

Test della frammentazione del DNA spermatico: metodi e interpretazione dei risultati

L'integrità del DNA dello spermatozoo è considerata di fondamentale importanza per ottenere una normale fecondazione, un normale sviluppo embrionale, il successivo impianto dell'embrione e l'ottenimento di gravidanza sia nella fecondazione naturale che in quella assistita. Il DNA dello spermatozoo è fisiologicamente soggetto a frammentazione durante la spermiogenesi per permettere la riorganizzazione della cromatina. Questi tagli sono poi riparati per opera delle topoisomerasi. Tuttavia, se questo processo di riparazione non funziona e se intervengono altri meccanismi (difetti della condensazione cromatinica, processi apoptotici e stress ossidativo) che inducono rotture non fisiologiche nel DNA, nell'eiaculato saranno presenti spermatozoi con DNA frammentato. Tale anomalia genomica si osserva in percentuali elevate nei pazienti sub- e infertili, nei fumatori, negli uomini di età avanzata, nei soggetti esposti a sostanze tossiche o a terapie gonadotossiche.

Numerosi studi hanno dimostrato che la percentuale di spermatozoi frammentati presenti in un eiaculato correla con i parametri seminali convenzionali, anche se tale associazione non è così stretta, indicando che il danno al DNA spermatico potrebbe predire, in modo indipendente, il potenziale fecondante dello spermatozoo. Tuttavia, al momento, l'accuratezza, la sensibilità e la specificità diagnostica dei test utilizzati per la valutazione dell'assetto del DNA spermatico, nel discriminare tra soggetti fertili e infertili, non sono completamente validate e rimane ancora incerta la loro capacità di predire gli esiti delle tecniche di fecondazione assistita.

Vi sono principalmente quattro metodi utilizzati per la determinazione della frammentazione del DNA spermatico: Comet assay (single cell gel electrophoresis), TUNEL (terminal deoxyuridine nick end labeling assay), SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay) e SCD (Sperm Chromatin Dispersion assay) (vedi tabella).

1. Comet assay: prevede l'inclusione degli spermatozoi in un gel di agarosio su vetrino e la migrazione per elettroforesi del singolo spermatozoo lisato in condizioni neutre o alcaline; il DNA è visualizzato grazie all'impiego di un colorante specifico e le cellule danneggiate appaiono come una cometa, con una testa fluorescente e una coda la cui lunghezza e fluorescenza è proporzionale al numero di tagli al DNA.

È un metodo rapido e sensibile che permette la valutazione del danno al DNA anche in campioni con un numero limitato di spermatozoi e rivela i tagli sia a singola sia a doppia elica.

È stata proposta una versione modificata della COMET, pretrattando gli spermatozoi con l'enzima formamidopirimidina DNA glicosilasi, che converte l'8-idrossi-deossiguanosina in tagli al DNA. La frammentazione del DNA risultante è data dalla somma dei tagli al DNA e la presenza di 8-idrossi-deossiguanosina, un marker del danno al DNA da stress ossidativo. Utilizzando tale metodo, il potere predittivo della Comet, in termini di esiti di fecondazione assistita, è aumentato sia per FIVET sia ICSI.

2. TUNEL: quantifica il livello di nucleotidi fluorescenti incorporati alle estremità 3' libere del DNA derivate da rotture a singola o doppia elica in una reazione catalizzata dall'enzima deossinucleotidil transferasi terminale stampo-indipendente. Si può rivelare sia attraverso microscopia a fluorescenza sia citometria a flusso.

Per questa metodologia sono stati riportati diversi valori di cut-off per lo stato di fertilità maschile. Alcuni studi hanno cercato di migliorare la sensibilità e la specificità di questo test apportando delle modifiche, ovvero: analizzando i risultati con un citometro a flusso invece che in microscopia a fluorescenza, decompattando il DNA con ditiotreitolo (che facilita l'accessibilità ai nuclei dello spermatozoo da parte dell'enzima), eliminando tutti gli interferenti presenti nel seme nell'analisi citofluorimetrica o aggiungendo un colorante nucleare per discriminare tra popolazioni di spermatozoi che mostrano differenti gradi di danno al DNA.

Altro vantaggio potrebbe essere rappresentato dall'utilizzo della tecnica TUNEL accoppiata a un colorante vitale, che permetterebbe la rivelazione della frammentazione del DNA solo nella frazione di spermatozoi vivi, che teoricamente dovrebbe avere un impatto maggiore sugli esiti riproduttivi, migliorando quindi il potere predittivo della tecnica.

