

VALUTAZIONE DELL'INTEGRITA' CROMATINICA : SCSA, TUNEL, COMET, SCD

VALUTAZIONE ISTONI E PROTAMINE: BU DI ANILINA , CMA3,

La cromatina nemaspermica è stata oggetto di numerosi studi che hanno evidenziato una diversità di organizzazione nucleare nelle varie specie animali; in particolare nei mammiferi il DNA nemaspermico, grazie a particolari proteine basiche, viene notevolmente condensato. Infatti, nonostante, lo spermatozoo sia privo di sistemici enzimatici di riparo del DNA, risulta essere una cellula molto resistente all'azione di agenti fisici, chimici e biologici grazie proprio alla profonda ristrutturazione nucleare. L'impacchettamento della cromatina è dovuto principalmente al DNA complessato con le protamine (PRM) piuttosto che con gli istoni, come invece avviene per le cellule somatiche e per le cellule germinali prima del loro differenziamento. Le PRM sono proteine basiche specie-specifiche, espresse solo nel maschio, a basso peso molecolare e con elevato contenuto di arginina e cisteina. Tutto ciò contribuisce a far sì che il DNA nemaspermico dei mammiferi sia il DNA eucariotico maggiormente condensato. Nell'uomo sono distinguibili 2 tipi di PRM: PRM1 e PRM2. PRM2 differisce da PRM1 nella sequenza aminoacidica e nel peso molecolare, è molto più ricca di istidina, e presenta il cluster di arginine distribuito più regolarmente lungo la molecola. Il processo di compattazione DNA-protamine inizia nel testicolo, continua nell'epididimo, si conclude nel fluido seminale. In particolare, durante la spermiogenesi, il nucleo degli spermatidi viene rimodellato e condensato mediante la sostituzione degli istoni con le protamine. La transizione istoni/protamine è molto complessa e si effettua con diversi meccanismi di fosforilazione, acetilazione, ubiquinazione istonica e con l'ausilio di proteine di transizione (TNP), capaci di mantenere una struttura intermedia nei siti di deposizione delle PRM e favorire l'eliminazione degli istoni (1) anche se il loro ruolo non è stato ben definito. Il filamento di DNA si avvolge intorno alle molecole di protamine formando loops altamente organizzati. Ogni molecola di protamina viene avvolta da una spira di DNA; in particolare, lungo il solco della doppia elica, si formano legami tra cariche positive dei residui di arginina delle protamine e residui carichi negativamente della struttura fosfodiesterica del DNA. Il DNA legato alle protamine si avvolge in cerchi concentrici, che collassano in una struttura toroidale contenente 50-60 Kb di DNA. Tale complesso è fortemente compattato e stabilizzato da ponti covalenti -S-S- intra ed inter-protaminici tra i residui cisteinici -SH. L'unità fondamentale dell'impacchettamento cromatinico è, quindi, un toroide di circa 60 kb di DNA, di circa 0.9 μm di diametro, spesso circa 0.2 μm e con un buco centrale di 0.15 μm . Ogni toroide contiene un loop di DNA ed è ancorato alla matrice nucleare, mediante regioni di attracco definite MAR (Matrix Associated Regions) (2), ad intervalli di 40 Kb; tali regioni sono costituite da

un segmento nucleasi sensibile di circa 1000 bp (3). La matrice nucleare sembra svolgere un ruolo molto importante in quanto è stato dimostrato che la corretta associazione DNA- matrice nucleare è necessaria per la replicazione del DNA del pronucleo maschile ed il controllo dell'integrità nucleare dopo la fecondazione. La cromatina dello spermatozoo, quindi, può essere suddivisa in importanti domini strutturali rappresentati da istoni, protamine e MAR. Tale complessa organizzazione strutturale è necessaria per la realizzazione di importanti funzioni quali ridurre la grandezza e la forma del nucleo dello spermatozoo conferendo alla cellula una struttura idrodinamica e proteggere il genoma maschile durante il transito nelle vie genitali femminili. Il DNA nemaspermico, infatti, può essere soggetto a frammentazione, ed in particolare, una piccola percentuale di rotture del DNA avviene fisiologicamente, durante la spermiogenesi, per agevolare la riorganizzazione della cromatina. Una volta che la cromatina viene condensata, le rotture dei filamenti di DNA vengono riparati. Errori che intervengono nel meccanismo di rottura e riparo dei filamenti di acido nucleico possono causare alterazione della condensazione e frammentazione del DNA. L'etiologia del danno al DNA nemaspermico è multifattoriale e le anomalie della struttura cromatinica possono essere, anche, il risultato di danni indotti da difetti di condensazione cromatinica e di protaminizzazione, processo apoptotico e stress ossidativo da radicali liberi.

