

# Effetti negativi dello stress ossidativo sul DNA dei gameti maschili: le ripercussioni sulla patologia riproduttiva di coppia

L. Coppola<sup>1,2,3</sup>, V. Caroli Casavola<sup>1,2</sup>, G.A. Coppola<sup>1,3</sup>, D.D. Montagna<sup>1</sup>, I. Ortensi<sup>3</sup>, G. Presicce<sup>1,2</sup>, S. Pinto Provenzano<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Centri Integrati di Fisiopatologia della Riproduzione Umana Tecnomed (Nardò); <sup>2</sup>Casa di Cura Salus (Brindisi);  
<sup>3</sup>Casa di Cura Fabia Mater (Roma)

## Introduzione

Il termine stress ossidativo ricorre ampiamente in campo medico-biologico grazie all'interesse derivato dalle crescenti evidenze scientifiche che lo correlano con l'eziopatogenesi di numerose patologie. È ormai noto che una condizione di stress ossidativo è causata da uno sbilanciamento dell'equilibrio normalmente esistente tra produzione di radicali liberi e loro parziale inattivazione a opera della barriera antiossidante dell'organismo.

I radicali sono atomi e molecole instabili che tendono a sottrarre l'elettrone di cui deficitano ad altre specie chimiche, determinando un effetto ossidante su queste ultime. Tale processo forma una nuova specie radicalica che, a sua volta, tende a generarne un'altra, innescando così una reazione a catena senza alcuna capacità autolimitante. Questa potrebbe continuare all'infinito generando una gran quantità di prodotti e amplificando a dismisura i propri effetti negativi sull'organismo. Le specie reattive vengono classificate in due grandi famiglie di molecole: le Specie Reattive dell'Ossigeno (ROS) e le Specie Reattive dell'Azoto (RNS), alle quali appartengono sia le forme radicaliche sia quelle ossidanti.

## Ruolo dei ROS nell'infertilità maschile

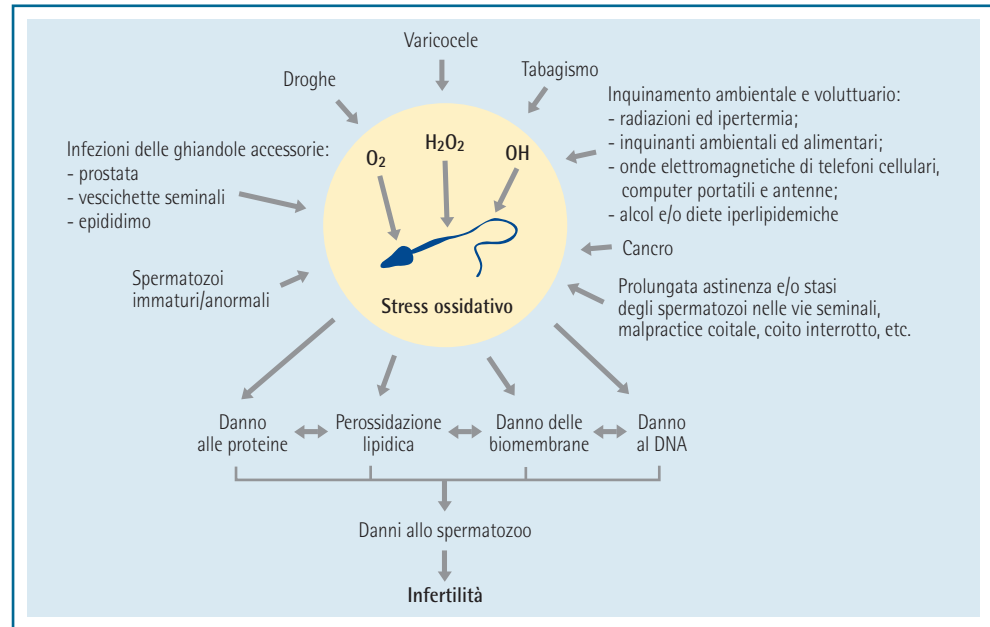
Gli spermatozoi vengono rilasciati in un ambiente aerobico in cui i radicali liberi vengo-

no prodotti sia dalle cellule presenti lungo le vie di deflusso sia dagli stessi nemaspermi.

I gameti maschili entrano costantemente in contatto con i ROS, i quali, se presenti in concentrazione fisiologica, risultano fondamentali durante determinati processi legati ad alcune funzioni spermatiche, come la reazione acrosomiale, la capacitazione e la fusione spermatozoo-ovocita.