3. SCSA: i tagli al DNA spermatico sono determinati in modo indiretto valutando la suscettibilità della cromatina alla denaturazione del DNA. Determina l'estensione del danno misurando lo shift metacromatico dalla fluorescenza verde (tagli a doppio filamento) alla fluorescenza rossa (tagli a singolo filamento) in seguito a denaturazione acida e colorazione con arancio di acridina. Il rapporto tra queste due emissioni determina l'indice di frammentazione del DNA (DFI: fluorescenza rossa/(fluorescenza rossa+fluorescenza verde)). SCSA è l'unica metodica standardizzata e con la quale sono stati determinati dei valori di cut-off per distinguere soggetti fertili e infertili. Un DFI < 30% identifica una popolazione di spermatozoi con buona integrità cromatinica e un potenziale stato di fertilità, mentre un DFI ≥ 30% indica una popolazione di spermatozoi con anomalie della struttura cromatinica.

4. SCD: determina la capacità della cromatina spermatica di formare aloni di dispersione in seguito a decondensazione cromatinica, permettendo di differenziare gli spermatozoi non-frammentati (con alone) da quelli frammentati (senza alone) in modo indiretto. Il test è effettuato mediante un kit commerciale (Halosperm) e rivelato mediante microscopio in campo chiaro.

Uno studio recente ha comparato le diverse tecniche sulla stessa popolazione di soggetti fertili e infertili calcolando le rispettive curve ROC: la Comet alcalina si è rivelata quella con l'AUC (area under the curve) più alta e con valori maggiori di sensibilità e specificità seguita da TUNEL, SCD, SCSA e Comet neutrale.

Numerosi studi hanno valutato la relazione tra danni al DNA (valutato con le varie metodiche sopradescritte) ed esiti riproduttivi sia nelle gravidanze naturali che in quelle da fecondazione assistita. I risultati dimostrano che il danno al DNA è associato a un tasso di gravidanza più basso nella fecondazione naturale, intrauterina e FIVET e, che, soggetti con bassa frammentazione del DNA hanno un più alto indice di bimbi nati rispetto a quelli con elevati livelli, in seguito a FIVET. È meno chiara l'associazione tra danno al DNA ed esiti riproduttivi in seguito ad ICSI, anche se in una meta-analisi recentemente pubblicata si dimostra un impatto negativo della frammentazione del DNA anche con l'impiego di questa tecnica. Le recenti meta-analisi hanno mostrato anche che le tecniche utilizzate hanno un impatto diverso: dai risultati sembra infatti che SCSA e SCD siano metodi poco predittivi degli esiti della fecondazione assistita, mentre il TUNEL e la Comet sembrano presentare una maggior capacità predittiva. Al contrario, nel concepimento naturale e nelle inseminazioni intrauterine l'SCSA risulta essere un buon predittore di gravidanza. Da sottolineare che questi dati provengono da review e meta-analisi, che da un lato, analizzando numerosi studi, aumentano la dimensione del campione e la potenza statistica, dall'altro, risentono dell'eterogeneità dei dati, in quanto, includono studi che utilizzano metodologie diverse, popolazioni differenti e valori di soglia diversi.

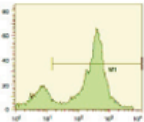
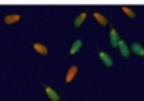
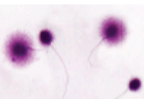
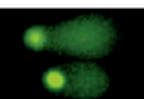
L'impiego, quindi, di test per la valutazione della frammentazione del DNA come marker diagnostico per meglio gestire il maschio infertile rimane controverso e, a oggi, un consenso non è stato raggiunto. Le motivazioni di questo mancato accordo sono numerose:

- le differenti metodiche misurano aspetti diversi del danno al DNA (mentre Comet e TUNEL rivelano i tagli "reali" al DNA, SCSA e SCD misurano l'integrità cromatinica e la suscettibilità del DNA alla denaturazione), portando quindi a risultati incongruenti e non comparabili;
- non esiste un consenso su quale sia il metodo "gold standard";
- mancanza di standardizzazione delle metodiche (eccetto per SCSA) che rende difficile il paragone tra laboratori;

- ampi range di valori di soglia ottenuti, anche per lo stesso test (dovuto alla mancata standardizzazione della metodica);
- bassa specificità e riproducibilità delle diverse metodiche;
- gli studi spesso non riportano i dati corretti per i fattori confondenti (ad es. il fattore femminile può avere un ruolo modulatore);
- questi metodi spesso non differenziano il danno al DNA patologico (ovvero clinicamente significativo) da quello fisiologico (ovvero clinicamente non-significativo).

