipare al processo di fertilizzazione. Il rischio paventato è che lo spermatozoo con DNA danneggiato, pur mantenendo la capacità di fertilizzare l'oocita (Ahmadi et al, 1999), non sia in grado di supportare un corretto sviluppo embrionale e la nascita di progenie sana. Effettivamente, studi recenti indicano che aumentati livelli di frammentazione del DNA spermatico sono legati sia ad un aumentato tasso di aborti (Zini et al, 2008) che ad un maggiore rischio di cancro nella progenie (Hansen et al, 2002; Aitken and Baker, 2006).

1.6 ORIGINE DELLA FRAMMENTAZIONE DEL DNA SPERMATICO

Quale siano l'origine e il meccanismo che genera la frammentazione del DNA negli spermatozoi non è stato ancora del tutto chiarito, sebbene la loro conoscenza sia di interesse notevole in quanto potrebbe portare allo sviluppo di nuove terapie per i pazienti con ridotta fertilità.

¹ Fertilization in Vitro and Embryo Transfer: tecnica di procreazione medicalmente assistita di II livello dove l'oocita viene messo a contatto con gli spermatozoi in un apposito supporto, in modo che la fertilizzazione avvenga in maniera spontanea. Segue il trasferimento dell'embrione nell'utero della donna.

² Intracytoplasmic Sperm Injection: tecnica di procreazione medicalmente assistita di II livello che consiste nella microiniezione (ad opera di un operatore) di un singolo spermatozoo nel citoplasma oocitario. Segue il trasferimento dell'embrione nell'utero della donna.

La letteratura scientifica propone attualmente tre principali ipotesi, ciascuna delle quali attribuisce l'origine della frammentazione negli spermatozoi a fenomeni diversi e precisamente:

- i) a difetti maturativi che si verificano durante la spermiogenesi;
- ii) alla morte cellulare programmata o apoptosi;
- iii) al danno ossidativo dovuto ai radicali liberi e specie dell'ossigeno altamente reattive.

La teoria del *difetto maturativo* origina da osservazioni eseguite su modelli animali (Mc Pherson and Longo, 1992) ed è stata poi confermata anche nell'uomo (Marcon et al, 2004). In questi studi è stato osservato che durante la spermiogenesi compaiono delle rotture nella doppia elica del DNA. Questi tagli sono destinati ad essere rilegati in un secondo tempo, come dimostra la loro scomparsa negli spermatozoi maturi. Più precisamente, la comparsa dei tagli alla doppia elica è concomitante a quella fase della spermiogenesi in cui la cromatina spermatica subisce un intenso processo di riarrangiamento che ha come risultato l'impacchettamento serrato e condensato che caratterizza il nucleo spermatico maturo (vedi paragrafo 1.2). È stato ipotizzato che questi tagli abbiano un ruolo nel promuovere la riorganizzazione dell'assetto della cromatina spermatica. In particolare, il loro verificarsi destabilizzerebbe la struttura nucleosomale, favorendo la sostituzione degli istoni da parte, prima delle proteine di transizione e poi delle protamine. Sulla base di queste osservazioni la presenza di frammentazione del DNA negli spermatozoi eiaculati potrebbe essere interpretata come il risultato del mancato completamento della maturazione dei gameti ed in particolare del processo di impacchettamento cromatinico.

Un'altra teoria molto accreditata è quella dell'*apoptosi abortiva* (Sakkas et al, 1999a) (**Figura 7**). Questa teoria si basa sul ritrovamento nell'eiaculato (soprattutto di soggetti con ridotta fertilità) di spermatozoi con segni di apoptosi, come l'espressione del recettore Fas, (Sakkas et al, 1999b), di p53 e di bcl-x (Sakkas et al, 2002), la presenza di ultrastrutture apoptosis-like (Gandini et al, 2000) e dell'attività caspatica (Paasch et al, 2003 e 2004). La presenza di segni apoptotici, sia ultrastrutturali che molecolari, ha indotto ad

ipotizzare la teoria dell'apoptosi abortiva ovvero di un processo di apoptosi che origina nel testicolo ma che non riesce a completarsi. Conseguentemente, nell'eiaculato si ritrovano spermatozoi con segni di apoptosi. Sulla base di questa teoria dunque, la frammentazione del DNA sarebbe il risultato dell'attivazione delle nucleasi apoptotiche. Per quanto le evidenze a sostegno dell'effettivo verificarsi di un fenomeno di apoptosi abortiva siano numerose, non è del tutto chiaro se l'apoptosi abortiva possa spiegare totalmente la frammentazione del DNA negli spermatozoi. Infatti alcuni studi indicano che non c'è totale corrispondenza fra segni di apoptosi e danno al DNA spermatozoario (Sakkas et al, 2002; Muratori et al, 2000). Recentemente, l'autore della teoria dell'apoptosi abortiva, ha rivisitato questa teoria per spiegare questa non totale corrispondenza. Secondo questa nuova versione, il danno al DNA e la persistenza di markers apoptotici sono generati da processi indipendenti seppur interagenti (Sakkas et al, 2004). Viene quindi suggerito che mentre le caratteristiche apoptosi-simili ritrovate nell'eiaculato (come Fas, caspasi, p53) rappresentano il risultato di un fallimento dell'apoptosi testicolare, i tagli al DNA rappresentano il risultato di una mancata riparazione che dovrebbe normalmente avvenire durante il processo di rimodellamento nucleare nella spermiogenesi. Tuttavia, cellule in corso di apoptosi fallirebbero nel processo di rilegatura dei tagli al DNA, così come il rimaneggiamento della cromatina comporterebbe il deragliament del processo apoptotico. Il risultato netto dell'interazione fra i due fenomeni sarebbe una popolazione di spermatozoi eiaculati variabile dove, oltre a cellule normali, sono presenti cellule con tagli al DNA e marker apoptotici che possono coesistere o meno.

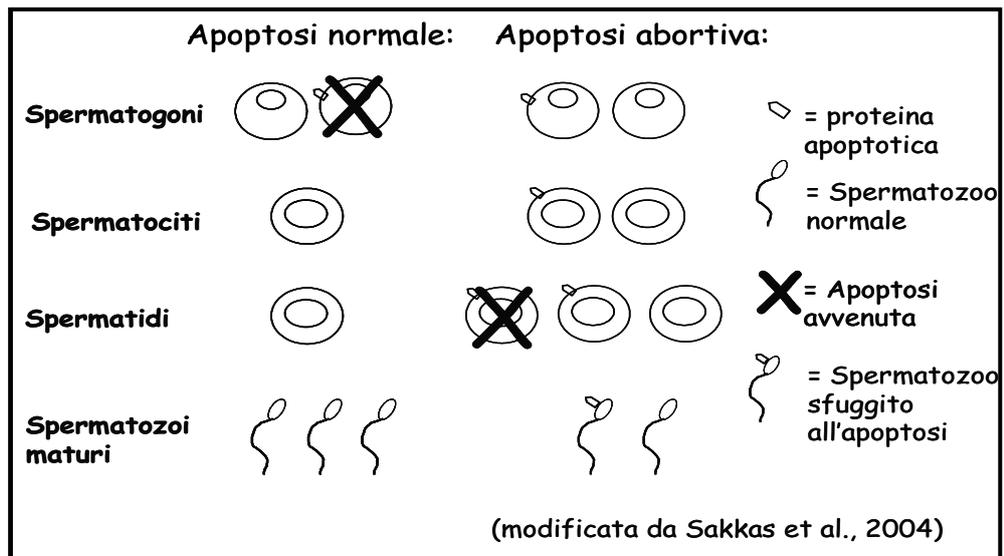


Figura 7. Schema dell'apoptosi abortiva confrontato con l'apoptosi normale

Un'altra teoria elaborata per spiegare la presenza di tagli al DNA negli spermatozoi è quella del *danno ossidativo*. I ROS (Specie Reattive dell'Ossigeno) possono essere generati, nel seme, da numerosi fattori presenti, come ad esempio i leucociti che sembrano essere una delle maggiori fonti di ROS (Cocuzza et al, 2007), nonchè gli stessi spermatozoi, in particolare quelli con malformazioni della testa e che presentano ritenzione citoplasmatica (Gomez et al, 1996). Quando la produzione dei ROS è regolata nella quantità e nel tempo, queste molecole svolgono ruoli importanti in numerosi processi fisiologici, tra i quali l'interazione con l'oocita, la reazione acrosomiale e l'iperattivazione, dove sono coinvolti in un aumento dei livelli di cAMP, ed infine la capacitazione (Makker et al, 2009). Tuttavia, quando la produzione è eccessiva, o comunque supera i livelli che possono essere fronteggiati dai sistemi di difesa antiossidante, i ROS invece sono associati a scarsa qualità del seme (Pasqualotto et al, 2001). I lipidi sono le macromolecole maggiormente suscettibili ai ROS essendo ricchi di acidi grassi polinsaturi e dunque proni ad una reazione chimica a catena nota come perossidazione lipidica. In questo modo si perde la fluidità nonché l'integrità della membrana e di conseguenza la funzionalità dello spermatozoo soprattutto nell'interazione con l'oocita. Tra i principali prodotti della perossidazione lipidica abbiamo la Malonildialdeide (MDA), molecola tossica e mutagenica, in grado di reagire con i gruppi funzionali delle macromolecole, modificandone la struttura. L'altro bersaglio

importante dei ROS è il DNA. In particolare, i ROS sarebbero responsabili della produzione di tagli sia a singola che a doppia elica nel DNA spermatico oltre che di modificazioni delle basi azotate come ad esempio la deossiguanosina che viene ossidata a 8-idrossi-2'-deossi-guanosina (8-OHdG), uno dei marker più studiati nello stress ossidativo (Aitken and Krausz 2001; Mazzilli et al,1994). A supporto della teoria che vede i ROS come agenti responsabili del danno al DNA spermatico, vi è il dato che in pazienti infertili (gli stessi che presentano una maggiore incidenza di frammentazione del DNA), il livello dei ROS risulta maggiore rispetto ai controlli (Sikka, 2001). Inoltre, il fatto che la frammentazione del DNA aumenti durante l'incubazione in vitro a causa di una produzione endogena di ROS (Muratori et al, 2003), è un'ulteriore conferma che queste specie reattive hanno un ruolo importante nel fenomeno.

Una differenza tra la teoria che attribuisce ai ROS l'origine della SDF e le altre due teorie è il sito di origine del danno al DNA. Secondo questa teoria infatti il danno al DNA può originarsi sia a livello testicolare che post testicolare. A questo proposito, molto interessante è il dato che gli spermatozoi prelevati dal testicolo mediante biopsia, presentano un'incidenza di SDF inferiore a quella degli spermatozoi eiaculati (Muratori et al, 2006).

E' possibile che i meccanismi ipotizzati dalle diverse teorie sull'origine della SDF, concorrano nel generare il danno che dunque potrebbe essere il risultato sia di fenomeni testicolari (apoptosi abortiva e/o difetti nella maturazione e/o ROS) che post testicolari (produzione di ROS) (Muratori et al, 2006) (**Figura 8**).

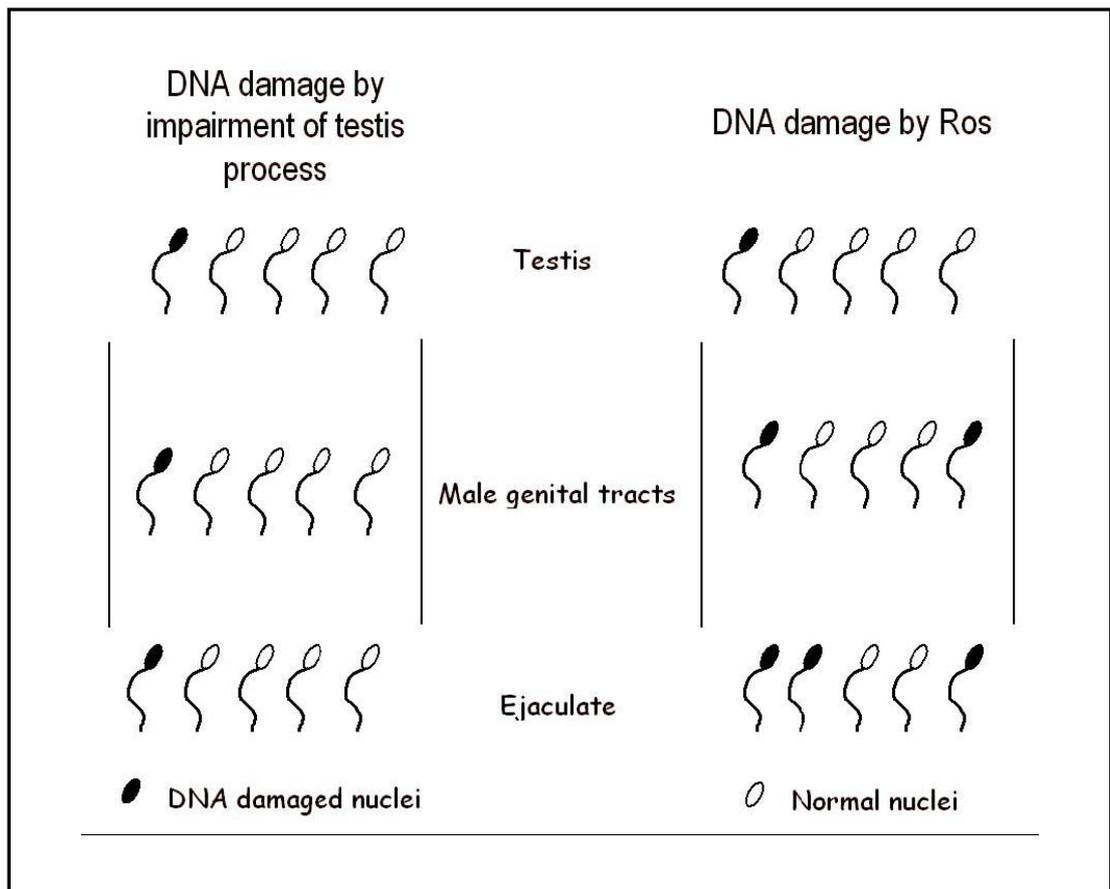


Figura 8. Diversi siti d'origine del danno al DNA negli spermatozoi secondo le due teorie sull'origine della frammentazione del DNA: apoptosi abortiva (a sinistra) e danno ossidativo (a destra).

1.7 I DATI DEL LABORATORIO DI ANDROLOGIA DI FIRENZE

Recentemente nel laboratorio di Firenze dove ho svolto il mio dottorato, si è da poco concluso un lavoro volto ad indagare i meccanismi di genesi della SDF. A questo scopo abbiamo utilizzato una strategia diretta: con analisi multiparametriche di citometria a flusso, abbiamo rivelato simultaneamente la SDF con i segni distintivi dei tre meccanismi ipotizzati sopradescritti: 8-idrossi, 2'-deossiguanosina (8-OHdG) e malondialdeide (MDA) per il danno ossidativo; l'attività caspatica e la forma clivata di Poly ADP-ribosio polimerasi (cPARP) per l'apoptosi e la creatinfosfochinasi (CK) per l'immaturità spermatica. Per quest'ultimo meccanismo abbiamo anche valutato l'eccesso di residui istonici, segno di immaturità cromatinica, mediante

colorazione con blu di anilina. Per questa colorazione abbiamo separato gli spermatozoi frammentati da quelli non frammentati con il cell sorting e nelle due frazioni abbiamo, effettuato la colorazione con blu di anilina.

I nostri risultati (Muartori et al, in press) indicano che l'apoptosi è fortemente associata alla SDF: infatti le caspasi e cPARP si trovano, rispettivamente, nell'80.8±8.9% e nel 54±16.3% degli spermatozoi frammentati rispetto al 15.7±10.8% ($p<0.0001$) e al 22.4±14.1% ($p<0.0001$) dei non frammentati. Relativamente ai segni di ossidazione, per quanto siano risultati statisticamente associati alla SDF, si mostrano poco concomitanti alla presenza di tagli al DNA (8-OHdG: 19.0±10.5% nei frammentati vs 12.4±6.4% nei non frammentati, $p<0.05$; MDA: 25.9±13.4% nei frammentati vs 21.6±12.5%, nei non frammentati, $p<0.01$). L'SDF è risultata anche concomitante con l'eccesso di residui istonici, che abbiamo trovato nel 76.5±18.6% degli spermatozoi frammentati e nel 37.3±16.6%, di quelli non frammentati ($p<0.005$). Tuttavia, la SDF non è risultata associata con l'immaturità citoplasmatica rivelata con la presenza di CK, a suggerire che immaturità cromatinica e citoplasmatica seguano meccanismi di tipo diverso.

I nostri risultati sinora indicano quindi che le vie principali che portano alla frammentazione del DNA dello spermatozoo sono l'apoptosi e l'immaturità cromatinica mentre lo stress ossidativo sembra avere un ruolo marginale. In realtà, possiamo ritenere che tale ruolo possa essere mascherato dalle cellule morte presenti nell'eiaculato, che sappiamo rappresentare una grande parte degli spermatozoi con SDF (Mitchell,2011). Per eliminare questi interferenti cellulari, è importante approfondire le analisi di colocalizzazione diretta sulla sola frazione vitale degli spermatozoi.

1.8 TECNICHE PER LA RILEVAZIONE DEL DANNO AL DNA DEGLI SPERMATOZOI

Attualmente sono disponibili una serie di metodiche per valutare il danno al DNA negli spermatozoi. Tra queste, quelle più consolidate e maggiormente utilizzate, sono la COMET (o SCGE, Single Cell Gel Electrophoresis), la TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated fluorescein dUTP

Nick End Labeling), la SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay) e la SCD (Sperm Chromatin Dispersion). A seconda del metodo utilizzato la frammentazione del DNA può essere rivelata sia tramite citometria a flusso che tramite microscopia a fluorescenza (**Figura 9**).

Mentre la citofluorimetria consente di analizzare in maniera oggettiva centinaia di migliaia di cellule, con il microscopio a fluorescenza si ottiene un'analisi soggettiva e limitata a poche centinaia di cellule. Le tecniche esistenti per la determinazione della SDF sono molte ed eterogenee, nel senso che si basano su principi anche molto diversi fra loro. E' dunque possibile che esse non rivelino esattamente lo stesso tipo di danno e che le loro misure non siano direttamente paragonabili. A questo aspetto, si aggiunge poi la mancanza di protocolli standardizzati nella quasi totalità delle tecniche. In questo scenario, è plausibile che una delle ragioni della grande discordanza degli studi sull'impatto della SDF sugli esiti della riproduzione (vedi capitolo successivo), risieda proprio nelle tecniche per la determinazione del fenomeno (Tamburrino et al, 2012).

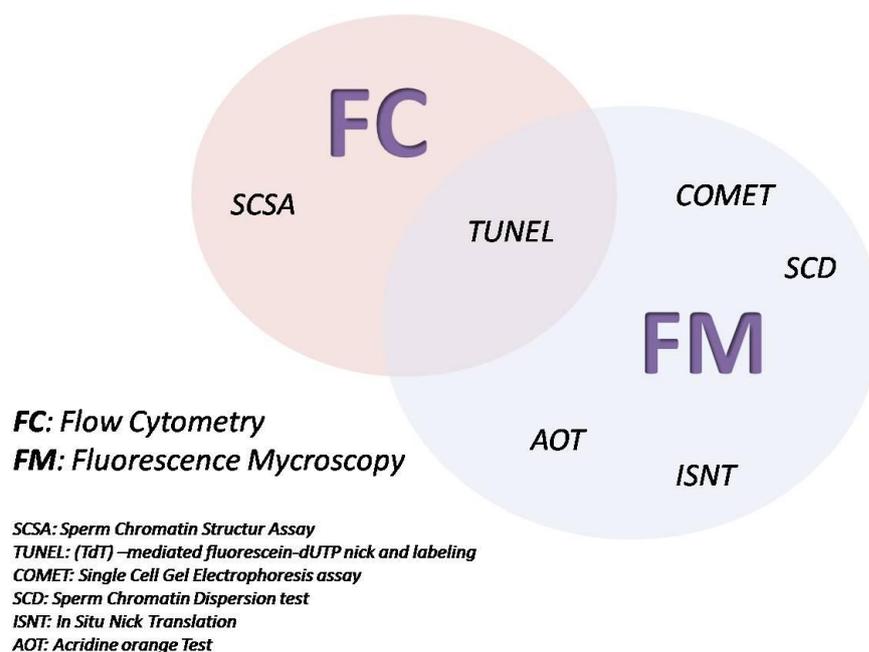


Figura 9. Metodi utilizzati per valutare la frammentazione del DNA negli spermatozoi e le tecnologie (FC: citometria a flusso, FM: microscopia a fluorescenza) che possono essere utilizzate in associazione a questi.

Le tecniche più frequentemente utilizzate negli studi clinici sono il TUNEL e la SCSA.

La tecnica TUNEL marca e rivela le estremità 3'OH che si liberano in seguito a frammentazione del DNA. Tale marcatura viene eseguita utilizzando l'enzima terminal transferasi (TdT), una DNA polimerasi stampo e primer indipendente, che catalizza l'addizione di desossinucleotidi marcati, alle estremità 3'OH dei frammenti a singola e doppia elica, che si generano in seguito a rotture del DNA. Una variante di questa tecnica utilizza un altro enzima, la DNA polimerasi I che invece è stampo e primer dipendente. Il differente meccanismo di azione dei due enzimi rende la terminal transferasi capace di marcare tutte le rotture a doppio filamento mentre la DNA polimerasi I è incapace di agire sui tagli a doppia elica sia privi di estremità protrudenti (blunted ends) sia con l'estremità non protrudente in 5' (5' recessed ends). Questa differenza nel meccanismo di azione è ritenuta responsabile della capacità della TdT di distinguere, nelle cellule somatiche, fra frammentazione del DNA aspecifica (ad esempio quella che interviene durante la necrosi cellulare) e la frammentazione programmata che si verifica in corso di morte cellulare per apoptosi (Gorczyca et al, 1993; Gold et al, 1994; Nakamura et al, 1995). In quest'ultima forma di degradazione del DNA, infatti, risultano estremamente più frequenti i tagli a doppia elica che, come detto, sono più efficacemente marcati dalla TdT. Poiché questa tecnica è applicabile a sospensioni cellulari e utilizza desossinucleotidi fluoresceinati come marcatura, consente la rivelazione di quest'ultima anche in citofluorimetria a flusso oltre che in microscopia a fluorescenza (**Figura 9**).

La SCSA è una misura della suscettibilità della cromatina spermatica alla denaturazione indotta con blando trattamento acido o termico. L'estensione della denaturazione del DNA è determinata dalla misura dello shift metacromatico dalla fluorescenza verde (Arancio di Acridina che si intercala nella doppia elica come monomero) alla fluorescenza rossa (Arancio di Acridina associato al singolo filamento sotto forma di aggregato) (Agarwal et al, 2004a). Con un apposito software, viene calcolato, a livello della singola cellula, il rapporto tra la fluorescenza rossa (DNA denaturato) e quella totale (verde+rossa, DNA denaturato e non denaturato), indicato come DFI (DNA Fragmentation Index). Tale valore è poi rappresentato come istogramma di

distribuzione sul quale si individuano le percentuali di cellule frammentate. L'SCSA, al contrario della TUNEL trova applicazione solo in citofluorimetria a flusso, (**Figura 9**). Un grande vantaggio di questa tecnica è che è l'unica a disporre di protocolli rigorosamente standardizzati.

Sebbene le due tecniche mostrino risultati correlati tra loro (Evenson et al, 2007), non sono equivalenti e rivelano due tipi di danno differenti. In particolare mentre il TUNEL dà una misura diretta la presenza di tagli al DNA, la SCSA misura indirettamente l'integrità del DNA in quanto valuta quanto il DNA si è denaturato a seguito dal trattamento con acidi o con calore (Alvarez et al, 2005).

Un'altra tecnica frequentemente utilizzata è la COMET, un' elettroforesi applicata a cellule incluse in gel di agarosio e montate su vetrino che dunque si avvale esclusivamente del microscopio a fluorescenza (**Figura 9**). L'analisi consiste nella rivelazione e misurazione, previa lisi, decondensazione e marcatura fluorescente del DNA, di una caratteristica figura di migrazione (simile ad una cometa) e in genere è supportata da sistemi di analisi dell'immagine (Shen et al., 2000). Oltre a fornire percentuali di cellule frammentate, è in grado di quantificare anche il danno per cellula in base alla lunghezza e alla intensità di fluorescenza della coda della cometa. Si tratta di una tecnica semplice, economica e molto sensibile, molto utile soprattutto nei casi di oligozoospermia severa. Gli svantaggi sono la mancanza di standardizzazione e la necessità di un software per l'analisi delle immagini (Zini and Sigman, 2009a).

Lo SCD è un test nuovo che si basa sulla differente risposta presentata dai nuclei di spermatozoi con DNA frammentato e quelli con DNA integro alla denaturazione (tramite trattamento con acidi) e alla rimozione delle proteine nucleari (tramite un buffer di lisi). Negli spermatozoi con nucleo integro la decondensazione indotta dà origine ad un nucleoide parzialmente deproteinizzato, che è composto da un core centrale e da un alone periferico di DNA disperso. Viceversa, gli spermatozoi con DNA frammentato non producono l'alone di dispersione del DNA oppure producono un alone la cui ampiezza è simile o addirittura più piccola del diametro minore del core (Fernández et al, 2005). Si tratta di un metodo veloce, altamente riproducibile e

che, al contrario delle tecniche analizzate fin'ora, non richiede l'uso di una strumentazione complessa.

1.9 LA TECNICA PER VALUTARE LA SDF NEL NOSTRO LABORATORIO: LA TUNEL/PI

Il TUNEL è una tecnica di marcatura e rilevazione delle estremità 3'OH che si liberano in seguito a frammentazione del DNA. Tale marcatura viene eseguita utilizzando l'enzima Terminal deossinucleotide transferasi, TdT, una DNA polimerasi stampo e primer indipendente, che catalizza l'addizione di desossinucleotidi marcati alle estremità 3'OH.

A differenza di quanto succede nelle cellule somatiche (Gorczyca W. et al., 1993; Gold R. et al., 1994; Nakamura T. et al., 1995), la marcatura con il TUNEL non indica per sé che il danno al DNA sia generato da apoptosi. Infatti, come precedentemente indicato, altri meccanismi oltre all'apoptosi sono proposti per spiegare la genesi della frammentazione del DNA spermatico (Muratori et al., 2006).

Poiché questa tecnica è applicabile a sospensioni cellulari e utilizza desossinucleotidi fluoresceinati come "probes", consente la rilevazione della marcatura in citofluorimetria a flusso, offrendo quindi la possibilità di eseguire misure rapide e oggettive su numeri molto elevati di cellule.

Il seme umano è un fluido biologico complesso nel quale sono presenti tipi cellulari eterogenei, quali cellule germinali con differente grado di maturità, oltre a spermatozoi maturi, e cellule somatiche. Inoltre, nel nostro laboratorio, sono stati scoperti, nel liquido seminale di pazienti subfertili, dei corpi rotondi, eterogenei per dimensione e densità, che si colorano prontamente con Merocianina 540, e per questo denominati "M540 bodies" (**Figura 10**).

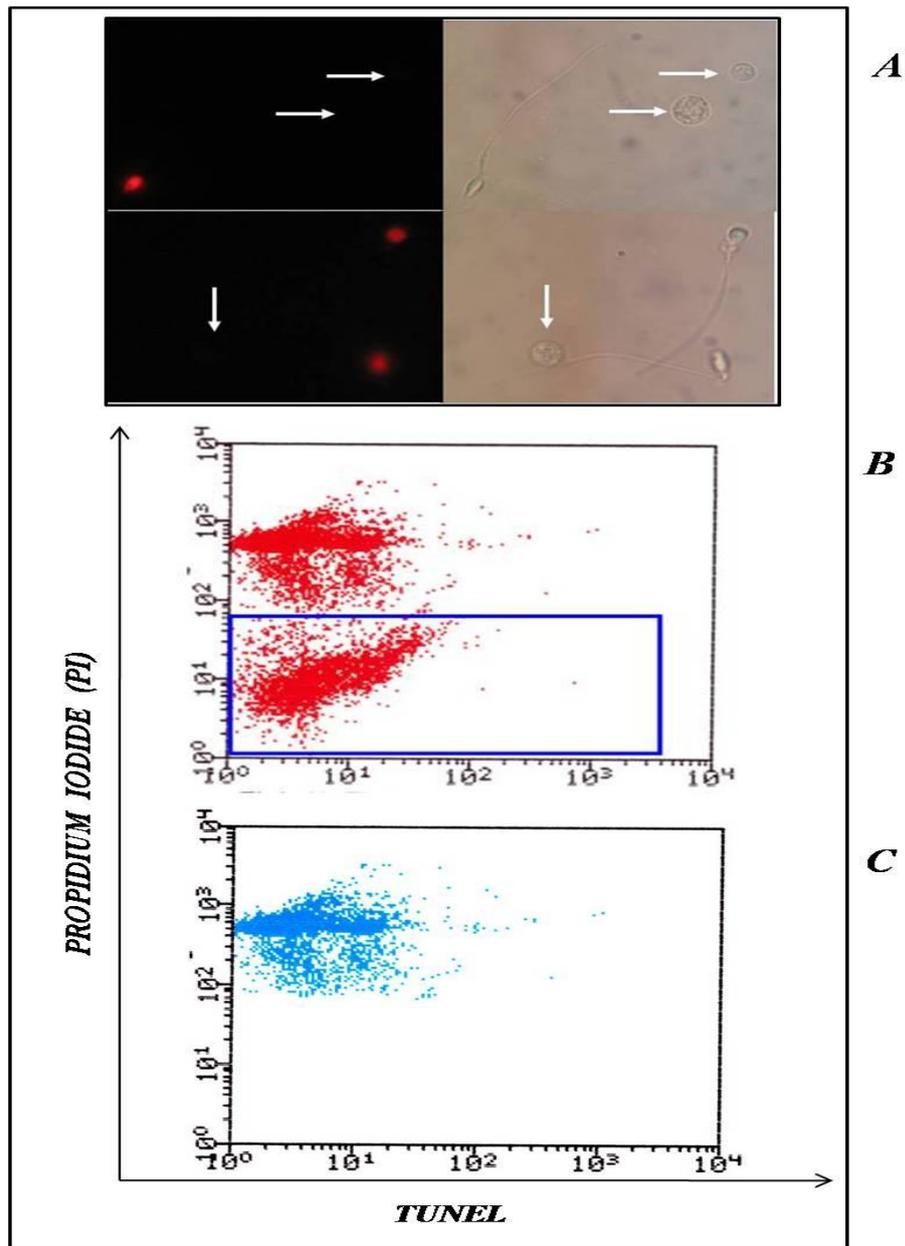


Figura 10: A) Immagine al microscopio a fluorescenza di spermatozoi positivi al PI e bodies (indicati dalle frecce) che invece non si colorano con PI; B) Dot plot ottenuto in seguito alla doppia colorazione con TUNEL e PI, in cui la regione all'interno del riquadro blu raccoglie gli eventi negativi al PI, cioè gli M540 bodies; C) Dot plot relativo ai soli eventi positivi al PI, gli spermatozoi, escludendo gli M540 bodies.

La M540 è un fluorocromo che rivela le degenerazioni di membrana che avvengono durante l'apoptosi delle cellule somatiche (Aussel et al., 1993) e durante il processo di capacitazione di spermatozoi di alcune specie di

mammiferi (Gadella and Harrison, 2000; Flesch et al., 2001), ma non dell'uomo (Muratori et al., 2004).

La natura non cellulare di queste strutture è risultata dalla dimostrazione che gli M540 bodies non hanno nucleo (Muratori et al., 2004).

Gli studi effettuati per chiarire la loro identità ed origine hanno mostrato che queste strutture esprimono alcuni marker chiave dell'apoptosi testicolare, quali il recettore Fas, p53, Bcl-XL e le caspasi (Marchiani et al., 2007) e i loro livelli nel seme sono altamente correlati con segni clinici di disordini a livello testicolare (Lotti, Tamburrino et al, 2012). Tali risultati indicano che gli M540 bodies sono corpi apoptotici di origine testicolare, sfuggiti alla fagocitosi, così come previsto per altri segni apoptotici dell'eiaculato dalla teoria dell'apoptosi abortiva.

Un altro dato importante sono le concentrazioni con cui gli M540 bodies si rinvenivano nel seme dei pazienti subfertili: queste strutture sono quantitativamente importanti in tutte le categorie di pazienti anche se negli oligoastenoteratozoospermici il livello di M540 bodies può essere molto elevato (Marchiani et al, 2007).

L'ultimo aspetto degli M540 bodies riguarda le loro caratteristiche morfometriche, le loro dimensioni e la densità interna. Tali caratteristiche sono molto variabili e simili a quelle degli spermatozoi. Come è mostrato in **Figura 11**, una parte degli M540 bodies è localizzata nella regione caratteristica degli spermatozoi, che appare assumere una forma di fiamma. La scoperta degli M540 bodies ha reso necessario introdurre una modifica nella tecnica citofluorimetrica usata, al fine di eliminare il segnale proveniente dagli stessi, che interferiva con il calcolo della percentuale di spermatozoi con DNA frammentato, e, in generale, con tutte le valutazioni citofluorimetriche degli spermatozoi nell'eiaculato.