Durante la spermatogenesi, però, la capacità degli spermatozoi maturi di produrre radicali viene limitata dalla perdita del citoplasma e degli organuli citosolici che contengono importanti fonti di queste specie. I soli spermatozoi, quindi, non sono capaci di generare una quantità di ROS in grado di causare stress ossidativo, come invece si osserva in presenza di elevate quantità di leucociti e spermatozoi immaturi. Un aumento dei ROS nel plasma seminale, infatti, è spesso dovuto alla presenza di condizioni patologiche notoriamente correlate a una riduzione del potenziale di fertilità maschile (infezioni, infiammazioni, congestioni, varicocele, cancro), fattori esogeni (radiazioni, inquinamento ambientale e alimentare, ipertermia ambientale per altiforni o saune), prolungata astinenza sessuale e/o continenza con conseguente stasi degli spermatozoi nelle vie di deflusso o malpractice procreativa (coitus interruptus o reservatus o stop start eiaculatorio), nonché particolari stili di vita che si possono classificare come "inquinamento voluttuario" (tabagismo, alcolismo, tossicodipendenza). In tutte queste condizioni l'e-

Figura 1. Effetti negativi dello stress ossidativo sul DNA dei gameti maschili umani.



same basale del liquido seminale evidenzia quasi sempre un incremento dei leucociti e delle forme immature (Fig. 1).

Alcuni autori hanno riscontrato che il livello di ROS nel liquido seminale risulta direttamente correlato con il numero di leucociti attivati, i quali sono in grado di produrre una quantità di radicali anche 100 volte superiore rispetto a quelli inattivi. Secondo altri, inoltre, gli stessi leucociti sarebbero addirittura in grado di stimolare la produzione di spermatozoi immaturi, producendo così un'ulteriore quota radicalica attraverso un contatto diretto cellula-cellula e/o attraverso molecole segnale rilasciate precocemente dal continuo sfaldamento dei tubuli seminiferi. È proprio a questo livello che si osserva infatti un'aumentata concentrazione di spermatozoi immaturi fonti di enzimi responsabili della produzione di specie ossidanti, perché dotati ancora del residuo citoplasmatico.

D'altra parte, però, bisogna tener conto che la fisiologica assenza di citoplasma negli spermatozoi maturi comporta anche la perdita di importanti sistemi antiossidanti e di enzimi ristrutturanti. L'eccessiva quantità di

ROS, quindi, può essere causa di alterazioni strutturali e funzionali dello spermatozoo maturo, poiché la loro presenza in eccesso contribuisce alla perossidazione dei lipidi di membrana, all'ossidazione delle proteine e al danneggiamento del DNA.

La grande sensibilità alla perossidazione lipidica delle membrane risulta correlata alla loro particolare composizione, ricca cioè di acidi grassi polinsaturi, principali bersagli della reazione stessa e i cui prodotti, essendo strutturalmente più stabili dei radicali dai quali essi stessi sono generati, possono essere dosati in laboratorio.

Nonostante gli spermatozoi maturi non siano dotati di sistemi antiossidanti intracellulari, godono comunque di un'efficiente protezione dai radicali liberi grazie alla presenza di una barriera antiossidante presente nel plasma seminale, la cui efficienza risulta nettamente più elevata rispetto a quella osservabile in altri fluidi biologici. Tale barriera è costituita da diversi agenti, enzimatici e non enzimatici, che contribuiscono, in maniera diversa, all'azione antiossidante totale.

Tra i sistemi enzimatici vi sono le glutazione pe-

rossidasi, l'indolamina-2,3-diossigenasi (IDO), la catalasi e le superossido dismutasi. Tra gli antiossidanti seminali non enzimatici, con funzione prevalentemente scavenger, ricordiamo l'acido ascorbico, l' $\alpha$ -tocoferolo, il glutatione, il coenzima Q<sub>10</sub>, l'N-acetil-L-cisteina, l'ipotaurina, l'urato e numerose sostanze appartenenti alla famiglia dei carotenoidi quali, ad esempio, il licopene e il  $\beta$ -carotene.

Queste sostanze vengono secrete prevalentemente dalle ghiandole accessorie e pertanto durante la spermatogenesi e la migrazione degli spermatozoi attraverso le vie di deflusso, i gameti potranno contare solo sugli antiossidanti epididimari e testicolari, nonché sui propri antiossidanti endogeni che, nel complesso, hanno una minore efficienza rispetto a quelli del plasma seminale.

La condizione di stress ossidativo non sempre comporta un'alterazione dei parametri seminali rivelabili attraverso l'esecuzione di uno spermioγραμμα di base. Infatti, anche in caso di lieve stress ossidativo, lo spermatozoo, pur conservando intatte le membrane, può subire un esteso danno a livello del DNA (sia cellulare, sia mitocondriale) con conseguente riduzione della capacità fertilizzante.