Per la valutazione del danno al DNA nemaspermico sono stati messi a punto numerosi metodi e strategie al fine di definire il grado di condensazione della cromatina all'interno del nucleo. Lo sviluppo di questi test si è incrementato parallelamente al progresso della Procreazione Medicalmente Assistita (PMA) e all'importanza che l'integrità cromatinica ha assunto in questo contesto.

Per valutare il processo di sostituzione istoni - protamine sono stati utilizzati i seguenti metodi: Blu di Anilina e Cromomicina A3 (CMA3). In condizioni normali, la sostituzione deve essere completa affinché la condensazione della cromatina possa essere considerata ottimale. Per l'analisi degli istoni residui, viene utilizzato il Blu di Anilina, un colorante che si lega specificamente con la lisina, amminoacido molto presente negli istoni e poco rappresentato nelle protamine. Gli spermatozoi con nuclei ricchi di istoni appariranno blu mentre quelli protaminati non verranno colorati. Vari studi hanno confrontato le anomalie cromatiniche valutate mediante blu di anilina con l'outcome della PMA indicando che la percentuale di spermatozoi con anomalie cromatiniche sembra maggiore nei pazienti infertili. La maggior parte degli studi non ha rilevato una correlazione tra spermatozoi con anomalie della condensazione cromatinica e percentuale di fecondazione; l'associazione invece, è stata identificata, dopo IUI (Intra Uterine Insemination) e Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI), con la percentuale di aborto, sviluppo dello zigote (4,5) e con il corso della gravidanza (6), indicando il test Blu di Anilina come predittivo nella scelta

della tecniche di PMA. Le anomalie della cromatina possono essere anche valutate mediante l'analisi delle protamine. In questo caso si utilizza la Cromomicina A3, un antibiotico fluorescente con affinità per le regioni ricche di G-C. La CMA3 compete per il sito di legame delle protamine, quindi, spermatozoi subprotaminati appariranno fluorescenti mentre quelli che hanno completato la sostituzione istonica compariranno non fluorescenti alla lettura al microscopio a fluorescenza. In letteratura sono presenti numerosi lavori che utilizzano il test CMA3 al fine di predire l'outcome riproduttivo, ma i dati sono discordanti. Diversi studi (7,8,9,10,11) hanno rilevato una correlazione negativa tra percentuale di spermatozoi subprotaminati valutati e percentuale di fecondazione con ICSI; un minor numero di studi, invece, ha trovato una significatività tra percentuale di CMA3 e percentuale di fecondazione con IVF (12,13). Diversi lavori, inoltre, hanno comparato i due test CMA3 e Blu di Anilina dimostrando che CMA3 aveva una maggiore capacità predittiva rispetto al test Blu di Anilina (7,14); mentre un lavoro del 2015 (15) ha dimostrato che i due test non rilevano differenze nella condensazione cromatinica tra fertili e infertili rispetto ad altre metodologie prese in considerazione nello studio. E' da sottolineare, però, che le capacità predittive di CMA3 e Blu di Anilina possono variare sulla base del cutoff scelto (16) e che tali metodologie analizzano le anomalie di sostituzione istoni/ protamine ma non riescono a dare informazioni molto precise; in particolare, non sono in grado di discriminare il difetto di PRM1 o di PRM2, per il quale, invece, è necessario applicare metodologie più specifiche e attendibili, quali RTqPCR o Western blotting. Il processo di impacchettamento, derivante dalla sostituzione degli istoni con le protamine, infatti, è caratterizzato da un corretto rapporto di PRM1 e 2. Negli individui fertili tale rapporto è compreso tra 0,8 e 1,2 (17,18) e alterazioni nell'espressione genica e nel rapporto proteico di PRM1/PRM2 sono state osservate in associazione con l'infertilità (19,20) e con la riduzione della qualità embrionale (21,22,23). Livelli alterati delle protamine sono, anche, associati ad una riduzione dell'integrità cromatinica. In un lavoro del 2005 è stato dimostrato, infatti, una aumentata frammentazione del DNA in campioni con un basso rapporto PRM1/PRM2 rispetto a quelli con normale o elevato rapporto di protamine (24).