In particolare nello studio della SDF, la presenza di DNA frammentato all'interno degli M540 bodies, la loro frequenza variabile e spesso elevata nel liquido seminale dei pazienti subfertili e soprattutto la loro localizzazione all'interno della regione a fiamma degli spermatozoi, ci ha indotto a pensare che i valori della frammentazione del DNA nei pazienti sub fertili potessero essere influenzati dalla presenza di questi corpi, come già osservato nello studio dell'ubiquitinazione spermatozoaria (Muratori et al., 2005).

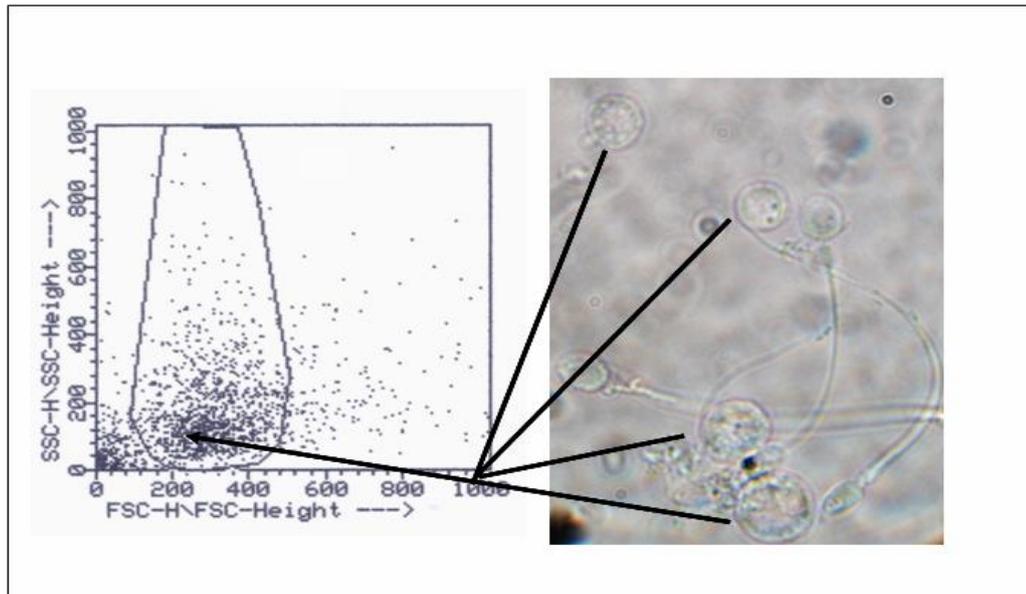
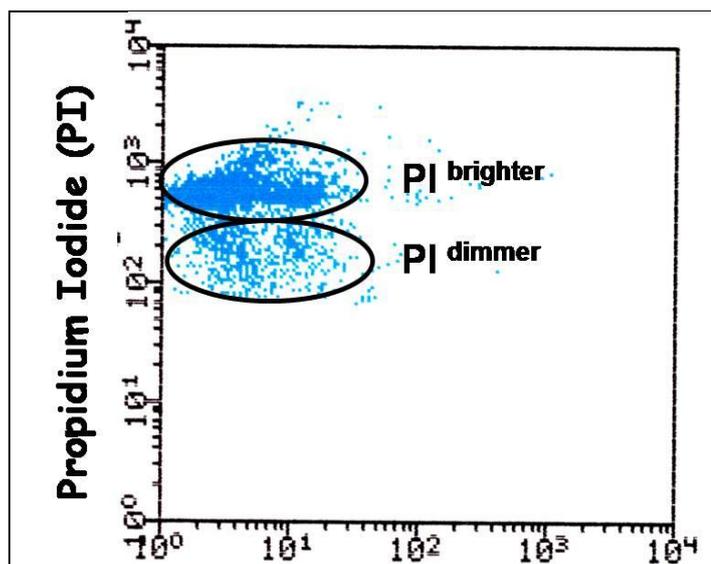


Figura 11: Localizzazione degli M540 bodies all'interno della regione a fiamma, caratteristica degli spermatozoi umani, nel dot plot FSC/SSC. L'immagine a contrasto di fase mostra come alcuni degli M540 bodies siano simili per dimensione alle teste degli spermatozoi.

La strategia che consente di distinguere, all'interno di questa regione, fra spermatozoi e M540 bodies consiste nel marcare i campioni con un colorante nucleare come lo ioduro di propidio, PI, (**Figura 10 A**). In questo modo gli M540 bodies, che sono anucleati, possono facilmente essere esclusi dall'analisi.

Grazie alla colorazione con PI applicata per lo scopo sopra descritto, si è potuto inoltre evidenziare l'esistenza, all'interno della popolazione degli spermatozoi, della presenza di due sottopopolazioni che si colorano in maniera differente con lo ioduro di propidio (Muratori et al., 2008; **Figura 12**).

Queste due sottopopolazioni sono state denominate PIbrighter e PIDimmer e rappresentano, rispettivamente, la popolazione che si colora più intensamente con lo ioduro di propidio e quella che mostra una colorazione a minore intensità.



Muratori et al, Hum Reprod 2008

Figura 12: Tipico dot plot ottenuto con la tecnica TUNEL/PI. Sono evidenti le due sottopopolazioni di spermatozoi a diversa colorazione nucleare ($PI^{brighter}$ e PI^{dimmer}).

Per confermare che le due popolazioni fossero effettivamente costituite da spermatozoi, abbiamo osservato i campioni colorati con lo ioduro di propidio al microscopio a fluorescenza, riscontrando la presenza di queste due classi di spermatozoi colorate più o meno brillantemente con PI (**Figura 13**).

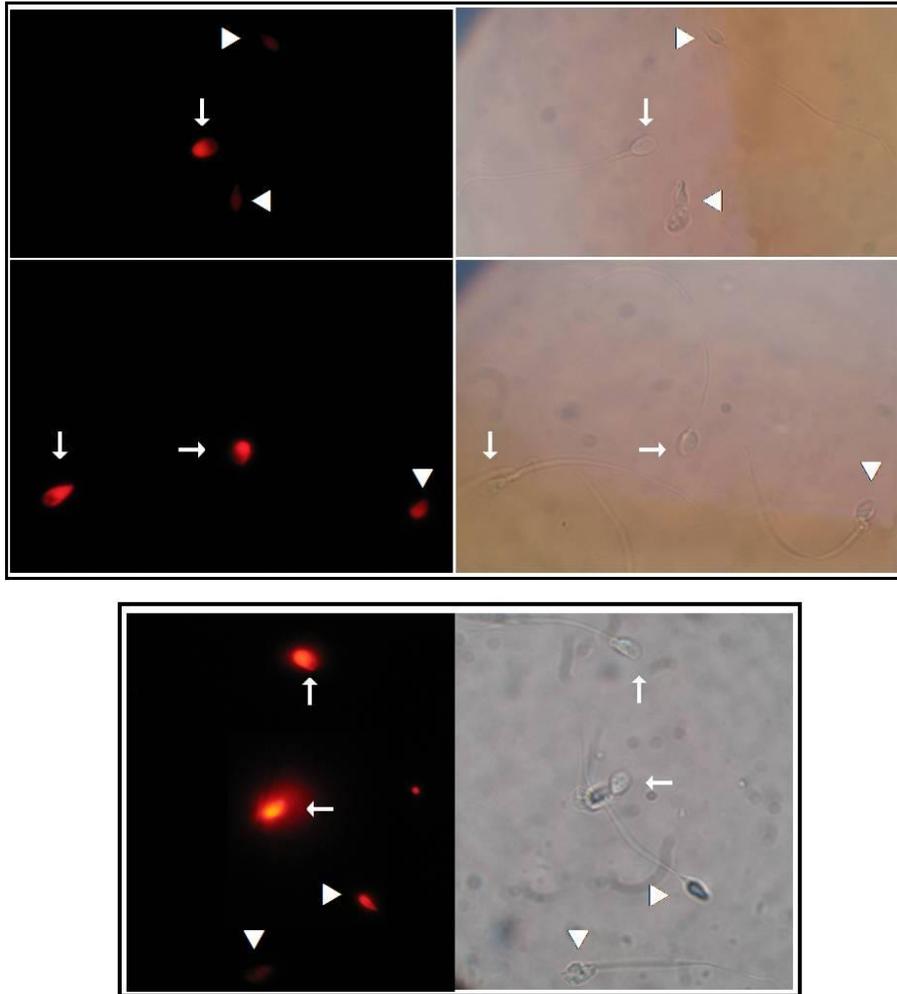


Figura 13: Immagine al microscopio a fluorescenza che mostra spermatozoi che si colorano più intensamente con PI ($PI^{brighter}$ –freccia) e spermatozoi che si colorano meno intensamente con PI (PI^{dimmer} –punta di freccia). I pannelli a sinistra mostrano l'immagine in fluorescenza, quelli a destra in campo chiaro.

Oltre che per la diversa colorabilità nucleare, queste due popolazioni si differenziano per altri parametri, che sono:

- la diversa estensione (Muratori et al, 2008);
- e del danno al DNA (Muratori et al, 2008);
- la diversa relazione con la qualità del seme (Muratori et al, 2008);
- diversa vitalità (Marchiani et al, 2011).

Queste osservazioni sono scaturite negli anni dall'utilizzo della colorazione con PI non solo nella tecnica del TUNEL, ma in tutte le altre misurazioni citofluorimetriche da noi eseguite. In particolare, mediante la

tecnica TUNEL/PI si è evidenziato che, mentre la popolazione PIbrighter è formata sia da spermatozoi con DNA frammentato che non frammentato, in percentuali variabili da paziente a paziente, nella popolazione PIDimmer sono presenti esclusivamente spermatozoi con DNA completamente frammentato. A questo proposito infatti la popolazione PIDimmer risulta essere invariabilmente spostata verso destra lungo l'asse della frammentazione del DNA (**Figura 14**).

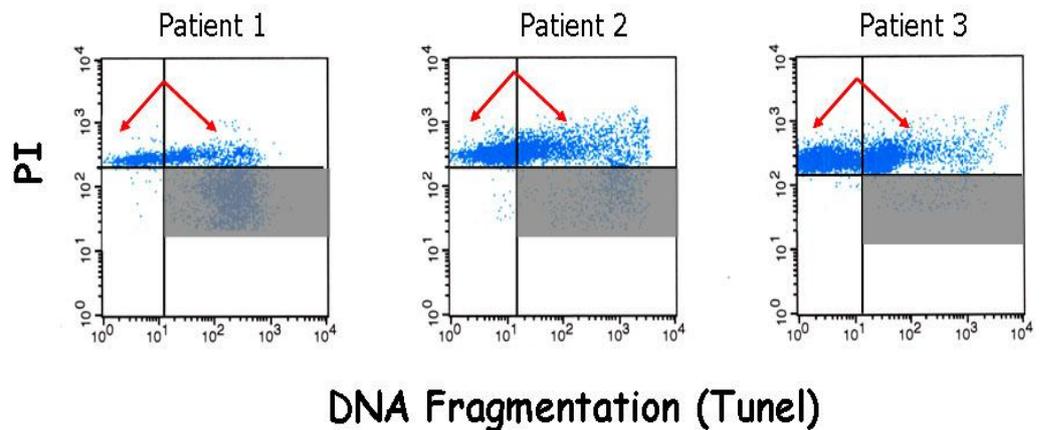


Figura 14: come si può notare dal dotplot TUNEL/PI, la popolazione brighter mostra spermatozoi sia frammentati che non ed in quantità variabili da paziente a paziente; la popolazione dimmer invece è sempre interamente frammentata e spostata verso destra lungo l'asse della frammentazione.

La seconda differenza tra le due popolazioni riguarda la correlazione che esse mostrano tra il danno a livello del DNA e la qualità del seme. Quando la frammentazione del DNA viene calcolata sull'intera popolazione di spermatozoi, si trova che essa correla negativamente con la qualità del seme, espressa attraverso i parametri seminali determinati dallo spermogramma (ovvero motilità, morfologia e conta spermatica). Tuttavia, quando la frammentazione viene valutata separatamente relativamente alle due popolazioni, si trova che a guidare la correlazione con la qualità del seme è la frammentazione della popolazione PIDimmer. Al contrario, la frammentazione della popolazione PIbrighter è del tutto indipendente dalla qualità del seme.

Questo dato appare di notevole importanza clinica: infatti dire che gli spermatozoi frammentati nella popolazione PIdimmer , correlano con una morfologia alterata, una motilità ed un numero ridotto, significa che i gameti di questa popolazione sono più probabilmente alterati morfologicamente, meno mobili e appartenenti ad eiaculati con una ridotta conta spermatica di quanto lo siano gli spermatozoi frammentati della popolazione PIbrighter. Conseguentemente, la probabilità di partecipare al processo della fertilizzazione o anche di essere scelti dall'operatore che esegue la ICSI è attesa essere minore rispetto agli spermatozoi frammentati della popolazione PIbrighter. Tutto questo ha un'importante implicazione clinica, poiché il danno al DNA a carico delle due diverse popolazioni di spermatozoi, potrebbe avere una diversa predittività degli esiti della riproduzione.

La terza differenza tra le due popolazioni riguarda la vitalità. Utilizzando una sonda fluorescente che si lega alle cellule morte in maniera stabile, abbiamo dimostrato che mentre la popolazione PIbrighter contiene sia spermatozoi vivi che morti in percentuali variabili da paziente a paziente e, in media, intorno al 50%, gli spermatozoi appartenenti alla popolazione PIdimmer sono risultati tutti non vitali (Marchiani et al., 2011) (**Figura 15**).

Nel complesso, i dati sulla PI brighter ci indicano che effettivamente questa sia la popolazione che riveste una maggiore importanza clinica, poiché è all'interno di essa che si trovano gli spermatozoi vivi in grado di prendere parte al processo di fertilizzazione dell'ovocita. Quindi la frammentazione della PIbrighter ed in particolare quella degli spermatozoi vivi di tale popolazione, riveste un ruolo fondamentale negli esiti della fertilizzazione sia naturale che assistita.

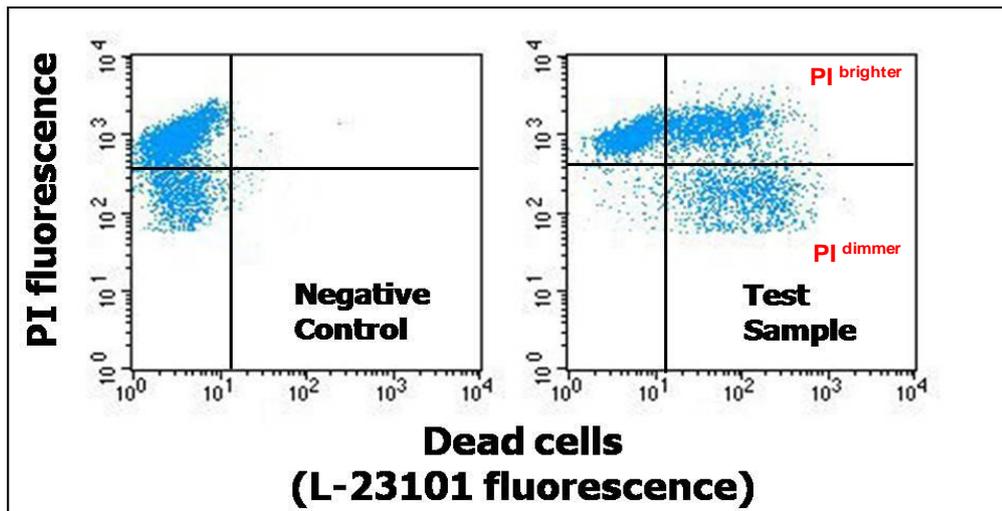


Figura 15: Dot plots che mostrano l'analisi citofluorimetrica della vitalità nelle due popolazioni, in campioni sottoposti a colorazione con L23. La popolazione PI^{dimmer} risulta interamente marcata con il colorante, dunque costituita da cellule non vitali.

1.10 RELAZIONE FRA LA FRAMMENTAZIONE DEL DNA E L'ESITO DELLA PROCREAZIONE NATURALE: I RISULTATI DEL NOSTRO STUDIO

L'integrità del genoma paterno gioca un ruolo chiave nel mantenimento del potere riproduttivo come chiaramente dimostrato da studi condotti su animali, che indicano in maniera univoca un netto effetto negativo della frammentazione su tutti gli indici riproduttivi e sulla salute della progenie (Fatehi et al, 2006; Fernandez-Gonzalez et al, 2008).

Nell'uomo, sebbene molti studi dimostrino che la percentuale di spermatozoi con DNA frammentato è maggiore nei soggetti infertili che nei soggetti fertili (O'Brien and Zini 2005), gli studi di relazione tra SDF e riproduzione tracciano la situazione in maniera più controversa.

Per quanto riguarda la riproduzione naturale, gli studi non sono molti, ma sono tutti concordi nello stabilire che maggiori livelli di frammentazione del DNA si associano a tempi di attesa più lunghi per l'ottenimento della gravidanza e ad una minore probabilità che questo avvenga. Questi risultati

sono confermati sia da studi in cui la SDF è rivelata tramite la SCSA (Zini et al, 2011) sia tramite il TUNEL (Aitken et al, 2010).

Nel nostro laboratorio abbiamo preso in esame un gruppo di soggetti fertili (partner maschili di coppie che hanno concepito entro un anno dall'esecuzione del test di SDF) ed uno di soggetti sub-infertili e confrontato i livelli di SDF totale, brighter e dimmer tra i due gruppi dopo aver effettuato un match tra i pazienti per i parametri seminali. Abbiamo osservato che i livelli di frammentazione totale sono significativamente più elevati negli infertili, ma andando ad esaminare i livelli di SDF separatamente nelle due sottopopolazioni si scopre che tale differenza è totalmente a carico delle popolazione brighter (risultati non pubblicati). Questo dato conferma la nostra ipotesi che effettivamente sia la SDF della popolazione brighter, dove ricordo si trovano gli spermatozoi vivi, il parametro seminale ad oggi conosciuto più rappresentativo dello stato di fertilità di un individuo.

1.11 RELAZIONE FRA LA FRAMMENTAZIONE DEL DNA E L'ESITO DELLA PROCREAZIONE MEDICALMENTE ASSISTITA

Quando si applica una tecnica di PMA (Procreazione Medicalmente Assistita) la qualità degli spermatozoi che vengono utilizzati è estremamente importante per la riuscita del trattamento.

I dati e l'esperienza acquisiti hanno rivelato come le cellule germinali seminali di alcuni pazienti, pur essendo in grado di sostenere il processo di fertilizzazione, non sono poi capaci di portare alla formazione di embrioni vitali (Hammadeh et al., 1996; Sanchez et al., 1996). In alcuni casi invece, si osserva la normale formazione di embrioni, ma questi falliscono l'impianto o vengono rapidamente persi dopo l'inizio della gravidanza. I motivi del fallimento sono, verosimilmente, molteplici, tra cui la SDF.

Infatti, sulla base di questi dati, si sono sviluppati numerosi progetti allo scopo di analizzare il reale rapporto tra SDF, indici di performance riproduttiva, ed outcomes delle tecniche di riproduzione assistita.

Sebbene molti studi dimostrino che la percentuale di spermatozoi con DNA frammentato è maggiore nei soggetti infertili che nei soggetti fertili (O'Brien and Zini, 2005), gli studi di relazione tra SDF e riproduzione in vitro non sempre hanno portato a risultati univoci, andando a tracciare una letteratura estremamente variegata e controversa (Tamburrino et al, 2012).

Molti lavori hanno dimostrato come non esista una chiara correlazione tra SDF, analizzata attraverso TUNEL assay (Benchaib et al., 2007; Henkel et al., 2003; Henkel et al., 2004; Greco et al., 2005), SCSA (Larson et al., 2000; Gandini et al., 2004; Virro et al., 2004) o COMET assay (Lewis et al., 2004; Nasr-Esfahani et al., 2005), e fertilization rate, FR³. Correlazione che invece viene rilevata in altri studi (Lopes et al., 1998; Host et al., 2000; Huang et al., 2005; Bakos,2008). Al contrario, è stata dimostrata una chiara correlazione negativa confrontando lo sviluppo ad embrione o blastocisti e SDF, misurata usando tutte e tre le tecniche (Tomsu et al., 2002; Benchaib et al., 2003; Virro et al., 2004; Seli et al., 2004; Nasr-Esfahani et al., 2005).

Anche dal confronto tra pregnancy rate, PR⁴, e SDF emerge un quadro controverso poiché, mentre alcuni trovano una chiara correlazione negativa tra i due indici (Huang et al., 2005; Larson-Cook., 2003; Borini et al., 2006), per altri non esiste alcuna correlazione tra l'SDF e l'indice di gravidanza (Huang et al., 2005).

È stato dimostrato come anche la PL⁵ e SDF siano strettamente correlati (Borini et al., 2006). Inoltre una recente metanalisi (Robinson et. al,2014) ha dimostrato come la tecnica TUNEL sia a tutti gli effetti quella che maggiormente è in grado di discriminare tra chi ottiene una gravidanza e che invece va incontro ad aborto. Dall'analisi dei vari lavori emerge un ulteriore dato. Il valore predittivo della SDF sull'outcome della fecondazione in vitro appare assumere significati differenti in base alla tecnica con cui viene rapportata.

³ Fertilization rate (FR), inteso come il rapporto percentuale del numero di ovociti fecondati (zigoti) su numero di ovociti inseminati per trattamento

⁴ Pregnancy rate (PR), inteso come il rapporto tra il numero di gravidanze portate a termine sul numero di transfer eseguiti

⁵ Pregnancy loss (PL), inteso come il rapporto tra il numero di aborti-gravidanze biochimiche sul numero di pazienti β -hCG positivo

In particolare, se si valuta la SDF attraverso metodiche TUNEL o COMET, il valore predittivo di questo parametro appare più strettamente correlato all'esito dei trattamenti ICSI rispetto a quelli FIVET (Morris et al., 2002; Borini et al., 2006). Questa correlazione potrebbe essere spiegata considerando l'eziologia dell'infertilità all'interno delle coppie infertili.

Questo perché è stato dimostrato come alti livelli di SDF, misurati con metodiche TUNEL e COMET, vengono ritrovati in pazienti con scarsa qualità del seme e per questo candidati per la ICSI poiché il fattore maschile risulta estremamente determinante per il successo del trattamento (Sun et al., 1997; Benchaib et al., 2003; Borini et al., 2006).

Al contrario, nei pazienti destinati a cicli FIVET il successo del trattamento può dipendere da altre variabili, ad esempio il fattore femminile, per cui la relazione tra SDF e outcome riproduttivo risulta più blanda. Questo anche rispetto al fatto che nella FIVET vengono mantenute alcune barriere naturali che fanno una sorta di selezione nei confronti di spermatozoi con morfologia irregolare, scarsa motilità e DNA compromesso, che in questo modo hanno minore possibilità di partecipare al processo di fecondazione (Borini et al., 2006).

Questa ipotesi trova oltretutto conferma in studi che dimostrano come spermatozoi geneticamente compromessi possano essere identificati e selezionati dalle cellule della zona pellucida (Menkveld et al., 1991; Van Dyk et al., 2000).

Come già suggerito, introducendo la problematica delle diverse tecniche per la rivelazione della SDF, le controversie della letteratura sono in parte spiegabili con la scarsa standardizzazione delle variabili in gioco, come recentemente è stato segnalato in una review di Zini et al. (2011) (**Figura 16**).

Table 3. Selected Characteristics of 11 Studies on Sperm DNA Damage and Pregnancy After IVF.

Study	Population	Outcome	Design	Female factors	Cutoff based on
Filatov et al. 1999	Unselected	CP	Unspecified	Unspecified	Large population
Host et al. 2000	Unselected	BP	Prospective	Unspecified	Fertile population
Henkel et al. 2003	Unselected	CP	Prospective	Unspecified	ROC analysis
Huang et al. 2005	Unselected	CP	Retrospective	Unspecified	Unspecified
Boe-Hansen et al. 2006	Unselected	CP	Prospective	FSH<10	Evenson et al. 1999
Borini et al. 2006	Unselected	CP	Unspecified	Unspecified	Benchaib et al. 2007
Lin et al. 2008	Normal semen	CP	Prospective	<40 years, FSH<15	Evenson et al. 1999
Benchaib et al. 2007	Unselected	CP	Prospective	Unspecified	IVF & ICSI results
Bungum et al. 2007	Female factor	BP	Prospective	<40 years, FSH<12	Evenson et al. 1999
Frydman et al. 2008	Unselected	CP	Prospective	<38 years, FSH<10	Median value
Tarozzi et al. 2009	Male factor	CP	Unspecified	Unspecified	ROC analysis

Abbreviations: CP = clinical pregnancy; BP = biochemical pregnancy; ROC = receiver operating characteristics.

Figura 16: *Tabella riassuntiva che evidenzia come la letteratura controversa, riguardo l'incidenza della SDF sull'outcome delle tecniche di fecondazione assistita, tragga origine dalla eterogeneità di parametri, metodiche e fattori utilizzati e analizzati nei diversi studi sull'argomento.*

Tra queste variabili, una molto importante è rappresentata dalle metodiche per la rilevazione della SDF, che misurano tipi diversi di danno al DNA. Il COMET assay, infatti permette di valutare la presenza di tagli a singolo e doppio filamento sul DNA a livello della singola cellula, il TUNEL assay è anch'essa in grado di rivelare gli effettivi tagli a singola e doppia elica del DNA, ed infine abbiamo la tecnica SCSA che misura un danno "potenziale", cioè la suscettibilità della cromatina ad una blanda denaturazione indotta dall'esterno (Tamburrino, 2012).

Un'altra variabile scarsamente standardizzata che incide sull'impatto della SDF sugli esiti riproduttivi è il fattore femminile (Zini et al., 2011). Tale questione assume un'importanza particolare soprattutto quando si parla di coppie che ricorrono alla procreazione medicalmente assistita, in cui l'età della partner femminile è piuttosto avanzata (Leridon et al., 2004). L'età della donna, infatti, incide notevolmente sulla qualità ovocitaria e quindi anche sulla capacità riparativa dell'ovocita nei confronti del danno al DNA spermatico (Alvarez et al., 2005).

Gli ovociti e gli embrioni nelle prime fasi di sviluppo sono in grado di riparare i danni al DNA nemaspermico. Gli effetti biologici di una struttura

cromatinica anomala dipendono dalla combinazione del danno cromatinico spermatozoario e della capacità degli ovociti di riparare tale danno. Un DNA spermatico alterato si associa infatti a possibili alterazioni dello sviluppo embrionale con basse percentuali di impianto e maggior rischio di aborti precoci.

È ormai largamente accettato che, i primissimi step dello sviluppo embrionale sono regolati dal genoma materno, mentre il contributo paterno inizia a partire dallo stadio di quattro-otto cellule. Durante lo sviluppo dell'embrione a blastocisti, il genoma è attivato, i livelli trascrizionali sono elevati ed il contributo paterno è essenziale per le funzioni embrionarie (Seli et al., 2004). In questa fase, l'eventuale presenza di danni a carico del DNA paterno, può compromettere il successo dello sviluppo embrionario o la formazione della blastocisti (Tesarik et al., 2004; Tesarik, 2005).

Negli studi si trova inoltre una grande eterogeneità anche nei criteri di scelta dei cut off sui quali a loro volta si basano le analisi degli odd ratios (Zini et al., 2011).

Il livello soglia di DFI (DNA Fragmentation Index), che dovrebbe discriminare tra individui fertili e non-fertili, non è ancora stato ben stabilito e dipende strettamente dalla tecnica utilizzata per misurare l'SDF. Per quanto riguarda l'SCSA è stato stabilito, su un elevato numero di uomini fertili e infertili, un cut off di DFI del 30%, al di sopra del quale il successo della riproduzione risulta compromesso (Evenson et al., 2002). Per il TUNEL invece il cut off spesso indicato è del 20%, ma questo valore è stato ottenuto su un numero molto più ristretto di soggetti fertili (Sergerie et al., 2005b).

Altro dato che emerge dalla letteratura è rappresentato dal fatto che le correlazioni tra SDF ed i parametri embrionari precoci emergono o risultano più fortemente significative quando si analizza il liquido seminale intero anziché il capacitato, che è quella porzione di seme che si ottiene dopo opportune metodiche di selezione volte ad ottenere gli spermatozoi migliori (in quanto a motilità e morfologia) per essere utilizzati nelle tecniche di PMA. *Simon* e collaboratori, nel loro lavoro del 2010, infatti trovano che il FR e la QE⁶ hanno una correlazione negativa con la frammentazione del DNA

⁶ Embryo quality (QE), inteso come il rapporto tra la somma di embrioni di grado 1 e grado 2, sul numero di embrioni totali

spermatico in coppie che si sottopongono a FIVET e queste correlazioni sono più forti se si considera l'intero. Inoltre da questo lavoro emerge che la SDF esaminata nel seme intero ha un più alto valore predittivo positivo rispetto al seme selezionato.

Anche *Marchetti (2002)* sottolinea una stretta correlazione negativa tra la SDF del non selezionato ed il FR in coppie sottoposte a FIVET.

1.12 LA FRAMMENTAZIONE DEL DNA NEGLI SPERMATOZOI VIVI

Come si può ben capire, la frazione degli spermatozoi vivi della popolazione brighter, rappresenta la parte clinicamente più rilevante per gli studi che prendono in considerazione l'impatto della SDF sulla riproduzione sia naturale che assistita.

Infatti sono solo i vivi a prendere parte alla fertilizzazione dell'oocita e alle tecniche di selezione.

I risultati presenti nei lavori citati nel paragrafo precedente, appaiono del tutto insoliti se si pensa che la frazione di seme che viene utilizzata nella PMA è quella del selezionato e ci aspetteremmo quindi che sia questa ad impattare maggiormente sugli esiti delle tecniche di fecondazione assistita. In realtà, i valori di SDF che si misurano nel selezionato sono il risultato, non solo del danno indotto da tali tecniche, ma anche dell'eliminazione delle cellule morte che avviene durante le tecniche di selezione del seme intero. E' dunque possibile che un decremento di frammentazione durante la procedura sia imputabile alla semplice eliminazione delle cellule frammentate morte, mentre magari nelle vive (ovviamente più importanti dal punto di vista clinico) il danno rimane paragonabile o addirittura aumenta. Dovremmo quindi in realtà prendere in esame la sola popolazione degli spermatozoi vivi nel liquido seminale per capire il reale effetto delle tecniche di selezione sulla SDF e confrontare in maniera più adeguata la SDF dell'intero e del selezionato nelle correlazioni con i parametri embrionari.

Per quanto riguarda la riproduzione naturale, i risultati del nostro studio su soggetti fertili ed infertili hanno evidenziato come nettamente la PI brighter abbia un forte significato clinico e ci aspettiamo quindi che prendendo in considerazione la sola frazione vitale di questa popolazione la forza clinica della SDF aumenti ulteriormente.

Anche nello studio dei meccanismi che causano la SDF , gli spermatozoi morti rappresentano una variabile confondente se si pensa che la maggior parte degli spermatozoi frammentati sono morti (Mitchell et al, 2011). Infatti, possiamo ritenere che essi siano il risultato di meccanismi di frammentazioni innescati in tempi meno recenti rispetto all'eiaculazione, ovvero a livello testicolare, che hanno poi portato gli spermatozoi apoptotici ed ampiamente frammentati a morte. Per comprendere meglio i meccanismi innescati in tempi più recenti, presumibilmente durante il transito nelle vie genitali maschili, occorre studiarli quando sono ancora in corso ovvero nelle cellule vive.

2 SCOPO DELLA TESI

Questa tesi di dottorato ha analizzato molteplici aspetti che riguardano la SDF.

Vista la controversia esistente in letteratura riguardo la relazione tra SDF e outcome della fecondazione assistita, due scopi della tesi hanno riguardato la valutazione:

- dell'effetto sui livelli di SDF (totale e brighter) delle procedure di selezione adottate nei centri di PMA per la preparazione degli spermatozoi
- dell'impatto dei livelli di SDF, sia totale che a carico della sola popolazione brighter, sugli esiti riproduttivi di coppie sottoposte a cicli di PMA di secondo livello. In particolare è stato valutato l'effetto sulla fertilizzazione, cleavage embrionale, efficacia dell'impianto, qualità embrionaria e ottenimento della gravidanza.