### Le ripercussioni sulla patologia riproduttiva di coppia quando lo spermatozoo è stressato

Lo stress ossidativo è una condizione che insorge a livello cellulare e che può estendersi a tessuti, organi e, nei casi più gravi, colpire l'organismo a vari livelli. Meno conosciuta è l'influenza negativa che i radicali liberi possono esercitare sulla capacità fecondante di una coppia nel cui partner maschile si genera una condizione di stress ossidativo. I radicali in eccesso stressano i gameti maschili alterandone, in alcuni casi, le caratteristiche morfologiche (struttura della testa o della coda) ma soprattutto influenzando negativamente l'espressione e la stabilità dell'anima dello spermatozoo: il codice genetico. Dal

punto di vista pratico, quindi, lo stress ossidativo che colpisce i gameti maschili è una condizione in grado di alterare sia la motilità e la morfologia della cellula, sia la stabilità del DNA. Tutto questo si traduce in una ridotta capacità fecondante dell'uomo, in aborti precoci o, in alcuni casi, in mutazioni genetiche dell'embrione. Infatti, qualora la capacità di fertilizzazione venga mantenuta, l'embrione potrebbe non svilupparsi correttamente o non svilupparsi affatto, per lo scontro invece dell'incontro tra il genoma maschile frammentato e quello femminile.

Questa condizione, in assenza di naturali processi riparativi insiti nel citoplasma di un ovocita normale e privo di forme radicaliche, è causa di missed abortion o blighted ovum. Inoltre, come noi stessi abbiamo sostenuto e dimostrato sin dal 1987, tale condizione può verificarsi anche quando esiste un eccesso di zinco all'interno dello spermatozoo, situazione questa notoriamente causata nell'uomo da fenomeni flogistici o/e congestivi prostatici. Sebbene all'epoca lo ione Zn si riteneva responsabile di ipercondensazione del DNA maschile con conseguente difficoltà di decondensarsi prima della fusione con il DNA femminile (Coppola L et al. 1987 e 1988), oggi è noto come questo, interagendo con i gruppi tiolici liberi delle cisteine nella struttura secondaria e terziaria delle protammine, regola la formazione dei ponti disolfuro inter- e intracatena (Gatewood JM et al. 1990). Quindi le flogosi croniche delle vie seminali e il varicocele possono essere nel maschio causa di polibortività anche attraverso questo meccanismo, se non trattate preventivamente prima di un progetto procreativo naturale o/e assistito.

Dato che i parametri seminali delle analisi routinarie non consentono di evidenziare alterazioni nell'organizzazione della cromatina spermatica e che la fertilità è basata anche sulla capacità funzionale nemaspermica, dovrebbero essere utilizzati metodi addizionali che indaghino la stabilità del DNA. In questo modo si potranno ben valutare i reali disordi-

ni della fertilità e incrementare il valore predittivo delle analisi spermatiche nella procreazione *in vivo* e *in vitro* specie se l'indicazione è per patologia del partner maschile (Zini and Libman, 2006; Aziz and Agarwal, 2008).

È stato ampiamente dimostrato che avere parametri seminali normali non è garanzia di buona qualità genomica.

È anche vero che, nonostante i soggetti dispermici abbiano generalmente percentuale di spermatozoi con DNA frammentato più alta rispetto a individui che presentano una qualità seminale normale, è possibile riscontrare una percentuale di frammentazione nella norma.

Presso i nostri laboratori l'indagine sul DNA spermatico viene effettuata utilizzando l'SCD test (Sperm Chromatin Dispersion Test) che si basa sulla differente risposta chimica degli spermatozoi con DNA frammentato, rispetto a quelli con DNA integro. L'analisi, condotta con supporto informatico, viene effettuata dopo opportuna denaturazione controllata del DNA cui fa seguito l'estrazione delle proteine nucleari. Questo consente l'apertura delle eliche di DNA attorno a un core proteico con formazione di un alone di dispersione cromatinico. Attraverso il calcolo del rapporto tra il diametro dell'alone di dispersione e il diametro minore del suddetto core centrale spermatico è possibile distinguere gli spermatozoi dotati di Big Halo e Medium Halo da quelli con Small Halo e Without Halo. I primi

due rappresentano gli spermatozoi non frammentati mentre gli ultimi due quelli frammentati (Fig. 2).

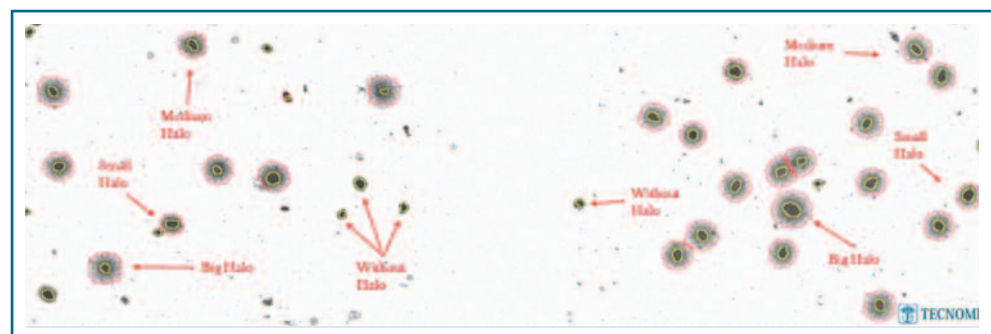
I valori di riferimento utilizzati per l'interpretazione dei risultati sono evidenziati in tabella I. In presenza di un'alta percentuale di frammentazione del DNA spermatico sarebbe opportuno individuarne le cause usufruendo di test di approfondimento:

