

# La frammentazione del DNA degli spermatozoi: possibilità terapeutiche

Luciano Negri

Humanitas Research Hospital

Department of Gynecology

Division of Gynecology and Reproductive Medicine

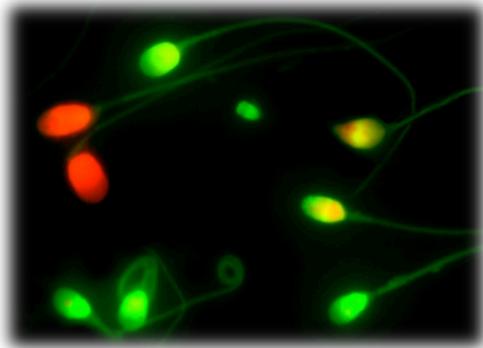
## **Esperienze di PMA in Lombardia**

### **3° Incontro Annuale**

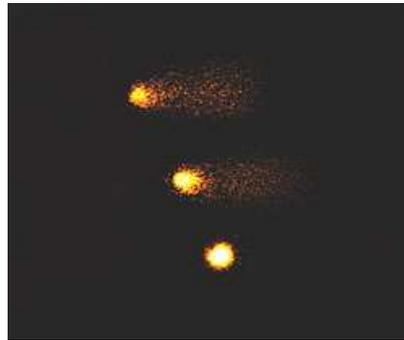
Valutazione e discussione di esperienze sulla PMA  
attraverso un dialogo interattivo

Sabato 15 marzo 2014 - Aula Magna Mangiagalli

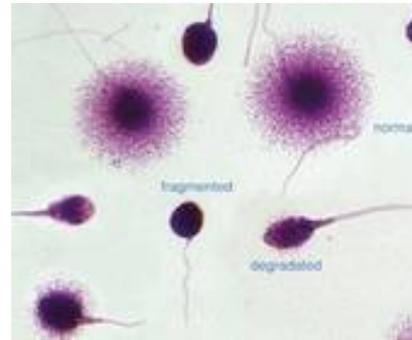
# Come si diagnostica?



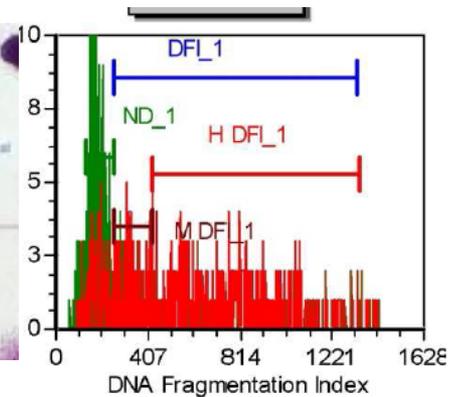
TUNEL



COMET



SCD



SCSA

Si usa lo sperma (come per lo spermogramma)

TUNEL e COMET a pH neutro: misurazione diretta del danno

SCSA, SCD: misurazione indiretta del danno

Il test ideale è il COMET ma è costoso e molto complesso

SCSA e SCD: test ideali per screening di base (semplicità e costo)

## Quale è l'impatto della frammentazione del DNA sulla riproduzione umana?

### Certezze

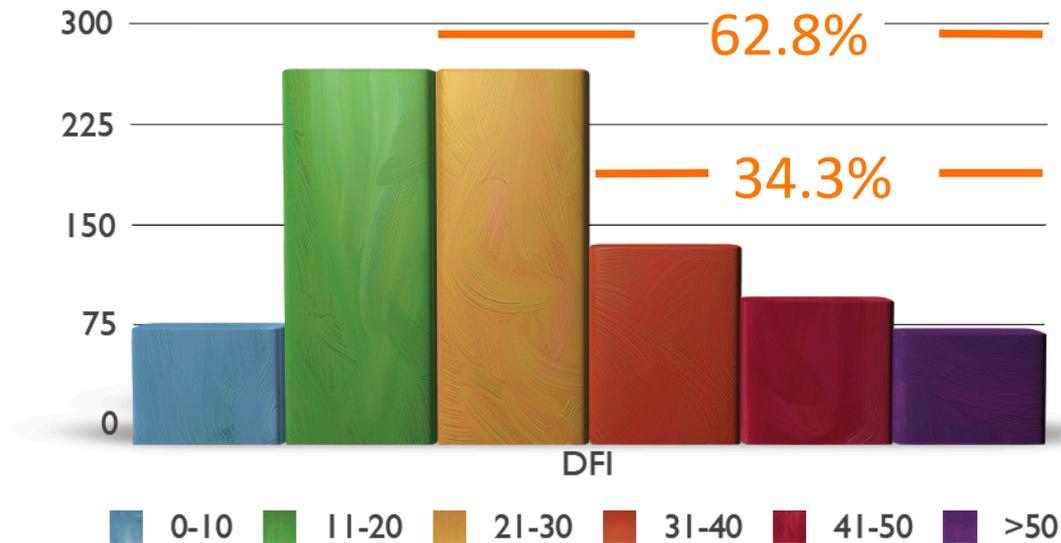
- La frammentazione (FRAM) è più elevata negli ipofertili vs popolazione generale
- 95% donatori seme ha FRAM <25% ; 98% infertili ha FRAM >25%  
Simon et al, 2011
- FRAM è un marker biologico affidabile per predire la fertilità spontanea. Le probabilità decadono quando FRAM 20%, quasi si azzerano quando FRAM >30%  
Evenson et al., 1999; Spano et al., 2000