Vista l'importanza della valutazione della DF nei soli spermatozoi vivi, un ulteriore scopo della presente tesi è stato quello di :

- Mettere a punto una versione modificata della tecnica TUNEL che sia in grado di rivelare simultaneamente la SDF e la vitalità degli spermatozoi

Una volta messa a punto questa tecnica, abbiamo analizzato:

- L'effetto delle tecniche di preparazione del seme per la PMA sulla SDF nella sola frazione vitale degli spermatozoi
- L'impatto della SDF negli spermatozoi vitali sulla riproduzione naturale attraverso uno studio di confronto tra i livelli nei soggetti di sicura fertilità e pazienti sub-fertili (partners maschili di coppie infertili)

Infine, mi sono occupata dello studio dei meccanismi di genesi della SDF negli spermatozoi vivi con esperimenti ex vivo ed in vitro.

Pertanto abbiamo:

- Analizzato, utilizzando analisi multiparametriche di citometria, i meccanismi ipotizzati per la genesi dell'SDF (apoptosi e danno ossidativo) nella sola popolazione degli spermatozoi vivi.
- Valutato l'effetto dell'incubazione a lungo termine sulla SDF e la sua genesi attraverso rilevazione simultanea di SDF e danno apoptotico e ossidativo.

3 MATERIALI E METODI

3.1 RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI DI LIQUIDO SEMINALE PER ANALISI DI IMMUNOFLUORESCENZA TRIPARAMETRICHE

I campioni di liquido seminale sono stati raccolti secondo i criteri della World Health Organization (Organizzazione Mondiale della Sanità 2010, OMS 2010), da soggetti sottoposti all'analisi routinaria del seme per problemi di infertilità di coppia nel laboratorio di Andrologia dell'Università di Firenze in seguito all'approvazione da parte del Comitato Etico locale per lo svolgimento dello studio e dopo avere ottenuto il consenso informato dei pazienti.

I soggetti sottoposti a terapie farmacologiche sono stati esclusi dallo studio, così come i campioni di liquido seminale in cui vi era la presenza di leucociti.

I campioni (2 aliquote da 20×10^6 spermatozoi) dopo liquefazione (30 minuti dopo la raccolta, OMS 2010) sono stati lavati due volte con HTF (Human Tubaric Fluid, Celbio) e poi incubati ciascuno per 1 ora a TA al buio con Live/Dead Fixable Far Red Dead Cell Stain Kit (L10120, Invitrogen) diluendo la sonda 1:10000 in 500 ul di PBS.

Successivamente sono stati eseguiti due lavaggi con PBS e poi un'aliquota da 20×10^6 spermatozoi è stata trattata con DTT (2 mM, 45 min a TA) in HTF addizionato con HEPES (Human Tubaric Fluid, Celbio) (Mitchell et al., 2011), quindi nuovamente lavata due volte con HTF/HEPES. La restante aliquota invece, è stata risospesa in HTF/HEPES alla concentrazione di 10×10^6 / mL e messa 24 ore a 37°C e al 5% CO₂, al buio.

Per il rilevamento di 8-OHdG, MDA, CK e SDF, i campioni sono stati fissati con paraformaldeide (500 ul, 4% in soluzione salina tamponata con fosfato [PBS], pH 7,4) per 30 minuti a TA.

3.2 RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI DI LIQUIDO SEMINALE PER ANALISI DI SDF DURANTE LE TECNICHE DI SELEZIONE

Per studiare l'impatto delle tecniche di selezione sulla SDF, tale parametro è stato valutato, in parallelo, su seme intero (ottenuto tramite ipsazione) e selezionato (mediante *Centrifugazione su Gradiente di Densità*, CDG, o *Swim up*, SU) di soggetti maschili afferenti, in parte, al laboratorio di Andrologia dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi (Firenze) e, in parte, al Centro di PMA Tecnobios Procreazione (Bologna).

Il trattamento in vitro dei campioni di liquido seminale per l'analisi di SDF, precedente e seguente la selezione, è stato svolto solo nel caso in cui i pazienti hanno permesso, tramite consenso firmato, l'utilizzo del loro liquido seminale, derivante in eccesso dallo spermioγραμμα, senza interferire con quest'ultimo.

La selezione mediante *CGD* si è ottenuta stratificando il liquido seminale sopra due gradienti discontinui di PureSperm gradient 40:80% (Nidacon, Gothemberg, Sweden), in un tubo da 15ml a fondo conico. Il tubo, preparato apportando massima attenzione per evitare mescolamenti tra le fasi, è stato poi posto in centrifuga a una velocità di 1600 rpm per 15 minuti, in modo da consentire la sedimentazione degli spermatozoi con migliore motilità e morfologia, grazie all'effetto setaccio esercitato dai gradienti. In seguito, il pellet cellulare è stato prelevato, risospeso in 1ml di mezzo di coltura PureSperm Wash (Nidacon, Gothemberg, Sweden) e centrifugato per 10 minuti, a 1300 rpm.

La selezione mediante *Swim up* è stata ottenuta mediante la metodica diretta ed indiretta. Lo *Swim up diretto* (*dSU*) si è eseguito ponendo sopra un volume prescelto di liquido seminale un restante volume (1-2ml) di HTF, all'interno di un tubo a fondo non conico. In questo caso, la migrazione degli spermatozoi mobili nel mezzo di coltura surnatante è avvenuta durante un'incubazione di 45 minuti a 37°C, non preceduta da centrifugazione. Nella *metodica indiretta* (*iSU*), invece, il liquido seminale è stato lavato con un uguale volume di HTF (2000 rpm, 5 minuti) e in seguito, sopra il pellet sono stati stratificati 1 o 2 ml di HTF, per procedere con l'incubazione (45 minuti, 37°C).

Al termine di *CGD* e *SU* sono state valutate la concentrazione e la motilità del campione, al fine di verificare l'esito della selezione e di prelevare un'aliquota con la concentrazione di spermatozoi appropriata per l'esecuzione del TUNEL assay.

Solo concentrazioni spermatiche sufficienti ($\geq 1 \times 10^6$ spz/ml), sia del campione intero sia del selezionato, hanno reso possibile valutare se si fosse verificato un aumento di FDS durante la selezione e, se questo fosse a carico della frazione vitale di spermatozoi. A tale scopo, il liquido seminale intero e selezionato dei pazienti è stato suddiviso in due aliquote, contenenti un numero di spermatozoi non superiore a 10×10^6 . I campioni non selezionati sono stati lavati per due volte consecutive in HTF, mentre i campioni selezionati, già risospesi nel mezzo di coltura, HTF o PureSperm Wash, sono stati centrifugati a 2000 rpm, 26°C, per 5 minuti, un'unica volta. In seguito, le due tipologie di campioni sono state trattate allo stesso modo come segue: si è proceduto marcando i campioni con la sonda L10120 diluita 1:1000 in 500 ul di PBS, per 1 ora a TA al buio .

In seguito, i campioni sono stati lavati due volte con PBS e fissati in 500 ul paraformaldeide 4%, pH 7.4, (come paragrafo 3.1) per 30 minuti a temperatura ambiente.

3.3 RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI DI LIQUIDO SEMINALE PER ANALISI DI SDF IN SPERMATOZOI VIVI DI SOGGETTI FERTILI ED INFERTILI

I campioni di liquido seminale sono stati raccolti secondo i criteri della World Health Organization (Organizzazione Mondiale della Sanità 2010, OMS 2010) come descritto nel paragrafo 3.1 e previa autorizzazione da parte del Comitato Etico locale per lo svolgimento dello studio e firma del consenso informato dei pazienti.

I soggetti infertili si recavano presso il laboratorio di Andrologia dell'Università di Firenze per effettuare l'analisi seminale, mentre i soggetti fertili (partner maschili di coppie che hanno concepito entro un anno

dall'esecuzione del test di SDF) erano volontari raccolti presso il medesimo laboratorio di Firenze o il Centro per la l'infertilità di coppia dell'Ospedale SS. Cosma e Damiano di Pescia (PT).

I soggetti sottoposti a terapie farmacologiche sono stati esclusi dallo studio, così come i campioni di liquido seminale in cui vi era la presenza di leucociti.

Se non diversamente indicato, i campioni (10×10^6 spermatozoi) dopo liquefazione (30 minuti dopo la raccolta, OMS 2010) sono stati lavati due volte con HTF e poi incubati per 1 ora a TA al buio con L10120 diluendo la sonda 1:10000 in 500 μ l di PBS.

Successivamente sono stati eseguiti due lavaggi con PBS e poi i campioni sono stati fissati con paraformaldeide (500 μ l, 4% in soluzione salina tamponata con fosfato [PBS], pH 7,4) per 30 minuti a TA.

3.4 DETERMINAZIONE DELLA FRAMMENTAZIONE DEL DNA MEDIANTE TECNICA TUNEL

La frammentazione del DNA in campioni di spermatozoi è stata rivelata attraverso la tecnica del TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated FITC-dUTP nick end labelling o dove indicato, terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated TMR-dUTP nick end labelling) mediante l'utilizzo del kit: In Situ Cell Death Detection Kit (Roche Molecular Biochemicals, Milano, Italia).

Gli spermatozoi (10×10^6 cellule) vengono preparati e fissati come descritto nel paragrafo 3.2 o 3.3. Dopo 2 lavaggi con 200 μ l di PBS addizionato con BSA (albumina sierica bovina, ICN Biomedicals) all' 1%, gli spermatozoi vengono permeabilizzati con 0.1% Triton X 100 in 0.1% Citrato di Sodio (100 μ l, per 4 minuti in ghiaccio). I campioni, lavati due volte, vengono divisi in due aliquote: un test positivo (TUNEL+) ed un controllo negativo (TUNEL-). Il test positivo è incubato in 50 μ l di soluzione di marcatura contenente dUTPs coniugati a FITC (o TMR) e l'enzima Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) diluito 1:10; nel controllo negativo invece

non viene aggiunto l'enzima alla soluzione di marcatura. I campioni vengono così incubati per 1 ora, al buio, a 37°C. Successivamente vengono effettuati 2 lavaggi ed infine gli spermatozoi vengono risospesi in 300 µl di PBS per l'acquisizione al citofluorimetro. Prima di procedere con l'analisi citofluorimetrica è stata eseguita la marcatura dei campioni con il colorante nucleare DAPI (1µg/ml per 15 min al buio a TA). L'utilizzo del DAPI al posto del PI è giustificato dal fatto che i campioni sono marcati con L10120 Far Red e l'utilizzo del PI non renderebbe compensabile la sovrapposizione tra i due segnali di emissione delle fluorescenze.

La colorazione DAPI inoltre è in grado di discriminare gli M540 e, all'interno di quest'ultima, la popolazione brighter e dimmer in modo simile alla colorazione con PI. L'analisi citofluorimetrica è stata eseguita mediante lo strumento FACSAria II (Becton Dickinson). In Figura 17 una schematizzazione della tecnica TUNEL/PI.

TUNEL/PI assay

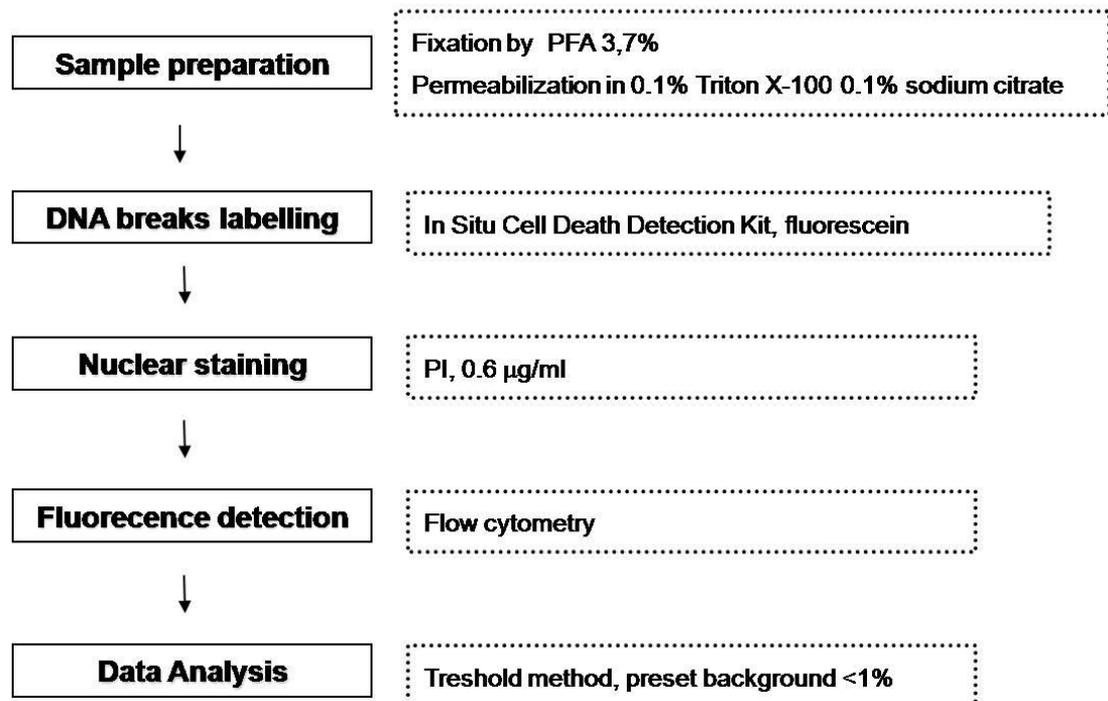


Figura 17. Schema riassuntivo della metodica TUNEL/PI utilizzata nel nostro laboratorio.

3.5 PROVE DI TOSSICITÀ PER L10120

Per valutare se la sonda L10120 avesse effetti tossici sulle nostre cellule, abbiamo effettuato delle prove di sopravvivenza cellulare.

A tale scopo abbiamo preso 10×10^6 spermatozoi e lavati due volte con HTF. Quindi abbiamo diviso i campioni ($n=3$) in due aliquote denominate L10120+ e L10120 -. La L10120 + è stata marcata con la sonda Live/Dead Fixable Far Red Dead Cell Stain Kit diluita 1:10000 in 500 μ l PBS mentre l' aliquota L10120 - è stata incubata con solo 500 μ l PBS per 1 ora a TA al buio.

Quindi i campioni sono stati lavati 2 volte in PBS e prelevato da ciascuno una aliquota per la valutazione della vitalità a tempo 0 (T0). La restante parte è stata risospesa in HTF/HEPES alla concentrazione di 10×10^6 /mL e messa in incubatore per 24 ore (T24) a 37°C e al 5% CO₂, al buio. La vitalità a T0 e T24 è stata valutata a fresco con il colorante nucleare YO-PRO1 (Y1, 25nM) , che entra e marca il nucleo delle sole cellule morte che hanno la membrana danneggiata.

3.6 RILEVAZIONE STRESS OSSIDATIVO (8-OHDG E MDA) E SDF

Dopo essere stati preparati e fissati come descritto nel paragrafo 3.1, i campioni di liquido seminale (20×10^6 spermatozoi) marcati con L10120 , trattati con DTT e fissati, vengono lavati due volte con PBS/NGS 1% e al secondo lavaggio suddivisi in due aliquote: un campione test (8-OHdG) e un controllo isotipico (Isotype control, IC).

Il campione test positivo è incubato con l' anticorpo primario 2 μ g/ml Monoclonal Mouse IgG2a anti-8-OHdG (15A3) (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) ed il controllo negativo con 2 μ g/ml Isotype control Mouse IgG2a (Exbio, Praha, Repubblica Ceca) in 100 μ l di 0.1% Triton X-100 in 0.1% Citrato di Sodio, per un' ora a 37°C.

Per la rilevazione di MDA invece le aliquote sono state prima permeabilizzate con 100 μ l di 0.2% Triton X 100 in 0.1% Citrato di Sodio per 30 minuti a TA. Quindi i campioni vengono nuovamente lavati e divisi in due

aliquote: campione test (MDA) e controllo isotipico (IC). Il campione test è incubato con l'anticorpo primario 2 µg/ml Monoclonal Mouse IgG2a anti-MDA clone 1F83 (JaICA, Haruoka Giappone) e l'IC è incubato con 2 µg/ml Isotype control Mouse IgG2a. L'incubazione è di un'ora a 37°C in 100 µl di NGS-PBS 1%.

Dopo l'incubazione con gli anticorpi e due lavaggi con PBS/NGS1%, gli spermatozoi sono stati incubati per 1h a TA al buio in agitazione con l'anticorpo secondario Goat anti-Mouse IgG FITC (Sigma, Saint Louis, Missouri, USA) diluito 1:100 in 100 µl PBS/NGS 1%.

Poi, sia campione test che il controllo isotipico sono stati divisi nuovamente in due aliquote e su ciascuna aliquota è stato effettuato il saggio TUNEL come descritto nel paragrafo 3.4.

Per evitare la sovrapposizione dei segnali di fluorescenza, abbiamo usato dUTPs coniugati con TMR (tetrametilrodamina, Muratori et al., 2010), in dotazione con il kit In Situ Cell Death Detection, TMR. Per ragioni analoghe, la colorazione nucleare è stata eseguita con DAPI (1µg/ml per 15 min al buio a TA) al posto del PI.

Lo stesso esperimento è stato ripetuto sull'altra aliquota da 20x10⁶ spermatozoi messa ad incubare per 24 ore.

3.7 RILEVAZIONE DELL'ATTIVITÀ CASPASICA E SDF

La determinazione dell'attività caspatica è stata eseguita con Vybrant FAM caspasi-3 e -7 Assay kit (Life Technologies, Paisley, UK) che rileva le caspasi attive 3 e 7 utilizzando un inibitore fluorescente di tali enzimi: Flica (Marchiani et al., 2014).

Dopo essere stati trattati marcati con L10120 e trattati con DTT, gli spermatozoi (15x10⁶ spermatozoi) vengono suddivisi in due aliquote da 300µl, una per il controllo negativo e una per campione test. In quest'ultimo, sono stati aggiunti 10µl di soluzione 30X FLICA (dotazione kit), poi le aliquote sono state incubate per 1 ora a 37°C e al 5% CO₂, al buio.

Dopo due lavaggi con wash buffer 1X (dotazione kit), i campioni vengono fissati con l'aggiunta di 40 µl di soluzione di formaldeide al 10%

(dotazione kit) per 10 minuti a TA. I campioni vengono nuovamente lavati due volte e sia il controllo negativo che campione test vengono divisi in due aliquote per poter eseguire il saggio TUNEL come descritto sopra, utilizzando TMR-dUTPs per la marcatura e il DAPI per la colorazione nucleare.

Lo stesso esperimento è stato ripetuto sull'altra aliquota da 20×10^6 spermatozoi messa ad incubare per 24 ore.

3.8 RILEVAZIONE DELL'ATTIVITÀ CASPASICA E 8-OHdG

Dopo aver processato i campioni per L10120 e per FLICA come descritto nel Paragrafo 3.7, abbiamo applicato il protocollo per la rivelazione di 8-OHdG come descritto nel Paragrafo 3.6. Per motivi dovuti alla sovrapposizione dei fluorocromi con FLICA non ci siamo potuti avvalere dell'anticorpo secondario fitcato, perciò abbiamo utilizzato lo sheep Anti-Mouse IgG (whole molecule) F(ab')₂ fragment-R-Phycoerythrin (R-PE) (Sigma, Saint Louis, Missouri, USA).

3.9 LA CITOMETRIA A FLUSSO

La citofluorimetria a flusso (FCM) è una potente tecnica analitica per l'esame di sospensioni cellulari monodisperse, nel nostro caso di spermatozoi, che consente una rapida determinazione quantitativa di molteplici proprietà fisiche e biochimiche cellulari. Caratteristica saliente di questa tecnica, è la capacità di eseguire misure individuali, cioè sulla singola cellula, fornendo quindi un risultato che non è la media di un esame massivo di un gran numero di cellule, ma l'insieme di un grande numero di misure eseguite su singole cellule. Questa caratteristica, inoltre, consente di distinguere, all'interno di una popolazione eterogenea, sottopopolazioni omogenee per uno o più parametri analizzati (ad esempio l'espressione di un recettore). Lo schema di funzionamento di un citofluorimetro a flusso è riportato in Figura 18.

L'introduzione ed il trasporto del campione avvengono solitamente grazie ad un sistema fluidico congegnato in maniera tale da convertire la disposizione casuale delle particelle in un allineamento in singola fila. Questo processo prende il nome di focalizzazione idrodinamica ed è realizzato grazie all'induzione di un flusso laminare (coassiale) nella camera di flusso dello strumento. Le particelle passando, una ad una, nella regione di misura dello strumento vengono intercettate da un intenso fascio di luce. La sorgente luminosa utilizzata può essere di diversa natura a seconda della lunghezza d'onda di emissione e della potenza desiderate. Normalmente due sono i tipi: lampada a vapori di mercurio e xenon oppure laser ad argon con emissione a 488 nm, in grado di produrre una radiazione coerente, polarizzata, intensa ed estremamente circoscritta.

Il momento cruciale dell'analisi è l'intercettazione da parte della radiazione, con la cellula da analizzare. La radiazione viene indirizzata tramite un sistema di lenti sul punto di misura dove scorre la sospensione cellulare, in modo da ottenere una intercetta di poche decine di cm di diametro.

I segnali che possono essere rilevati con la tecnica citofluorimetrica sono:

- ✧ intensità della luce diffusa a piccolo angolo (FSC, Forward Scatter) che dà indicazioni sulle dimensioni cellulari;
- ✧ intensità della luce diffusa a grande angolo (SSC, Side Scatter) che dà informazioni sulla struttura microscopica della cellula (granulosità citoplasmatica, densità cellulare, rapporto nucleo/citoplasma, rugosità di superficie); intensità della luce riemessa come fluorescenza da parte di uno o più fluorocromi grazie alla quale è possibile determinare sia qualitativamente che quantitativamente la presenza di un determinato bersaglio cellulare. In questo terzo caso occorre ovviamente marcare le cellule con una opportuna molecola (fluorocromo) che assorba alla lunghezza d'onda (λ) della luce incidente e riemetta a λ compatibili con i detectors dello strumento. Se il legame al bersaglio cellulare è specifico e stechiometrico, l'intensità del segnale sarà proporzionale alla quantità cellulare del bersaglio a cui si è legato il fluorocromo.

La combinazione dei primi due parametri FSC/SSC consente di creare un particolare tipo di diagramma di dispersione in cui è possibile risolvere fino a 4 o 5 popolazioni cellulari diverse in base alle loro caratteristiche fisiche.

Per quanto riguarda i fotoni di fluorescenza, questi vengono raccolti da lenti poste di solito ortogonalmente al fascio di eccitazione, selezionati con le opportune combinazioni di specchi separatori di fascio, filtri ottici e filtri dicroici, e portati ciascuno ad un fotomoltiplicatore. Qui i segnali vengono misurati come impulsi di ampiezza proporzionale al numero di molecole di fluorocromo presenti sulla cellula, trasformati in impulsi elettronici ed amplificati di un fattore lineare o logaritmico in base al tipo di parametro o di analisi. L'impulso amplificato viene inviato ad un circuito elettronico che lo converte da analogico a digitale. I valori continui degli impulsi sono trasformati in un numero prestabilito di valori discreti a seconda dei canali di cui il convertitore analogico/digitale dispone. Tutti i singoli dati amplificati e convertiti (eventi) si accumulano nei canali risultando in una distribuzione di frequenza. Nei citofluorimetri a circuito chiuso, cioè nei semplici analizzatori, il campione, una volta passato dalla camera di flusso, viene perso; in quelli a circuito aperto (sorter) la sospensione cellulare, una volta analizzata, può essere fisicamente separata in più sottopopolazioni in base ad uno dei parametri rilevati (vedi paragrafo successivo)

Un aspetto molto interessante della citofluorimetria a flusso è la possibilità di selezionare elettronicamente le popolazioni cellulari su cui eseguire l'analisi con il processo definito di "gating", sulla base di uno o più parametri prestabiliti.

Un altro aspetto che aumenta le potenzialità di analisi è la possibilità di marcare simultaneamente fino a tre bersagli con fluorocromi diversi. Per tale analisi (multiparametrica) i fluorocromi utilizzati devono ovviamente avere spettri di emissione non sovrapponibili. Comunque, in caso di leggera sovrapposizione nell'emissione dei due fluorocromi in uso, è possibile ovviare sottraendo elettronicamente alla fluorescenza dell'uno la fluorescenza dell'altro con un procedimento che prende il nome di compensazione.

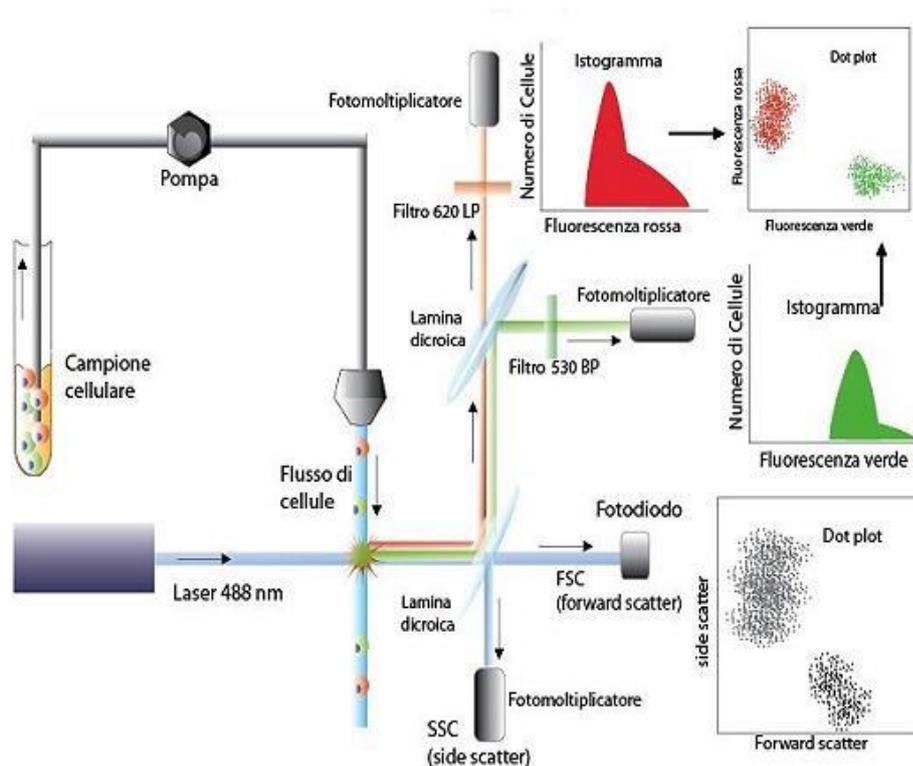


Figura 18. Rappresentazione schematica dei segnali rilevabili con la citometria a flusso.

3.10 ANALISI CITOFLUORIMETRICA AL FACSaria

Le analisi di citometria a flusso sono state condotte con il citofluorimetro FACSaria II (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA). Prima dell'acquisizione, gli spermatozoi sono stati filtrati attraverso filtri Syringe Filcons 50µm (Becton Dickinson, Milano Italia).

Il FACSaria è equipaggiato con tre laser: quello blu con emissione a 488nm (per i markers rivelati con Ab secondari coniugati con FITC e per il TUNEL-TMR), quello viola con emissione a 405nm (per il DAPI) e quello rosso con emissione a 633nm (per L10120 Far Red) (**Figura 19**).

La fluorescenza verde FITC (relativa ai markers presi in esame) è selezionata con un filtro band pass (BP) 530/30 nm, quella relativa al TMR con un filtro BP 585/42 , il DAPI con BP 450/50 e quella relativa all'L10120 con un filtro BP 660/20.

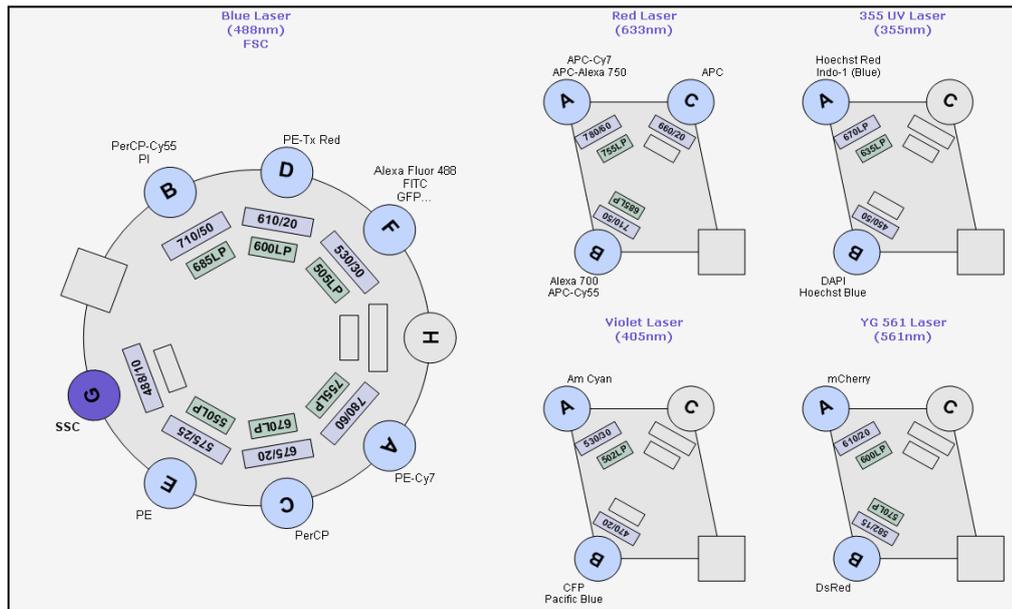


Figura 19. Possibili configurazioni ottiche in dotazione al FACS Aria II. I laser installati nello strumento utilizzati per questa tesi sono il Blue, il Red e Violet.

BD FACSDiva Software (BD Biosciences, Becton, Dickinson and Company, NJ, USA) è il Software utilizzato per l'acquisizione e l'analisi dei dati.

3.11 ANALISI STATISTICA DEI RISULTATI

Per tutte le variabili ne è stata controllata la distribuzione per verificare se fosse normale o meno, con il test di Kolmogorov-Smirnov. Quando i dati non erano distribuiti normalmente, per determinare la presenza di differenze statisticamente significative fra gruppi è stato usato il test di Wilcoxon per i dati dipendenti e il test U di Mann-Whitney per i dati indipendenti. Sempre per questo tipo di dati, gli studi di correlazione sono stati eseguiti con analisi di regressione lineare calcolando il coefficiente di regressione con il test di Spearman.

Per dati distribuiti normalmente invece è stato applicato il t-test e le analisi di regressione lineare sono state eseguite con il test di Pearson.

I dati nel testo sono riportati come $\text{media} \pm \text{SD}$ per i dati normali e come mediana (valore minimo ÷ valore massimo) per i dati che non presentavano distribuzione normale.

Si considera significativo un valore di $p < 0.05$. Tutta la statistica descrittiva e i test statistici sono stati effettuati con il software di analisi statistica Statistical Package for Social Science (SPSS, versione 20).

4 RISULTATI

4.1 CONFRONTO TRA I LIVELLI DI SDF PRIMA E DOPO LA PROCEDURA DI SELEZIONE SPERMATOZOARIA ADOTTATA DAI LABORATORI DI PMA

Per valutare l'effetto della selezione con centrifugazione su gradiente di densità (CGD) sui livelli di SDF abbiamo applicato la metodica TUNEL/PI, sia al seme intero che al selezionato, dei partners maschili di 101 coppie afferenti ai centri Tecnobios Procreazione di Bologna e Udine. Nella Tabella 2 si riportano le caratteristiche seminali dei pazienti. Lo studio dell'effetto della selezione è stato eseguito utilizzando sia la SDF totale che quella a carico della sola popolazione brighter. Utilizzando le mediane dei parametri SDF brighter, dimmer e totale i risultati (**Figura 20**) indicano che non c'è una differenza significativa tra i valori di SDF prima e dopo selezione, eccetto che per la popolazione dimmer, la quale, essendo costituita interamente da spermatozoi morti (Marchiani et al., 2011), scompare in seguito a selezione (Muratori et al., 2008). I valori riscontrati sono: % SDF Totale intero 34,7 (9,5 ÷ 94,8) vs % SDF Totale capacitato 22,4 (2,5 ÷ 99,8) p= n.s.; % SDF Brighter intero 21,4 (7 ÷ 78) vs % SDF Brighter capacitato 19,6 (2,3 ÷ 99,7) p= n.s.; % SDF Dimmer intero 9,7 (1 ÷ 37,7) vs % SDF Dimmer capacitato 0,83 (0 ÷ 39,8) p<0,000.

