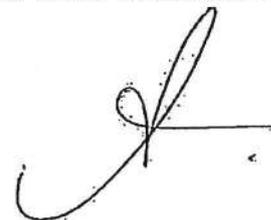


RIDUZIONE DEGLI EFFETTI DEI METALLI PESANTI SULLA QUALITÀ DEL LIQUIDO SEMINALE IN COPPIE SOTTOPOSTE A FECONDAZIONE CON DONAZIONE DI GAMETI

INTRODUZIONE

Le capacità riproduttive di un individuo di sesso maschile sono unite alla qualità del liquido seminale, centrato sulla motilità degli spermatozoi e sulla loro morfologia. Uno dei problemi che influenza la fertilità maschile è l'ambiente circostante fortemente inquinato da diversi fattori tra i quali i metalli pesanti, che costituiscono un elemento di disfunzionalità spermatica. I metalli pesanti sono elementi della tavola periodica, la cui densità è maggiore di 5 g/cm^3 [1]. Si trovano in buona percentuale nell'aria, nel cibo e nelle acque, a causa degli scarichi di industrie metallurgiche, chimiche e dai gas di scarico delle automobili. I massimi rappresentanti sono: l'Arsenico, il Cadmio originato da impianti industriali, il Piombo presente nelle vernici e risultante dalle emissioni dei mezzi di trasporto, e il Cromo [1] [2]. Sono da menzionare anche il Rame, Ferro, ma la loro presenza, a basse concentrazioni, è fondamentale per l'organismo poiché costituenti di proteine, enzimi e fattori di trascrizione. La lettura di numerosi articoli ha permesso di capire che, le dinamiche di interferenza di tutti i metalli, è attribuibile alla produzione di una quantità eccessiva di specie reattive dell'ossigeno, originando, nelle cellule, una situazione di stress ossidativo [3]. Una condizione di stress ossidativo può verificarsi per diversi fattori, sia nei normali processi biologici, ma in questo caso ci sono gli enzimi antiossidanti che ne regolano l'equilibrio tra la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e la loro eliminazione, e sia per fattori esogeni ed endogeni, che disturbano la normale fisiologia, e che incentivati dalla perdita dell'equilibrio tra i ROS e gli enzimi antiossidanti, provocano danno ossidativo, e attivazione di segnali pro-apoptotici da parte delle cellule [3]. La caratteristica delle specie reattive dell'ossigeno è di essere molecole fortemente instabili a causa di un elettrone spaiato nell'orbitale più esterno [4]. Pertanto reagire con molecole come le proteine, lipidi, acidi nucleici, permette loro di sottrarre l'elettrone e raggiungere la stabilità [4]. In questo modo si originano nuovi radicali liberi, ancora più reattivi, i quali promuovono reazioni a catena, che se non limitate protraggono il danno. Le cellule, per contrastare la reattività delle specie reattive, si avvalgono di un sistema di agenti antiossidanti, ovvero determinanti che smaltiscono, o neutralizzano i radicali liberi rendendoli non più reattivi [3] [4]. I componenti antiossidanti possono essere enzimatici e non enzimatici. Tra gli enzimatici [3] ci sono:



- La SOD (*Superoossido Dismutasi*), enzima costituita da ioni metallici nel sito attivo, ha il ruolo di dismutare l'anione superossido in perossido di idrogeno. La reazione è: $2O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$
- La CATALASI, un'emoproteina, costituita da 4 catene polipeptidiche, il cui sito attivo è formato da 4 gruppi ferrosi [4]. Catalizza la reazione di conversione del perossido di idrogeno in ossigeno ed acqua. La reazione è: $2H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2H_2O$
- La GLUTATIONE PEROSSIDASI, un enzima metallo proteina, contenente residui di selenio [4]. È presente sia a livello della membrana cellulare, che a livello extracellulare. Ha il compito di ridurre il perossido di idrogeno utilizzando come substrato il glutatione, che inizialmente si trova sotto forma ridotta per poi passare alla forma ossidata. La reazione è: $H_2O_2 + GSH_{rid} (Glutazione Ridotta) \rightarrow 2H_2O + GSSG_{oss} (Glutazione Ossidato)$