- test di maturazione nucleare al Blu di Anilina: permette di valutare il grado di metilazione degli istoni, vale a dire la percentuale di sostituzione istoni-protammine nel nucleo spermatico;
- attività radicalica spermatica (discriminazione tra spermatozoi immaturi e leucociti quali possibili fonti radicaliche);
- dosaggio della barriera antiossidante totale del liquido seminale;
- LPOp (determinazione dei prodotti di reazione di radicali liberi sulle membrane degli spermatozoi);

Tabella I. SCA - Frammentazione DNA.

≤15% Integrità del DNA spermatico eccellente
15% - 20% Integrità del DNA spermatico buona
20% - 27% Borderline
27% - 40% Integrità del DNA spermatico ridotta
>40% Integrità del DNA spermatico fortemente ridotta

Figura 2. Osservazione microscopica in capo chiaro, obiettivo 20x, analizzato con software SCA (Sperm Class Analyzer).



- dosaggio dell'8-OH-2-deossiguanosina;
- SHp Test (valutazione dei gruppi tiolici).

Nei successivi paragrafi riportiamo in modo sintetico e schematico quanto è scaturito dai lavori dell'11° Congresso Nazionale di A.G.E.O. in seno al 2° Congresso Nazionale della Federazione Italiana di Ostetricia e Ginecologia F.I.O.G. svoltosi al Lingotto di Torino dall'1 a 3 Dicembre 2009 (Agarwal A, Giorgino FL, Coppola L, F.I.O.G. 2009).

### 1. Come si presenta la cromatina degli spermatozoi umani?

Il DNA nemaspermico è organizzato in modo specifico (maturazione/condensazione) tale da rendere la cromatina nucleare compatta e stabile. Questa organizzazione del DNA non solo permette un impacchettamento molto stretto delle informazioni genetiche che verranno trasferite alla cellula uovo, ma assicura anche che il DNA sia "recapitato" in una forma fisica e chimica tale da consentire lo sviluppo embrionale, grazie a un facile accesso alle informazioni genetiche paterne. Spermatozoi fertili hanno un DNA intatto, in grado di decondensarsi durante il processo di fertilizzazione al momento opportuno trasmettendo DNA senza difetti, capace quindi di incontrarsi e non di scontrarsi con il DNA materno.

### 2. Origine del danno al DNA

I principali meccanismi alla base del danno del DNA sono due:

- alterazioni durante la spermatogenesi e/o spermiogenesi. Alterazione o interruzione del sistema di regolazione cellulare, apoptosi, riparazione del DNA e rimodellamento cromatinico;
- alterazioni causate dallo stress ossidativo. Danno indotto dall'inefficienza del sistema di difesa antiossidante contro l'azione dei radicali liberi.

Fattori associati al danneggiamento del DNA spermatico sono:

- farmaci, chemioterapici, radiazioni,
- stili di vita (fumo, radiazioni dei telefoni

cellulari, abuso di alcool, droghe etc.);

- infiammazioni del tratto genitale;
- ipertermia scrotale;
- disturbi ormonali;
- varicocele;
- congestione pelvica.

### 3. Tipi di danno al DNA

Difetti nel genoma paterno possono manifestarsi come:

- difetti di condensazione/maturità nucleare;
- interruzioni o difetti nell'integrità del DNA (rotture della singola o della doppia elica del DNA).

### 4. Significato del danno al DNA spermatico

L'integrità del DNA spermatico è essenziale per l'accurata trasmissione delle informazioni genetiche. Difetti nel genoma maschile potrebbero non essere corretti dai sistemi endogeni di riparazione del DNA dell'ocita, inficiando così la possibilità per la coppia di avere un figlio sano. Recenti lavori hanno sollevato preoccupazioni circa la riduzione della fertilità maschile dovuta proprio ad anomalie genomiche (Aitken and Sawyer 2003; Zini and Sigman 2009; Aitken and Lullis 2010; Cohen-Bacrie et al. 2009; Moskovtsev et al 2009) e all'incremento di anomalie congenite, tumori infantili e malattie ereditarie nella prole.