Per valutare l'integrità della cromatina nemaspermica vengono utilizzati i seguenti metodi:
TUNEL, COMET, SCSA, SCD.

TUNEL - Il metodo TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase UTP-driven Nick End Labeling) visualizza la presenza di rotture endogene sul DNA degli spermatozoi mediante l'enzima, TdT (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase). Questa polimerasi incorpora nucleotidi marcati a livello delle rotture 3'-OH terminali del DNA. Tale metodica, quindi, quantifica l'incorporazione di desossiridintrifosfato (dUTP) ai frammenti di DNA derivati da rotture a singola o doppia elica. Una volta che i nucleotidi marcati dUTP vengono incorporati ai frammenti di DNA possono essere

quantificati mediante microscopio a fluorescenza o analisi citofluorimetrica. I primi studi effettuati da Gorczyca et al. 1993(25) sulle cellule somatiche, hanno dimostrato la possibilità di distinguere DNA frammentato derivante da un processo apoptotico da quello delle cellule necrotiche, mediante la metodica TUNEL. Tale metodica ha consentito di identificare frammentazione del DNA correlato al processo apoptotico nelle cellule germinali maschili (26). E' stato ipotizzato, infatti, che fattori testicolari e extratesticolari contribuiscono alla formazione di DNA alterato negli spermatozoi e che il principale pathway che porta alla rottura dell'elica di DNA negli spermatozoi è un processo apoptotico (27,28).

COMET ASSAY- La Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE) o COMET assay, introdotta da Ostling and Johanson nel 1984 (29), è un metodo che consente di valutare l'integrità del DNA visualizzando le rotture dell'elica a livello di ogni singola cellula. Inizialmente fu utilizzata per la valutazione degli effetti genotossici sulle cellule somatiche e successivamente Singh NP *et al* (1989) (30) la applicarono allo studio delle cellule nemaspermiche. Il metodo prevede l'inclusione degli spermatozoi in un gel di agarosio su vetrino; le cellule vengono poi lisate e sottoposte ad elettroforesi in condizioni di elevata concentrazione salina. In tale test il DNA viene evidenziato con un colorante nucleare di tipo intercalante. La cellula danneggiata appare come una cometa, con una testa fluorescente ed una coda la cui lunghezza e fluorescenza è proporzionale al numero delle rotture presenti nell'elica di DNA. La cellula integra appare, invece, come un nucleo intatto fluorescente, la testa della cometa, senza coda. La metodica originaria prevedeva un elettroforesi in ambiente alcalino che si è dimostrata essere poco efficiente nello studio dell'integrità del DNA a causa della presenza di siti alcalino-labili che inducevano numerose rotture del DNA non presenti di base. Questo aveva reso, inizialmente, il metodo di difficile standardizzazione anche al fine di applicazioni immediatamente trasferibili in ambito clinico. Per tale motivo, è stata proposta una modifica della metodica che utilizza una elettroforesi neutra in grado di superare il problema dei siti alcalino- labili.

SCSA- è una tecnica citofluorimetrica caratterizzata dalla valutazione dei parametri rilevati su un numero statisticamente significativo di eventi, in quanto riesce ad analizzare circa 5000 spermatozoi per campione. Valuta la resistenza della cromatina nemaspermica all'azione di agenti denaturanti, attraverso il colorante arancio di acridina (AO). L'AO si lega agli acidi nucleici, in particolari condizioni stechiometriche, intercalando la doppia elica ed impacchettandosi nelle regioni a singola elica. Le molecole legate secondo queste due diverse modalità di interazione fluorescono in bande spettrali differenti; se la molecola è intercalata nella doppia elica emette una fluorescenza verde, mentre se legata a regioni a singola elica la fluorescenza è rossa. SCSA è l'unica tecnica per cui studi epidemiologici hanno suggerito un valore di soglia; è stato identificato, infatti, un parametro

che descrive la percentuale di spermatozoi con DNA suscettibile alla denaturazione, il DFI (DNA Fragmentation Index), ottenuto dal rapporto dell'intensità della fluorescenza rossa su quella totale (rossa+verde). Un DFI < 30% identificherebbe una popolazione nemaspermica con buona integrità cromatinica e un potenziale stato di fertilità, mentre un DFI \geq 30% indica una popolazione di spermatozoi con anomalie della struttura cromatinica (31)

SCD- Sperm Chromatin Dispersion test (32) identifica DNA nemaspermico frammentato sulla base della capacità della cromatina nemaspermica di denaturarsi. La tecnica prevede una fase di decondensazione cromatinica seguita dalla valutazione delle cellule nemaspermiche che se frammentate presenteranno un alone intorno alla testa. Il test SCD viene effettuato mediante Halosperm kit (Halotech DNA; Madrid, Spain). La preparazione dei vetrini è abbastanza rapida e la richiede un microscopio in campo chiaro.

