

## Effetto della terapia con FSH ricombinante sulla frammentazione del DNA spermatico in pazienti affetti da oligoastenoteratozoospermia avviati a cicli ICSI

F. FORNARO, E. LA VERDE, L. ZURZOLO, A. LAMBIASE, C. PACILIO, N. COLACURCI

**RIASSUNTO:** Effetto della terapia con FSH ricombinante sulla frammentazione del DNA spermatico in pazienti affetti da oligoastenoteratozoospermia avviati a cicli ICSI.

F. FORNARO, E. LA VERDE, L. ZURZOLO, A. LAMBIASE, C. PACILIO, N. COLACURCI

*Introduzione:* L'ICSI è considerata il trattamento appropriato per gli uomini sterili affetti da oligoastenoteratozoospermia OAT. Le alterazioni spermatiche, morfologiche e funzionali, a carico di questi pazienti possono portare ad insuccesso della ICSI, come nel caso di pazienti con un'elevata percentuale di DNA spermatico frammentato. L'efficienza delle terapie a nostra disposizione per l'ideopatica (iOAT) è ancora controversa. Diversi Autori hanno ipotizzato che la terapia con rFSH possa essere uno specifico pretrattamento per coppie con il partner maschile affetto da iOAT. Nel nostro studio abbiamo valutato l'effetto dell'rFSH ricombinante sulla frammentazione del DNA spermatico in pazienti avviati a cicli ICSI.

*Materiali e metodi:* sono stati arruolati per lo studio 39 uomini. Ai pazienti arruolati sono stati somministrati 150 UI di rFSH a giorni alterni almeno per tre mesi prima della ICSI. Per valutare la percentuale di DNA spermatico frammentato è stata utilizzata la tecnica del TUNEL assay, sia all'inizio del trattamento che al momento della ICSI.

*Risultati e conclusioni:* l'analisi dei dati ha mostrato che dopo terapia con rFSH si è verificata una riduzione statisticamente significativa del DFI (da  $23.4 \pm 10.1$  a  $14.9 \pm 8.8$ ). Tre sottogruppi di pazienti sono stati identificati sulla base della riduzione del DFI. I nostri risultati suggeriscono che la somministrazione di rFSH riduce la percentuale di DNA spermatico frammentato nell'iOAT quando presenti elevati livelli di DFI.

**SUMMARY:** Effect of the therapy with recombinant FSH on the fragmentation of the spermatic DNA in patients with idiopathic oligoastenoteratozoospermia undergoing ICSI.

F. FORNARO, E. LA VERDE, L. ZURZOLO, A. LAMBIASE, C. PACILIO, N. COLACURCI

*Introduction:* ICSI is considered to be an appropriate treatment for infertile men with severe oligoastenoteratozoospermia (OAT). Nevertheless, sperm morphological and functional alterations carried by these patients may impair ICSI success, such as high percentages of spermatozoa with DNA integrity anomalies. The efficiency of the available therapies for idiopathic OAT (iOAT) is still a matter for debate. It has been suggested that FSH therapy may be a specific pre-treatment for infertile male partners of couples undergoing ICSI. Our study aimed to evaluate the effect of recombinant FSH (rFSH) on sperm DNA fragmentation in iOAT patients undergoing ICSI.

*Material and methods:* 39 iOAT men volunteered for the study. Male patients were administered 150 IU of rFSH every other day for at least three months prior to ART. In order to determine the sperm DNA fragmentation index (DFI), TUNEL assay was performed before rFSH (baseline) and after the hormonal treatment (at the time of ICSI).

*Results and Conclusion:* The analysis of data showed that after rFSH therapy a statistically significant reduction in the sperm DFI occurred (from  $23.4 \pm 10.1$  to  $14.9 \pm 8.8$ ). Three subsets of patients were identified on the basis of their DFI decrease. Our findings suggest that rFSH administration may improve sperm DNA integrity in iOAT men with increased DFI values.

**KEY WORDS:** Frammentazione DNA spermatico - Oligoastenoteratozoospermia - rFSH - ICSI.  
Sperm DNA fragmentation - Oligoastenoteratozoospermia - rFSH - ICSI.