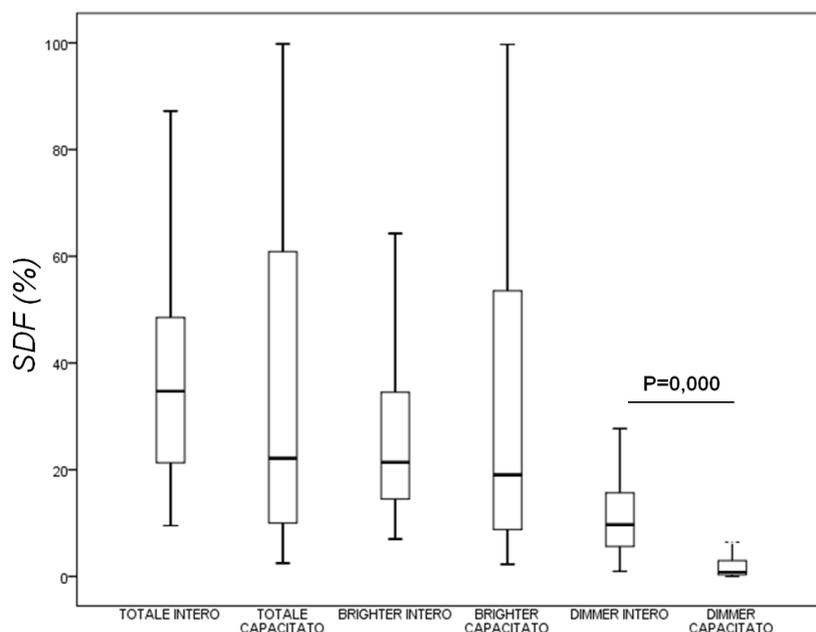


Figura 20: Confronto fra i valori di SDF (totale, brighter e dimmer) valutati in campioni di seme intero e selezionato.

Tuttavia, analizzando i valori di frammentazione nei campioni intero e selezionato dei singoli pazienti si osserva, sia per la SDF totale che per la brighter, un andamento variabile da paziente a paziente (**Figura 21A-B**). In alcuni soggetti, come atteso, la selezione ha comportato una diminuzione della SDF totale e della brighter (59 su 101) e perciò abbiamo definito questi pazienti “buoni” (**Figura 22A**); negli altri invece (42 di 101) la selezione ha portato ad un incremento, a volte drammatico, dei livelli di SDF e questi pazienti sono stati pertanto definiti “cattivi” (**Figura 22B**).

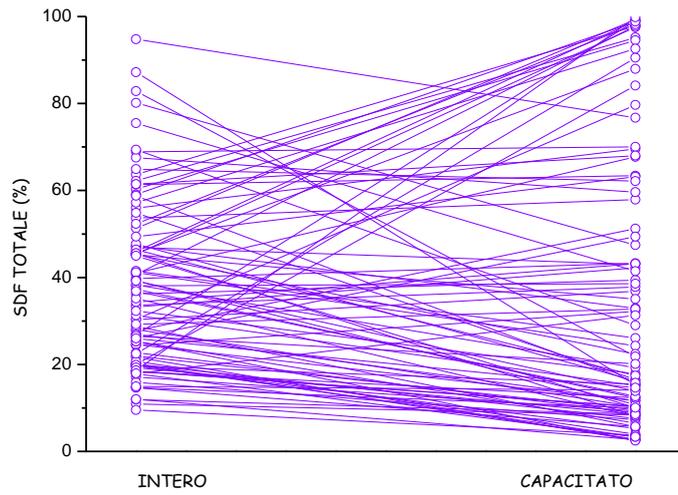


Figura 21 A: Confronto fra i valori di SDF totale, analizzati sui campioni di seme intero e capacitato, valutati sui singoli pazienti.

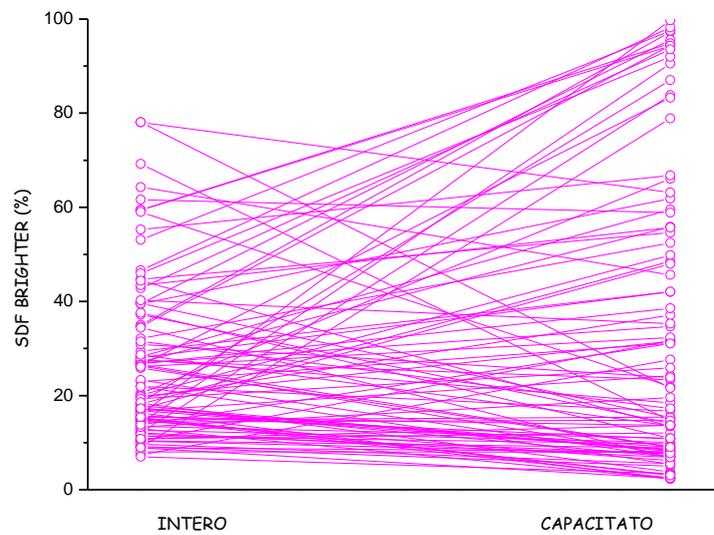


Figura 21 B: Confronto fra i valori di SDF brighter, analizzati sui campioni di seme intero e capacitato, valutati sui singoli pazienti.

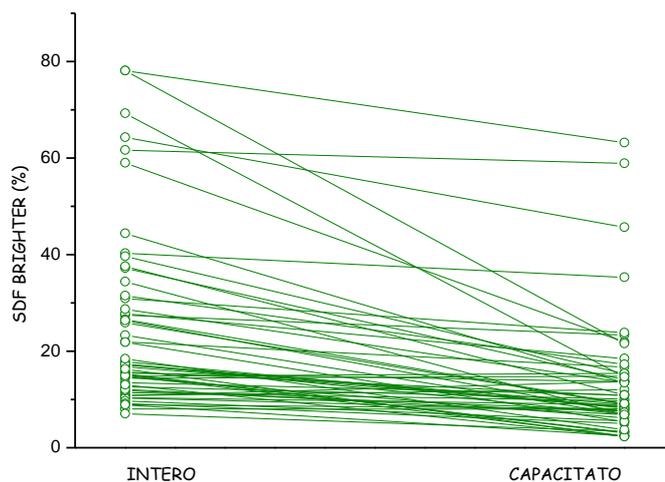


Figura 22 A: Confronto fra i valori di SDF brighter, analizzati sui campioni di seme intero e capacitato, valutati sui singoli pazienti **“buoni”**.

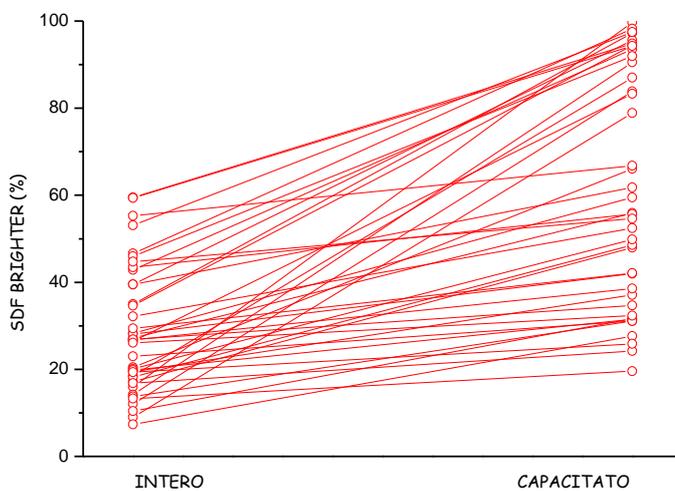


Figura 22 B: Confronto fra i valori di SDF brighter, analizzati sui campioni di seme intero e capacitato, valutati sui singoli pazienti **“cattivi”**.

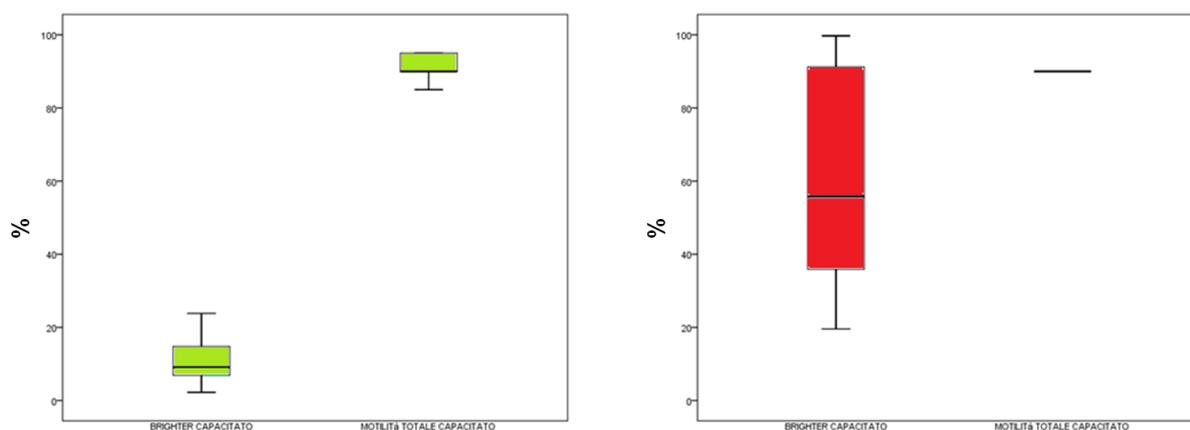


Figura 23: Confronto fra i valori di SDF brighter e motilità totale, analizzati sui campioni del seme capacitato, valutati sui singoli pazienti “buoni” (in verde) e “cattivi” (in rosso).

Da notare che l’incremento della frammentazione nei campioni “cattivi”, non è dovuto all’insuccesso della procedura di selezione, come mostrato dal fatto che l’incremento di motilità che si attende dopo la selezione è paragonabile nei due gruppi di pazienti (**Figura 23**)

Per valutare se l’esito della selezione dipendesse dai valori iniziali di SDF, abbiamo correlato questi ultimi con i valori ottenuti dopo la selezione. A tale scopo, abbiamo utilizzato la sola SDF brighter, che, nel campione selezionato, quasi sempre coincide con la SDF totale, in quanto, come ricordato, la selezione comporta l’eliminazione della frazione dimmer. Abbiamo quindi eseguito un’analisi di regressione lineare i cui risultati sono riportati in **Figura 24**. Come mostrato, nella totalità dei pazienti vi è una stretta correlazione positiva fra i valori di SDF brighter prima e dopo selezione ($r = 0,512$; $p = 0,000$). Separando inoltre i “buoni” dai “cattivi”, ed eseguendo la stessa analisi separatamente nei due gruppi, la relazione si mantiene sia nei pazienti “buoni” che nei “cattivi” (buoni $r = 0,604$, $p = 0,000$; cattivi $r = 0,522$, $p = 0,001$).

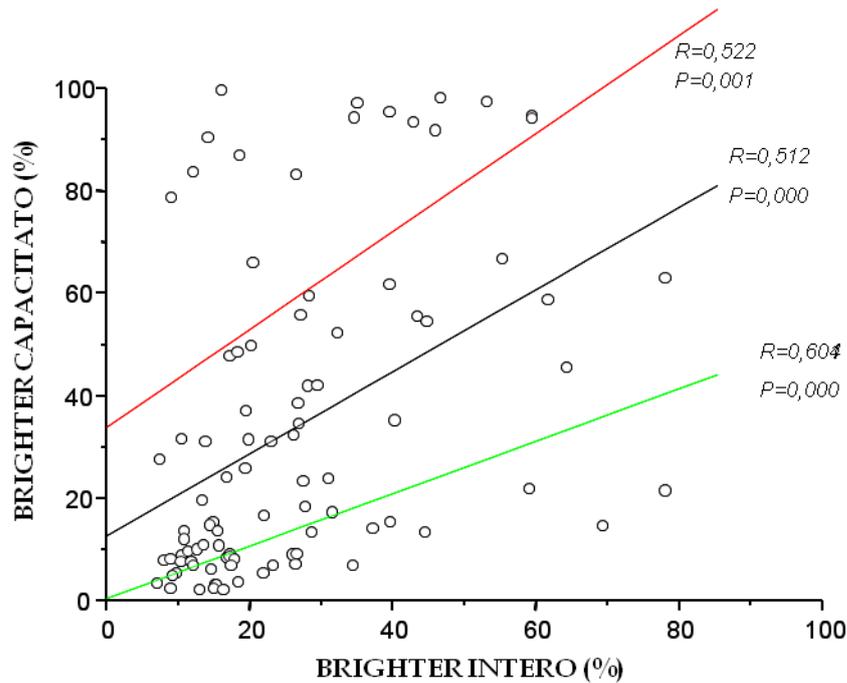


Figura 24: Grafico che riporta il risultato dell'analisi di regressione lineare effettuata in campioni di seme intero e selezionato per quanto riguarda la SDF brighter. Si distinguono i due diversi sottogruppi: i "buoni" in verde e i "cattivi" in rosso.

4.2 IMPATTO DELLA SDF TOTALE E BRIGHTER SUGLI OUTCOME RIPRODUTTIVI

Per valutare l'impatto della SDF sugli outcome riproduttivi sono state fino ad ora reclutate 101 coppie, afferenti ai suddetti centri Tecnobios Procreazione, sottoposte a FIVET o ICSI. Le caratteristiche di queste coppie e i parametri seminali dei partners maschili sono riportati in **Tabella 1-2**.

Età media donne	34,6 ± 3,2
Età media uomini	37 ± 5,5
Fattore	9 fattore maschile 8 fattore maschile + femminile 19 fattore tubarico 2 fattore endocrino 12 endometriosi 34 idiopatico 1 uterino 5 multiplo femminile 3 ridotta riserva ovarica 8 non disponibili
Trattamento	89 FIVET 12 ICSI
Esito	4 gravidanze in corso 5 gravidanze biochimiche 2 extrauterine 3 aborto 68 insuccessi 8 non disponibili 11 nati

Tabella 1: *Suddivisione delle coppie prese in esame in base al fattore di infertilità, trattamento effettuato ed esito del trattamento.*

Parametri seminali	Seme intero	Seme selezionato
Volume (ml)	2,4 ± 1,1	1
Concentrazione (10⁶/ml)	44,5 ± 31,1	15± 12,9
Numero totale	98,4 ± 82,7	15± 12,9
Motilità totale (%)	43,3 ± 9,5	88,9 ± 9,9
Motilità progressiva(%)	36,7 ± 8,6	83,2 ± 9,9
In situ (%)	6,5 ± 3,1	5,6 ± 2,7
Numero totale mobili (10⁶/ml)	43,6 ± 36,3	13,3 ± 11,3
Forme normali (%)	24,6 ± 7	38,1 ± 10,7

***Tabella 2:** Valori medi dei parametri seminali, di soggetti sottoposti a PMA, valutati sia in campioni di seme intero che selezionato.*

Attraverso un'analisi di regressione lineare abbiamo correlato le percentuali di frammentazione totale e della popolazione brighter, sia nell'intero che nel selezionato, con gli indici di performance riproduttiva, ovvero con FR, CR, IR, QE.

I risultati, riportati in **Tabella 3**, non mostrano nessuna associazione statisticamente significativa tra la frammentazione, sia totale che brighter, con i parametri testati.

SDF	FR	CR	IR	QE
Totale intero	r = -0,001 p > 0,05	r = -0,03 p > 0,05	r = 0,09 p > 0,05	r = 0,03 p > 0,05
Brighter intero	r = -0,03 p > 0,05	r = -0,02 p > 0,05	r = 0,05 p > 0,05	r = -0,02 p > 0,05
Totale selezionato	r = 0,07 p > 0,05	r = -0,03 p > 0,05	r = -0,11 p > 0,05	r = -0,05 p > 0,05
Brighter selezionato	r = -0,06 p > 0,05	r = 0,004 p > 0,05	r = -0,1 p > 0,05	r = 0,08 p > 0,05

Tabella 3: *Correlazione tra SDF totale e brighter, in campioni seminali interi e selezionati, e gli indici di performance riproduttiva FR, CR, IR e QE (n=101)*

A questo punto, abbiamo voluto indagare l'effetto della presenza del fattore femminile sui risultati ottenuti, in quanto patologie che incidono sulla qualità ovocitaria e sull'annidamento dell'embrione possono inficiare le analisi di correlazione. A questo scopo abbiamo escluso dall'analisi statistica quelle coppie in cui vi era la presenza di un fattore femminile (endometriosi, ridotta riserva ovarica, fattori endocrini femminili e fattori misti (maschile + femminile)) ed abbiamo quindi ripetuto le analisi di correlazione sulle 62 coppie rimanenti. Mentre per CR e QE non abbiamo ottenuto alcun risultato, per IR ed FR abbiamo scoperto una correlazione negativa tra tali indici e la frammentazione sia totale che brighter del seme capacitato (**Tabella 4** e **Figura 25 A-B**).

SDF	FR	CR	IR	QE
Totale intero	r = -0,11 p > 0,05	r = -0,07 p > 0,05	r = -0,22 p > 0,05	r = -0,05 p = 0,03
Brighter intero	r = -0,12 p > 0,05	r = -0,06 p > 0,05	r = -0,16 p > 0,05	r = -0,08 p = 0,092
Totale selezionato	r = -0,25 p < 0,05	r = -0,14 p > 0,05	r = -0,25 p < 0,05	r = -0,05 p > 0,05
Brighter selezionato	r = -0,26 p < 0,05	r = -0,1 p > 0,05	r = -0,25 p < 0,05	r = -0,02 p > 0,05

Tabella 4: Correlazione tra SDF totale e della sola brighter, in campioni seminali interi e selezionati, e gli indici di performance riproduttiva FR, CR, IR, QE escludendo i fattori femminili (n=62)

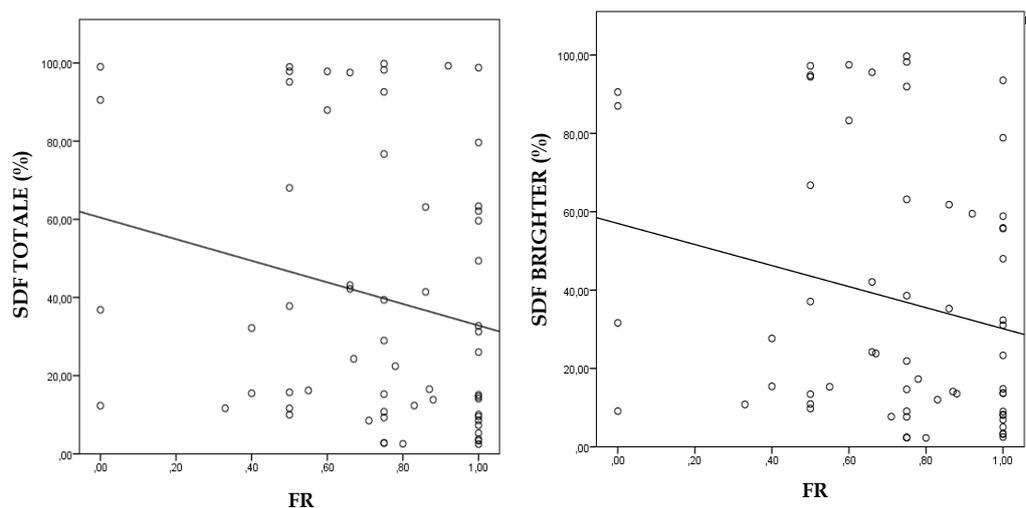


Figura 25 A: Grafico che riporta il risultato dell'analisi di regressione lineare tra la FR e la SDF totale e brighter nel capacitato (totale nel capacitato: r=-0,25, p<0,05 e brighter nel capacitato: r = -0,26; p<0,05, n=62).

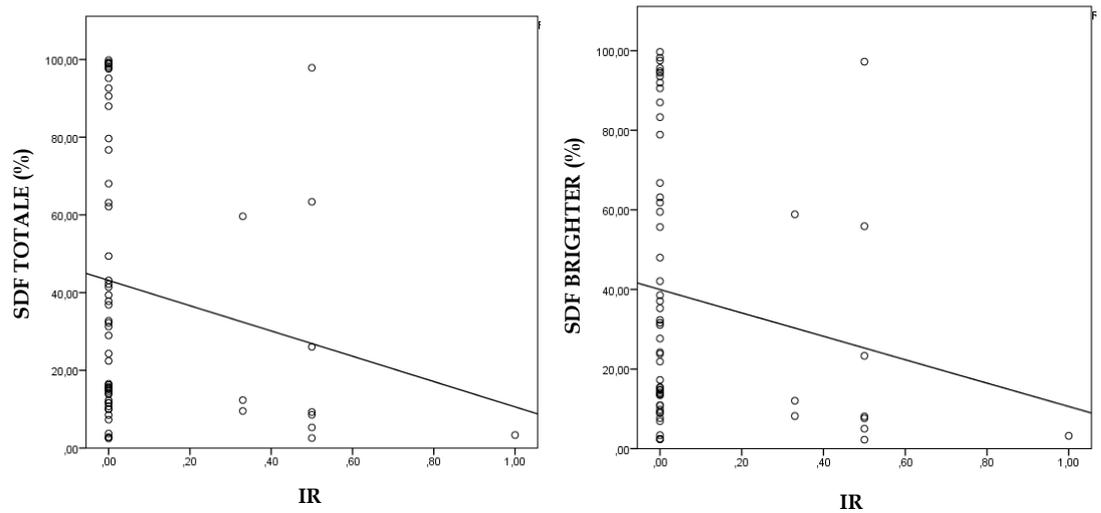


Figura 25 B: Grafico che riporta il risultato dell'analisi di regressione lineare tra la IR e la SDF totale e brighter nel capacitato (totale nel capacitato: $r = -0,25$; $p < 0,05$ e brighter nel capacitato: $r = -0,25$; $p < 0,05$, $n=62$).

Tale risultato ci ha spinti ad approfondire le analisi sui due indici FR e IR. A tale scopo, per l'FR abbiamo diviso le coppie in due gruppi, un gruppo formato dalle coppie che presentavano un indice $FR \leq 0,5$ ($n=15$), e l'altro dalle coppie che presentavano un indice $FR > 0,5$ ($n=47$). Per l'IR analogamente abbiamo diviso le coppie in $IR=0$ ($n=51$) e $IR > 0$ ($n=11$). Abbiamo quindi confrontato tra i due gruppi le medie delle frammentazioni totale e brighter sia per l'intero che per il selezionato. Da questa analisi è emersa una tendenza ad una differenza statisticamente significativa per la SDF della brighter del capacitato fra i due gruppi a IR diverso (mediana % SDF brighter $IR=0$: 27,7 (2,3 ÷ 99,7) vs $IR > 0$: 8,2 (2,3 ÷ 97,2); $p=0,057$) mentre per il FR non abbiamo ottenuto alcuna differenza nei livelli di frammentazione tra i due gruppi a indice diverso.

Poiché anche l'età femminile è un importante fattore dell'infertilità femminile, abbiamo ripetuto le analisi di correlazione tra i valori di frammentazione e i parametri embrionari, escludendo dall'analisi le donne che presentavano un'età maggiore di 36 anni. Infatti, come è noto, l'età influenza non solo la capacità dell'ovocita di riparare il danno portato dallo spermatozoo

ma ha una notevole influenza anche sulla capacità di impianto e di portare a termine la gravidanza. Dopo l'eliminazione delle donne con età >36 anni rimanevano 41 coppie.

SDF	FR	CR	IR	QE
Totale intero	r = -0,23 p > 0,05	r = -0,06 p > 0,05	r = -0,26 p > 0,05	r = -0,05 p > 0,05
Brighter intero	r = -0,37 p > 0,05	r = 0,04 p > 0,05	r = -0,20 p > 0,05	r = -0,04 p > 0,05
Totale selezionato	r = -0,47 p < 0,01	r = -0,23 p > 0,05	r = -0,31 p < 0,05	r = -0,01 p > 0,05
Brighter selezionato	r = -0,49 p < 0,01	r = -0,15 p > 0,05	r = -0,32 p < 0,05	r = -0,01 p > 0,05

***Tabella 5:** Correlazione tra SDF totale e della sola brighter, in campioni seminali interi e selezionati, e gli indici di performance riproduttiva FR, CR, IR, QE, escludendo fattori femminili e selezionando le donne giovani (età ≤ 36anni)(n=41)*

Le analisi di correlazione con i parametri embrionari ancora una volta hanno portato a scoprire una correlazione negativa e statisticamente significativa tra gli indici IR e FR ed i valori di frammentazione totale (grafici non mostrati) e brighter del capacitato (**Tabella 5 e Figura 26**). In particolare, per FR tali correlazioni in questo caso diventano notevolmente più strette (p<0,05, r=-0,26 vs p<0,01, r=-0,49; vedi tabelle 4 e 5).

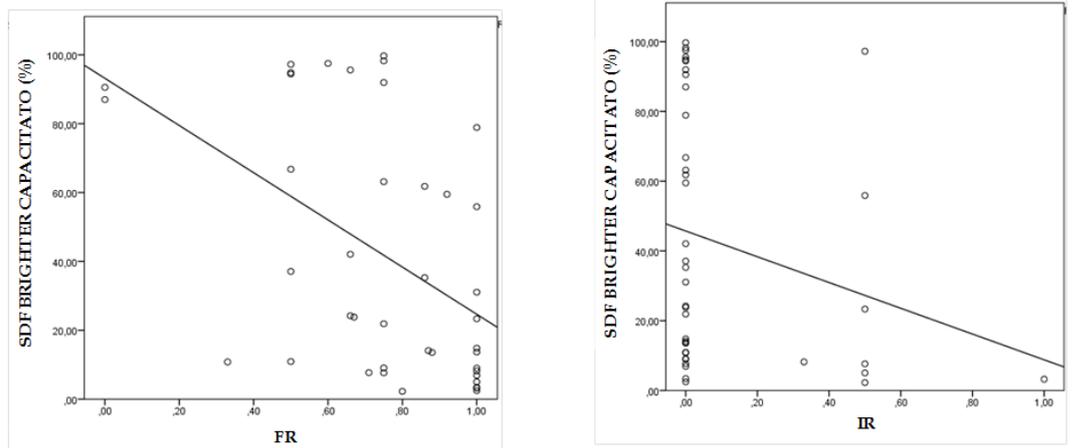


Figura 26: Grafico che riporta il risultato dell'analisi di regressione lineare tra la FR (a sinistra) e IR (a destra) con la SDF brighter nel seme capacitato (FR con brighter nel capacitato $r=-0,49$ e $p<0,01$; IR con brighter nel capacitato $r=-0,32$ $p<0,05$; $n=41$)

Le stesse 41 coppie sono state divise in due gruppi in base ai parametri embrionari (FR $\leq 0,5$ (n=9) e FR $> 0,5$ (n=32); IR=0 (n=33) e IR >0 (n=8)) e quindi le medie delle frammentazioni totale e brighter sia per l'intero che per il selezionato sono state confrontate. Da questa analisi è emersa una differenza statisticamente significativa fra i due gruppi a diverso IR e FR per quanto riguarda la brighter del capacitato ($45,8 \pm 36\%$, vs $25,4 \pm 34,1\%$ $p<0,05$ rispettivamente per IR=0 e IR >0 e $65,5 \pm 36,4\%$ vs $35,2 \pm 33,7\%$, $p<0,05$ rispettivamente per FR $\leq 0,5$ e FR $>0,5$) (**Figura 27 e 28**).

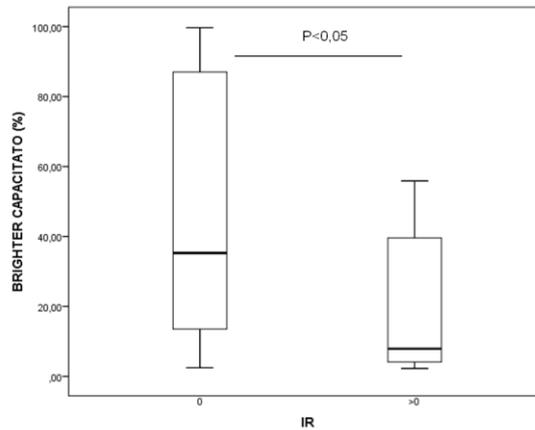


Figura 27: Confronto dei valori di SDF brighter del seme capacitato tra i due gruppi a diverso IR ($p<0,05$)($n=41$)

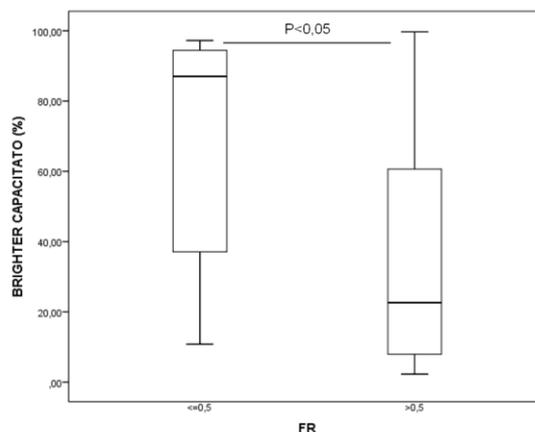


Figura 28: Confronto dei valori di SDF brighter del seme capacitato tra i due gruppi a diverso FR ($p<0,05$)($n=41$)

Le stesse analisi di correlazione sono state poi ripetute analizzando separatamente i campioni “buoni” e “cattivi” sia all’interno delle 62 coppie in cui è stato escluso il fattore femminile, sia nel gruppo costituito dalle 41 coppie che include le coppie con donne giovani (≤ 36 anni). Non abbiamo trovato alcuna correlazione tra gli indici embrionari e la SDF nei due gruppi di campioni “buoni” e “cattivi”.

Abbiamo infine confrontato le coppie che hanno ottenuto la gravidanza (SI, $n=15$) con quelle che non l’hanno ottenuta (aborti compresi) (NO, $n=76$) in termini di frammentazione totale e brighter calcolata sia nel seme intero che nel

capacitato. I risultati non evidenziano differenze significative fra la frammentazione delle coppie con e senza successo riproduttivo, né per quanto riguarda la SDF totale e brighter del campione intero, né per quanto riguarda i campioni selezionati.

Anche in questo confronto abbiamo valutato sia l'effetto della presenza di un fattore femminile che l'effetto dell'età della partner. Tuttavia, nessuna differenza statistica è emersa fra i due gruppi, in termini di frammentazione (**Figura 29**) seppur i livelli di frammentazione brighter nel capacitato mostravano una tendenza ad essere più alti nelle coppie che non hanno ottenuto gravidanza. Stesso risultato è stato ottenuto per le coppie che hanno avuto aborto (n=30) e per quelle in cui la gravidanza ha portato al “bimbo in braccio” (n=11). Analogamente, nessuna differenza si è evidenziata, analizzando separatamente il gruppo dei “buoni” e quello dei “cattivi” (dati non mostrati).

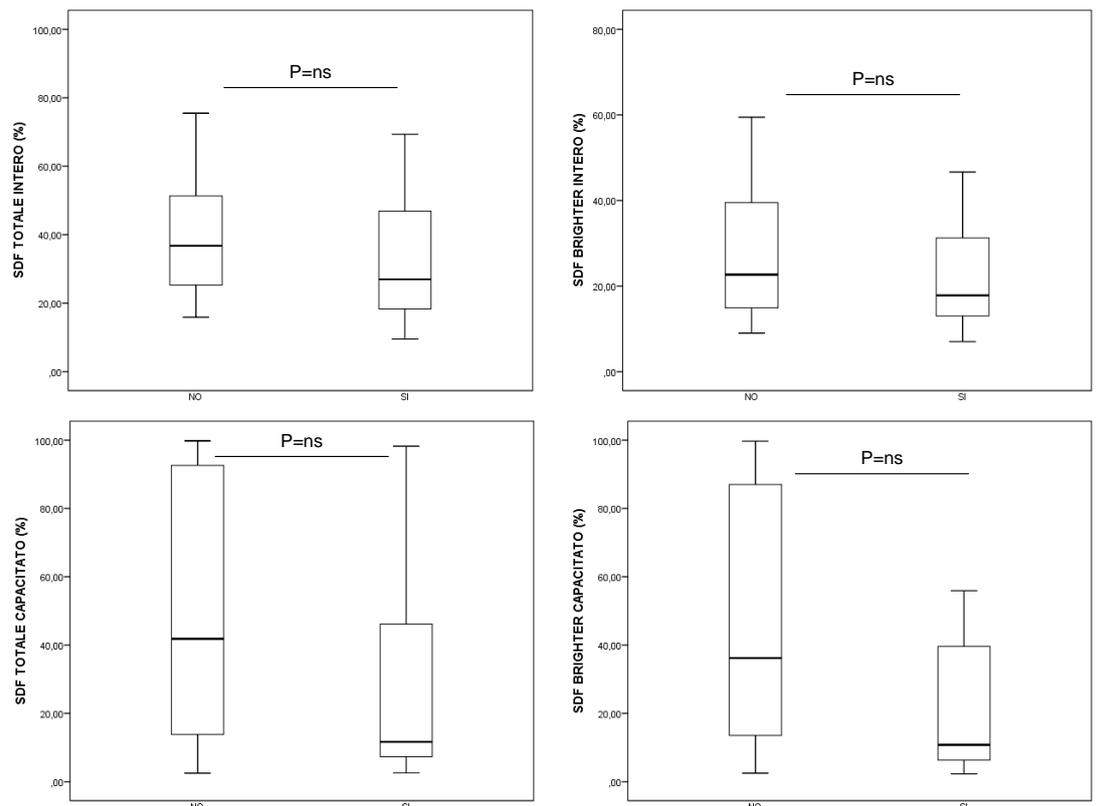


Figura 29: Confronto dei valori di SDF totale e brighter del seme intero e capacitato tra i gruppi gravidanza SI e gravidanza NO (n=41)

4.3 VALUTAZIONE SIMULTANEA DELLA SDF E DELLA VITALITÀ CELLULARE

I risultati sopra riportati suggeriscono che la frammentazione brighter, che, come sopramenzionato, è indipendente dalla qualità seminale e formata sia da spermatozoi vitali che non, abbia un impatto maggiore sugli esiti della fecondazione assistita. Questo risultato suggerisce che siano gli spermatozoi vivi frammentati, contenuti nella popolazione brighter, ad aver il maggior impatto sulla fertilità come d'altra parte atteso e ci ha spinti alla messa a punto di una metodica in grado di valutare la frammentazione del DNA nei soli spermatozoi vitali.