Le conseguenze sul processo di fecondazione e di sviluppo embrionale dei danni subiti dal DNA, non sono ancora completamente note in quanto le lesioni che originano nel DNA dello spermatozoo sono molto diverse tra di loro e a seconda della tipologia di danno si possono verificare diverse condizioni 1) i meccanismi di riparo dell'ovocita non sono sufficienti e l'embrione non si sviluppa o non si impianta oppure la gravidanza esita in aborto 2) l'ovocita ripara la rottura dell'elica di DNA prima dell'inizio del clivaggio con generazione di una normale prole 3) l'ovocita può riparare il danno in modo parziale e il risultato potrebbero essere delezioni, errori di sequenza e anomalie nella prole. Tutto ciò indica che spermatozoi con DNA danneggiato possono fecondare e che l'impatto biologico della cromatina alterata dipende, quindi, dal tipo di danno e dalla capacità dell'ovocita di ripararlo. Diversi studi hanno valutato la relazione tra danni al DNA nemaspermico, valutato con SCSA e TUNEL, ed esito riproduttivo sia nel caso di gravidanze naturali che in PMA. In particolare, è stata evidenziata una forte associazione tra DNA danneggiato e fallimento del raggiungimento della gravidanza naturale, mentre elevati livelli di DNA alterato sono stati associati anche con basse percentuali di gravidanza mediante IUI (Intra Uterine Insemination) (33). Numerosi studi, invece, hanno esaminato l'influenza dell'integrità del DNA nemaspermico sulla percentuale di gravidanza dopo IVF (In Vitro Fertilization); con tale tecnica di riproduzione assistita la frammentazione del DNA era associata, anche se debolmente, con basse percentuali di gravidanza (OR 1.57); mentre i lavori che hanno considerato la tecnica ICSI hanno rilevato che la frammentazione del DNA non era associata con le percentuali di gravidanza in ICSI (OR 1.14) (34). Bungum et al. (2004), Gandini et al (2004) (35,36) hanno dimostrato, invece, che alterazioni dell'integrità cromatinica valutate mediante SCSA non sono incompatibili con gravidanze dopo IVF and ICSI. Diversi Autori, inoltre, hanno riportato una associazione significativa tra frammentazione del DNA e aborti dopo IVF e ICSI (OR 2.48) (34), mentre non ci sono dati relativi agli effetti post-