### Introduzione

L'oligoastenoteratozoospermia (OAT) rappresenta circa la metà dei casi di sterilità di coppia. Attualmente, l'ICSI è considerata il trattamento dell'OAT di grado severo. È stato osservato in numerosi studi (1-5) che pazienti con un'alta percentuale di spermatozoi

con DNA frammentato risultano subfertili o sterili e un'umentata percentuale di spermatozoi con DNA frammentato può inficiare il successo della ICSI (6-10). La frammentazione del DNA spermatico può essere causata da numerosi fattori, quali anomalie genetiche, la produzione di radicali liberi dell'ossigeno in sede pre- o post- testicolare (11-12), il fumo di sigaretta (13), precedenti radio o chemioterapie (14-15), infezioni del tratto urogenitale e leucospermia (16) ed anche varicocele (17). In circa il 30% di tutti i casi di infertilità maschile, la causa rimane tuttora sconosciuta, configurando quella che viene definita OAT idiopatica (iOAT). Tale patologia è stata associata ad un aumentato indice di frammentazione del DNA spermatico che potrebbe essere la causa determinante della ridotta capacità riproduttiva e degli insuccessi in tecniche di riproduzione assistita. Attualmente, non esiste un trattamento adeguato per questa condizione e l'efficacia delle terapie a nostra disposizione è ancora controversa. Considerato il ruolo fondamentale dell'FSH nella regolazione della spermatogenesi e l'efficienza della terapia con FSH ricombinante (rFSH) nei casi di ipogonadismi ipogonadotropi, è stato sperimentato da numerosi Autori l'utilizzo empirico dell'rFSH ricombinante per trattare i pazienti con iOAT. Alcuni Autori (18) hanno proposto l'utilizzo di FSH come pretrattamento di pazienti con iOAT avviati ad ICSI. Il nostro studio ha valutato l'effetto della terapia con rFSH sulla frammentazione del DNA spermatico nei pazienti con iOAT candidati ad ICSI.

## Materiali e metodi

Trentanove coppie sterili afferenti al Centro di Sterilità della Seconda Università degli studi di Napoli, con indicazione alla ICSI per iOAT sono state reclutate per lo studio. L'età dei pazienti era compresa fra 26 e 41 anni. I criteri per l'inclusione prevedevano nel partner maschile: conta spermatica tra 1 e 10 x10<sup>6</sup>/mL; livelli basali di FSH, LH, prolattina, testosterone e inibina B sierici nella norma; anamnesi negativa per criptorchidismo, varicocele, infezioni del tratto urogenitale, malattie croniche sistemiche; anticorpi antispermatozoi; microdelezioni del cromosoma Y; anomalie del cariotipo; mutazioni del gene CFTR. Per quanto riguarda la partner femminile (età < 37 anni), sono state incluse solo pazienti con assenza di altri fattori di sterilità eccetto da causa tubarica. Tutti i pazienti sono stati sottoposti a spermioγραμμα secondo le linee guida OMS, dopo 3-5 giorni di astinenza. Per valutare la percentuale di DNA spermatico frammentato è stata utilizzata la tecnica del *TUNEL assay* su spermatozoi selezionati con la tecnica del gradiente. Ai pazienti arruolati sono stati somministrati 150 UI di

rFSH a giorni alterni almeno per tre mesi prima della ICSI. Lo spermioγραμμα e la valutazione della frammentazione del DNA spermatico sono stati eseguiti prima dell'inizio del trattamento (T0) e quindi dopo il trattamento. La stimolazione ovarica nella partner femminile con rFSH è stata preceduta da *down-regulation* ipofisaria in *long-protocol*. Sono stati valutati: tasso di fertilizzazione e impianto, variazioni dei parametri dello spermioγραμμα e valutazione del DNA spermatico. Una risposta al trattamento è stata definita come variazione di almeno il 10% dell'indice di frammentazione del DNA (DFI) tra T0 e T1 con almeno un DFI < 15% dopo il trattamento. I risultati sono riportati come medie  $\pm$  DS.

## Risultati

La terapia con rFSH è durata 98.7 $\pm$ 15.8 giorni. La terapia con rFSH ha portato ad una riduzione statisticamente significativa ( $p < 0.05$ ) dei valori di DFI spermatico (da 23.3 $\pm$ 10.6 a 15.2 $\pm$ 9.0). Dai nostri risultati sono stati identificati tre sottogruppi di pazienti: gruppo A [16 uomini con DFI basale >15% e che hanno risposto con una significativa riduzione del loro DFI (da 24.7 $\pm$ 5.3 a 11.7 $\pm$ 2.1)]; gruppo B [7 uomini, con DFI basale < 15% ma in cui non ci sono state modifiche del loro DFI in seguito alla terapia (da 10.8 $\pm$ 2.7 a 10.4 $\pm$ 1.9)] e gruppo C [5 uomini con DFI basale > 15%, che non hanno mostrato riduzione significativa del loro DFI (da 36.4 $\pm$ 11.7 a 32.2 $\pm$ 7.9)]. Non sono state trovate differenze nei tassi di fertilizzazione e nella qualità embrionaria in relazione ai loro parametri di liquido seminale. Dopo l'esecuzione della ICSI sono state ottenute quattro gravidanze nel gruppo A, ed una nel gruppo B. Nel gruppo C è stata ottenuta soltanto una gravidanza esitata in aborto alla quinta settimana di gestazione.