Con l'avvento delle ART, per le quali è sufficiente un ridotto numero di spermatozoi, parametri seminali tradizionali come la conta e lo studio della motilità sono diventati meno importanti nella valutazione della qualità seminale. Recentemente quindi l'integrità del DNA spermatico è stata riconosciuta come misura indipendente e imprescindibile della qualità. Solo studiando infatti quella che a noi piace definire l'anima degli spermatozoi siamo in grado di migliorare la capacità diagnostica e prognostica rispetto ai parametri seminali standard per la fertilizzazione sia *in vivo* che *in vitro*.

La causa di infertilità in soggetti subfertili

*Tabella II. Distribuzione della frammentazione del DNA spermatico tramite la tecnica TUNEL in 1.633 liquidi seminali, appartenenti a partner maschili di coppie infertili (Cohen-Bacrie P. 2009; mod.).*

Frammentazione del DNA Spermatico	Nr. di pazienti (%)
0-20%	668 (40,9)
20-30%	463 (28,4)
30-40%	286 (17,5)
>40%	216 (13,2)

con parametri seminali normali potrebbe quindi essere relazionata a un DNA spermatico alterato (Tab. II).

### 5. Danni al DNA spermatico e parametri seminali di routine

Cohen-Bacrie et al (2009) hanno condotto uno studio prospettico su 1.633 pazienti per determinarne la correlazione tra parametri seminali e tasso di frammentazione tramite la tecnica TUNEL.

È stata evidenziata una correlazione tra i risultati della TUNEL e le seguenti variabili:

- età dei pazienti;
- durata dell'astinenza (correlazione positiva) (p=006);
- conta totale degli spermatozoi mobili (correlazione inversa) (p<0,0001);
- progressione rapida (correlazione inversa) (p<0,0001);
- vitalità (correlazione negativa) (p<0,0001);
- percentuale di forme atipiche (correlazione positiva) (p<0,0006);
- colli anormali (correlazione positiva) (p=016);
- code avvolte (correlazione positiva) (p<0,0001).

Non sembra invece esserci correlazione tra la percentuale di frammentazione secondo tecnica TUNEL e le seguenti variabili:

- percentuale di spermatozoi mobili e atipici per eiaculato;
- motilità progressiva dopo 1 ora e ampiezza dello spostamento laterale della testa;

- numero di spermatozoi con parte basale del flagello anormale o circolare;
- volume seminale e concentrazione spermatica;
- pH seminale;
- morfologia della testa, dell'acrosoma e della parte intermedia;
- variazioni dei fattori di spermioagglutinazione;
- presenza di leucociti e neutrofili nell'eiaculato.

### 6. Attuali orientamenti su danno del DNA e gravidanze naturali

Evidenze in letteratura mostrano che il danno al DNA spermatico influenza l'esito della fertilità in misura variabile. Ne consegue che, anche qualora uno spermatozoo con DNA anomalo fertilizzasse l'ovocita e la gravidanza venisse portata felicemente a termine, c'è comunque la possibilità che si sviluppino anomalie congenite nella prole. Un alto DFI (DNA Fragmentation Index) non preclude quindi che la gravidanza abbia esito positivo.

Nonostante il valore predittivo delle tecniche SCSA/TUNEL sia elevato per le gravidanze normali e per le IUI, sono ancora necessari ulteriori studi per confermare la relazione tra integrità del DNA spermatico ed esiti di gravidanze.

### 7. Ruolo del danno del DNA spermatico nelle ART

Il danno al DNA spermatico ha attirato molto l'attenzione a causa di recenti lavori che lo correlano con vari indici di fertilità, come il tasso di fertilizzazione, di impianto embrionale, di aborti precoci, di gravidanze ottenute e di vitalità dei bambini nati (Agarwal and Al-lamaneni, 2004) (Tab. III).

Se il DNA spermatico non si decondensa dopo l'entrata nell'ooplasma la fertilizzazione potrebbe non avvenire; difetti del DNA spermatico possono portare a fallimenti anche ad avvenuta fertilizzazione (es. bassa qualità embrionale) (Tomsu et al. 2002).

Tabella III. Influenza del danno del DNA spermatico sulla percentuale di fertilizzazione, sulla qualità embrionale e sulla pregnancy rates in IVF e IVF/ICSI (Zini A. 2006 mod.).