natali. Una meta-analisi (37) ha dimostrato una significativa relazione tra danno al DNA, valutato con SCSA, TUNEL e COMET e aborti dopo PMA, indipendentemente dalla tipologia di trattamento, ICSI o FIVET. Lo studio, inoltre, ha rilevato che l'associazione era più forte quando si consideravano i lavori che avevano utilizzato TUNEL (RR = 3.94 $p < 0.00001$). I risultati di review e metanalisi relativi a studi che hanno valutato l'associazione tra danni al DNA nemaspermico ed esito riproduttivo sia nel caso di gravidanze naturali che in PMA, hanno fornito risultati discordanti. Per questo motivo, nel 2013 (38) il Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine (ASRM) ha redatto delle linee guida basate su una metanalisi proveniente da 20 studi che hanno utilizzato TUNEL, SCSA e COMET. Tali linee guida hanno sottolineato che i dati pubblicati non permettono di definire una relazione tra integrità cromatinica e outcome riproduttivo; mentre esiste un'associazione significativa tra frammentazione e aborto dopo IVF o ICSI, anche se i risultati ottenuti, fino ad oggi, non sono sufficienti per poter inserire i test di integrità tra i test diagnostici routinari. Una recente meta analisi di Simon et al (2016) (39) effettuata su 41 studi (23 con SCSA, 18 TUNEL, 7 COMET e 8 SCD), invece, ha identificato un impatto negativo del danno al DNA nemaspermico sulla percentuale di gravidanza in IVF e ICSI. Nonostante i numerosi studi presenti in letteratura ci sono, quindi, numerosi dubbi riguardo alla applicazione clinica di test di valutazione dell'integrità cromatinica. Quando si valutano studi relativi all'integrità del DNA è necessario fare delle considerazioni sulle metodologie utilizzate. Sebbene molte metodiche affermano di identificare il "DNA frammentato" non è ancora ben definito quali informazioni molecolari forniscono. TUNEL e COMET misurano la quantità di DNA con rotture di doppio o singolo filamento, mentre SCSA fornisce una misura indiretta del danno all'acido nucleico, in quanto valuta la percentuale di DNA suscettibile alla denaturazione; le cellule più facilmente denaturabili sono portatrici di frammentazione del DNA. Il test SCD, invece, si basa sul principio che spermatozoi con DNA frammentato non riescono a produrre un alone intorno alla testa dello spermatozoo dopo denaturazione acida. Tale metodo, anche se molto utilizzato in diversi laboratori perché di semplice esecuzione e non necessita di grandi attrezzature, risulta essere ambiguo in quanto fornisce informazioni di difficile interpretazione e non riesce a definire la tipologia di danno molecolare del DNA nemaspermico. Tutte le metodiche ad oggi disponibili, infatti, non riescono a differenziare rotture del DNA fisiologiche da quelle patologiche e quindi il DNA frammentato, clinicamente importante, dalle rotture che avvengono fisiologicamente, durante il processo di condensazione cromatinica. Il DNA frammentato a singola elica può essere riparato dall'ovocita mentre rotture della doppia elica sono irreversibili. Infine, i test non identificano i geni che possono, eventualmente, essere coinvolti nella rottura dell'acido nucleico. Attualmente, le metodiche di valutazione dell'integrità cromatinica misurano, solamente, la quantità di cellule con

frammentazione dell'acido nucleico e si basano sul principio che maggiore è la quota di cellule con DNA danneggiato maggiore è la probabilità che la popolazione cellulare sia patologica (40). Alcuni studi hanno cercato di definire, anche, un valore soglia di danno al DNA nemaspermico, oltre il quale i campioni seminali vengano definiti patologici, ottenendo risultati differenti. Il livello soglia che discrimina tra individui fertili e non fertili, in realtà, non è ancora stato stabilito (41). Nella diagnostica molecolare del gamete maschile, un test ideale, dovrebbe essere quello che, aiuti nella diagnosi di infertilità, riesca a predire l'outcome riproduttivo nell'ambito di ART e fornisca notevoli evidenze relative all'integrità genomica del gamete maschile. Attualmente, invece, l'utilizzo dei test di integrità cromatinica, nella clinica, presenta delle limitazioni: mancano studi popolazionistici e il valore clinico si basa su dati provenienti dalla letteratura relativi a lavori, review e metanalisi. Queste ultime presentano il vantaggio di analizzare diversi studi aumentando la dimensione del campione e la potenza statistica, ma hanno lo svantaggio dell'eterogeneità dei dati, in quanto, includono studi che utilizzano diverse metodologie, differenti popolazioni e diversi cut-off.

E' importante, quindi, avere cautela quando si valuta il valore predittivo di un test di integrità cromatinica nell'ambito di tecniche di PMA. Non dobbiamo mai dimenticare che il valore clinico di queste metodologie deve essere valutato con gli stessi criteri di un test diagnostico: sensibilità, specificità, ripetibilità, predittività e soprattutto robustezza statistica; ad oggi, l'utilità clinica di questi test deve essere ancora stabilita. Per una corretta interpretazione dei dati sono necessari protocolli standardizzati con opportuni controlli di qualità e studi controllati con numero elevato di pazienti studiati.