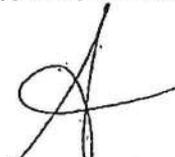
Tra gli agenti antiossidanti non enzimatici, troviamo il Coenzima Q, il Glutatione, e infine le vitamine [3]. Questo lavoro si occuperà di descrivere il meccanismo di azione dei metalli pesanti sul sistema riproduttivo maschile, e come essi siano influenti sulla qualità del liquido seminale, dopo averlo analizzato e infine capire come poter agire per ridurre al massimo la loro efficienza. Nella normale fisiologia riproduttiva maschile, le specie reattive dell'ossigeno sono necessarie, in quanto agiscono da secondi messaggeri nella via di trasduzione del segnale. Esempi di come le specie reattive dell'ossigeno siano essenziali sono la spermatogenesi e la steroidogenesi [3] [4] [5]. Due eventi che rappresentano lo sviluppo della cellula spermatica. La spermatogenesi, evento che ha luogo nei testicoli, precisamente nelle cellule costituenti il tubulo seminifero, ovvero le cellule del Leydig e le cellule del Sertoli. L'inizio del processo vede una cellula germinale primordiale, lo spermatogonio, il quale si divide per mitosi originando lo spermatozoo primario. Lo spermatozoo primario, successivamente, si divide per meiosi producendo lo spermatozoo [6]. Nella fase di differenziazione delle cellule germinali, le cellule del Sertoli producono i ROS. La loro funzione permette di regolare il limite massimo di cellule germinali nel testicolo attraverso l'attivazione dei segnali pro-apoptotici della via estrinseca, ovvero mediante il legame tra il ligando FasL, espresso nella cellula del Sertoli, e il recettore Fas presente nella cellula germinale che deve andare incontro ad apoptosi [3]. La steroidogenesi, che ha luogo nelle cellule del Leydig, stimolate dall'ormone luteinizzante (LH), coordina con la spermatogenesi, attivando la sintesi del testosterone. Il meccanismo di sintesi ha inizio con il legame tra l'ormone LH e i recettori posti sulla membrana della cellula di Leydig. A questo punto si susseguono una serie di reazioni, catalizzate dalle citocromo P450, che vedono un incremento della via di trasduzione del segnale dipendente dall'Adenilato Monofosfato Ciclico (cAMP), seguita dalla traslocazione del colesterolo nel mitocondrio, il quale viene convertito in pregnenolone. Successivamente il pregnenolone è trasferito nel reticolo endoplasmatico liscio dove

si procederà alla sua conversione in testosterone. Queste reazioni redox, sono molto simili alla fosforilazione ossidativa, in quanto i passaggi da un composto organico ad un altro, vertono sul trasferimento di elettroni forniti dai due cofattori Nicotinammide Adenina Dinucleotide Fosfato (NADPH) e ossigeno molecolare [3]. L'ossigeno viene dapprima incorporato nel substrato organico, dopo di che viene ridotto e diventa anione superossido. Successivamente, con l'aggiunta di due ioni idrogeno, che leggeranno l'anione superossido, si avrà acqua ed idrossilazione del substrato. L'origine delle specie reattive dell'ossigeno si verifica anche nella cellula spermatica. La funzione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS), nello spermatozoo, ha il compito di regolare l'acquisizione della motilità, sia nell'epididimo, a seguito dell'eccitazione sessuale, sia una volta giunto nelle vie genitali femminili. La motilità dello spermatozoo è stabilita dall'attività dei numerosi mitocondri che apportano costantemente adenosina trifosfato (ATP), per consentire il movimento del flagello [7]. La sintesi di ATP è preceduta dall'ultima tappa del metabolismo aerobico, ovvero la fosforilazione ossidativa, in cui la riduzione dell'ossigeno molecolare comporta l'inevitabile genesi di specie reattive dell'ossigeno, prontamente convertite dagli antiossidanti presenti nel mitocondrio. Il flagello si compone di tre segmenti: segmento intermedio, principale e terminale. La porzione del segmento intermedio è caratterizzata da un assonema formata da microtubuli¹, la cui disposizione prevede che, due coppie si dispongono centralmente, mentre le 9 doppiette di microtubuli periferici² le avvolgono. Interconnesse, ai microtubuli doppi periferici, sono presenti le dineine assonemali, i cui bracci esterni (ODA) e quelli interni (IDA) sono complessi multiproteici ad attività ATPasica, trasferiscono ATP per coordinare lo scorrimento dei microtubuli doppi e determinare il battito flagellare. L'assonema è ricoperta da una fibre esterne dense (ODF), le quali garantiscono elasticità e integrità alla struttura e da una guaina mitocondriale [7]. Il segmento intermedio si chiude con una struttura denominata annulus, in particolare anello di Septin, che funge da barriera per garantire la corretta localizzazione delle proteine lungo i diversi compartimenti del flagello. La regione del segmento principale è costituito da una guaina fibrosa composta da proteine, le quali sono stabilizzate da ponti disolfuro, che regolano la motilità e la funzionalità dello spermatozoo. Le proteine in questione sono le AKAP e le proteine chinasiche, dipendenti da cAMP, coinvolte nella via di trasduzione del segnale. Infine il segmento terminale racchiude la coda, composta da sola assonema [7]. La cellula spermatica, affinché riesca a raggiungere la zona pellucida e successivamente a penetrarla per fecondare l'ovocita, necessita di variazioni sia strutturali che funzionali, in cui a giocare il ruolo di regolatori sono i ROS. I protagonisti di formazione di ROS, sono la NADPH ossidasi e i mitocondri. La NADPH ossidasi, è