Studio	Influenza del danno del DNA spermatico*					
	IVF n. di pazienti	ICSI n. di pazienti	Sulla percentuale di fertilizzazione	Sulla qualità embrionale	Sulla pregnancy rates	Assay used
Lopes 1998	0	150	↓	0	NA	TUNEL
Host 2000	50	61	↓IVF	NA	NA	TUNEL
Tomlinson 2001	140	0	0	0	↓	TUNEL
Tomsu 2002	40	0	0	↓	↓	Comet
Morris 2002	20	40	0	↓	NA	Comet
Benchaib 2003	50	54	↓	0	↓ICSI	TUNEL
Larson-C 2003	55	34	0	0	↓	SCSA
Henkel 2004	249	0	0	NA	↓	TUNEL
Seli 2004	49	0	NA	↓	0	TUNEL
Virro 2004	249	-	0	↓	↓	SCSA
Bungum 2004	109	66	NA	NA	0	SCSA
Payne 2005	46	54	↓	NA	↓ <sup>†</sup>	SCSA
Huang 2005	217	86	↓	0	0	TUNEL
Zini 2005	0	60	0	↓	0	SCSA

IVF=fertilizzazione *in vitro*; ICSI=iniezione intracitoplasmatica di sperma; NA=non disponibile; TUNEL=terminal deoxynucleotidyl-mediated Nick End Labelling transferasi; Comet=Single Cell Gel Elettroforesi; SCSA=Sperma Chromatin Structure Assay; \*↓danno del DNA spermatico è associato con scarso esito riproduttivo; 0=danno del DNA spermatico non ha effetti su esiti riproduttivi; <sup>†</sup>il risultato atipico può essere dovuto all'alta proporzione di coppie con fattori femminili di infertilità

Un alto DFI (DNA Fragmentation Index) spermatico può inoltre essere causa di aborti; potrebbe essere proprio questa la chiave per spiegare alcuni casi di poliabortività inspiegata (Carrell et al. 2003).

Ma in fondo c'è un reale aumento del rischio di anomalie dopo le ART?

Non è chiaro se la responsabilità sia da attribuire alla tecnica ICSI o a problematiche della coppia stessa.

1. Vi è una maggiore incidenza di difetti di nascita (odds ratio: ~1,5) in bambini concepiti con IVF/ICSI rispetto a bambini concepiti naturalmente (Hansen et al. 2002; 2005).

2. Vi è una elevata prevalenza di anomalie cromosomiali de-novo (1,6 vs. 0,5%) in bambini concepiti con ICSI rispetto a quelli concepiti naturalmente (Bonduelle et al. 2005).

3. È stato trovato un maggior numero di anomalie epigenetiche (es.: errori nella metilazione del DNA) in bambini concepiti con IVF/ICSI rispetto a quelli concepiti naturalmente

## 8. Tecnica ideale per la valutazione del danno al DNA

Dovrebbe rispondere alle seguenti caratteristiche:

- semplice, attendibile e riproducibile;
- definire la frazione di DNA spermatico alterato associata con una riduzione della fertilità, della qualità embrionale e del tasso di gravidanza utilizzando il test disponibile;
- indirizzare nuovi studi per il futuro sviluppo di analisi del danno al DNA spermatico. Solo la quantità dei difetti del DNA, o anche la qualità, il tipo, la localizzazione hanno un ruolo nella riproduzione? Se quest'ultima ipotesi è vera, questo può spiegare perché molte coppie possono ottenere gravidanze nonostante presentino alti livelli di danno al DNA spermatico;
- identificare e selezionare spermatozoi con DNA intatto influenzando così significativamente sul futuro delle ART. Se una tale tecnica fosse sviluppata potrebbe rendere la misurazione del danno al DNA di corrente utilizzo.

### 9. Indicazioni cliniche nell'esecuzione di test per la valutazione del danno al DNA

Il valore potenziale dell'integrità del DNA risulta chiaro se si considera che il gamete maschile è un trasportatore specializzato, la cui funzione è di far arrivare il corredo genetico all'ovocita. Comunque, la mancanza di conoscenze a riguardo attualmente limita l'applicazione di tale test solo in centri andrologici altamente specializzati in grado di trasmettere il proprio know how, fornendo assistenza tecnica, logistica e formativa a singoli specialisti, a strutture sanitarie, laboratori d'analisi e ai centri di procreazione medicalmente assistita. Il continuo aggiornamento scientifico e culturale in tema di riproduzione umana, rende il nostro centro un'azienda sanitaria in grado di offrire un'ampia gamma di esami diagnostici specifici nel campo della medicina e biologia riproduttiva, garantendo a coloro che usufruiscono di tali prestazioni l'esecuzione della maggior parte delle analisi specialistiche emergenti nei seguenti campi d'azione:

- a. counseling nella pianificazione della prima gravidanza;
- b. sterilità inspiegata;
- c. poliabortività;
- d. counseling e pianificazione di coppie che si sottoporranno a PMA per cause maschili;
- e. counseling dopo reiterati fallimenti IVF/ICSI;
- f. tossicologia riproduttiva, inquinamento ambientale e voluttuario;
- g. monitoraggio del rischio potenziale per la prole (in prospettiva).