Per la valutazione simultanea della SDF e della vitalità cellulare, abbiamo accoppiato il TUNEL con la sonda L10120 Far Red. Chiamiamo per brevità questa nuova versione di TUNEL, LiveTUNEL.

La sonda L10120 Far Red lega, nelle cellule vive, solo le ammine presenti sulla superficie esterna e, nelle cellule morte, dove attraversa la membrana, anche le quelle presenti sul versante interno, conferendo a queste ultime una maggiore intensità di fluorescenza (**Figure 30 e 31**). Inoltre, la sonda L10120 Far Red è resistente alla fissazione, che come abbiamo visto, rappresenta un passaggio fondamentale per l'applicazione della tecnica TUNEL e che, naturalmente, deve essere successiva alla colorazione per la vitalità.

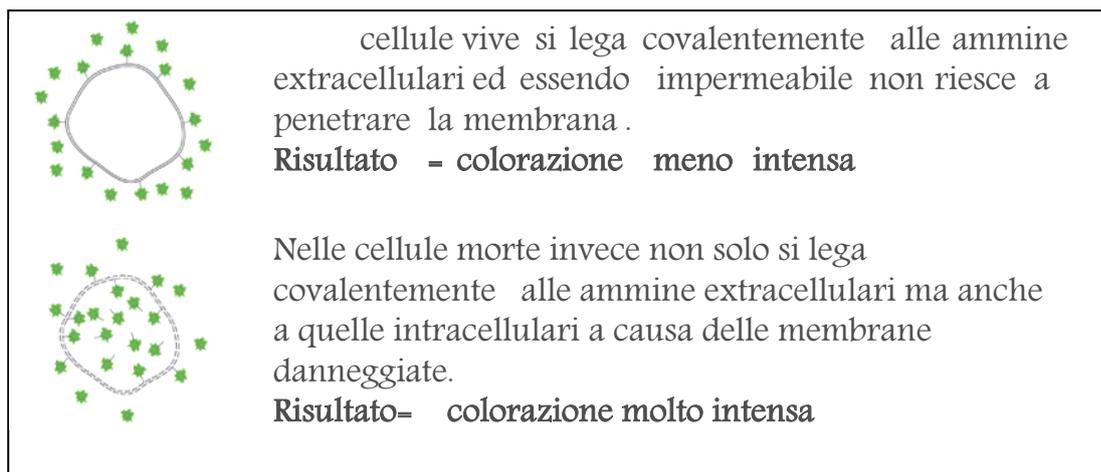


Figura 30 - Marcatura di una cellula vitale e non con la sonda L10120

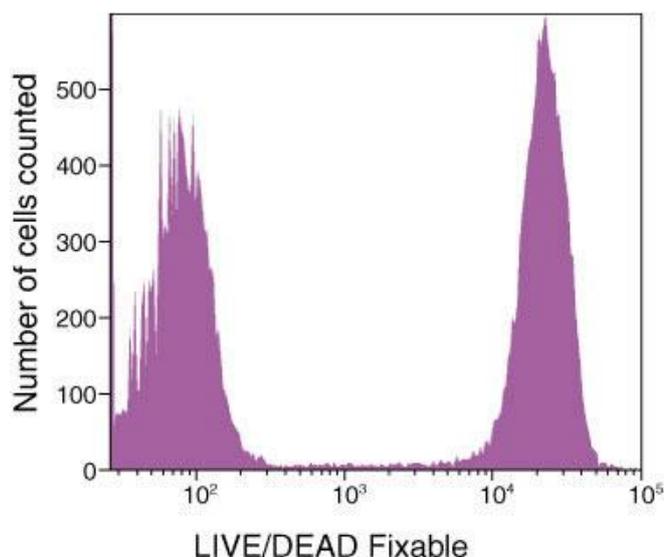


Figura 31 - Picchi citometrici delle cellule vive (picco a sinistra) e morte (picco a destra) marcate con L10120

Il LiveTUNEL, prevede dunque l'utilizzo di tre fluorescenze per i campioni analizzati (**Figure 32 e 33**):

- Per valutare la SDF: TUNEL FITC
- Colorante vitale: L10120 FAR RED
- Colorante nucleare: DAPI

Come si può osservare dalla Figura 32 A-B, questa tecnica permette di distinguere gli spermatozoi vitali nella popolazione brighter dai morti e valutare sia complessivamente che separatamente la loro positività al TUNEL-FITC.

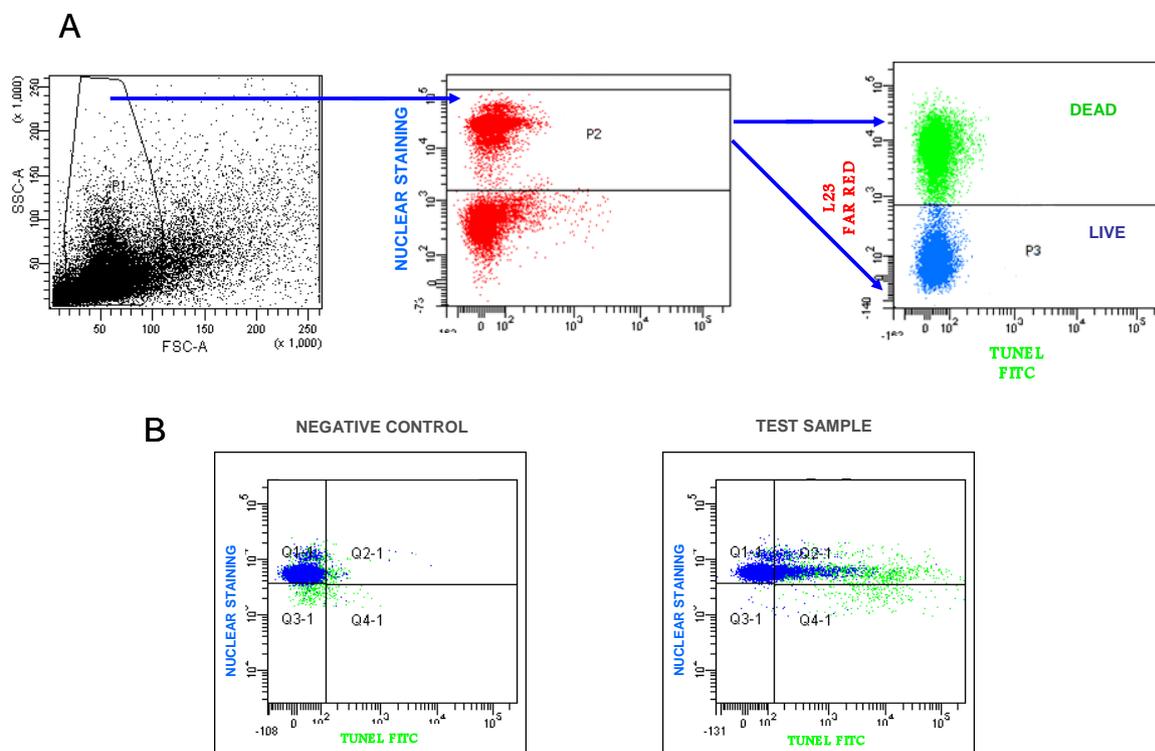


Figura 32 - Acquisizione citofluorimetrica di un campione marcato con TUNEL FITC, DAPI e L10120 FAR RED. A) P1: fiamma contenente gli spermatozoi e i corpi apoptotici seminali; P2: spermatozoi, distinti in brighter e dimmer; P3: spermatozoi vivi B) set dei quadranti stabilito per il controllo negativo (a sinistra) e il campione test (a destra): gli eventi colorati in blu corrispondono agli spermatozoi vivi. In verde, quelli morti.

Per ciascun campione si stabilisce, all'interno del citogramma FSC/SSC, una regione a forma di fiamma (P1), che esclude detriti e aggregati dall'analisi e all'interno della quale si registrano diecimila eventi. L'utilizzo del gate descritto non è tuttavia sufficiente per l'ottenimento di una popolazione formata dai soli spermatozoi. Infatti, come abbiamo visto, in tale regione sono localizzati anche gli M540 bodies e per escluderli è necessario studiare le

fluorescenze nei soli eventi colorati con DAPI, ovvero nei soli eventi nucleati. Abbiamo utilizzato il DAPI, invece del PI, per ovviare al problema della sovrapposizione negli spettri di emissione del PI e del L10120 Far Red (**Figura 33**), che rende impossibile la compensazione delle fluorescenze. A questo scopo si traccia una seconda regione (P2), contenete i soli spermatozoi (Figura 32 A). Per l'analisi dei singoli markers e della SDF nei soli spermatozoi vitali, è poi necessario stabilire una terza regione in cui includere solo questi ultimi escludendo quindi gli spermatozoi morti (Figura 32 A). Da sottolineare il fatto che questa tecnica consente la determinazione, in un unico campione, sia della SDF a carico della frazione vitale, che quella a carico della popolazione totale (e all'interno di questa, quella di brighter e dimmer).

Il valore della frammentazione del DNA negli spermatozoi vivi sul totale degli spermatozoi presenti nel seme prima della selezione, valutati con questa metodica, è risultata in media del $17 \pm 14,1\%$ (n=45), confermando che la maggior parte della frammentazione del DNA è a carico degli spermatozoi morti.

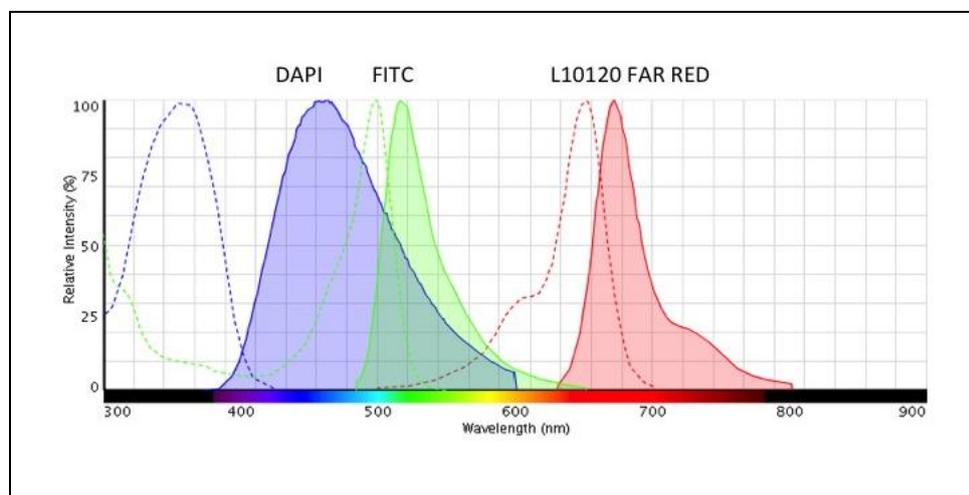


Figura 33 - Spettri di eccitazione ed emissione dei fluorocromi DAPI, FITC e L10120 FAR RED (linee tratteggiate=eccitazione, linee continue=emissione)

E' importante chiarire che, prima di sostituire l'utilizzo del PI con quello del DAPI, abbiamo verificato che i due coloranti nucleari marcessero gli spermatozoi con uguale efficienza e potessero essere utilizzati indiscriminatamente.

A questo scopo abbiamo colorato cinque campioni di liquido seminale con i due coloranti e, dopo l'acquisizione, abbiamo calcolato sia la percentuale di spermatozoi dentro la regione a fiamma (**Figura 34**) che le percentuali reciproche delle due popolazioni.

I risultati hanno evidenziato che il DAPI produce percentuali della popolazione di spermatozoi dentro la fiamma ($84,6\pm 8,8\%$) del tutto sovrapponibili a quelli del PI ($79,1\pm 14,4\%$; $p>0,05$; $n=5$).

Inoltre, anche le percentuali reciproche della popolazione brighter e dimmer ottenute con le due colorazioni sono apparse del tutto sovrapponibili (PIbrighter $84,6\pm 8,7\%$ vs DAPIbrighter $80,5\pm 13,6\%$ e PIDimmer $15,4\pm 8,8\%$ vs DAPIdimmer $18,8\pm 14,6\%$; $p>0,05$; $n=5$; Figura 34).

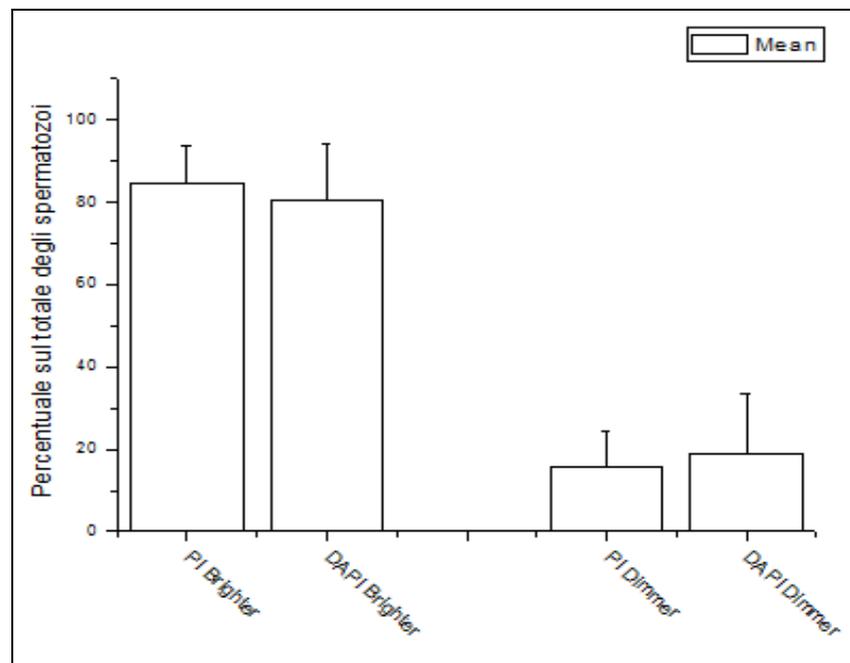


Figura 34- Confronto delle medie percentuali delle popolazioni

4.4 VALUTAZIONE DELLA SDF NEGLI SPERMATOZOI VITALI, PRIMA E DOPO LA SELEZIONE CON CGD

Con il *LiveTUNEL*, abbiamo valutato la SDF in campioni di liquido seminale intero e dopo selezione con *CGD* (n=18) al fine di capire se l'incremento dei livelli di SDF brighter dopo *CGD* osservata nei campioni "cattivi" fosse dovuta alla selezione di spermatozoi vivi frammentati o all'induzione di un danno negli spermatozoi vitali. Similmente a quanto ottenuto con la tecnica tradizionale, i valori medi di SDF della brighter, prima ($28,4 \pm 18,1\%$) e dopo selezione ($43 \pm 31,9\%$), non sono statisticamente diversi ($p > 0,05$). L'incremento durante la selezione appare comunque più cospicuo di quello ottenuto con la tecnica tradizionale (vedi Figura 20), probabilmente a causa del minor numero di campioni analizzati (18 vs 101) e della presenza casuale in essi di un maggior numero di campioni in cui si registra il raggiungimento di quasi il 100% di frammentazione dopo selezione. Una differenza la si apprezza invece quando si valutano i valori medi di SDF dei vivi (SDF vivi: $20,18 \pm 16,85\%$ vs $41,75 \pm 35,30\%$, rispettivamente prima e dopo selezione; $p < 0,05$). Analizzando singolarmente i campioni, si conferma l'esistenza di due categorie: "buoni" e "cattivi", sia per la SDF brighter che per quella nei vivi. Mentre in alcuni campioni ("buoni") il livello di SDF dei vivi è diminuito a seguito della selezione con *CGD* rispetto al seme intero, in altri ("cattivi") lo stesso parametro è aumentato, a volte anche drasticamente. Questi risultati sono mostrati in **Figura 35** che riporta, per confronto, anche i valori della SDF brighter (pannello di sinistra).

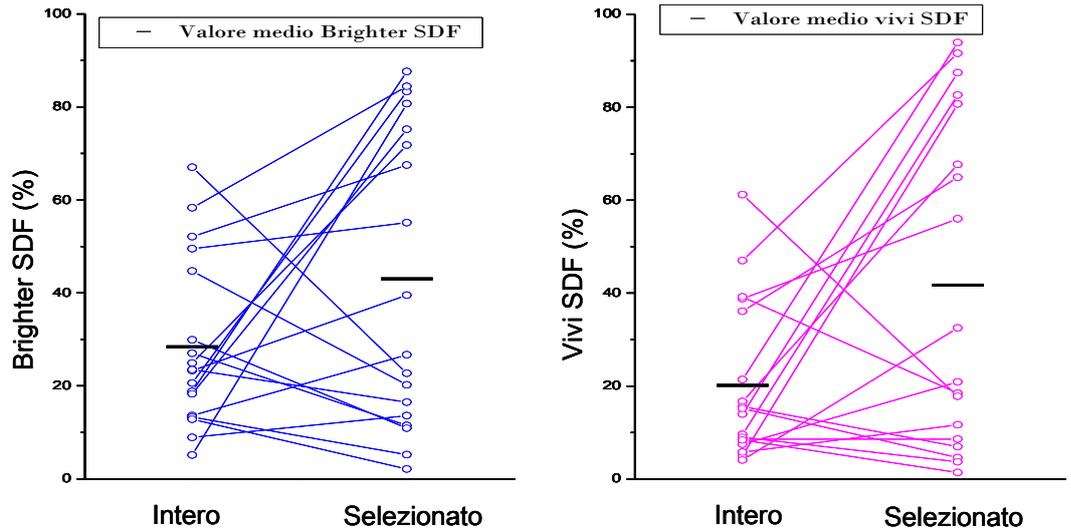


Figura 35- Andamento nei singoli pazienti ($n=18$) dei valori di SDF valutati negli spermatozoi brighter (grafico a sinistra) e nei soli spermatozoi vivi (grafico a destra), prima e dopo la selezione mediante CGD. Le linee rappresentano le medie dei valori di frammentazione.

Come si può osservare (**Figura 36 A**), abbiamo individuato 10/18 campioni "cattivi" (incremento della SDF vivi da $18,7 \pm 15,2\%$ a $62,7 \pm 29,1\%$; $p= 1,82883E-4$) e 8/18 campioni "buoni" (decremento della SDF vivi da $20,4 \pm 19,6\%$ a $9,2 \pm 6,4\%$; $p=ns$).

Inoltre, è importante notare (**Figura 36 B**) che in entrambe le categorie di pazienti la selezione produce popolazioni altamente mobili (motilità totale buoni $86,9 \pm 6,5\%$, motilità totale cattivi: $84,2 \pm 7,8\%$; $p > 0,05$).

Tuttavia, come accade per la valutazione della SDF brighter (vedi Figura 23), solo nei "cattivi" valori elevati di motilità si associano ad alti livelli di frammentazione del DNA.

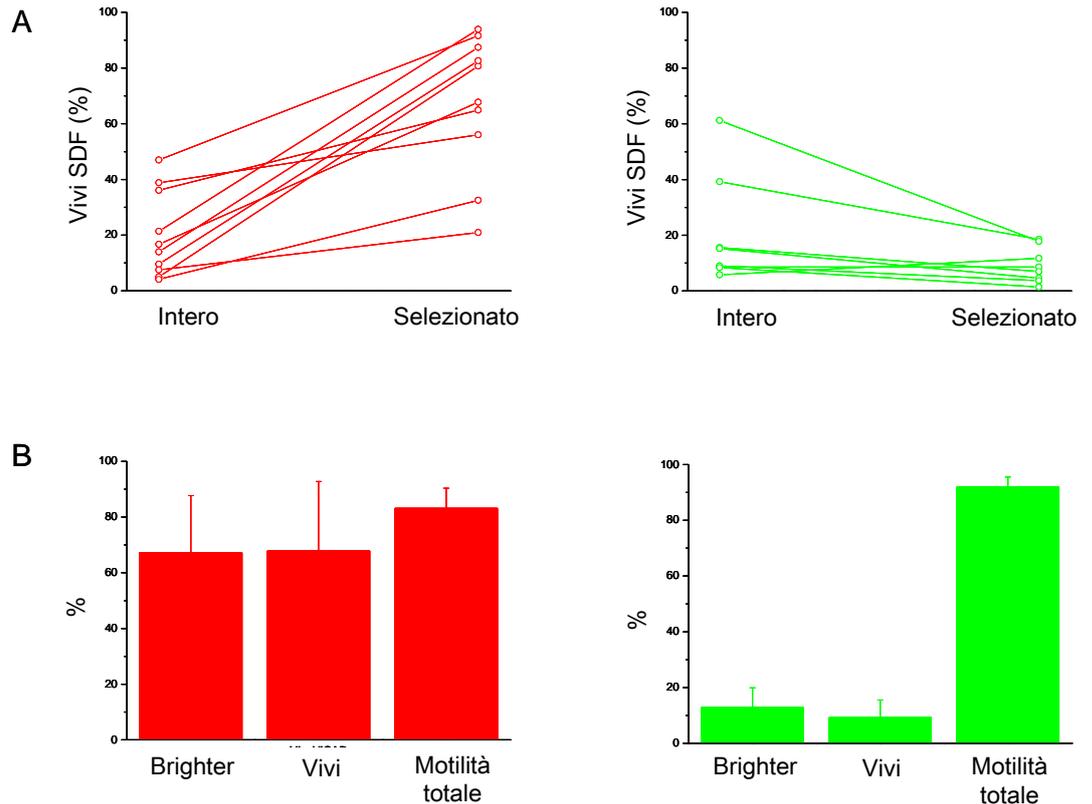


Figura 36 - A) Andamento della SDF dei vivi (frammentazione degli spermatozoi vivi come % sui soli spermatozoi vivi) nei singoli pazienti divisi nelle due categorie ("buoni" e "cattivi"); B) Medie (\pm SD) della SDF brighter, della SDF nei vivi e della motilità totale del seme selezionato: solo nei cattivi (a sinistra) l'elevata motilità si associa a livelli alti di SDF.

I livelli della SDF nella brighter e nei soli vivi hanno un andamento simile fra loro, ovvero ad un incremento della SDF brighter si associa un incremento della SDF dei vivi e lo stesso vale quando tale parametro diminuisce. Tuttavia, valutando il rapporto fra il valore nel seme intero e dopo la selezione sia sul totale dei pazienti che nei "cattivi", troviamo che l'incremento della SDF nei vivi è significativamente maggiore ($p=0,03$) rispetto all'incremento calcolato nella popolazione brighter (**Figura 37**). Nei campioni "buoni", invece, il decremento della SDF brighter e della SDF nei vivi mostra valori simili (dati non mostrati). Considerando che la frazione vitale è quella più importante dal punto di vista clinico, questo risultato

suggerisce che la nuova tecnica mostra una maggiore sensibilità nell'individuare quei pazienti che subiscono incrementi della SDF durante la preparazione del seme con *CGD* e che l'incremento è dovuto ad un danno "de novo" che si sviluppa sugli spermatozoi vitali durante la selezione.

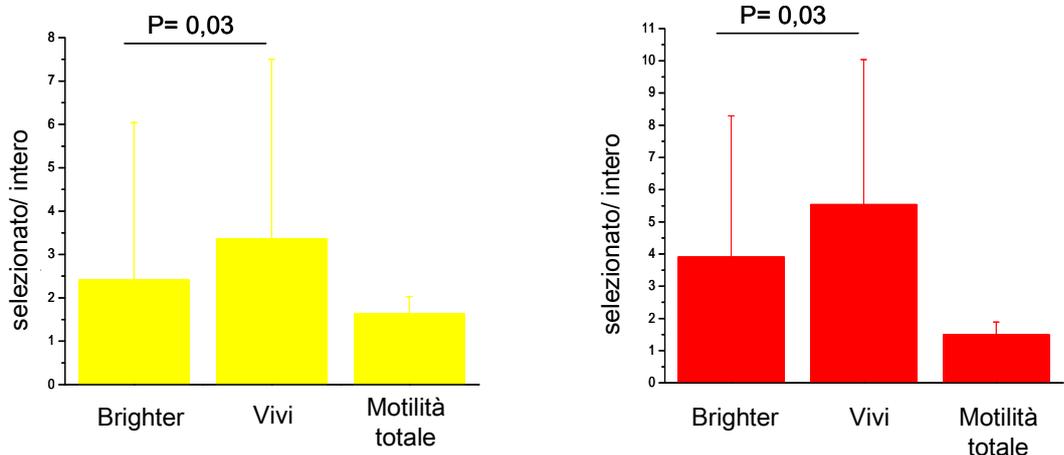


Figura 37. *Variazione (espressa come rapporto fra valore dopo la selezione e valore prima) dei valori di SDF-brighter, SDF-vivi e di motilità totale rivelate durante la selezione con CGD . Il grafico in giallo si riferisce al totale dei pazienti (n=18) e quello in rosso ai soli "cattivi" (n=10).*

4.5 VALUTAZIONE DELLA SDF NEGLI SPERMATOZOI VITALI PRIMA E DOPO LA SELEZIONE MEDIANTE SWIM UP DIRETTO ED INDIRECTO

Per verificare se l'utilizzo di tecniche meno invasive potesse scongiurare l'incremento della SDF nei campioni "cattivi", si sono valutati i livelli di SDF prima e dopo selezione del seme, eseguita con Swim up indiretto (n=18) e diretto (n=18).

Per quanto riguarda lo Swim up indiretto, i valori medi di SDF ottenuti non indicano una differenza statisticamente significativa tra l'intero ed il selezionato per quanto riguarda la brighter (SDF brighter intero: $26,9 \pm 9,9\%$ vs selezionato: $35,5 \pm 19,1\%$, $p=ns$) mentre, anche con questa metodica, quando si considerano i soli vivi, si viene a scoprire un incremento significativo dei

livelli di SDF (SDF vivi intero: $25,1 \pm 15,2\%$ vs selezionato: $38,9 \pm 22,6\%$; $p=0,02$; Figura 38). Anche in questo caso, si evidenziano sia campioni in cui aumentano (10/18, incremento della SDF vivi da $26,7 \pm 17\%$ a $56,9 \pm 21,1\%$; $p = 7,78073E-4$) sia campioni in cui diminuiscono (8/18, decremento della SDF vivi da $29,2 \pm 19,8\%$ a $20,9 \pm 8,8\%$; $p=ns$) i livelli di SDF dei vivi prima e dopo selezione (Figura 38). Inoltre, se si valuta l'incremento della SDF (sia della brighter sia dei vivi) rispetto all'intero, anche in questo caso si evidenzia un effetto maggiore e statisticamente significativo a carico della SDF dei vivi rispetto alla brighter ($p=0,01$; Figura 39), confermando la maggiore sensibilità della rivelazione simultanea della SDF e della vitalità cellulare.

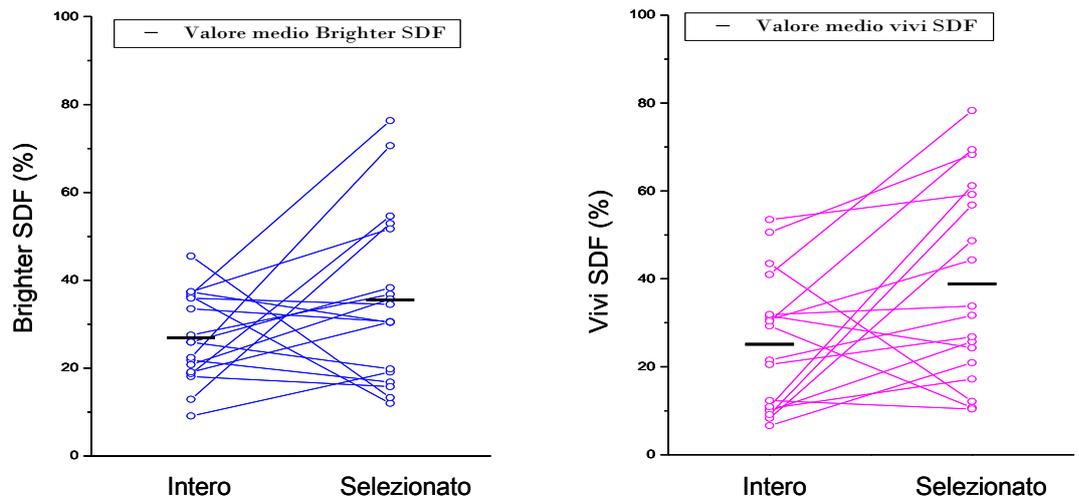


Figura 38 - Swim up indiretto. Andamento nei singoli pazienti ($n=18$) dei valori di SDF valutati nella popolazione brighter (grafico a sinistra) e nei soli spermatozoi vivi (grafico a destra), prima e dopo la selezione con Swim up indiretto. Le linee nere rappresentano le medie dei valori di frammentazione.

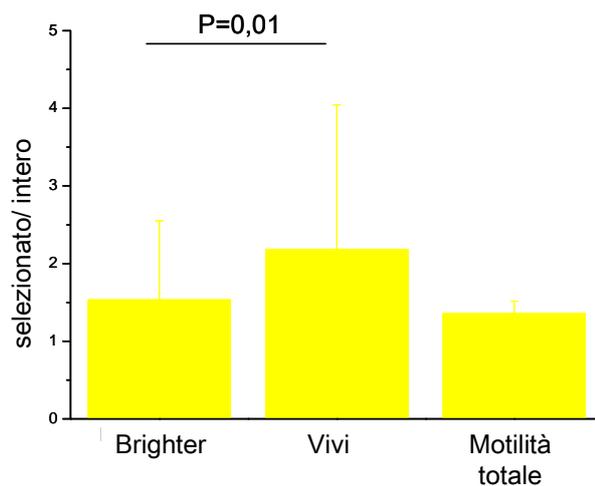


Figura 39- *Variazione (espressa come rapporto fra valore prima e dopo la selezione) dei valori di SDF-brighter, SDF-vivi e di motilità totale rivelate durante la selezione con Swim up indiretto (n=18).*

Per quanto riguarda lo *Swim up diretto*, i valori medi di SDF ottenuti non indicano una differenza statisticamente significativa tra l'intero ed il selezionato per quanto riguarda la brighter (SDF brighter intero: $28,6 \pm 10\%$ vs selezionato: $38,5 \pm 24,2\%$, $p=ns$), mentre, ancora una volta, quando si considerano i soli vivi si viene a scoprire un incremento significativo dei livelli di SDF (SDF vivi intero: $21,8 \pm 13,6\%$ vs selezionato: $42,7 \pm 27,4\%$; $p=0,01$; **Figura 40**). Anche in questo caso, si evidenziano sia campioni in cui i livelli di SDF dei vivi dopo selezione aumentano (10/18, incremento medio da $28,8 \pm 15,6\%$ a $56,7 \pm 26,1\%$; $p = 0,002$) sia campioni in cui diminuiscono (8/18, decremento medio da $23,3 \pm 11,2\%$ a $23,5 \pm 15\%$; $p=ns$) (**Figura 40**).

Inoltre, dal confronto dell'incremento della SDF nella brighter e nella frazione vitale, si ottiene che la valutazione della SDF nei vivi è in grado di rivelare in modo significativamente maggiore l'incremento di tale parametro dopo la selezione ($p=0,01$) (**Figura 41**).

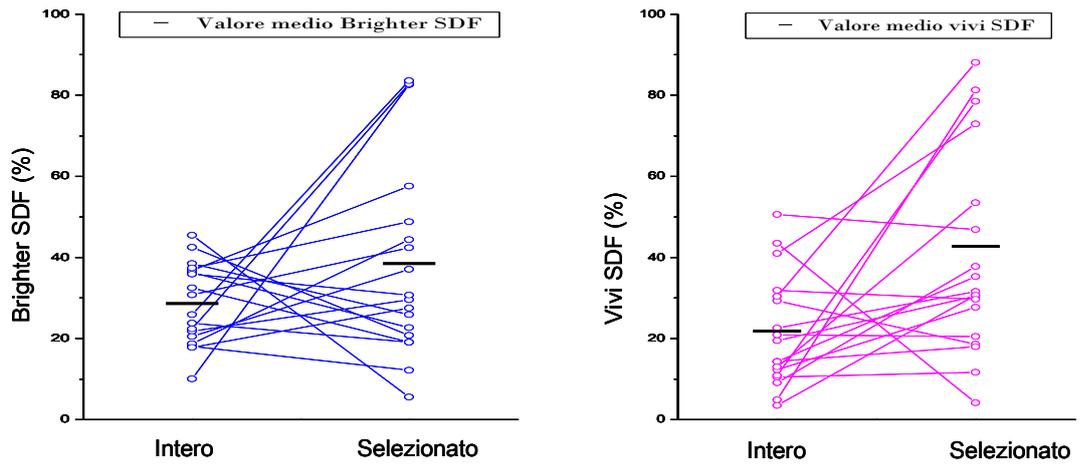


Figura 40 - Swim up diretto. Andamento nei singoli pazienti ($n=18$) dei valori di SDF valutati nella popolazione brighter (grafico a sinistra) e nei soli spermatozoi vivi (grafico a destra), prima e dopo la selezione con Swim up diretto. Le linee rappresentano le medie dei valori di frammentazione.