### Solide evidenze

- La FRAM riduce i tassi di successo della inseminazione intrauterina (IUI)
- 387 cicli IUI: PR 19% per ciclo se FRAM<30%; PR 1,5% se FRAM>30%
- Sarebbe quindi auspicabile controllare FRAM prima di proporre IUI

Bungum et al., 2004-2007; Thomson et al., 2011

% frammentazione DNA in 918 pazienti non selezionati



2 pazienti su 3 che  
accedono  
al nostro Fertility  
Center ha una  
frammentazione >20%

**Obiettivo:** intercettare una anomalia invisibile allo spermogramma classico e correggerne le cause

Forme correggibili

Forme non correggibili

## CORREGGIBILI

Infezioni seminali  
Disturbi svuotamento vie seminali  
Varicocele  
Obesità  
Fumo, alcool, droghe, alimentazione, ecc.  
Saune, abbigliamento tecnico  
Esposizione onde elettromagnetiche  
Farmaci (probabilmente tutti !)

## NON CORREGGIBILI

Età  
Epididimo ostile  
Malformazioni vie seminali distali  
Ipogonadismo ipergonadotropo  
(testicoli piccoli e FSH >7.6 mu/ml)  
Malattie metaboliche croniche  
Uso cronico di farmaci indispensabili  
Aberrazioni cromosomiche

Smit et al., 2009; Simon et al., 2013

# Primo scenario

Spermiogramma poco alterato, durata 12-18 mesi;  
partner <35 anni senza evidenza di patologie

- 1) Terapia infezioni, varicocele (nel 50% si normalizza)
- 2) Perdita peso, attività fisica, correzione dieta, abolizione fumo, alcool, saune, ecc.
- 3) Utilizzo di integratori alimentari

(Zini et al., 2009; Lanzafame et al., 2009; Ross et al., 2010; Showell et al., 2011; Gharagozloo and Aitken, 2011)

**A 6 mesi: 1 su 4 ha una gravidanza**

## Primo scenario

No gravidanza: Ricontrollare FRAM

➡ normalizzata: procedere con IUI

➡ ancora elevata: NO IUI

Lewis et al., 2013



## PMA II livello

*La frammentazione del DNA condiziona l'esito della PMA II livello?*

Una frammentazione elevata condiziona l'esito finale della **IVF classica**

Collins et al., 2008; Simon et al., 2010; Lewis et al., 2013

FRAM	<25%	25-50%	>50%
Gravid. a termine	26.1%	18.8%	11.7%
Aborti	0%	6.3%	3.3%

Simon et al, 2013 - COMET

# Frammentazione & IVF classica

Prima di proporre una IVF varrebbe la pena di richiedere un test di frammentazione.

Se molto elevata (in base al tipo di test)



ICSI

Lewis et al, 2013

---

La ICSI è considerata la soluzione per la FRAM elevata

Host et al., 2000; Bungum et al., 2004; Boe-Hanson et al., 2006; Zini et al., 2005; Payne et al., 2005; Garrido et al. 2010; Benchaib et al., 2007; Lin et al., 2008; Shir Dar et al., 2013

ma non tutti sono d'accordo

Larson et al., 2000; Larson-Cook et al., 2003; Virro et al., 2004; Borini et al., 2006; Bakos et al., 2008; Bungum et al., 2008; Simon et al 2010; Avendano and Oehninger, 2010; Mesequer et al.,2011; Rocio Nunez-Calonge, 2012