### 10. Strategie per migliorare l'integrità del DNA spermatico e risvolti nelle ART... ovvero "Le 10 regole d'oro per mantenere integro il proprio DNA"

1. Smettere di fumare o/e di esporsi a possibili inquinanti estrogenici, come pesticidi e droghe;
2. uso di trattamenti con antiossidanti orali prima di una ART per minimizzare lo stress ossidativo;
3. cura delle flogosi croniche di coppia per ri-

durare i ROS generati dai leucociti;

4. aumentare la frequenza delle eiaculazioni spontanee e/o dei rapporti sessuali nei periodi non fertili della donna per rinnovare il pool di spermatozoi utilizzabili al momento della fecondazione spontanea o/e delle tecniche di PMA;

5. utilizzo nelle ICSI di spermatozoi testicolari congelati invece di spermatozoi epididimari o seminali, per minimizzare quelli con DNA frammentato nei soggetti fortemente dispermici;

6. eseguire colture *in vitro* di spermatozoi congelati recuperati dal testicolo per migliorarne la motilità e ridurre la proporzione di quelli che presentano rotture della singola elica;

7. possibilità di usare sistemi ottici a elevata magnificazione per selezionare gli spermatozoi migliori (IMSI);

8. ridurre la forza centrifuga e possibilmente prediligere sempre le tecniche di Swim up per la preparazione degli spermatozoi per le tecniche di PMA *in vivo* e/o *in vitro*;

9. aggiunta di un medium di lavaggio al liquido seminale prima della liquefazione allo scopo di inibire la contaminazione batterica e ridurre i ROS;

10. isolare spermatozoi maturi liberi da anomalie cromosomiali da usare nelle PICSI tramite l'utilizzo della tecnica di legame spermatozoo-acido ialuronico (HA).

### Conclusioni

- L'integrità del DNA spermatico gioca un ruolo preponderante nel successo della fertilità maschile e di coppia;
- sembra che ci sia una soglia di danno al DNA spermatico oltre la quale lo sviluppo embrionale e il conseguente esito della gravidanza sono inficiate;
- evidenze cliniche suggeriscono che il danno al DNA spermatico è deleterio per la riuscita delle tecniche riproduttive;
- gli spermatozoi di soggetti infertili possiedono sostanzialmente più DNA danneggiato rispetto ai soggetti fertili;



- Sono necessari ulteriori studi per selezionare ancor più correttamente individui infertili tramite test di valutazione del danno al DNA;
- Nell'era della procreazione assistita oggi,

per ottimizzarne i risultati, vale più che mai il consiglio di Agarwal: "Right Assay for the Right Patient at the Right Time" (La Giusta Tecnica per il Giusto Paziente al Momento Giusto, Ashok Agarwal, Cleveland 2009).

## Bibliografia

- Agarwal A, Giorgino FL, Coppola L. Negative effect of oxidative stress on DNA of human male Gametes. Atti del 2° Congresso Nazionale FIOG e 11° Congresso AGEO, Torino Lingotto, 1-3 Dicembre 2009.
- Agarwal A, Sharma RK, Desai NR, Prabakaran S, Tavares A, Sabanegh E. Role of oxidative stress in pathogenesis of varicocele and infertility. *Urology* 2009;73(3):461-469.
- Agarwal A, Varghese AC, Sharma RK. Markers of oxidative stress and sperm chromatin integrity. *Methods Mol Biol* 2009;590:377-402.
- Agarwal A, Prabakaran S, Allamaneni S. What an andrologist/urologist should know about free radicals and why. *Urology* 2006;67(1):2-8.
- Agarwal A, Prabakaran SA, Said TM. Prevention of oxidative stress injury to sperm. *J Androl* 2005;26(6):654-660.
- Agarwal A, Said TM. Oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male infertility: a clinical approach. *BJU Int* 2005;95(4):503-507.
- Agarwal A, Allamaneni SS. Sperm DNA damage assessment: a test whose time has come. *Fertil Steril* 2005;84:850.
- Aitken RJ, De Lullis GN. On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa. *Mol Human Reprod* 2010;16(1):3-13.
- Aitken RJ, Sawyer D. The human spermatozoon-not waving but drowning. *Adv Exp Med Biol* 2003;518:85-98.
- Agarwal A, Mahfouz RZ, Sharma RK et al. Potential biological role of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) in male gametes. *Reprod Biol Endocrinol* 2009;7:143.
- Aziz N, Agarwal A. Evaluation of sperm damage: beyond the World Health Organization criteria. *Fertil Steril* 2008;90(3):484-485.
- Benchaib M, Lornage J, Mazoyer C, Lejeune H, Salle B, Francois Guerin J. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as a prognostic indicator of assisted reproductive technology outcome. *Fertil Steril* 2007;87:93-100.
- Bonduelle M, Wennerholm UB, Loft A et al. A multi-centre cohort study of the physical health of 5-year-old children conceived after intracytoplasmic sperm injection, in vitro fertilization and natural conception. *Human reprod* 2005;20(2):413-419.
- Bungum M, Humaidan P, Spano M et al. The predictive value of sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters for the outcome of intrauterine insemination, IVF and ICSI. *Hum Reprod* 2004;19:1401.
- Carrell DT, Liu L, Peterson CM et al. Sperm DNA fragmentation is increased in couples with unexplained recurrent pregnancy loss. *Arch Androl* 2003;49(1):49-55.
- Cohen-Bacrie P, Belloc S, Menézo YJ, Clement P, Hmidi J, BenKhalifa M. Correlation between DNA damage and sperm parameters: a prospective study of 1633 patients. *Fertil Steril* 2009;91:1801-1805.
- Coppola L, Calò GA, De Luca GF, Losavio PP, Chiappetta L, Sances B. Varicocele: possibile causa andrologica di abortività nella donna (Dati preliminari su 52 coppie); Atti del 5° Congresso Nazionale SIA, Bologna 1987:273-279.
- Coppola L, Losavio PP. Risultati preliminari su uno studio di correlazione tra zinco intraspermatozoario e test all'arancio di acridina in pazienti infertili; Atti 3° Congresso Nazionale della Società Italiana di Fisiopatologia della Riproduzione, Padova 1988:181-188.
- Coppola L, Barone G, Caputo L et al. Evaluation of male partner in assisted reproduction and ovum donation programs - role of the andrology laboratory; Atti del Congresso Nazionale della Società Ucraina di Medicina riproduttiva, Kiev, 19-21 giugno 2008:39-40.
- Coppola L, Pinto Provenzano S, Montagna DD et al. Lo stress ossidativo nel liquido seminale. Fitoterapia ed integratori in ostetricia e ginecologia. CIC Edizioni Internazionali 2009;261:72-77.
- Coppola L, Pinto Provenzano S, Montagna DD et al.