¹ I microtubuli sono costituiti da tubulina unite tra loro da due bracci di dineina, in grado di convertire l'energia chimica in energia contrattile [18].

² La struttura 9+2 assicura la stabilità e la flessione laterale del flagello per lo scorrimento delle doppiette periferiche rispetto alla coppia centrale [18].

3



un enzima localizzato sulla membrana plasmatica, precisamente nella regione della testa. La reazione catalizzata dalla NADPH ossidasi sussiste nel utilizzare il cofattore NADPH, fornito dalla glucosio-6-fosfato deidrogenasi (G6PD)³, e l'O₂ riducendo quest'ultimo in anione superossido. L'anione superossido formato, insieme con il perossinitrito (ONOO⁻)⁴, promuove l'ossidazione del colesterolo e il suo efflusso [12]. Dopo di che l'anione superossido viene dismutato, da parte della superossido

dismutasi (SOD), in perossido di idrogeno (H₂O₂). A questo punto il perossido di idrogeno, aiutandosi con il perossinitrito, inibisce la tirosina fosfatasi, consentendo l'attivazione

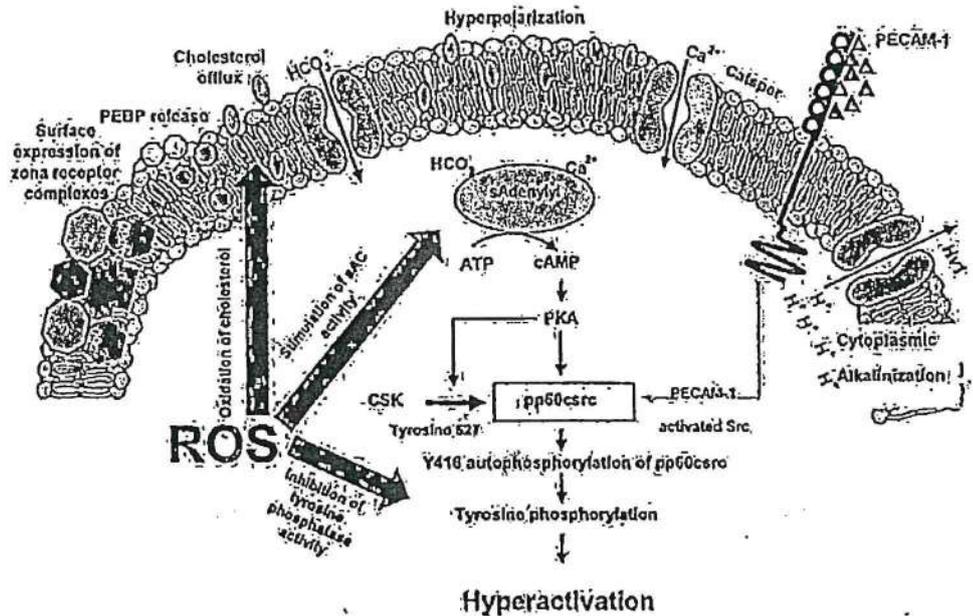


Figura 1. Schema rappresentativo della formazione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) nella cellula spermatica nella fase di capacitazione. [11].