BIBLIOGRAFIA

1. Steger K, Pauls K, Klonisch T, Franke FE, Bergmann M. Expression of protamine-1 and -2 mRNA during human spermiogenesis. *Mol Hum Reprod*. 2000 Mar;6(3):219-25.
2. Kramer JA, Krawetz SA. Nuclear matrix interactions within the sperm genome. *J Biol Chem*. 1996 May 17;271(20):11619-22.
3. Ward WS. Deoxyribonucleic acid loop domain tertiary structure in mammalian spermatozoa. *Biol Reprod*. 1993 Jun;48(6):1193-201.
4. Mohamed EE, Mohamed MA. Effect of sperm chromatin condensation on the outcome of intrauterine insemination in patients with male factor infertility. *J Reprod Med*. 2012 Sep-Oct;57(9-10):421-6
5. Asmarinah, Syauqy A, Umar LA, Lestari SW, Mansyur E, Hestiantoro A, Paradowszka-Dogan A. Sperm chromatin maturity and integrity correlated to zygote development in ICSI program. *Syst Biol Reprod Med*. 2016 Oct;62(5):309-16.
6. Irez T, Sahmay S, Ocal P, Goymen A, Senol H, Erol N, Kaleli S, Guralp O. Investigation of the association between the outcomes of sperm chromatin condensation and decondensation tests, and assisted reproduction techniques. *Andrologia*. 2015 May;47(4):438-47.
7. Razavi S, Nasr-Esfahani MH, Mardani M, Mafi A, Moghdam A. Effect of human sperm chromatin anomalies on fertilization outcome post-ICSI. *Andrologia*. 2003 Aug;35(4):238-43.
8. Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Mozdarani H, Mardani M, Azvagi H. Relationship between protamine deficiency with fertilization rate and incidence of sperm premature chromosomal condensation post-ICSI. *Andrologia*. 2004 Jun;36(3):95-100.
9. Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Mardani M, Shirazi R, Javanmardi S. Effects of failed oocyte activation and sperm protamine deficiency on fertilization post-ICSI. *Reprod Biomed Online*. 2007 Apr;14(4):422-9.
10. Tavalae M, Razavi S, Nasr-Esfahani MH. Influence of sperm chromatin anomalies on assisted reproductive technology outcome. *Fertil Steril*. 2009 Apr;91(4):1119-26.
11. Iranpour FG. Impact of sperm chromatin evaluation on fertilization rate in intracytoplasmic sperm injection. *Adv Biomed Res*. 2014 Nov 29;3:229.
12. Iranpour FG, Nasr-Esfahani MH, Valojerdi MR, al-Taraihi TM. Chromomycin A3 staining as a useful tool for evaluation of male fertility. *J Assist Reprod Genet*. 2000 Jan;17(1):60-6.
13. Nijs M, Creemers E, Cox A, Franssen K, Janssen M, Vanheusden E, De Jonge C, Ombelet W. Chromomycin A3 staining, sperm chromatin structure assay and hyaluronic acid binding assay as predictors for assisted reproductive outcome. *Reprod Biomed Online*. 2009 Nov;19(5):671-84.
14. Iranpour FG. Impact of sperm chromatin evaluation on fertilization rate in intracytoplasmic sperm injection. *Adv Biomed Res*. 2014 Nov 29;3:229.
15. Garolla A, Cosci I, Bertoldo A, Sartini B, Boudjema E, Foresta C. DNA double strand breaks in human spermatozoa can be predictive for assisted reproductive outcome. *Reprod Biomed Online*. 2015 Jul;31(1):100-7. doi: 10.1016/j.rbmo.2015.03.009.
16. Sadeghi MR, Lakpour N, Heidari-Vala H, Hodjat M, Amirjannati N, Hossaini Jadda H, Binaafar S, Akhondi MM. Relationship between sperm chromatin status and ICSI outcome in men with obstructive azoospermia and unexplained infertile normozoospermia. *Rom J Morphol Embryol*. 2011;52(2):645-5
17. Balhorn R, Reed S & Tanphaichitr N. Aberrant protamine 1/protamine 2 ratios in sperm of infertile human males. 1988 *Experientia* 44: 52-55.