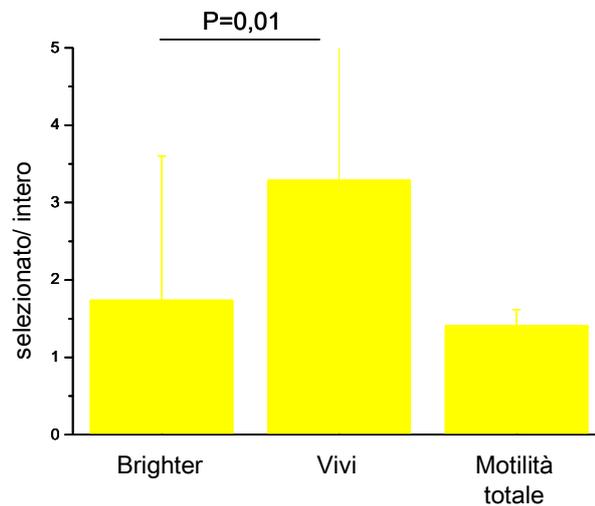


Figura 41- Variazione (espressa come rapporto fra valore prima e dopo la selezione) dei valori di SDF-brighter, SDF-vivi e di motilità totale rivelate durante la selezione con Swim up indiretto($n=18$).

Su 14 campioni sono state eseguite entrambe le tecniche di selezione (*Swim up diretto ed indiretto*) e confrontate le percentuali di SDF dopo la selezione (sia della brighter che dei vivi, **Figura 42**) con le due metodiche nei diversi soggetti. I risultati mostrano che, dopo selezione, non c'è una differenza tra i valori medi per entrambi i parametri presi in esame (SDF brighter diretto: $36,5 \pm 24,1\%$ vs indiretto: $36,2 \pm 20,7\%$; $p=ns$; SDF vivi diretto: $39,8 \pm 25,6\%$ vs indiretto: $40,9 \pm 24,6\%$; $p=ns$), indicando che lo *Swim up* diretto, per quanto meno invasivo dell'indiretto, non comporta miglioramenti in termini di integrità cromatinica.

Come si può osservare, negli stessi pazienti l'impiego di una tecnica piuttosto che dell'altra porta a risultati molto diversi tra loro, ovvero per alcuni soggetti l'applicazione della metodica diretta, teoricamente meno invasiva, comporta la presenza di livelli di SDF sia della brighter che dei vivi molto più elevati rispetto alla metodica indiretta. In molti pazienti invece si osservano livelli di SDF solo lievemente minori con lo *Swim up* diretto rispetto all'indiretto. Questi risultati ci confermano che non è la metodica ad influire sugli esiti della selezione quanto piuttosto una diversa suscettibilità cromatinica.

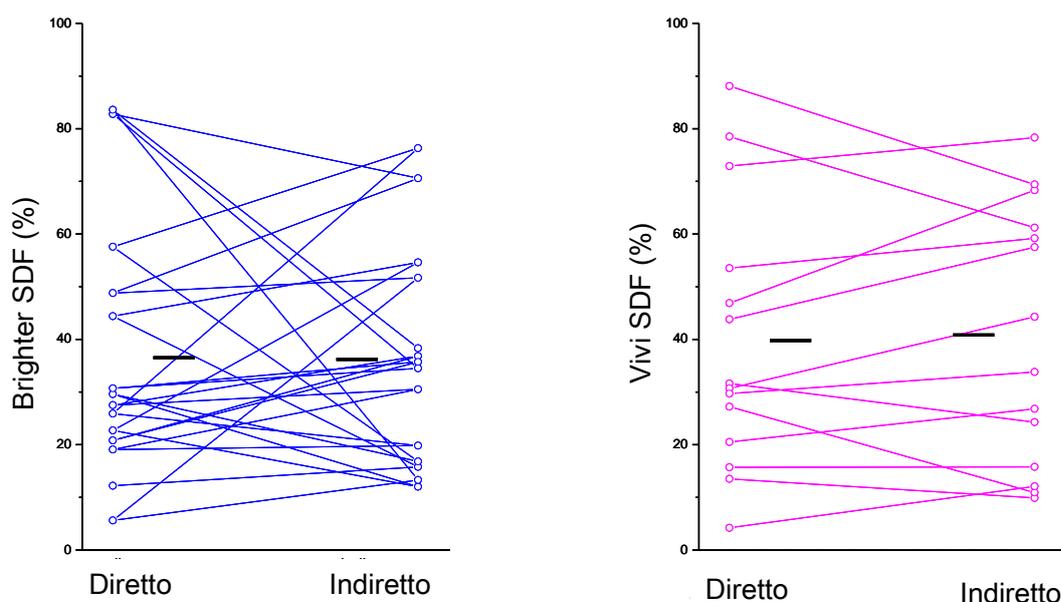


Figura 42 - Confronto fra la SDF nella popolazione brighter e nella frazione vitale degli stessi campioni di liquido seminale dopo selezione con *swim up* diretto ed indiretto.

4.6 VALUTAZIONE DELLA SDF IN SPERMATOZOI VITALI DI SOGGETTI FERTILI ED INFERTILI

Per valutare se la SDF negli spermatozoi vitali avesse implicazioni anche sulla riproduzione naturale, abbiamo valutato i livelli di frammentazione con la tecnica liveTUNEL e ne abbiamo confrontato i valori tra due gruppi di soggetti, fertili (che avevano concepito entro un anno dall'esecuzione del test) (n=40) ed infertili (n=43). I parametri seminali della casistica in esame sono riportati nella **Tabella 6**. I due gruppi non presentano differenze significative in merito ai parametri seminali esaminati fatta eccezione per l'età, che evidenzia come il gruppo dei soggetti infertili sia costituito da uomini con un'età significativamente più alta rispetto ai fertili ($p < 0,001$).

La SDF nei due gruppi è stata valutata nella popolazione totale, nella sola brighter e dimmer e nei soli vivi con la tecnica live TUNEL. Dall'analisi dei dati è emerso che i soggetti infertili hanno livelli significativamente maggiori di SDF sia per quanto riguarda la SDF totale ($p < 0,05$) che brighter ($p < 0,05$) ed in modo maggiormente significativo per quanto riguarda i soli vivi ($p < 0,01$) (valori medi di SDF mostrati in **Tabella 7** ed in **Figura 43**). Questi risultati evidenziano come anche per la riproduzione naturale vi sia un forte impatto della SDF soprattutto quando analizzata negli spermatozoi vivi, che ricordo sono quelli direttamente coinvolti nella fertilizzazione dell'ocita.

	FERTILI	INFERTILI	p
Età	33,3± 11	41,1± 5	p <0,001
Concentrazione (10⁶/ml)	63,3 ± 43,6	69,1± 55,4	p= ns
Numero totale (milioni/eiaculato)	176,4 ±114,7	233,6± 192,7	p= ns
Motilità progressiva(%)	51,7 ± 15,9	48,3 ± 16,2	p= ns
Immobili (%)	36,5 ± 13,6	41,2 ± 13,8	p= ns
In situ (%)	11,8 ± 14,9	10,6 ± 4,7	p= ns
Forme normali (%)	6,1 ± 3,9	6,7 ± 6,5	p= ns

Tabella 6: Valori medi dei parametri seminali, di soggetti fertili ed infertili.

	FERTILI	INFERTILI	p
SDF Brighter (%)	23,4± 10,1	30,2± 16	p<0,05
SDF Dimmer (%)	9,8 ± 5,8	11,1± 7,9	p= ns
SDF Totale (%)	33,2 ±12,9	41,6± 18,8	p<0,05
SDF Vivi (%)	6,9 ± 4,3	24 ± 18,7	p<0,01

Tabella7: Valori medi dei valori di SDF di soggetti fertili ed infertili.

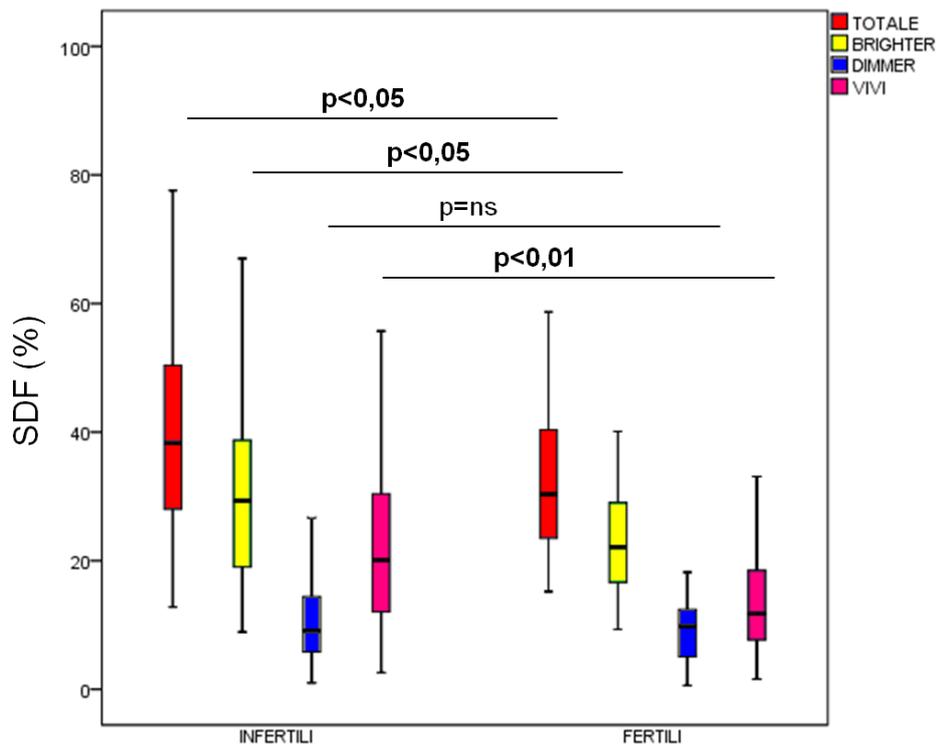


Figura 43: Valori medi dei valori di SDF totale (rosso), brighter (giallo), dimmer (azzurro) e dei vivi (rosa) di soggetti fertili ed infertili.

4.7 ASSOCIAZIONE DI SDF CON 8-OHDG, MDA E ATTIVITÀ CASPASICA IN SPERMATOZOI VITALI

Come menzionato nell'Introduzione della presente tesi (Paragrafo 1.7), lo studio dei meccanismi che generano la SDF nell'intera popolazione degli spermatozoi ha dimostrato che i marker di stress ossidativo erano concomitanti alla presenza di SDF solo quando si considerava la sola popolazione brighter, che, lo ricordo ancora una volta, contiene sia spermatozoi vitali che non vitali. Ciò ci ha fatto pensare che sia proprio la frazione vitale all'interno della brighter quella dove lo stress ossidativo avesse il ruolo predominante. Pertanto, lo studio dei meccanismi di genesi della SDF, è stato approfondito studiando la presenza concomitante di frammentazione e marker di ossidazione (8-OHDG e MDA) e apoptosi (caspasi) nella sola frazione vitale degli spermatozoi con la tecnica LiveTUNEL. La rilevazione simultanea di SDF con i marker di ossidazione (**Figura 44 A e B**) nel campione basale, ha mostrato che le

percentuali medie di co-presenza dell'SDF negli spermatozoi vitali con la 8-OHdG (n=6) e la MDA (n=6) risultano, rispettivamente, del $4.1\pm 2.4\%$ e del $10.8\pm 7.0\%$, mentre nel $14.6\pm 9.8\%$ e nel $35.9\pm 9.9\%$ degli spermatozoi totali, rispettivamente per l'8-OHdG e per la MDA, è presente il solo danno ossidativo. Inoltre, la percentuale di spermatozoi esprimenti i marker di ossidazione è statisticamente maggiore per i frammentati rispetto ai non frammentati, sia per 8-OHdG che per l'MDA (Figura 45A e B, pannelli in basso).

Nel campione basale, la rivelazione simultanea di SDF con le caspasi (n=7) (**Figura 44 C**) ha mostrato che i due parametri sono concomitanti nel $5.7\pm 2.9\%$ degli spermatozoi vivi, mentre il $3.3\pm 1.8\%$ mostra il solo tratto apoptotico. Anche in questo caso, abbiamo trovato che la percentuale di apoptosi è statisticamente maggiore negli spermatozoi frammentati rispetto a quelli non frammentati (Figura 44C, pannello in basso). Di interesse, relativamente alle cellule frammentate, non c'è differenza statistica fra la percentuale di apoptosi e quella di ossidazione, quest'ultima valutata sia come 8-OHdG che come MDA.

I risultati ottenuti per la frazione vitale degli spermatozoi, hanno pertanto evidenziato non solo una maggiore co-presenza di danno ossidativo negli spermatozoi vivi frammentati (8-OHdG: $53.9\pm 15.6\%$; MDA: $66.0\pm 20.7\%$;) rispetto a quanto visto per la sola popolazione brighter (8-OHdG: $19.0\pm 10.5\%$; MDA: $24.4\pm 10.5\%$) ma hanno anche evidenziato la presenza di una quota più elevata di danno ossidativo sia nucleare (brighter: 13.4 ± 6.4 vs vivi: $18.36\pm 9.19\%$) che di membrana (brighter: 19.7 ± 7.8 vs vivi: $46.7\pm 14.4\%$), suggerendo come tale danno fosse evidentemente sottostimato dalla presenza delle cellule morte. Inoltre, anche nella frazione vitale degli spermatozoi eiaculati, si conferma il ruolo causativo dell'apoptosi nei confronti della sDF.

Poiché risulta evidente che, negli spermatozoi vitali frammentati, una larga fetta esprime sia segni di apoptosi che di danno ossidativo abbiamo anche voluto investigare se vi fosse una co-presenza dei marker di stress ossidativo ed attività caspatica. A questo scopo, dopo staining con L10120 abbiamo marcato simultaneamente i nostri campioni (n=6) sia per 8-OHdG che per attività caspatica. Come mostrato nei dot plot in **Figura 45**, seppure una quota di

spermatozoi vivi esprima il solo marker 8-OHdG, risulta evidente come gran parte delle cellule che presentano attività caspasi presentino anche il danno ossidativo nucleare.

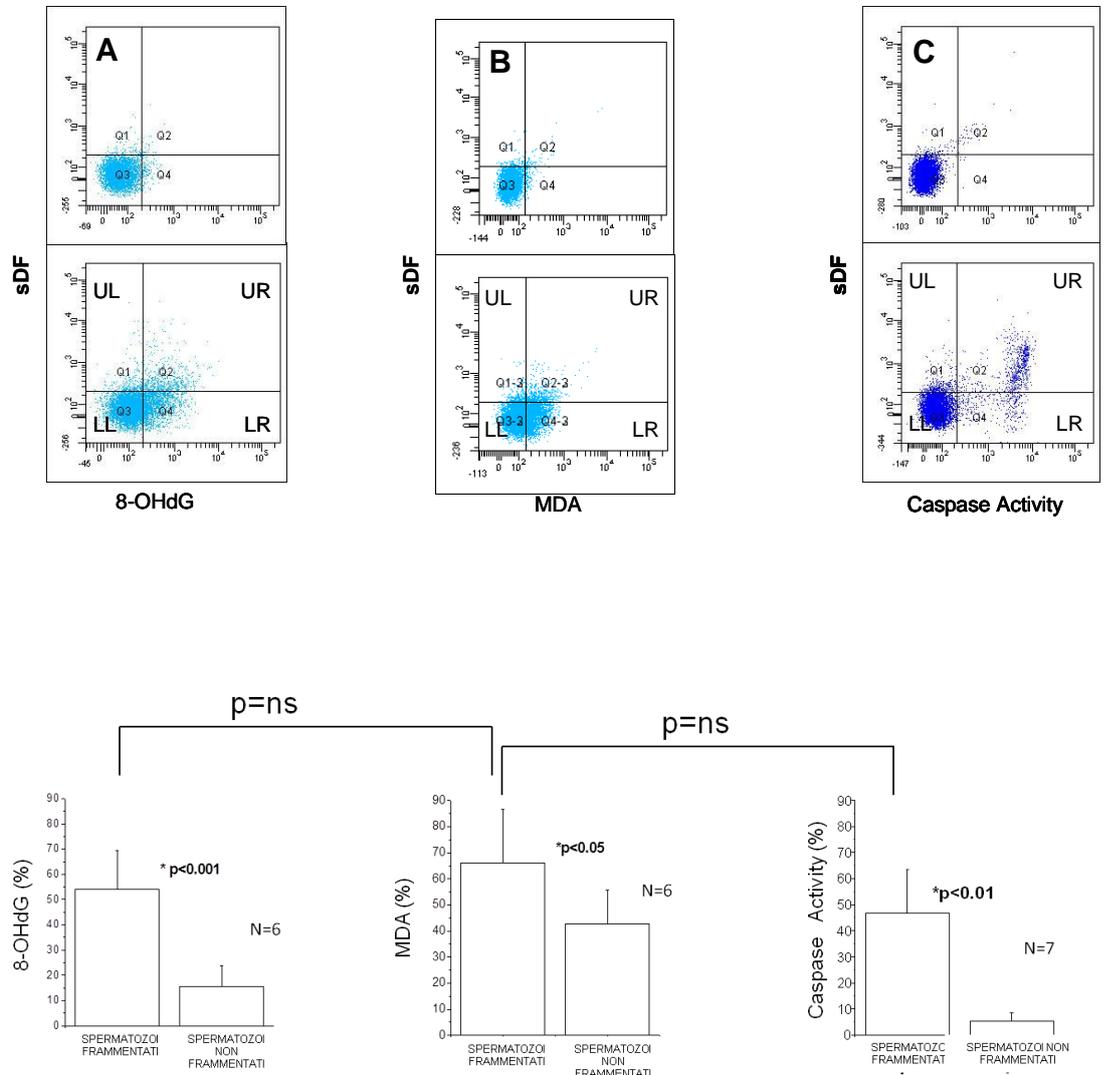


Figura 44 Analisi multiparametriche nella frazione vitale degli spermatozoi, identificata grazie alla colorazione con L10120. Dot plots che riportano la colocalizzazione tra SDF e rispettivamente 8-OHdG (A), MDA (B), FLICA (C). Nei grafici sono riportate le relative espressioni dei 3 markers nella frazione dei frammentati ($UR/(UL+UR)$) e non ($LR/(LL+LR)$).

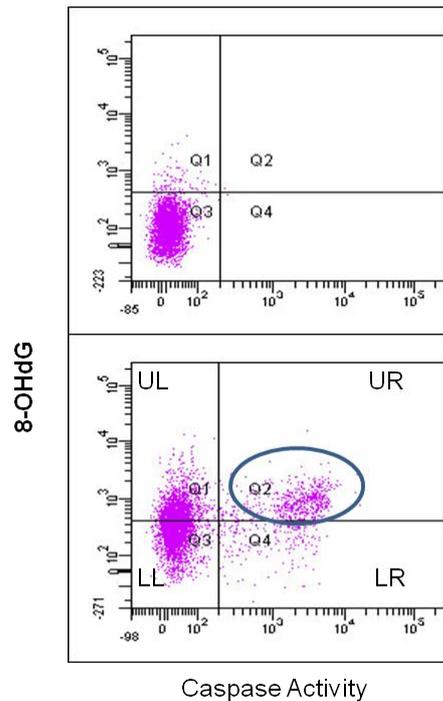


Figura 45 *Analisi multiparametrica nella frazione vitale degli spermatozoi. Dot plots che riportano nel pannello in alto il controllo negativo e nel pannello in basso il campione test. La colocalizzazione tra 8-OHdG e FLICA è evidenziata nel cerchio in blu all'interno del quadrante UR.*

4.8 ASSOCIAZIONE DI SDF CON 8-OHDG E ATTIVITÀ CASPASICA IN SPERMATOZOI VITALI DURANTE INCUBAZIONE IN VITRO

I risultati che abbiamo visto nel capitolo precedente indicano il ruolo dell'apoptosi e dello stress ossidativo nella genesi di SDF negli spermatozoi vivi. Tale conclusione è dedotta da come i segni apoptotici e quelli ossidativi si distribuiscono nelle cellule frammentate e non, in campioni immediatamente dopo l'eiaculazione. Per verificare il meccanismi dedotti, abbiamo allestito esperimenti di incubazione in vitro durante i quali è ben noto che si sviluppa una frazione di danno al DNA addizionale rispetto al tempo basale (prima dell'incubazione, Muratori et al, 2003). Tali esperimenti consentono infatti di valutare in dinamico i meccanismi di genesi della SDF e più in particolare il

coinvolgimento dell'apoptosi e dello stress ossidativo. A questo scopo, abbiamo ripetuto lo studio della concomitanza tra SDF e sia 8-OHdG (n=5) che attività caspatica (n=5), sia in condizioni basali che dopo un 'incubazione di 24 ore.

A questo scopo i campioni sono stati marcati al tempo 0 con L10120 , quindi una parte è stata immediatamente processata per le nostre analisi triparametriche mentre l'altra è stata incubata per 24 ore e poi processata (vedi Paragrafo 3.1). Questa procedura ci consente di eliminare dalle nostre analisi le cellule morte che sappiamo andare incontro a SDF con meccanismi aspecifici (Mitchell,2011) rappresentando quindi un fattore confondente in questo tipo di studio.

Poiché, a questo scopo, la sonda L10120 doveva essere impiegata per incubare cellule marcate per 24 ore, abbiamo preliminarmente valutato se l'incubazione per un tempo così lungo avesse un effetto tossico sugli spermatozoi. Pertanto, abbiamo valutato la vitalità (mediante l'uso del colorante nucleare YO-PRO-1) su 8 campioni incubati per 24 ore con e senza la sonda Live/Dead Fixable Far Red Dead Cell Stain Kit.

I risultati che abbiamo ottenuto mostrano che dopo 24 ore di incubazione la sonda non ha effetto tossico sugli spermatozoi (vitalità T24 campioni marcati con L10120 $39.6 \pm 12,1$ % vs vitalità T24 campioni non marcati con L10120: 37.7 ± 15.2 % , p=ns; **Figura 46**).

Tale risultato ci ha portato a concludere che quindi questa sonda potesse essere impiegata per i successivi esperimenti di incubazione in vitro.

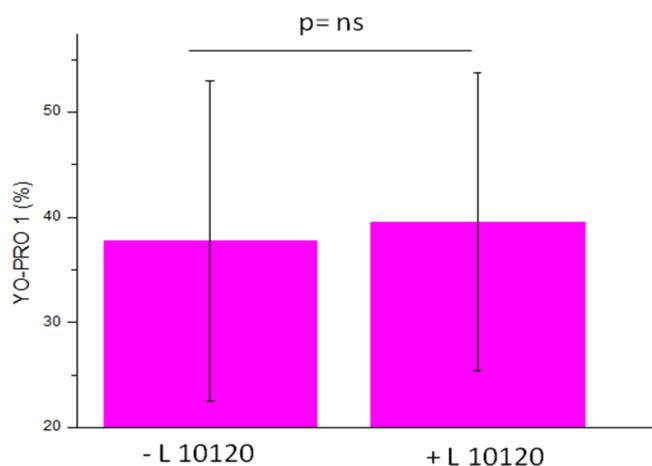


Figura 46 Vitalità a T24 di campioni marcati e non con L10120. Come si può vedere la sonda non ha effetti tossici sugli spermatozoi.

Gli esperimenti in dinamico che riguardano la SDF negli spermatozoi vitali e attività apoptotica (in **Figura 47 A** un tipico dot plot di questi esperimenti), indicano che nelle 24 ore vi è un aumento statisticamente significativo sia della SDF (T0: $11,9 \pm 6,3\%$, T24: $44,4 \pm 14,4\%$; $p < 0,01$) che dell'attività caspatica (T0: $8,8 \pm 3,7\%$, T24: $36 \pm 24,8\%$; $p < 0,05$). Ad indicare che i due fenomeni (SDF e apoptosi) siano fra loro dipendenti è il fatto che il loro incremento è dovuto all'aumento della frazione cellulare che presenta contemporaneamente sia l'apoptosi che la SDF. (T0: $4,6 \pm 2,2\%$, T24: $28,2 \pm 18,2\%$; $p < 0,05$). Infatti, andando a valutare l'incremento dei parametri presi in esame nelle 24 ore ($\Delta T24-T0$) , rappresentato in **Figura 47B**, si può notare come l'aumento della SDF uguaglia quello delle caspasi ed entrambi uguagliano quello della frazione cellulare con concomitanza di sDF e apoptosi.

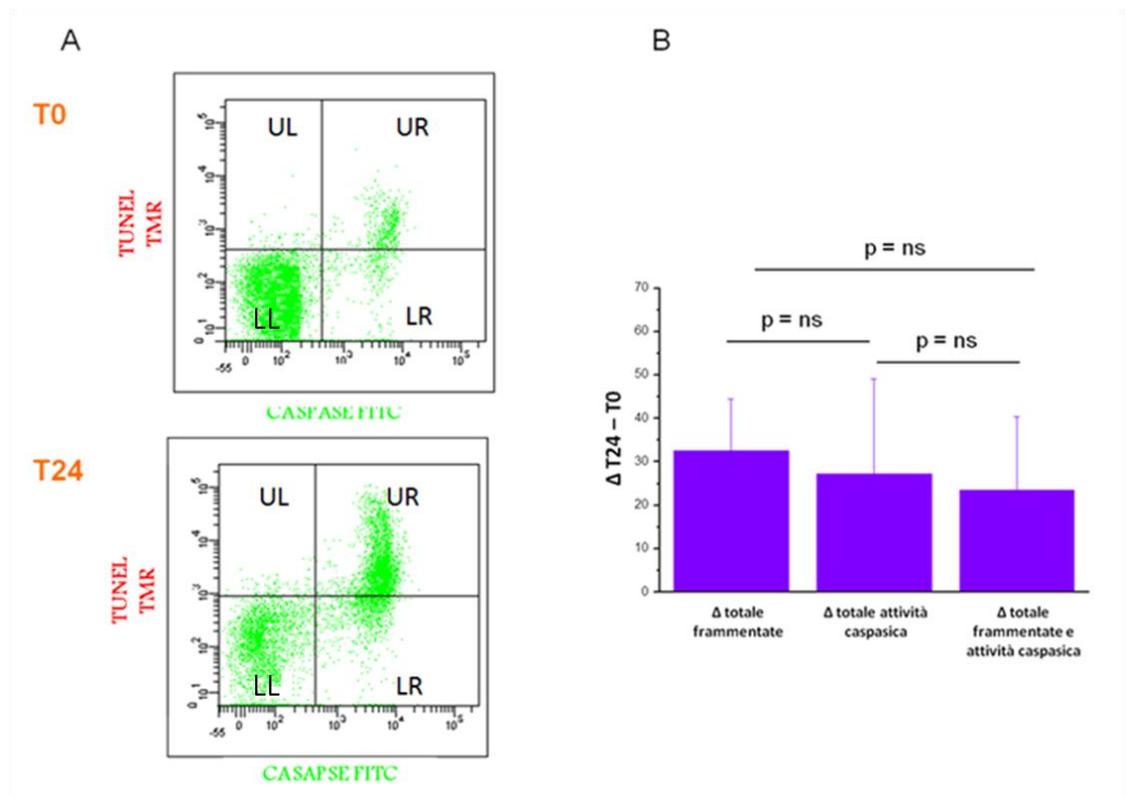


Figura 47 Analisi multiparametrica degli esperimenti di incubazione *in vitro* nella frazione vitale degli spermatozoi . A: Dot plots che riportano nel pannello in alto il T0 e nel pannello in basso il T24. Da notare come dopo l'incubazione l'aumento delle cellule frammentate (quadranti UL e UR) e di quelle apoptotiche (quadranti LR e UR) siano quasi totalmente dovuti all'aumento delle cellule sia frammentate/apoptotiche (quadranti UR). La colocalizzazione tra SDF e FLICA è rappresentata nel quadrante UR. B: grafici che riportano l'incremento nelle 24 ore dei parametri presi in esame. Come si può notare l'aumento della SDF si accompagna a quello di attività apoptotica.

Gli esperimenti in dinamico che riguardano SDF e danno ossidativo nucleare (la **Figura 48 A** riporta un dot plot tipico di questi esperimenti), indicano anche in questo caso che nelle 24 ore negli spermatozoi vivi aumentano in modo statisticamente significativo sia la SDF (T0: $13,2 \pm 9,9\%$, T24: $63,5 \pm 25,1\%$; $p < 0,01$) che l'8-OHdG (T0: $12,6 \pm 7,2\%$, T24: $31,2 \pm 8,7\%$; $p < 0,05$). Ad incrementare in modo significativo sono anche i vivi che presentano sia SDF che 8-OHdG (T0: $3,6 \pm 2,1\%$, T24: $19,2 \pm 7,7\%$; $p < 0,05$).

Valutando l'incremento dei parametri presi in esame nelle 24 ore ($\Delta T24-T0$), rappresentato in **Figura 48B**, si può notare come solo una parte della SDF che si genera ex novo sia associata all'azione dei ROS..

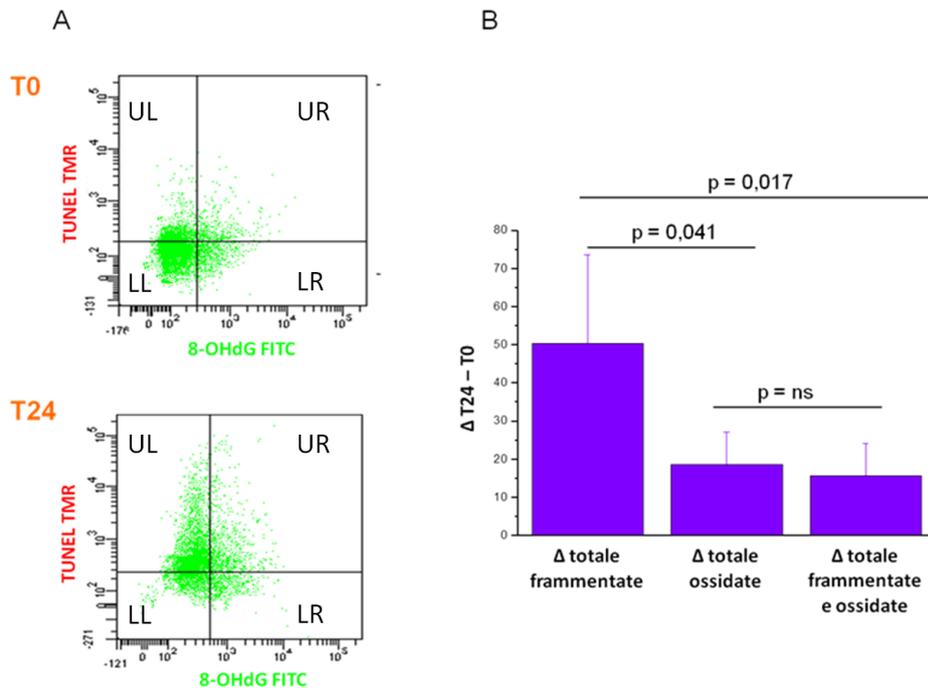


Figura 48 Analisi multiparametrica degli esperimenti di incubazione *in vitro* nella frazione vitale degli spermatozoi . A: Dot plots che riportano nel pannello in alto il T0 e nel pannello in basso il T24. La colocalizzazione tra SDF e 8-OHdG è rappresentata nel quadrante UR. B: grafici che riportano l'incremento nelle 24 ore dei parametri presi in esame. Come si può notare l'aumento della SDF si accompagna solo in parte a quello del danno indotto da ROS ($p=0,041$).

Come precedentemente riportato, l'incremento dell'ossidazione si sovrappone totalmente all'incremento della frazione di cellule che sono sia ossidate che frammentate (Figura 48). Questo fa pensare ad un ruolo causativo dell'ossidazione nei confronti della frammentazione. Tuttavia, poiché

l'aumento della frammentazione si accompagna totalmente all'aumento dell'attività caspasi (Figura 47), si deduce che l'ossidazione agisca nell'indurre frammentazione attraverso un pathway apoptotico. Per verificare tale deduzione abbiamo allestito una tecnica volta a rilevare contemporaneamente sia le caspasi che l'8-OHdG, di cui in Figura 49 sono riportati dei tipici tracciati. Con questa tecnica, valuteremo se l'aumento dell'ossidazione si accompagna a quello dell'apoptosi, risultato suggestivo dell'ipotesi che l'ossidazione agisca attraverso induzione di apoptosi nel generare la SDF.