# Frammentazione & ICSI

**Sicuramente** si associa ad un aumentato rischio di aborto (OR 2.5, 95% CI 1.5–4.0) Zini et al, 2008

**Probabilmente** si associa ad una riduzione della delivery rate

**Table III** OR on ART outcome in IVF and ICSI cycles using a cut-off value of 56% in the native semen.

	IVF			ICSI		
	<56%	>56%	OR (95% CI)	<56%	>56%	OR (95% CI)
Cycles started	127	97	—	47	80	—
Biochemical pregnancies (n, % per cycle)	44 (34.6)	18 (18.6)	2.58 (1.31–5.12)	23 (48.9)	31 (38.8)	1.18 (0.52–2.68)
Clinical pregnancies (n, % per cycle)	32 (25.2)	7 (7.2)	4.52 (1.79–11.92)	20 (42.6)	24 (30.0)	1.97 (0.81–4.77)
Deliveries to date (n, % per cycle)	27 (21.3)	2 (2.1)	10.13 (0.74–294.05)	17 (36.2)	15 (18.8)	5.25 (1.15–25.7)
Early pregnancy loss (n, % per cycle)	2 (1.6)	2 (2.1)	16.5 (0.95–424.73)	3 (6.4)	5 (6.3)	2.95 (0.49–19.16)

Simon et al, 2010

# Frammentazione elevata & ripetuti fallimenti ICSI: cosa fare?

Prescrivere antiossidanti (se non già utilizzati)

Tremellen et al., 2007

## Spermatozoi testicolari?

### REVIEW

#### The impact of sperm DNA damage in assisted conception and beyond: recent advances in diagnosis and treatment

Sheena EM Lewis <sup>a,\*</sup>, R John Aitken <sup>b</sup>, Sarah J Conner <sup>c</sup>, Geoffry De Iulius <sup>d</sup>,  
Donald P Evenson <sup>e</sup>, Ralph Henkel <sup>f</sup>, Aleksander Giwercman <sup>g,h,i</sup>,  
Parviz Gharagozloo <sup>j</sup>

**Fertility and Sterility.** AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE MEDICINE

Articles & Issues ▾ Collections ▾ For Authors ▾ For Patients ▾ Journal Info ▾ Subscribe ASRM ▾ Asia

All Content Search Advanced Search

< Previous Article **December 2015** Volume 104, Issue 6, Pages 1398–1405 Next Article >

Comparison of reproductive outcome in oligozoospermic men with high sperm DNA fragmentation undergoing intracytoplasmic sperm injection with ejaculated and testicular sperm

Sandro C. Esteves, M.D., Ph.D. , Fernando Sánchez-Martín, M.D., Pascual Sánchez-Martín, M.D., Danielle T. Schneider, M.Sc., Jaime Gosálvez, Ph.D.

**Fertility and Sterility.** AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE MEDICINE

Articles & Issues ▾ Collections ▾ For Authors ▾ For Patients ▾ Journal Info ▾ Subscribe ASRM ▾ Asia

All Content Search Advanced Search

< Previous Article **December 2015** Volume 104, Issue 6, Pages 1382–1387 Next Article >

Higher pregnancy rates using testicular sperm in men with severe oligospermia

Akanksha Mehta, M.D. , Alexander Bolyakov, M.S., Peter N. Schlegel, M.D., Darius A. Paduch, M.D., Ph.D.

# Uso di spermatozoi testicolari nei ripetuti fallimenti ICSI, in presenza di iperframmentazione del DNA spermatozoario

E' noto da anni che gli spermatozoi testicolari hanno un livello di frammentazione inferiore rispetto a quelli eiaculati

**TABLE 2**

TUNEL-positive cells, by sperm origin.

Sperm origin	Mean no. of counted cells	TUNEL-positive cells (%)
Patients (n = 41)		
Testicular	193	9.3 ± 2.3
Epididymal (caput/cauda)	420	17.4 ± 4.0
Vas deferens	280	29.2 ± 6.7
Electroejaculate	411	15.9 ± 2.9
Mean in patient group	338	18.9 ± 2.4 <sup>a</sup>
Donors (n = 10)		
	533	6.2 ± 0.7 <sup>a</sup>

Note: Values with the plus/minus sign are means ± SD. TUNEL = TdT-mediated dUTP nick-end labeling.

<sup>a</sup> P < .001

Ramos. Sperm DNA damage in obstructive azoospermia. Fertil Steril 2002.