Perché un test possa essere introdotto nella diagnostica dell'infertilità maschile dovrebbe essere in grado di discriminare tra soggetto fertile ed infertile e riuscire a predire l'esito riproduttivo. Inoltre, dovrebbero raggiungere buoni livelli di sensibilità, specificità, ripetibilità, predittività e robustezza statistica. Al momento, l'impiego dei test per la valutazione della frammentazione del DNA nella pratica clinica presenta delle limitazioni, per cui non è possibile giungere a conclusioni chiare riguardo all'utilità di questi metodi finché non saranno effettuati studi randomizzati, ben disegnati, con una potenza adeguata, che comparino soggetti maschi di coppie infertili con soggetti di provata fertilità ed escludano casi di infertilità femminile. Tali studi dovranno anche tener presente che il danno più rilevante è quello che impatta sugli esiti riproduttivi e quindi focalizzarsi sulla relazione tra i test utilizzati e l'esito riproduttivo preso in considerazione. Una volta che questo tipo di studi sarà stato eseguito, potranno essere definiti protocolli standardizzati che saranno poi verificati da opportuni controlli di qualità e che permetteranno di raggiungere una buona riproducibilità sia intra- che inter-laboratori. Infine sarà importante definire le categorie di soggetti in cui un eventuale test per la rivelazione del danno al DNA potrebbe essere utile e fornire informazioni cliniche (ad es. coppie con aborti ricorrenti o fallimenti di cicli di fecondazione assistita, soggetti che presentano età avanzata del maschio, esposizione a sostanze tossiche o terapie, obesità, fumo, segni di infezioni/infiammazioni del tratto genitale, lesioni del midollo spinale, varicocele).

Tabella. Principali metodi per la valutazione della frammentazione del DNA negli spermatozoi.
Modificata da Agarwal et al. TAU 2016.

	Test	Principle	Advantage	Disadvantage
	TUNEL	Quantifies the enzymatic incorporation of dUTP into DNA breaks. Can be done using both optical microscopy and fluorescent microscopy. Uses optical microscopy, fluorescent microscopy and flow cytometry	Sensitive, reliable with minimal inter-observer variability. Can be performed on few sperm	Requires standardization between laboratories
	SCSA	Measures the susceptibility of sperm DNA to denaturation. The cytometric version of AO test. Uses flow cytometry	Reliable estimate of the percentage of DNA-damaged sperm	Requires the presence of expensive instrumentation (flow cytometer) and highly skilled technicians
	SCD or Halo test	Assess dispersion of DNA fragments after denaturation. Uses optical or fluorescent microscopy	Simple test	Inter-observer variability
	SCGE or comet assay	Electrophoretic assessment of DNA fragments of lysed DNA. Uses fluorescent microscopy	Can be done in very low sperm count. It is sensitive and reproducible	Requires an experienced observer. Inter-observer variability

Lettere consigliate:

1. Agarwal A, Majzoub A, Esteves SC, Ko E, Ramasamy R, Zini A. Clinical utility of sperm DNA fragmentation testing: practice recommendations based on clinical scenarios. *Transl Androl Urol.* 2016 Dec;5(6):935-950. doi: 10.21037/tau.2016.10.03. Review.
2. Cissen M, Wely MV, Scholten I, Mansell S, Bruin JP, Mol BW, Braat D, Repping S, Hamer G. Measuring Sperm DNA Fragmentation and Clinical Outcomes of Medically Assisted Reproduction: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One.* 2016 Nov 10;11(11):e0165125.
3. Ribas-Maynou J, García-Peiró A, Fernández-Encinas A, Abad C, Amengual MJ, Prada E, Navarro J, Benet J. Comprehensive analysis of sperm DNA fragmentation by five different assays: TUNEL assay, SCSA, SCD test and alkaline and neutral Comet assay. *Andrology.* 2013 Sep;1(5):715-22.
4. Osman A, Alsomait H, Seshadri S, El-Toukhy T, Khalaf Y. The effect of sperm DNA fragmentation on live birth rate after IVF or ICSI: a systematic review and meta-analysis. *Reprod Biomed Online.* 2015 Feb;30(2):120-7. doi: 10.1016/j.rbmo.2014.10.018. Epub 2014 Nov 13. Review.
5. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Diagnostic evaluation of the infertile male: a committee opinion. *Fertil Steril.* 2015 Mar;103(3):e18-25.
6. Robinson L, Gallos ID, Conner SJ, Rajkhowa M, Miller D, Lewis S, Kirkman-Brown J, Coomarasamy A. The effect of sperm DNA fragmentation on miscarriage rates: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod.* 2012 Oct;27(10):2908-17. doi: 10.1093/humrep/des261. Epub 2012 Jul 12. Review.
7. Simon L, Zini A, Dyachenko A, Ciampi A, Carrell DT. A systematic review and meta-analysis to determine the effect of sperm DNA damage on in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection outcome. *Asian J Androl.* 2017 Jan-Feb;19(1):80-90. doi: 10.4103/1008-682X.182822. Review.
8. Zini A. Are sperm chromatin and DNA defects relevant in the clinic? *Syst Biol Reprod Med.* 2011 Feb;57(1-2):78-85. doi: 10.3109/19396368.2010.515704. Epub 2011 Jan 6. Review.

Autore : Sara Marchiani (Firenze)

Commissione Linee Guida SIAMS : Elisa Giannetta (Roma) , Sandro La Vignera (Catania), Sara Marchiani (Firenze), Pier Francesco Palego (Padova).