18. Corzett M, Mazrimas J and Balhorn R (2002) Protamine 1: protamine 2 stoichiometry in the sperm of eutherian mammals, *Mol Reprod Dev* 61,519-527.
19. Rogenhofer N¹, Dansranjav T, Schorsch M, Spiess A, Wang H, von Schönfeldt V, Cappallo-Obermann H, Baukloh V, Yang H, Paradowska A, Chen B, Thaler CJ, Weidner W, Schuppe HC, Steger K. The sperm protamine mRNA ratio as a clinical parameter to estimate the fertilizing potential of men taking part in an ART programme. *Hum Reprod.* 2013 Apr;28(4):969-78.
20. Francis S, Yelumalai S, Jones C, Coward K. Aberrant protamine content in sperm and consequential implications for infertility treatment. *Hum Fertil (Camb).* 2014 Jun;17(2):80-9.
21. Simon L, Castillo J, Oliva R, Lewis SE. Relationships between human sperm protamines, DNA damage and assisted reproduction outcomes. *Reprod Biomed Online.* 2011 Dec;23(6):724-34. doi: 10.1016/j.rbmo.2011.08.010.
22. Depa-Martynow M, Kempisty B, Jagodziński PP, Pawelczyk L, Jedrzejczak P. Impact of protamine transcripts and their proteins on the quality and fertilization ability of sperm and the development of preimplantation embryos. *Reprod Biol.* 2012 Mar;12(1):57-72.
23. Grassetti D, Paoli D, Gallo M, D'Ambrosio A, Lombardo F, Lenzi A, Gandini L. Protamine-1 and -2 polymorphisms and gene expression in male infertility: an Italian study. *J Endocrinol Invest.* 2012 Nov;35(10):882-8. doi: 10.3275/8111. Epub 2011 Nov 21.
24. Aoki VW, Moskovtsev SI, Willis J, Liu L, Mullen JB, Carrell DT. DNA integrity is compromised in protamine-deficient human sperm. *2005J Androl.* Nov-Dec;26(6):741-8.
25. Gorczyca W, Gong J, Ardelt B, Traganos F, Darzynkiewicz Z. The cell cycle related differences in susceptibility of HL-60 cells to apoptosis induced by various antitumor agents. *Cancer Res.* 1993 Jul 1;53(13):3186-92.
26. Gorczyca W, Traganos F, Jesionowska H, Darzynkiewicz Z. Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA in situ to denaturation in abnormal human sperm cells: analogy to apoptosis of somatic cells. *Exp Cell Res.* 1993 Jul;207(1):202-5.
27. 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 Apr;15(4):830-9
28. Muratori M, Tamburrino L, Marchiani S, Cambi M, Olivito B, Azzari C, Forti G, Baldi E. Investigation on the Origin of Sperm DNA Fragmentation: Role of Apoptosis, Immaturity and Oxidative Stress. *Mol Med.* 2015 Jan 30;21:109-22. doi: 10.2119/molmed.2014.00158.
29. Singh NP, Danner DB, Tice RR, McCoy MT, Collins GD, Schneider EL. Abundant alkali-sensitive sites in DNA of human and mouse sperm. *Exp Cell Res.* 1989 Oct;184(2):461-70.
30. Ostling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1984 Aug 30;123(1):291-8.
31. 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 Jan-Feb;23(1):25-43.
32. Fernández JL, Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosálvez J, Enciso M, LaFromboise M, De Jonge C. Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. *Fertil Steril.* 2005 Oct;84(4):833-42.
33. Bungum M, Spanò M, Humaidan P, Eleuteri P, Rescia M, Giwercman A. Sperm chromatin structure assay parameters measured after density gradient centrifugation are not predictive for the outcome of ART. *Hum Reprod.* 2008 Jan;23(1):4-10.
34. Zini A, San Gabriel M, Baazeem A. Antioxidants and sperm DNA damage: a clinical perspective. *J Assist Reprod Genet.* 2009 Aug;26(8):427-32.
35. Bungum M, Humaidan P, Spano M, Jepson K, Bungum L, Giwercman A. The predictive value of sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters for the outcome of intrauterine insemination, IVF and ICSI. *Hum Reprod.* 2004;19:1401-8.

36. Gandini L, Lombardo F, Paoli D, Caruso F, Eleuteri P, Leter G, Ciriminna R, Culasso F, Dondero F, Lenzi A, Spanò M. Full-term pregnancies achieved with ICSI despite high levels of sperm chromatin damage. *Hum Reprod.* 2004 Jun;19(6):1409-17.
37. 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.
38. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. The clinical utility of sperm DNA integrity testing: a guideline. *Fertil Steril.* 2013 1;99:673-7.
39. 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.* 2016 Jun 24. doi: 10.4103/1008-682X.182822.
40. Zini A, Sigman M. Are tests of sperm DNA damage clinically useful? Pros and cons. *J Androl.* 2009;30:219-29.
41. Simon L, Brunborg G, Stevenson M, Lutton D, McManus J, Lewis SE. Clinical significance of sperm DNA damage in assisted reproduction outcome. *Hum Reprod.* 2010 ;25:1594-608