Human Reproduction Vol.20, No.1 pp.226-230, 2005  
Advance Access publication November 11, 2004

doi:10.1093/humrep/deh590

## Efficient treatment of infertility due to sperm DNA damage by ICSI with testicular spermatozoa

Ermanno Greco<sup>1</sup>, Filomena Scarselli<sup>1</sup>, Marcello Iacobelli<sup>1</sup>, Laura Rienzi<sup>1</sup>, Filippo Ubaldi<sup>1</sup>, Susanna Ferrero<sup>1</sup>, Giorgio Franco<sup>1</sup>, Nazareno Anniballo<sup>1</sup>, Carmen Mendoza<sup>2,3</sup> and Jan Tesarik<sup>2,4,5</sup>

				DNA	
	Concentration (× 10 <sup>6</sup> /ml)	Motility (%)	Normal forms (%)	Ejaculate	Testis
1	6	11	2	20	3
2	31	52	3	15	5
3	38	71	20	24	4
4	33	40	11	21	3
5	3	19	9	27	2
6	25	65	15	31	6
7	75	42	48	25	4
8	22	3	8	23	1
9	25	15	6	22	18
10	2	14	7	25	5
11	19	29	25	26	4
12	51	41	48	21	3
13	12	63	11	37	6
14	24	32	61	19	5
15	1	42	22	17	6
16	33	21	13	24	4
17	17	56	10	20	5
18	66	44	58	27	3

# Testicular spermatozoa have statistically significantly lower DNA damage compared with ejaculated spermatozoa in patients with unsuccessful oral antioxidant treatment

Sergey I. Moskovtsev, M.D., Ph.D.,<sup>a</sup> Keith Jarvi, M.D.,<sup>b</sup> J. Brendan M. Mullen, M.D.,<sup>a</sup>  
Kenneth I. Cadesky, M.D.,<sup>c</sup> Thomas Hannam, M.D.,<sup>d</sup> and Kirk C. Lo, M.D.<sup>b</sup>

**TABLE 1**

**Sperm DNA assessment results.**

Patient	DFI (%)		TUNEL (%)		Absolute difference ejaculate versus testicular (%)
	Initial	Post-treatment	Ejaculate	Testicular	
1	75.59	75.89	70.8	14.5	-56.3
2	64.15	80.85	53	32.2	-20.8
3	43.29	39.57	23.3	13.2	-10.1
4	55.99	57.89	42.7	14.8	-27.9
5	45.75	56.71	56.5	9.0	-47.5
6	53.89	54.92	43.3	8.7	-34.6
7	33.48	52.69	40.5	12.6	-27.9
8	45.5	31.77	31.5	6.6	-24.9
9	33.79	45.17	20.8	6.5	-14.3
10	58.48	51.26	36.8	7.8	-29
11	46.08	40.53	32.4	12.6	-21.8
12	35.58	38.67	25	21.7	-3.3
Mean	49.2 ± 12.8	52.2 ± 14.7	39.7 ± 14.8	13.3 ± 7.3 <sup>a</sup>	-26.5 ± 14.8

Note: Values are mean ± standard deviation. DFI = DNA fragmentation index; TUNEL = terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick end labeling.

<sup>a</sup>  $P < .001$ .

Moskovtsev. Testicular spermatozoa DNA damage. *Fertil Steril* 2010.

Uso di spermatozoi testicolari nei ripetuti fallimenti ICSI, in presenza di iperframmentazione del DNA spermatozoario (2012-2014)



141 coppie con  $\geq 3$  cicli PMA falliti

Almeno 2 oociti iniettabili; età  $\leq 43$  aa

SCSA: DFI  $> 50\%$ . VITALITA' NORMALE (eosin test  $> 58\%$ )

Spermiogramma non gravemente alterato



79 coppie ripetono  
125 cicli ICSI  
con sperma



62 coppie usano  
spermatozoi testicolari  
(96 cicli ICSI)

# Spermatozoi testicolari?

Mediana	8696 ICSI	ICSI DFI>50% (79 coppie, 125 cicli)	TESE- ICSI (62 coppie, 96 cicli)
Età donna (median)	37	37	37
FSH	7,1	6.8	7
AMH	1,4	1,5	1,4
Oociti iniettati	5	6	5
Fertilizzati	3	4	3
Trasferiti	2	2	2
Non fertilizzazione	2,5%	5,6%	4,1%
Gravidanze	2218 (25,5)	25 (20,0)	18 (18,7)
Nascite/ciclo	1658 (19,0) *	<b>14 (11,2) *</b>	<b>16 (16,6)</b>

\* p=0.03

ns

- Nelle coppie con ripetuti fallimenti ICSI dovrebbero controllare la frammentazione del DNA spermatozoario.
- Quando risultasse elevata e non correggibile con terapie mediche convenzionali, si potrebbe prendere in considerazione l'utilizzo di spermatozoi testicolari.
- Ipotizzando in queste coppie un incremento del 6% delle nascite con ICSI ed i benefici economici, sociali e psicologici,
- uno screening preliminare della FRAM potrebbe risultare economicamente sopportabile sia per il Sistema Sanitario Regionale, sia per le coppie.