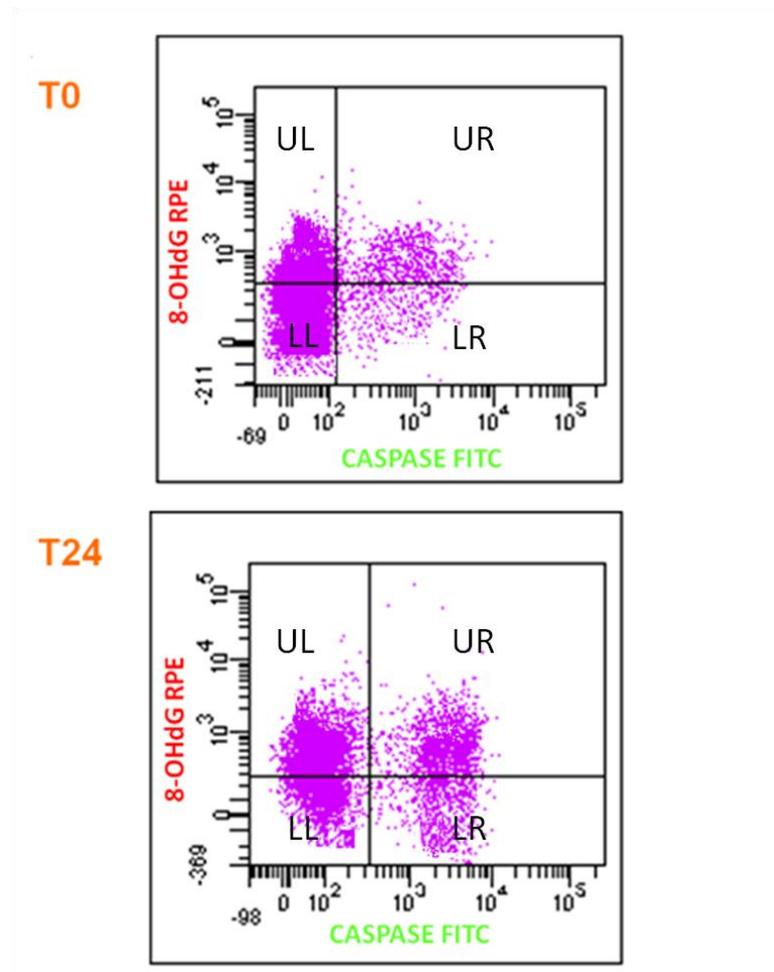


Figura 49 Analisi multiparametrica degli esperimenti di incubazione in vitro nella frazione vitale degli spermatozoi . A: Dot plots che riportano nel pannello in alto il T0 e nel pannello in basso il T24. La colocalizzazione tra attività caspasi e 8-OHdG è rappresentata nel quadrante UR.

5 DISCUSSIONE

5.1 SIGNIFICATO CLINICO DELLA FRAMMENTAZIONE DEL DNA NEGLI SPERMATOZOI

5.1.1 FRAMMENTAZIONE DEL DNA DURANTE LA PREPARAZIONE DEGLI SPERMATOZOI PER LE TECNICHE DI FECONDAZIONE ASSISTITA

La prima parte del presente lavoro di tesi ha preso in considerazione l'effetto sui livelli di SDF (totale e brighter) delle procedure di selezione adottate nei centri di PMA per la preparazione degli spermatozoi e l'impatto dei livelli di SDF, sia totale che a carico della sola popolazione brighter, sugli esiti riproduttivi di coppie sottoposte a cicli di PMA di secondo livello. La relazione fra SDF e outcome riproduttivi nella PMA è ancora oggetto di discussione nella letteratura internazionale, in quanto i risultati degli studi sono molto contrastanti (Tamburrino et al., 2012). Infatti ci sono sia studi che riportano un impatto negativo della SDF sugli indici riproduttivi precoci e sul rate di gravidanza, che studi che non osservano alcun effetto del danno al DNA spermatico sugli esiti delle PMA (Tamburrino et al., 2012). E' possibile che le controversie negli studi condotti finora siano spiegabili con l'estrema eterogeneità delle loro caratteristiche, quali la selezione delle coppie, la popolazione (seme o campione capacitato) su cui viene studiata la SDF, la tecnica utilizzata per rivelare la SDF, i cut off stabiliti per le analisi statistiche (Zini et al 2011). Questo studio è stato condotto utilizzando come tecnica per la rivelazione della SDF, la metodica del TUNEL/PI (Muratori et al., 2010). Il TUNEL/PI consente non solo di eliminare dall'analisi della frammentazione tutti gli interferenti presenti nel seme, ma anche di distinguere due popolazioni di spermatozoi (brighter e dimmer) con diverse caratteristiche. Infatti la popolazione dimmer è costituita da cellule che, oltre ad essere frammentate, sono morte e dunque presentano probabilità nulla di partecipare al processo di

fertilizzazione. Al contrario nella popolazione brighter le cellule frammentate potrebbero essere vive e dunque rappresentare la frazione di danno realmente impattante sulla riproduzione.

Utilizzando il TUNEL/PI, il primo scopo della tesi è stato valutare l'effetto sui livelli di SDF delle procedure di selezione adottate nei centri di PMA, in particolare della migrazione su gradiente di densità. I nostri dati dimostrano che, considerando i valori mediati fra tutti i pazienti, non si ha nessuna differenza fra i campioni interi e i loro corrispondenti selezionati (Figura 20). Tuttavia, considerando i pazienti individualmente, si scopre che in circa il 43% di essi si verifica un incremento di SDF dopo selezione (Figura 22B). Questi risultati possono spiegare le controversie esistenti in letteratura fra studi che riportano un aumento (Alvarez et al., 1993; Garcia-Alvarez., 2010) e quelli che riportano una diminuzione della frammentazione (Aitken et al., 2010) dopo selezione. In particolare i risultati contrastanti potrebbero derivare da diverse combinazioni, nei diversi lavori, di pazienti “buoni” (in cui la selezione come atteso riduce il danno) e “cattivi” (in cui invece la selezione comporta un incremento del danno). Un altro dato interessante è la constatazione che nei “cattivi”, i valori elevati della frammentazione si associano a valori altrettanto elevati della motilità (superiore all'80%) ad indicare la presenza di spermatozoi frammentati nella frazione mobile e quindi con la capacità di partecipare alla fertilizzazione dell'ovocita. Questa parte dello studio ha evidenziato che esiste una relazione piuttosto stretta ($r = 0,512$; $p < 0,001$) fra il valore basale e quello finale (dopo selezione) di SDF ovvero, maggiore è la frammentazione nel campione di partenza, maggiore è quella che viene ritrovata dopo selezione. Questo dato, unitamente al fatto che l'incremento di SDF non si verifica in tutti i pazienti, suggerisce che sia più la presenza di caratteristiche intrinseche del campione (ad esempio ridotta compattazione della cromatina) a favorire l'incremento della frammentazione del DNA durante selezione, che non la metodica utilizzata. In questo scenario, la seconda parte di questo lavoro di tesi si è posta come scopo quello di approfondire lo studio dell'effetto delle tecniche di selezione spermatica presenti nei laboratori di PMA sui livelli di SDF. In primo luogo, abbiamo messo a punto una nuova metodica di valutazione dell'SDF, che consentisse di quantificare il danno al DNA nella frazione vitale degli spermatozoi

(LiveTUNEL). L'importanza dell'utilizzo di tale tecnica si comprende considerando che la maggior parte degli spermatozoi frammentati presente nel seme è non vitale (Mitchell et al, 2011) e che, naturalmente, la selezione comporta un arricchimento in cellule vive della popolazione selezionata, come peraltro indicato indirettamente dall'incremento della motilità dopo selezione. Conseguentemente, i valori di SDF che si misurano nel selezionato sono il risultato, non solo del livello di danno, ma anche dell'eliminazione delle cellule morte. E' dunque possibile che un decremento di frammentazione durante la procedura sia imputabile alla semplice eliminazione delle cellule frammentate morte, mentre magari nelle vive (ovviamente più importanti dal punto di vista clinico) il danno rimane paragonabile o addirittura aumenta.

Quando con il LiveTUNEL abbiamo replicato gli esperimenti condotti con la tecnica tradizionale, abbiamo nuovamente dimostrato l'esistenza di campioni "buoni" e di campioni "cattivi". Inoltre, mediante la tecnica LiveTUNEL abbiamo potuto dimostrare che dopo CGD sono gli spermatozoi vitali che vengono danneggiati dalla selezione e non che, semplicemente, vengono selezionati gli spermatozoi vitali frammentati già presenti nel seme intero.

Un altro scopo dello studio era valutare se tecniche meno invasive della CGD potessero scongiurare l'aumento di SDF nei cattivi. Infatti, si pensa che a indurre il danno al DNA durante la centrifugazione su gradiente, sia la produzione di ROS (Reactive Oxygen Species) innescata dallo stress meccanico dovuto alla migrazione forzata delle cellule dentro il gradiente (Aitken et al,2010). In particolare, a produrre i ROS, sarebbe la frazione germinale più immatura (Aitken et al., 1998) (oltre che i leucociti se presenti (Mupfiga et al., 2013)) molto rappresentata anche nel seme dei soggetti normospermici. Sulla base di questa ipotesi, abbiamo valutato l'effetto sulla SDF della selezione con Swim up, che non prevede l'attraversamento del gradiente. Alla luce dell'ipotesi di lavoro, i risultati ottenuti sono sorprendenti, giacché anche utilizzando lo Swim up si osserva la presenza di campioni in cui la selezione induce un aumento del danno al DNA. Non solo, ma confrontando direttamente le due procedure di Swim up, al momento utilizzate (diretto e indiretto) non abbiamo riscontrato nessuna differenza, neanche con l'uso di quella diretta, che non prevede centrifugazioni. Il risultato è ancora più

sorprendente considerando che le cellule selezionate con lo Swim up diretto, al contrario di quello indiretto, non sono mai in contatto con la frazione immatura dell'eiaculato tranne in presenza del plasma seminale, che tuttavia contiene diverse difese antiossidanti (Henkel et al. 2003).

Considerando che il meccanismo più probabilmente responsabile dello sviluppo dei tagli alla doppia elica durante la selezione è l'attacco ossidativo, il nostro studio suggerisce che a provocare il danno al DNA, non siano tanto gli steps procedurali, ma la semplice esposizione dei gameti all'atmosfera ossidativa, in mezzi di coltura evidentemente non adeguati, ovvero sprovvisti di capacità protettiva nei confronti dello stress ossidativo. Il fatto che la procedura meno invasiva di Swim up (quello diretto) non implichi protezione delle cellule potrebbe suggerire anche che l'innescò sia la fase saliente del meccanismo di danno, il quale, una volta iniziato, procede indipendentemente dalle condizioni ambientali. Rimane totalmente da determinare quali siano le caratteristiche di vulnerabilità presenti nei campioni "cattivi", a causa delle quali le procedure selettive producono un danno addizionale anziché selezionare gameti dotati d'integrità cromatinica, come invece succede nei "buoni". Una maggiore suscettibilità alla produzione di specie ossidanti e/o una minore capacità di difesa dalle stesse rappresentano possibilità indagabili nel proseguo dello studio. Da notare che i nostri risultati sono in linea con recenti indagini che riportano come l'esito della selezione dipende dal paziente (Stevanato et al., 2008; Vioria et al., 2007). E' anche interessante notare che l'incremento della SDF dopo Swim up è riportato soprattutto da studi che utilizzano, per la rivelazione del danno al DNA, metodiche come il TUNEL o l'SCD test (Sperm Chromatin Dispersion) (Stevanato et al., 2008; Vioria et al., 2007) mentre l'utilizzo dell'SCSA (Sperm Chromatine Structure Assay) riporta invariabilmente una riduzione dei livelli di SDF dopo selezione (Spanò et al., 1999; Zini et al., 2000). Questa discrepanza potrebbe essere spiegata proprio dalla differenza fra le metodiche di rivelazione dell'SDF, che non valutano esattamente lo stesso tipo di danno. Questo studio apre scenari molto interessanti da un punto di vista clinico, ovvero sarebbe opportuno chiarire il pathway cellulare attraverso cui si sviluppa il danno in vitro e questo può gettare le basi per nuovi interventi tesi a limitare il danno genetico in questi soggetti. D'altra parte, essere in grado di individuare condizioni più idonee per

la manipolazione in vitro degli spermatozoi unitamente alla capacità di identificare preventivamente i soggetti “cattivi”, potrebbe migliorare gli esiti riproduttivi di questi ultimi.

5.1.2 FRAMMENTAZIONE DEL DNA NEGLI SPERMATOZOI ED ESITI DELLA FECONDAZIONE ASSISTITA

Per quanto riguarda lo studio dell’impatto della frammentazione sugli indici riproduttivi precoci e sull’ottenimento della gravidanza, la SDF è stata da noi misurata sia nella popolazione totale di spermatozoi che nella sola brighter e sia nel seme intero che in quello selezionato. Le analisi di correlazione fra la frammentazione e gli indici riproduttivi precoci, non hanno evidenziato nessuna associazione. E nessuna differenza nei valori di frammentazione è stata ritrovata tra le coppie che hanno ottenuto una gravidanza e quelle che invece hanno fallito. Inoltre, ci aspettavamo che utilizzando solo le coppie con partner appartenente ai “cattivi”, si smascherasse un maggior impatto della SDF misurata nella popolazione selezionata sugli indici riproduttivi. Tuttavia non abbiamo osservato nessun effetto della SDF, considerando i soli “cattivi”. Questo risultato potrebbe essere spiegato dal fatto che sembra esserci una sorta di esclusione naturale degli spermatozoi con danno al DNA da parte dell’ocita (Hourcade et al., 2010; Liu et al., 2007) in caso di FIVET e che nel nostro studio la stragrande maggioranza delle coppie è stata trattata proprio con tale tecnica. Il problema della presenza di spermatozoi mobili frammentati nel DNA potrebbe tuttavia rimanere per le coppie trattate con la ICSI nelle quali un partner appartenente alla categoria dei “cattivi” potrebbe aumentare il rischio di utilizzo di uno spermatozoo con DNA frammentato. Poiché le coppie trattate con ICSI rappresentano una minima parte nella nostra casistica saranno necessari altri studi per poter rispondere a questo quesito.

Poiché gli esiti riproduttivi dipendono naturalmente anche dal fattore femminile, le analisi tra SDF e esiti di riproduzione assistita sono state ripetute dopo aver selezionato la casistica eliminando le coppie in cui l’infertilità fosse dovuta, totalmente o in parte, alla partner femminile. Ciò ha permesso di

smascherare un impatto significativo della SDF sia sul FR che sull'IR. Infatti, (Tabella 5) abbiamo evidenziato una correlazione negativa tra la SDF, sia brighter che totale, del selezionato e gli indici riproduttivi precoci IR e FR. Inoltre, in considerazione che anche l'età è un fattore femminile di infertilità, abbiamo ulteriormente selezionato includendo solo le coppie in cui le donne avessero un'età ≤ 36 anni. Con tale casistica (n=41), (Tabella 6), per il FR la correlazione con la SDF del selezionato diventa ancora più stretta, suggerendo che anche l'età femminile rappresenta un fattore confondente negli studi che valutano l'impatto della SDF sugli esiti riproduttivi. È nota infatti l'importanza della qualità ovocitaria nel riparare i danni al DNA portati dallo spermatozoo (Ménézo et al., 2010), che, a sua volta, si pensa dipendere negativamente dall'età femminile. Questo significa che a parità del danno portato dallo spermatozoo l'esito può essere legato fortemente al riparo ovocitario, mascherando quindi l'impatto del fattore maschile. Infine dividendo le coppie in due gruppi a diverso IR e FR e confrontando i livelli di frammentazione brighter e totale sia dell'intero che del selezionato, si trova che le coppie con un basso IR ($=0$) presentano livelli significativamente più alti di SDF brighter del selezionato rispetto alle coppie con un IR favorevole. Similmente le coppie con basso FR ($\leq 0,5$) presentano livelli di SDF brighter del selezionato significativamente più alti delle coppie a FR $>0,5$. Nel loro insieme, questi risultati indicano che la SDF impatta negativamente sul FR e IR, quando misurata nel seme selezionato. Questo dato, se da una parte appare ovvio in quanto è proprio la popolazione selezionata quella usata per la fecondazione in vitro, è tuttavia in contrasto con i lavori di Marchetti (2002) e Bungum (2007), i quali mostrano che la SDF del seme intero è più predittiva dell'esito delle PMA rispetto al selezionato, i cui livelli di frammentazione non correlano con nessun parametro embrionario. Pertanto, il nostro è il primo studio che, grazie all'utilizzo di una metodica più precisa per la valutazione dell'SDF e, soprattutto, alla valutazione nella sola popolazione brighter, ha permesso di smascherare un'effetto dell'SDF nel seme selezionato sugli esiti di PMA.

Molto interessante è il fatto che l'influenza della SDF sulla riproduzione viene scoperta quando si azzerà il fattore femminile. Come brevemente accennato all'inizio, la composizione della casistica dello studio, con particolare riferimento all'esclusione del fattore femminile, appare un aspetto

determinante ed un elemento di disomogeneità fra gli studi che spesso trascurano questo criterio. Ad esempio in letteratura sono presenti vari lavori in cui gli autori non trovano nessun effetto sugli indici precoci né sul rate di gravidanza, utilizzando tuttavia casistiche che includono ampiamente fattori di infertilità femminili come endometriosi e fattori uterini (Benchaib, 2007; Esbert, 2011) oppure in alcuni casi i fattori di infertilità femminile non sono nemmeno specificati (Henkel 2003 e 2004; Avendano e Oehninger, 2011; Wang Min, 2014).

Per quanto riguarda l'impatto della SDF sull'ottenimento della gravidanza, al momento non abbiamo evidenziato alcuna differenza nei livelli di SDF sia dell'intero che del selezionato tra le coppie che hanno ottenuto o meno una gravidanza e tra le coppie con "bimbo in braccio" e quelle che invece hanno terminato con un aborto. Tuttavia la nostra casistica annovera un numero ancora ristretto di pazienti (15 su 101) che hanno ottenuto la gravidanza. Sarà necessario quindi ampliare la casistica per poter eventualmente scoprire differenze nei livelli di SDF tra chi ha portato a termine una gravidanza e chi no.

5.2 FRAMMENTAZIONE DEL DNA DEGLI SPERMATOZOI E CONCEPIMENTO NATURALE

Per quanto riguarda l'impatto clinico della SDF sul concepimento naturale, i risultati mostrati in questa tesi sembrano confermare le ipotesi appena descritte, ovvero come la valutazione della SDF nella sola frazione vitale degli spermatozoi sia in grado di evidenziare un impatto maggiore rispetto alla valutazione sull'intera popolazione. La tecnica LiveTunel ha infatti permesso di smascherare una quota di SDF che la presenza di spermatozoi non vitali nella popolazione PIbrighter non consentiva di valutare. Confrontando infatti i livelli di frammentazione del DNA tra soggetti di sicura fertilità e partner maschili di coppie infertili abbiamo visto come progressivamente la significatività della differenza dei livelli di SDF tra i due gruppi aumenta quando si passa dalla PIbrighter ($p < 0,05$) alla SDF dei soli vivi ($p < 0,01$).

Come è noto, uno spermatozoo con DNA frammentato è in grado di fecondare l'ovocita e, come di recente dimostrato (Yamauchi et al, 2012) il danno al DNA portato dallo spermatozoo può persistere almeno nelle prime fasi di sviluppo embrionale. Il nostro studio rivela pertanto un impatto della SDF sulla fecondazione naturale in accordo con studi precedenti eseguiti con metodiche diverse (Giwercman et al, 2010; Aitken et al, 2010; Spanò et al, 2000). I nostri risultati sulla frammentazione negli spermatozoi vivi della PIbrighter nei soggetti fertili ci incoraggiano ad andare avanti nello studio dell'impatto di questa popolazione sulla riuscita delle tecniche ART, che sarà il passo successivo della ricerca in questo campo. Nel complesso, i nostri dati suggeriscono che la valutazione della SDF degli spermatozoi vitali, possa avere un ruolo diagnostico nella valutazione del maschio infertile anche se sono necessari ulteriori studi per chiarire il suo impatto sia nella fertilità naturale che in quella assistita.

5.3 FRAMMENTAZIONE DEL DNA NEGLI SPERMATOZOI VITALI: MECCANISMI DI GENESI IN VITRO

L'ultimo aspetto che è stato preso in considerazione nel presente lavoro di tesi, è stata la valutazione dei meccanismi responsabili della genesi di SDF negli spermatozoi vivi. Come abbiamo visto nel Paragrafo 1.7 dell'Introduzione i risultati ottenuti dallo studio dei meccanismi di genesi della SDF indicano che le vie principali che portano alla frammentazione del DNA dello spermatozoo sono l'apoptosi e l'immatùrità cromatinica mentre lo stress ossidativo sembra avere un ruolo marginale, che diventa evidente solo quando si considera la popolazione PI^{brighter} degli spermatozoi (che contiene spermatozoi frammentati sia vitali che non vitali). Per questo motivo abbiamo studiato i meccanismi di genesi nella sola frazione vitale in quanto le cellule morte presenti nell'eiaculato, che sappiamo rappresentare una grande parte degli spermatozoi con SDF (Mitchell,2011), potrebbero andare incontro a frammentazione del DNA con meccanismi aspecifici. I risultati che abbiamo

ottenuto, riportati in Figura 45, hanno evidenziato come l'apoptosi e lo stress ossidativo giochino un ruolo chiave nella genesi di SDF anche negli spermatozoi vitali. Infatti, l'associazione tra 8-OHdG e frammentazione è diventata molto più stretta ($p < 0,05$ con la PI^{brighter} vs $p < 0,001$ per i vivi). È interessante notare che la frequenza di ossidazione (8-OHdG e MDA) in spermatozoi frammentati è simile a quella dell'apoptosi, suggerendo che, negli spermatozoi vivi, l'ossidazione (riflesso dalla presenza di 8-OHdG ed MDA) può attivare un percorso apoptotico portando a SDF (riflesso dalla concomitante presenza di sDF con 8-OHdG/MDA e caspasi) coerenti con molti studi eseguiti trattando in vitro con composti ossidanti gli spermatozoi (Grizard et al., 2007; Lozano et al., 2009; Martínez-Pastor et al., 2009; Kang et al., 2012). La presenza di spermatozoi vitali che presentano contemporaneamente attività caspasi e danno ossidativo sembra confermare la nostra ipotesi di associazione diretta tra i due meccanismi causativi della genesi di SDF nei vivi. Possiamo ipotizzare infatti che l'apoptosi sia innescata dai ROS durante il transito nelle vie genitali maschili e che essa culmini nell'attivazione delle nucleasi responsabili dell'insorgere dei tagli al DNA. Da qui il ritrovamento nell'eiaculato di spermatozoi vivi con DNA frammentato e segni sia ossidativi che apoptotici.

Per approfondire ulteriormente questo aspetto abbiamo effettuato uno studio in dinamico sulla genesi della SDF in vitro negli spermatozoi vivi. Ovvero abbiamo voluto investigare i meccanismi responsabili della genesi di SDF dopo l'eiaculazione. Che la frammentazione del DNA si sviluppasse "de novo" in modo spontaneo dopo l'eiaculazione durante incubazioni in vitro è infatti noto (Muratori et al., 2003; Cicarè 2014, Lopes, 1998; Nabi, 2014). È altresì noto che trattamenti in grado di indurre stress ossidativo o apoptosi erano in grado di indurre un aumento della SDF (Nakagawa, 1997; Bennetts, 2008; De Iulii, 2009). Ciò che è poco chiaro riguarda i meccanismi di genesi della SDF spontanea. Inoltre gli studi in vitro sui meccanismi di genesi possono anche aiutare a capire se i meccanismi ipotizzati per la SDF endogena (apoptosi abortiva e stress ossidativo) siano effettivamente in grado di produrre il danno. I risultati ottenuti in questa ultima parte della tesi mostrano come la genesi di SDF (questa volta *de novo*, ovvero a livello post testicolare) sia chiaramente associata ad attività apoptotica, come si può vedere dalla Figura

47, dove tutto l'incremento *de novo* della SDF si accompagna in ugual misura a quello di attività caspatica. Per il danno ossidativo invece il quadro appare più complesso, in quanto solo una piccola parte della SDF che si genera in vitro è associata a 8-OHdG, mentre la quasi totalità dell'incremento della frammentazione non vi si associa. Pertanto, visto che la totalità degli spermatozoi frammentati *de novo* mostravano anche attività caspatica, abbiamo pensato che anche lo stress ossidativo potesse indurre il danno al DNA attraverso l'induzione di un processo apoptotico (coerentemente con l'ipotesi formulata precedentemente riguardo il danno endogeno negli spermatozoi vitali). Valutando la presenza contemporanea di apoptosi e danno ossidativo al DNA valuteremo, anche per gli esperimenti in dinamico, se l'attività caspatica che si genera nelle 24 ore sia tutta associata a 8-OHdG. Nel loro complesso quindi i dati del nostro studio in dinamico dimostrano che gli spermatozoi vitali vanno incontro ad apoptosi anche dopo la spermiiazione e l'eiaculazione e che quindi esiste un meccanismo apoptotico diverso da quello che avviene a livello testicolare, ovvero un meccanismo apoptotico verosimilmente mediato dall'insulto ossidativo. Durante l'incubazione in vitro, tuttavia, non tutto il danno apoptotico può essere spiegato dallo stress ossidativo e bisogna ipotizzare che meccanismi aspecifici (probabilmente legati ai costituenti presenti nei mezzi di coltura degli spermatozoi) sono in grado di indurre apoptosi.

5.4 CONCLUSIONE

In conclusione lo studio da me portato avanti durante il dottorato, ha permesso di valutare l'impatto della frammentazione del DNA nella popolazione vitale degli spermatozoi sia sulla fecondazione naturale che assistita. Ha inoltre evidenziato, per la prima volta, l'esistenza di soggetti che, per caratteristiche seminali intrinseche, vanno incontro ad un aumento della SDF nella frazione vitale degli spermatozoi.

Inoltre, il nostro è stato il primo studio che ha valutato tutti i principali meccanismi ipotizzati per l'origine della SDF verificando direttamente i segni

di tali meccanismi in spermatozoi vitali con frammentazione del DNA. I nostri risultati hanno dimostrato che la via principale che porta alla formazione di rotture del DNA è un processo apoptotico innescato dallo stress ossidativo durante il transito nel tratto genitale maschile ed anche dopo l'eiaculazione. Questi risultati potrebbero aprire nuove prospettive terapeutiche per il trattamento dei soggetti infertili e per la manipolazione del liquido seminale durante le tecniche di fecondazione assistita, incentivando la ricerca di sostanze in grado di inibire l'attivazione del processo apoptotico o lo stress ossidativo.

6 BIBLIOGRAFIA

Agarwal A and Said TM. Sperm chromatin assessment. Textbook of ART, 2nd Edition. 2004a; 93-106.

Ahmadi A, Ng SC. Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. *J Exp Zool.* 1999; 284:696-704.

Aitken RJ and Krausz C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction.* 2001; 122:497-506.

Aitken RJ, Baker MA. Oxidative stress and male reproductive biology. *Reprod Fertil Dev.* 2004; 16:581-8.

Aitken RJ, De Iuliis GN, Finnie JM, Hedges A, McLachlan RI. Analysis of the relationships between oxidative stress, DNA damage and sperm vitality in a patient population: development of diagnostic criteria. *Hum Reprod* 2010; 25: 2415-26.

Aitken, R. J. and Clarkson, J. S., «Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques,» *J. Androl.*, vol. 9, pp. 367-376, 1998.

Alvarez JG, Lasso JL, Blasco L, Nuñez RC, Heyner S, Caballero PP, Storey BT. Centrifugation of human spermatozoa induces sublethal damage; separation of human spermatozoa from seminal plasma by a dextran swim-up procedure without centrifugation extends their motile lifetime. *Hum Reprod.* 1993 Jul;8(7):1087-92.

Alvarez JG. The predictive value of sperm chromatin structure assay. *Hum Reprod.* 2005; 20:2365-7.

Aravindan GR, Bjordahl J, Jost LK, Evenson DP. Susceptibility of human sperm to in situ DNA denaturation is strongly correlated with DNA strand breaks identified by single-cell electrophoresis. *Exp Cell Res* 1997; 236:231-237.

Avendaño C, Oehninger S.; DNA fragmentation in morphologically normal spermatozoa: how much should we be concerned in the ICSI era? *J Androl.* 2011 Jul-Aug;32(4):356-63.

Baccetti B. Lo spermatozoo umano. In: Conti Isidori "Trattato di andrologia" Padova, Italia, Ed Piccin 1984; 157-197.

Bailey JL. Factors regulating sperm capacitation. *Syst Biol Reprod Med.* 2010; 56:334-48.

Bakos HW, Thompson JF, Feil D, Lane M. Sperm DNA damage is associated with assisted reproductive technology pregnancy. *Int J Androl* 2008 Sep; 31(5):518-26.

Balhorn R. A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. *J Cell Biol.*

1982; 93:298-305.

Benchaib Mehdi, ValeÂrie Braun, Jacqueline Lornage, Samia Hadj, Bruno Salle, HerveÂ Lejeune and Jean FrancËois GueÂri Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique, *Human Reproduction* Vol.18, No.5 pp. 1023±1028, 2003.

Bennetts LE, De Iuliis GN, Nixon B, Kime M, Zelski K, McVicar CM, Lewis SE, Aitken RJ. Impact of estrogenic compounds on DNA integrity in human spermatozoa: evidence for cross-linking and redox cycling activities. *Mutat Res.* 2008 May 10;641(1-2):1-11.

Borini A, Tarozzi N, Bizzaro D, Bonu MA, Fava L, Flamigni C, Coticchio G. Sperm DNA fragmentation: paternal effect on early post-implantation embryo development in ART. *Hum Reprod.* 2006 Nov;21(11):2876-81. Epub 2006 Jun 22.

Bungum M, Humaidan P., Axmon A., Spano M., Bungum L., Erenpreiss J. and Giwercman A. Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome, *Human Reproduction* Vol.22, No.1 pp. 174–179, 2007.

Chen Z, Feng M, Chen Y, Wei H, Li L, Wu T, Zhang S. The progress of sperm functional proteins regulating the process of fertilization. *Yi Chuan* 2014 Aug; 36 (8):747-55.

Cicar  J, Caille A, Zumoffen C, Ghersevich S, Bahamondes L, Munuce MJ. In vitro incubation of human spermatozoa promotes reactive oxygen species generation and DNA fragmentation. *Andrologia.* 2014 Sep 19.

Cocuzza M, Sikka SC, Athayde KS, Agarwal A. Clinical relevance of oxidative stress and sperm chromatin damage in male infertility: an evidence based analysis. *Int Braz J Urol.* 2007; 33:603-21.

De Iuliis GN, Newey RJ, King BV, Aitken RJ. Mobile phone radiation induces reactive oxygen species production and DNA damage in human spermatozoa in vitro. *PLoS One.* 2009 Jul 31;4(7):e6446.

De Mouzon J, Goossens V, Bhattacharya S, Castilla JA, Ferraretti AP, Korsak V, Kupka M, Nygren KG, Nyboe Andersen A; European IVF-monitoring (EIM) Consortium, for the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE). Assisted reproductive technology in Europe, 2006: results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod.* 2010; 25:1851-62.

Esbert M, Pacheco A, Vidal F, Florensa M, Riqueros M, Ballesteros A, Garrido N, Calder n G. Impact of sperm DNA fragmentation on the outcome of IVF with own or donated oocytes. *Reprod Biomed Online.* 2011 Dec;23(6):704-10.

Evenson DP, Darzynkiewicz Z, Jost L, Janca F, Ballachey B. Changes in accessibility of DNA to various fluorochromes during spermatogenesis. *Cytometry.* 1986; 7:45-53.

Evenson DP, Darzynkiewicz Z, Melamed M.R. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science.* 1980; 210:1131-1133

Evenson DP, Kasperson K, Wixon RL. Analysis of sperm DNA fragmentation using flow cytometry and other techniques. *Soc Reprod Fertil Suppl* 2007; 65: 93-113.

Evenson DP, Larson KL and Jost L K 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.

Fatehi AN, Bevers MM, Schoevers E, Roelen BA, Colenbrander B, *et al.* DNA damage in bovine sperm does not block fertilization and early embryonic development but induces apoptosis after the first cleavages. *J Androl* 2006; 27: 176-88.

Fernandez-Gonzalez R, Moreira PN, Pe´ rez-CrespoM, Sa´ nchez-Marti´ nM, RamirezMA *et al.* Long-term effects of mouse intracytoplasmic sperm injection with DNA-fragmented sperm on health and behavior of adult offspring. *Biol Reprod* 2008; 78: 761–72.