## Discussione e conclusioni

La tecnica ICSI è sempre più usata per trattare coppie in cui il partner maschile è affetto da OAT idiopatica. L'iOAT è correlata alla presenza di una percentuale maggiore di spermatozoi con DNA frammentato. L'impossibilità da parte dell'operatore di accertare l'integrità del DNA spermatico dello spermatozoo durante la selezione dello stesso per l'esecuzione della ICSI, espone questi pazienti ad insuccesso della tecnica. Dai nostri risultati, si evince che l'FSH potrebbe migliorare i valori di DFI in un subset di pazienti. Infatti l'FSH stimola la sintesi di DNA durante meiosi e mitosi negli spermatogoni attraverso la sua azione sulle cellule del Sertoli ed assume quindi un ruolo pro-

tettivo contro la frammentazione del DNA spermatico. L'utilizzo di FSH esogeno bypassa anche le possibili alterazioni dell'asse ipotalamo-ipofisi, come il rapporto E-T. Non tutti i pazienti rispondono alla terapia, ma la valutazione del DFI basale, può indirizzare nella selezione dei pazienti che possano beneficiare della te-

rapia. Infatti pazienti con un valore aumentato di DFI sono risultati più responsivi. Nell'ambito dello studio della coppia è auspicabile quindi una valutazione ancor più minuziosa del fattore maschile, in quanto pazienti con iOAT e DFI aumentato possono giovare di una terapia con rFSH prima di essere avviati a ICSI.

## Bibliografia

1. 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;81:1289-95.
2. EVENSON DP, JOST LK, MARSHALL D, et al. *Utility of the sperm chromatin assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic.* Hum Reprod 1999; 14:1039-49.
3. SPANO M, BONDE JB, HJOLLUND HI, et al. *Sperm chromatin damage impairs human fertility.* Fertil Steril 2000;73:43-50.
4. ZINI A, BIELECKI R, PHANG D, et al. *Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men.* Fertil Steril 2001;75:674-7.
5. KODAMA H, YAMAGUCHI R, FUKUDA J, et al. *Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients.* Fertil Steril 1997;68: 519-24.
6. LOPES S, SUN JG, JURISICOVA A, et al. *Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection.* Fertil Steril 1998;69:528-32.
7. BUNGUM M, HUMAIDAN P, AXMON A, SPANO M, BUNGUM L, ERENPREISS J, GIWERCMAN A. *Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome.* Human Reproduction 2007; 22: 174-179.
8. BENCHAIIB M, BRAUN V, LORNAGE J, et al. *Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique.* Hum Reprod 2003;18:1023-8.
9. ZINI A, MERIANO J, KADER K, et al. *Potential adverse effect of sperm DNA damage on embryo quality after ICSI.* Hum Reprod 2005;20:3476-80.
10. LARSON-COOK KL, BRANNIAN JD, HANSEN KA, et al. *Relationship between the outcomes of assisted reproductive techniques and sperm DNA fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay.* Fertil Steril 2003;80:895-902.
11. SAKKAS D, MARIETHOZ E, MANICARDI G, BIZZARO D, BIANCHI PG, BIANCHI U. *Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa.* Rev Reprod 1999;4:31-7.
12. SHEN HM, DAI J, CHIA SE, LIM A, ONG CN. *Detection of apoptotic alterations in sperm in subfertile patients and their correlations with sperm quality.* Hum Reprod 2002;17:1266-73.
13. POTTS RJ, NEWBURY CJ, SMITH G, et al. *Sperm chromatin damage associated with male smoking.* Mutat Res 1999;423: 103-11.
14. MORRIS ID. *Sperm DNA damage and cancer treatment.* Int J Androl 2002a;25:255-61.
15. LEE SJ, SCHOVER LR, PARTRIDGE AH, et al. *American Society of Clinical Oncology Recommendations on Fertility Preservation in Cancer Patients.* J Clin Oncol 2006;24: 2917-31.
16. ERENPREISS J, HLEVICKA S, ZALKALNS J, et al. *Effect of leukocytospermia on sperm DNA integrity: a negative effect in abnormal semen samples.* J Androl 2002;23:717-23.
17. SALEH RA, AGARWAL A, SHARMA RK, et al. *Evaluation of nuclear DNA damage in spermatozoa from infertile men with varicocele.* Fertil Steril 2003;80:1431-6.
18. CAROPPO E, NIEDERBERGER C, VIZZIELLO GM, D'AMATO G. *Recombinant human follicle-stimulating hormone as a pretreatment for idiopathic oligoasthenoteratozoospermic patients undergoing intracytoplasmic sperm injection.* Fertil Steril. 2003 Dec;80(6):1398-403