Stress ossidativo ed infertilità: ruolo del laboratorio andrologico. Atti del 25° Congresso Nazionale SIA, Catania, 10-13 giugno 2009:107.

- Evenson DP, Larson KL, Jost LK. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J Androl* 2002;23:25.
- Gatewood JM, Schroth JP, Schmid CW, Bradbury EM. Zinc-induced secondary structure transition in human sperm protamine. *The Journal of Biological Chemistry* 1990;265:20667-20672.
- Hansen M, Kurinczuk JJ, Bower C, Webb S. The risk of major birth defects after intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization. *N Eng J Med* 2002;346(0):725-30.
- Hansen M, Bower C, Milne E et al. Assisted reproductive technologies and the risk of birth defects – a systemic review. *Hum Reprod* 2005;20:328-338.
- Henkel R, Kierspel E, Hajimohammad M et al. DNA fragmentation of spermatozoa and assisted reproduction technology. *Reprod Biomed Online* 2003;7:477-484.
- Lopes S, Jurisicova A, Sun JG, Casper RF. Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod* 1998;13:896-900.
- Mahfouz RZ, Du Plessis SS, Aziz N, Sharma R, Sabanegh E, Agarwal A. Sperm viability, apoptosis, and intracellular reactive oxygen species levels in human spermatozoa before and after induction of oxidative stress. *Fertil Steril* 2008. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 19100530.
- Mahfouz R, Sharma R, Lackner J, Aziz N, Agarwal A.

Evaluation of chemiluminescence and flow cytometry as tools in assessing production of hydrogen peroxide and superoxide anion in human spermatozoa. *Fertil Steril* 2009;92(2):819-827.

- Mahfouz RZ, Sharma RK, Said TM, Erenpreiss J, Agarwal A. Association of sperm apoptosis and DNA ploidy with sperm chromatin quality in human spermatozoa. *Fertil Steril* 2009;91(4):1110-1118.
- Moskovtsev SI, Willis J, White J, Mullen JB. Sperm DNA damage: correlation to severity of semen abnormalities. *Urology* 2009;74(4):789-793.
- Payne JF, Raburn DJ, Couchman GM et al. Redefining the relationship between sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay and outcomes of assisted reproductive techniques. *Fertil Steril* 2005;84:356.
- Sergerie M, Laforest G, Bujan L et al. Sperm DNA fragmentation: threshold value in male fertility. *Hum Reprod* 2005.
- Sakkas D, Mariethoz E, Manicardi G et al. Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Rev Reprod* 1999;4:31.
- Tomsu M, Sharma V, Miller D. Embryo quality and IVF treatment outcomes may correlate with different sperm comet assay parameters. *Hum Reprod* 2002;17(7):1856-1862.
- Zini A, Libman J. Sperm DNA damage: clinical significance in the era of assisted reproduction. *CMAJ* 2006; 175:495.
- Zini A, Sigman M. Are tests of sperm DNA damage clinically useful? Pros and cons. *J Androl* 2009;3:219-229.