Flesch FM, Brouwers JF, Nievelstein PF, Verkleij AJ, van Golde LM, Colenbrander B, Gadella BM. Bicarbonate stimulated phospholipid scrambling induces cholesterol redistribution and enables cholesterol depletion in the sperm plasma membrane. *J Cell Sci.* 2001; 114:3543–3555.

Foresta C, Zorzi M, Rossato M, Varotto A. Sperm nuclear instability and staining with aniline blue: abnormal persistence of histones in spermatozoa in infertile men. *Int J Androl* 1992; 15:330-337.

Gadella BM, Harrison RAP. The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipid transbilayer behaviour in the plasma membrane. *Development.* 2000; 127:2407–2420.

Gandini L, Lombardo F, Paoli D, Caponecchia L, Familiari G, Verlengia C, Dondero F, Lenzi A. Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod.* 2000; 15:830-9.

Gandini L, Lombardo F, Paoli D, Caruso F, Eleuteri P, Leter G. Full-term pregnancies achieved with ICSI despite high levels of sperm chromatin damage. *Hum Reprod.* 2004; 19:1409-17.

García-Alvarez O, Maroto-Morales A, Ramón M, del Olmo E, Montoro V, Dominguez-Rebolledo AE, Bisbal A, Jiménez-Rabadán P, Pérez-Guzmán MD, Soler AJ. Analysis of selected sperm by density gradient centrifugation might aid in the estimation of in vivo fertility of thawed ram spermatozoa. *Theriogenology.* 2010 Oct 1;74(6):979-88. Epub 2010 Jun 26.

Giwerzman A, Lindstedt L, Larsson M, Bungum M, Spano M, Levine RJ, Rylander L. Sperm chromatin structure assay as an independent predictor of fertility in vivo: a case-control study. *Int J Androl.* 2010; 33:e221-7.

Gold R, Schmied M, Giegerich G, Breitschopf H, Hartung HP, Toyka KV, Lassmann H. Differentiation between cellular apoptosis and necrosis by combined use of in situ tailing and nick translation techniques. *Lab Invest* 1994; 71:219-225.

Gomez E, D.W. Buckingham, J. Brindle, F. Lanzafame, D.S. Irvine, R.J. Aitken:

Development of an image analysis system to monitor the retention of residual cytoplasm by human spermatozoa: correlation with biochemical markers of the cytoplasmic space, oxidative stress, and sperm function. *J Androl* 1996; 17:276-87.

Gorczyca W, Gong J, Darzynkiewicz Z. Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assay. *Cancer Res.* 1993; 53:1945-1951.

Greco E, Iacobelli M, Ferrero S, Ubaldi F, Rienzi L, Tesarik J. Reduction of the incidence of sperm DNA fragmentation by oral antioxidant treatment. *Journal of Andrology*, 2005a. Vol 26 No.3

Grizard G, Ouchchane L, Roddier H, Artonne C, Sion B, Vasson MP, Janny L. "In vitro alachlor effects on reactive oxygen species generation, motility patterns and apoptosis markers in human spermatozoa" *Reprod Toxicol.* 2007.

Hammadeh ME, al-Hasani S, Stieber M, Rosenbaum P, K pker D, Diedrich K, Schmidt W. The effect of chromatin condensation (aniline blue staining) and morphology (strict criteria) of human spermatozoa on fertilization, cleavage and pregnancy rates in an intracytoplasmic sperm injection programme. *Hum Reprod.* 1996 Nov;11(11):2468-71.

Hansen M, Kurinczuk JJ, Bower C, Webb S. The risk of major birth defects after intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization. *N Engl J Med.* 2002; 346:725-30.

Harper MJK. Gamete and Zygote Transport. In: Knobil E, Neill JD eds "The Physiology of Reproduction" Volume 1, seconda edizione, New York, Raven Press 1994; 4: 23-187.

Henkel R, Hajimohammad M, Stalf T, Hoogendijk C, Mehnert C, Menkveld R, Gips H, Schill WB, Kruger TF. Influence of deoxyribonucleic acid damage on fertilization and pregnancy. *Fertil Steril.* 2004; 81:965-72.

Henkel R, Kierspel E, Hajimohammad M, Stalf T, Hoogendijk C, Mehnert C, Menkveld R, Schill WB, Kruger TF. DNA fragmentation of spermatozoa and assisted reproduction technology. *Reprod Biomed Online.* 2003 Oct-Nov;7(4):477-84.

Host E, Lindenberg S, Kahn JA, Christensen F. DNA strand breaks in human sperm cells: a comparison between men with normal and oligozoospermic sperm samples. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 1999;78:336-339.

Host ES, Linderbeg S, Smidt-Jensen S. The role of DNA strand breaks in human spermatozoa used for IVF and ICSI. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2000; 79:559-63.

Hourcade JD, Pérez-Crespo M, Fernández-González R, Pintado B, Gutiérrez-Ad n A. Selection against spermatozoa with fragmented DNA after postovulatory mating depends on the type of damage. *Reprod Biol Endocrinol.* 2010 Jan 31;8:9.

Huang Chun-Chia, M.Sc.,a,b,c David Pei-Cheng Lin, Sperm DNA fragmentation negatively correlates with velocity and fertilization rates but might not affect

pregnancy rates, *Fertility and Sterility* Vol. 84, No. 1, July 2005.

Irvine DS, J.P. Twigg, E.L. Gordon, N. Fulton, P.A.Milne, R.J.Aitken: DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *J Androl.* 2000; 21: 33-44.

Jin M, Fujiwara E, Kakiuchi Y, Okabe M, Satouh Y, Baba SA, Chiba K, Hirohashi N. Most fertilizing mouse spermatozoa begin their acrosome reaction before contact with the zona pellucida during in vitro fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108:4892-6.

Kang X, Xie Q, Zhou X, Li F, Huang J, Liu D, Huang T. "Effects of hepatitis B virus S protein exposure on sperm membrane integrity and functions" *PLoS One.* 2012.

Kodama H, Yamaguchi R, Fukuda J, Kasai H, Tanaka T. Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. *Fertil Steril.* 1997;68:519-24.

Laberge RM, Boissonneault G. Chromatin remodeling in spermatids: a sensitive step for the genetic integrity of the male gamete. *Arch Androl.* 2005; 51:125-33.

Larson KL, DeJonge CJ, Barnes AM, Jost LK, Evenson DP. Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques. *Hum Reprod.* 2000 Aug;15(8):1717-22.

Larson-Cook KL, Brannian JD, Hansen KA, Kasperson KM, Aamold ET, Evenson DP. Relationship between the outcomes of assisted reproductive techniques and sperm DNA fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay. *Fertil Steril.* 2003 Oct;80(4):895-902.

Leridon H. Can assisted reproduction technology compensate for the natural decline in fertility with age? A model assessment. *Hum reprod.* 2004; 19:1548-1553 Lewis et al., 2004.

Lewis SE, O'Connell M, Stevenson M, Thompson-Cree L, McClure N. An algorithm to predict pregnancy in assisted reproduction. *Hum Reprod.* 2004 Jun;19(6):1385-94.

Li Z, Wang L, Cai J, Huang H. Correlation of sperm DNA damage with IVF and ICSI outcomes: a systematic review and meta-analysis. *J Assist Reprod Genet.* 2006; 23:367-76.

Liu DY, Baker HW. Evaluation and assessment of semen for IVF/ICSI. *Asian J Androl.* 2002;4:281-5. Review.

Liu DY, Baker HW. Human sperm bound to the zona pellucida have normal nuclear chromatin as assessed by acridine orange fluorescence. *Hum Reprod.* 2007 Jun;22(6):1597-602.

Lopes S, Sun JG, Jurisicova A, Meriano J, Casper RF. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.* 1998; 69:528-532.

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.

Lozano GM, Bejarano I, Espino J, González D, Ortiz A, García JF, Rodríguez AB, Pariente JA. "Relationship between caspase activity and apoptotic markers in human sperm in response to hydrogen peroxide and progesterone" *J Reprod Dev.* 2009.

Makker K, Agarwal A, Sharma R. Oxidative stress and male infertility. *Indian J Med Res,* April 2009, pp357-67.

Manicardi GC, Bianchi PG, Pantano S, Azzoni P, Bizzaro D, Bianchi U, Sakkas D. Presence of endogenous nicks in DNA of ejaculated human spermatozoa and its relationship to chromomycin A3 accessibility. *Biol Reprod.* 1995; 52:864-867.

Manicardi GC, Tombacco A, Bizzaro D, Bianchi PG, Sakkas D. DNA strand breaks in ejaculated human spermatozoa: comparison of susceptibility to the nick translation and terminal transferase assays. *Histochem J.* 1998; 30:33-39.

Marchetti C, Obert G, Deffosez A, Formstecher P, Marchetti P. Study of mitochondrial membrane potential, reactive oxygen species, DNA fragmentation and cell viability by flow cytometry in human sperm. *Hum Reprod.* 2002 May;17(5):1257-65.

Marchiani S, Tamburrino L, Giuliano L, Nosi D, Sarli V, Gandini L, Piomboni P, Belmonte G, Forti G, Baldi E, Muratori M. Sumo1-ylation of human spermatozoa and its relationship with semen quality. *Int J Androl.* 2011; 34:581-93.

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;13:621-31.

Marchiani S, Tamburrino M, 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.

Marcon L, Zhao M, Shirley CR, Hayashi S, Mohapatra B, Suganuma R, Behringer RR, Boissonneault G, Yanagimachi R, Meistrich ML. Transition nuclear proteins are required for normal chromatin condensation and functional sperm development. *Genesis.* 2004; 38:200-13.

Martínez-Pastor F, Aisen E, Fernández-Santos MR, Estes MC, Maroto-Morales A, García-Alvarez O, Garde JJ. "Reactive oxygen species generators affect quality parameters and apoptosis markers differently in red deer spermatozoa" *Reproduction.* 2009.

Mazzilli F, Rossi T, Marchesini M, Ronconi C, Dondero F. Superoxide anion in human semen related to seminal parameters and clinical aspects. *Fertil Steril.* 1994; 62:862-68.

Mc Pherson SMG and FJ Longo. Localization of DNAase I hypersensitive regions during rat spermatogenesis: stage-dependent patterns and unique sensitivity of

elongating spermatids. *Mol Reprod Dev.* 1992; 31:268-79.

Ménézo Yves, Brian Dale and Marc Cohen UNILABS, DNA damage and repair in human oocytes and embryos: a review. *Zygote* 18 (November), pp. 357–365. C _ Cambridge University Press 2010.

Menkveld R, Franken DR, Kruger TF, Oehninger S, Hodgen GD. Sperm selection capacity of the human zona pellucida. *Mol Reprod Dev.* 1991 Dec;30(4):346-52.

Mitchell LA, De Iuliis GN, Aitken RJ. The TUNEL assay consistently underestimates DNA damage in human spermatozoa and is influenced by DNA compaction and cell vitality : development of an improved methodology. *Int J Androl.* 2011 Feb; 34(1) : 2-13.

Morris ID, Ilott S, Dixon L, Brison DR. The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (Comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development. *Hum Reprod.* 2002 Apr;17(4):990-8.

Mupfiga C, Fisher D, Kruger T, Henkel R, «The relationship between seminal leukocytes, oxidative status in the ejaculate, and apoptotic markers in human spermatozoa,» *Syst Biol Reprod Med.*, vol. Dec;59, n. 6, pp. 304-311, 2013.

Muratori M, Maggi M, Spinelli S, Filimberti E, Forti G, Baldi E. Spontaneous DNA fragmentation in swim-up selected human spermatozoa during long term incubation. *J Androl.* 2003; 24:253-62.

Muratori M, Marchiani S, Forti G, Baldi E. Sperm ubiquitination positively correlates to normal morphology in human semen. *Hum Reprod.* 2005; 20:1035-43.

Muratori M, Marchiani S, Maggi M, Forti G, Baldi E. Origin and biological significance of DNA fragmentation in human spermatozoa. *Front Biosci.* 2006; 11:1491-9. Review.

Muratori M, Marchiani S, Tamburrino L, Tocci V, Failli P, Forti G, Baldi E. Nuclear staining identifies two populations of human sperm with different DNA fragmentation extent and relationship with semen parameters *J Androl.* 2008; 23:1035-43.

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; 21:903-12.

Muratori M, Porazzi I, Luconi M, Marchiani S, Forti G, Baldi E. Annexin V binding and merocyanine staining fail to detect human sperm capacitation. *J Androl.* 2004; 25:797-810.

Muratori M, Tamburrino L, Marchiani S, Guido C, Forti G, Baldi E. Critical aspects of detection of sperm DNA fragmentation by TUNEL/flow cytometry. *Syst Biol Reprod Med* 2010b; 56: 277-85.

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.* 2010a; 31:336-45.
- Muratori M, Tamburrino L, Marchiani S, Cambi M, Olivito B, Azzari C, Forti G and Baldi E. Investigation on the origin of sperm dna fragmentation: role of apoptosis, immaturity and oxidative stress. *Mo Med.* In press.
- Nabi A, Khalili MA, Halvaei I, Roodbari F. Prolonged incubation of processed human spermatozoa will increase DNA fragmentation. *Andrologia.* 2014 May;46(4):374-9.
- Nakagawa S, Nakamura N, Fujioka M, Mori C. Spermatogenic cell apoptosis induced by mitomycin C in the mouse testis. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1997 Dec;147(2):204-13.
- Nakamura T, Sakai T, Hotchi M. Histochemical demonstration of DNA double strand breaks by in situ 3'-tailing reaction in apoptotic endometrium. *Biotech Histochem.* 1995; 70:33-39.
- Nasr-Esfahani MH, Salehi M, Razavi S, Anjomshoa M, Rozbahani S, Moulavi F, Mardani M. Effect of sperm DNA damage and sperm protamine deficiency on fertilization and embryo development post-ICSI. *Reprod Biomed Online.* 2005 Aug;11(2):198-205.
- O'Brian EME, O'Brian DA. The spermatozoon. In: Knobil E, Neill JD eds. "The Physiology of Reproduction" Volume 1, seconda edizione, New York, Raven Press 1994; 29-77.
- O'Brien J, Zini A. Sperm DNA integrity and male infertility. *Urology.* 2005; 65:16-22. Review.
- Paasch U, S. Grunewald, A. Agarwal, H.J. Glandera: Activation pattern of caspases in human spermatozoa. *Fertil Steril* 81. 2004; Suppl 1:802-9.
- Paasch U, S. Grunewald, G. Fitzl, H.J. Glander: Deterioration of plasma membrane is associated with activated caspases in human spermatozoa. *J Androl.* 2003; 24:246-52.
- Pasqualotto FF, Sharma RK, Kobayashi H, Nelson DR, Thomas AJ Jr, Agarwal A. Oxidative stress in normospermic men undergoing infertility evaluation. *J Androl.* 2001; 22:316-22.
- Poccia D. Remodeling of nucleoproteins during gametogenesis, fertilization, and early development. *Int Rev Cytol.* 1986; 105:1-65.
- Sailer BL, Jost LK, Evenson DP. Mammalian sperm DNA susceptibility to in situ denaturation associated with the presence of DNA strand breaks as measured by the terminal deoxynucleotidyl transferase assay. *J Androl.* 1995; 16:80-87.
- Sakkas D, Mariethoz E, Manicardi G, Bizzarro D, Bianchi PG, Bianchi U. Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Rev Reprod.* 1999b; 4:31-37.
- 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.* 1999a; 251:350-55.

Sakkas D, Moffatt O, Drury S, Tomlinson M, Afnan M. The apoptotic profile of human cumulus cells changes with patient age and after exposure to sperm but not in relation to oocyte maturity. *Fertil Steril*. 2002; 77:1006-11.

Sanchez R, Stalf T, Khanaga O, Turley H, Gips H, Schill WB. Sperm selection methods for intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in andrological patients. *J Assist Reprod Genet*. 1996 Mar;13(3):228-33.

Seli E, Gardner DK, Schoocraft WB, Moffatt O, Sakkas D. Extent of nuclear DNA damage in ejaculated spermatozoa impacts on blastocyst development after in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 2004; 82:378-83.

Sergerie M., Laforest G, Bujan L, Bissonnette F, and Bleau G. Sperm DNA fragmentation: threshold value in male fertility. *Hum Reprod* 2005b; 20:3446–3451.

Shen H, Ong C. Detection of oxidative DNA damage in human sperm and its association with sperm function and male infertility. *Free Radic Biol Med*. 2000; 28:529-536.

Shen HM, Chia SE, Ong CN. Evaluation of oxidative DNA damage in human sperm and its association with male infertility. *J Androl*. 1999; 20:718-723.

Shi Q, Martin RH. Aneuploidy in human spermatozoa: FISH analysis in men with constitutional chromosomal abnormalities, and in infertile men. *Reproduction*. 2001; 121:655-66. Review.

Sikka SC. Relative impact of oxidative stress on male reproductive function *Cur Med Chemr*. 2001; 8:851-862.

Stevanato J, Bertolla RP, Barradas V, Spaine DM, Cedenho AP, Ortiz V., «Semen processing by density gradient centrifugation does not improve sperm apoptotic deoxyribonucleic acid fragmentation rates,» *Fertil Steril*, vol. 90, n. 3, pp. 889-90, 2008.

Spano M, Cordelli E, Leter G, Lombardo F, Lenzi A, Gandini L., «Nuclear chromatin variations in human spermatozoa undergoing swim-up and cryopreservation evaluated by the flow cytometric sperm chromatin structure assay,» *Mol Hum Reprod*, vol. 5, p. 29–37, 1999.

Viloria T, Garrido N, Fernández JL, Remohí J, Pellicer A, Meseguer M, «Sperm selection by swim-up in terms of deoxyribonucleic acid fragmentation as measured by the sperm chromatin dispersion test is altered in heavy smokers,» *Fertil Steril*, vol. 88, n. 2, pp. 523-525, 2007.

Sun JG, Jurisicova A, Casper RF. Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. *Biol Reprod*. 1997; 56:602-607.

Tamburrino L, Marchiani S, Montoya M, Elia Marino F, Natali I, Cambi M, Forti G, Baldi E, Muratori M. Mechanisms and clinical correlates of sperm DNA damage. *Asian J Androl*. 2012 Jan;14(1):24-31.2011.59.

Tesarik J, Greco E, Mendoza C. Late, but not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation. *Hum Reprod.* 2004 Mar;19(3):611-5. Epub 2004 Jan 29.

Tesarik J. Paternal effects on cell division in the human preimplantation embryo. *Reprod Biomed Online.* 2005 Mar;10(3):370-5.

Tomsu M, Sharma V, Miller D. Embryo quality and IVF treatment outcomes may correlate with different sperm comet assay parameters. *Hum Reprod.* 2002 Jul; 17(7): 1856-62.

Van Dyk Q, Lanzendorf S, Kolm P, Hodgen GD, Mahony MC. Incidence of aneuploidy spermatozoa from subfertile men: selected with motility versus hemizona-bound. *Hum Reprod.* 2000 Jul;15(7):1529-36.

Virro MR, Larson-Cook KL, Evenson DP. Sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil Steril.* 2004 May;81(5):1289-95.

Wang Min & Jian Sun & Li Wang & Xiaohong Gao & Xiang Lu & Zhengmu Wu & Yongwei Wang & Kai Liu & Jiewei Tao & Yu Wu, Assessment of density gradient centrifugation (DGC) and sperm chromatin dispersion (SCD) measurements in couples with male factor infertility undergoing ICSI. *Assisted Reproduction Technologies*, Set 2014.

Ward WS, Coffey DS. DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. *Biol Reprod.* 1991;44:569-74.

World Health Organization. Towards more objectivity in diagnosis and management of male infertility. *Int J Androl.* 1987; 7(Suppl):1.

World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination and processing of Human Semen. 5th ed Cambridge University Press, Cambridge, UK. 2010.

World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interactions. 4th ed Cambridge University Press, Cambridge, UK. 1999.

Yamauchi Y, Riel JM, Ward MA. Paternal DNA damage resulting from various sperm treatments persists after fertilization and is similar before and after DNA replication. *J Androl.* 2012; 33:229-38.

Yanagimachi R. Mammalian Fertilization. In: Knobil E, Neil JD. "The Physiology of Reproduction" Volume 1, seconda edizione, New York, Raven Press 1994; 189-317.

Zini A and Sigman M. Are tests of sperm DNA damage clinically useful? Pros and cons. *J Androl* 2009a; 30: 219-29. Review.

Zini A, Boman JM, Belzile E, Ciampi A. Sperm DNA damage is associated with an increased risk of pregnancy loss after IVF and ICSI: systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod.* 2008; 23:2663-8.

Zini A, Jamal W, Cowan L, Al-Hathal N. Is sperm DNA damage associated with IVF embryo quality? A systematic review. *J Assist Reprod Genet.* 2011; 28:391-7. Review.

7 APPENDICE

Seguono gli abstract delle pubblicazioni scientifiche del candidato in ordine cronologico inverso.

Sono anche inclusi due abstract di due recenti lavori, uno attualmente in fase di pubblicazione e l'altro in fase di revisione.

SUMO1 in human sperm: new targets, role in motility and morphology and relationship with DNA damage.

Marchiani S¹, Tamburrino L², Ricci B², Nosi D², Cambi M², Piomboni P², Belmonte G², Forti G², Muratori M², Baldi E¹.

⊕ Author information

Abstract

In studies carried out previously, we demonstrated that small ubiquitin-like modifier 1 (SUMO1) is associated with poor sperm motility when evaluated with a protocol that reveals mostly SUMO1-ylated live sperm. Recently, with another protocol, it has been demonstrated that SUMO is expressed in most sperm and is related to poor morphology and motility, suggesting that sumoylation may have multiple roles depending on its localisation and targets. We show herein, by confocal microscopy and co-immunoprecipitation, that dynamin-related protein 1 (DRP1), Ran GTPase-activating protein 1 (RanGAP1) and Topoisomerase II α , SUMO1 targets in somatic and/or germ cells, are SUMO1-ylated in mature human spermatozoa. DRP1 co-localises with SUMO1 in the mid-piece, whereas RanGAP1 and Topoisomerase II α in the post-acrosomal region of the head. Both SUMO1 expression and co-localisation with the three proteins were significantly higher in morphologically abnormal sperm, suggesting that sumoylation represents a marker of defective sperm. DRP1 sumoylation at the mid-piece level was higher in the sperm of asthenospermic men. As in somatic cells, DRP1 sumoylation is associated with mitochondrial alterations, this protein may represent the link between SUMO and poor motility. As SUMO pathways are involved in responses to DNA damage, another aim of our study was to investigate the relationship between sumoylation and sperm DNA fragmentation (SDF). By flow cytometry, we demonstrated that SUMO1-ylation and SDF are correlated ($r=0.4$, $P<0.02$, $n=37$) and most sumoylated sperm shows DNA damage in co-localisation analysis. When SDF was induced by stressful conditions (freezing and thawing and oxidative stress), SUMO1-ylation increased. Following freezing and thawing, SUMO1-Topoisomerase II α co-localisation and co-immunoprecipitation increased, suggesting an involvement in the formation/repair of DNA breakage.

© 2014 Society for Reproduction and Fertility.

PMID: 25118297 [PubMed - in process]

Development of a specific method to evaluate 8-hydroxy, 2-deoxyguanosine in sperm nuclei: relationship with semen quality in a cohort of 94 subjects.

Cambi M¹, Tamburrino L, Marchiani S, Olivito B, Azzari C, Forti G, Baldi E, Muratori M.

⊕ Author information

Abstract

Oxidative stress (OS) is involved in many disorders including male infertility. Human spermatozoa are very sensitive targets of reactive oxygen species (ROS) and most sperm functions are impaired in the case of OS. In addition unbalanced production of ROS is considered one of the most important causes of sperm DNA fragmentation, a semen trait of infertile men. The relationship between oxidative damage and semen quality is partially controversial, probably due to the different methods and/or targets used to reveal the OS. In this study, by fluorescence microscopy and flow cytometry, we compared two methods to reveal 8-hydroxy, 2-deoxyguanosine (8-OHdG), the hallmark of oxidative DNA damage: an immunofluorescence method and the commercial OxyDNA kit. We found that although both methods localized the labelling in sperm nuclei they yielded different measures, and only with the immunofluorescence method was the labelling specific for sperm 8-OHdG. The immunofluorescence method, coupled to flow cytometry, was thus selected to analyse the 8-OHdG content in semen samples from 94 subfertile patients and to investigate the relationship with semen quality. We found that the percentages of spermatozoa with 8-OHdG (mean \pm s.d., 11.4 \pm 6.9%) were related to sperm count (Pearson's correlation coefficient (r)=-0.27, $P=0.04$ (ANOVA and student's t-test)), motility (progressive: $r=-0.22$, $P=0.04$; non-progressive: $r=0.25$, $P=0.01$), and normal morphology ($r=-0.27$, $P=0.01$). In conclusion, we demonstrate that immunofluorescence/flow cytometry is a reliable and specific method to detect 8-OHdG at single-cell level and show that oxidative damage only partially overlaps poor semen quality, suggesting that it could provide additional information on male fertility with respect to routine semen analysis.

PMID: 23457372 [PubMed - indexed for MEDLINE] [Free full text](#)

Sperm DNA fragmentation induced by cryopreservation: new insights and effect of a natural extract from *Opuntia ficus-indica*.

Meamar M¹, Zribi N, Cambi M, Tamburrino L, Marchiani S, Filimberti E, Fino MG, Biggeri A, Menezo Y, Forti G, Baldi E, Muratori M.

⊕ Author information

Abstract

OBJECTIVE: To analyze the effect of cryopreservation on sperm DNA fragmentation (SDF) in two cytometric sperm populations, PI(brighter) and PI(dimmer), and to test the effects of *Opuntia ficus-indica* (OFI) extracts, which contain antioxidants and flavanoids, and of resveratrol on cryopreservation of human semen.

DESIGN: In vitro prospective study.

SETTING: Institutional study.

PATIENT(S): Twenty-one normozoospermic men undergoing semen analysis for couple infertility.

INTERVENTION(S): Cryopreservation using the routine method in the presence of OFI extracts or resveratrol.

MAIN OUTCOME MEASURE(S): Measurement of SDF by TUNEL/PI flow cytometric method to evaluate sperm motility (by automated motion analysis, CASA system) and viability (by eosin/nigrosin staining) in the two populations of sperm PI(br) and PI(dim).

RESULT(S): Cryopreservation induced an increase of SDF only in the PI(br) sperm population. The increase was negatively dependent on the basal values of SDF in the same population. Addition of OFI extracts and resveratrol to the cryopreservation medium slightly but statistically significantly reduced SDF in the PI(br) population without affecting the deleterious effect of cryopreservation on sperm motion parameters or viability.

CONCLUSION(S): The increase of SDF in the PI(br) population, which is unrelated to semen quality, suggests that caution must be taken in using cryopreserved semen, as morphologically normal and motile sperm may be damaged. The addition of substances with multifunctional properties such as OFI extracts to cryopreservation medium is only slightly effective in preventing the dramatic effects on SDF.

Copyright © 2012 American Society for Reproductive Medicine. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

PMID: 22633258 [PubMed - indexed for MEDLINE]

Mechanisms and clinical correlates of sperm DNA damage.

Tamburrino L¹, Marchiani S, Montoya M, Elia Marino F, Natali I, Cambi M, Forti G, Baldi E, Muratori M.

⊕ Author information

Abstract

Among the different DNA anomalies that can be present in the male gamete, DNA fragmentation is the most frequent, particularly in infertile subjects. There is now consistent evidence that a sperm containing fragmented DNA can be alive, motile, morphologically normal and able to fertilize an oocyte. There is also evidence that the oocyte is able to repair DNA damage; however, the extent of this repair depends on the type of DNA damage present in the sperm, as well as on the quality of the oocyte. Thus, it is important to understand the possible consequences of sperm DNA fragmentation (SDF) for embryo development, implantation, pregnancy outcome and the health of progeny conceived, both naturally and by assisted reproductive technology (ART). At present, data on the consequences of SDF for reproduction are scarce and, in many ways, inconsistent. The differences in study conclusions might result from the different methods used to detect SDF, the study design and the inclusion criteria. Consequently, it is difficult to decide whether SDF testing should be carried out in fertility assessment and ART. It is clear that there is an urgent need for the standardisation of the methods and for additional clinical studies on the impact of SDF on ART outcomes.

PMID: 22138903 [PubMed - indexed for MEDLINE] PMCID: PMC3735140 [Free PMC Article](#)

Articolo in press presso Molecular Medicine:

INVESTIGATION ON THE ORIGIN OF SPERM DNA FRAGMENTATION: ROLE OF APOPTOSIS, IMMATURITY AND OXIDATIVE STRESS

Running head: Mechanisms of Sperm DNA Fragmentation

Monica Muratori^{1*}, Lara Tamburrino¹, Sara Marchiani¹, Marta Cambi¹, Biagio Olivito², Chiara Azzari², Gianni Forti¹ and Elisabetta Baldi^{1*}

¹Sexual Medicine and Andrology Unit, Department of Experimental, Clinical and Biomedical Sciences, Center of Excellence DeNothe, University of Florence, Italy.

²Pediatric Section, Department of Health Sciences, University of Florence and Anna Meyer Children's University Hospital, Florence, Italy

ABSTRACT

Rational: Sperm DNA fragmentation (sDF) represents a threat for male fertility, reproduction and the health of the offspring. The causes of sDF are still unclear, even if apoptosis, oxidative assault and defects in chromatin maturation are hypothesized. **Objectives:** Using multicolor flow cytometry and sperm sorting, we challenged the three hypothesized mechanisms by simultaneously evaluating sDF and signs of oxidative damage (8-hydroxy, 2'-deoxyguanosine, 8-OHdG, and malondialdehyde, MDA), apoptosis (caspase activity and cleaved Poly ADP-ribose polymerase, cPARP) and sperm immaturity (creatin phosphokinase, CK, and excess of residual histones). **Results:** Active caspases and c-PARP were concomitant with sDF in a high percentage of spermatozoa (respectively 82.6±9.1% and 53.5±16.4%). Excess of residual histones, was found significantly higher in DNA fragmented sperm (74.8±17.5% versus 37.3±16.6% in sperm without, $p<0.005$), and largely concomitant with active caspases. Conversely, oxidative damage was scarcely concomitant with sDF in the total sperm population, at variance with live sperm, where 8-OHdG and MDA were clearly associated to sDF. In addition, most live cells with active caspase also showed 8-OHdG suggesting activation of apoptotic pathways in oxidative injured live cells.

Conclusions: This is the first investigation on the origin of sDF directly evaluating the simultaneous presence of the signs of the hypothesized mechanisms with DNA breaks at single cell level. Results indicate that the main pathway leading to sperm DNA breaks is a process of apoptosis likely triggered by an impairment of chromatin maturation in the testis and by oxidative stress during the transit in the male genital tract.

These findings are highly relevant for clinical studies on the effects of drugs on sDF and oxidative stress in infertile men and for development of new therapeutic strategies.

SPERM FRAGMENTATION IN CRYOPRESERVED SAMPLES FROM SUBJECTS WITH DIFFERENT CANCERS

Lara Tamburrino¹, Marta Cambi¹, Sara Marchiani¹, Ilaria Manigrasso¹, Selene Degl'Innocenti², Gianni Forti¹, Mario Maggi¹ Elisabetta Baldi^{1,3}, Monica Muratori^{1,3}.

¹Department of Biomedical, Experimental and Clinical Sciences, Centre of Excellence DeNothe, University of Florence and ²Azienda Ospedaliera-Universitaria Careggi, Florence, Italy.

ABSTRACT

Cryopreservation is the only possibility to preserve fertility in cancer men undergoing chemo- or radio-therapy with detrimental effects on testis function. Evidence suggests that in vitro fertilization (IVF) outcome with cryopreserved sperm from cancer patients may be less successful. Among factors that may influence IVF success, sperm DNA fragmentation (sDF) is of utmost relevance. We evaluated here sperm DNA fragmentation (sDF) in 78 men cryopreserving for different cancers (Hodgkin Lymphoma, non-Hodgkin Lymphoma and testicular cancer) and in 53 men cryopreserving for non-cancer pathologies (subfertility, and autoimmune pathologies) who discontinued banking. sDF was assessed by TUNEL/Propidium Iodide (PI) protocol, allowing determination of sDF in total and in two sperm subpopulations differing for the intensity of the nuclear staining (PI^{brighter} and PI^{dimmer}). We found that total sDF was significantly higher in the different cancer groups and subfertile patients respect to non-cancer patients. PI^{dimmer} sDF was highest in subfertile and Hodgkin Lymphoma patients, who showed the lowest post-cryopreservation sperm motility, and was negatively correlated with post-thawing motility and viability both in cancer and non-cancer samples. PI^{brighter} sDF was significantly higher in all cancer groups respect to both subfertile and autoimmune patients and showed an unexpected positive correlation with post-thawing motility only in cancer samples which strongly indicates that post-thawing motile sperm from these patients may carry DNA damage. Overall, our results suggest that cryopreserved sperm from cancer men show higher levels of DNA damage. Our results may be important for appropriate counselling about the future possibilities of fertility for cancer patients.