della chinasi e determinando il movimento del flagello [5] (vedi Figura 1). I processi cellulari regolati dai ROS possono essere facilmente alterati, se la quantità di questi viene aumentata, a causa di fattori patogeni come i metalli pesanti. Il comportamento dei metalli pesanti sul sistema riproduttivo maschile è molto vario ed è osservabile sia sulle cellule del Sertoli e le cellule di Leydig, sia sulla cellula spermatica. Nello specifico ciò che si riscontra sulle cellule del Sertoli è che la tossicità dei metalli si esprime nel rompere l'integrità della barriera ematotesticolare [8]. Questa caratteristica è un tipico aspetto dovuto all'esposizione di Cadmio e Arsenico [2]. L'Arsenico agisce anche sulle cellule di Leydig, così come il Cromio. Ambedue alterano il processo di steroidogenesi, riportando una riduzione dei livelli di testosterone [2]. Tutto ciò è dovuto alla facilità di legare componenti funzionali e strutturali della cellula. In altri casi, invece, come l'esposizione a Cadmio e Piombo, è stato visto che vi è una sostituzione dei micronutrienti essenziali, favorita dagli aspetti chimico-fisiche

³ La glucosio-6-fosfato deidrogenasi è un enzima che coordina la velocità del flusso di glucosio, mediante la via degli esosi monofosfati e regola la disponibilità di NADPH.

⁴ Il perossinitrito è una specie reattiva dell'azoto derivante dall'ossido nitrico.

4

simili al metallo che viene sostituito. In questo modo i processi biologici in cui il metallo di partenza è impiegato, vengono alterati. Nella cellula spermatica, è stato riscontrato che l'esposizione da Cadmio, inibisce il complesso III della catena di trasporto mitocondriale, aumentando la produzione di ROS e attivando la perossidazione lipidica. Infine ci sono i metalli, Ferro e Rame, che svolgono una funzione fondamentale per le cellule, e che possono essere loro stessi fonte di eccessive quantità di specie reattive dell'ossigeno. Entrambi questi metalli sono importanti perché cofattori fondamentali di enzimi essenziali per i processi cellulari, ma se in eccesso possono essere anch'essi tossici e causare danno[9]. L'aspetto tipico che accumuna tutti i metalli, nonostante la modalità di azione sia diversa, è l'incremento di produzione delle specie reattive dell'ossigeno, tale per cui l'equilibrio fra la produzione e la loro eliminazione viene persa. La ragione di ciò è dovuta, sia al fatto che le fonti antiossidanti di cui la cellula dispone non sono sufficienti a contrastarne la reattività, e sia perché in alcuni casi i fattori antiossidanti sono substrati di attacco per metalli, come l'Arsenico, che ha una maggiore affinità per il glutatione ridotto, così che la glutatione perossidasi non è più funzionale[2]. Una possibile strategia, per difendere le cellule e ripristinare la corretta fisiologia riproduttiva, è quella di somministrare agenti esogeni con attività antiossidante introdotti attraverso la dieta. L'obiettivo finale di questo lavoro sarà valutare gli effetti benefici, in termini di motilità, di alcuni supplementi, come: il coenzima Q10, lo zinco ed infine l'acido D-aspartico [10]. Tutti e tre questi elementi hanno azione considerevole sul sistema riproduttivo, in particolare:

IL COENZIMA Q10

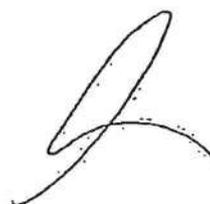
Il coenzima Q10 è conosciuto come ubiquinone liposolubile (1,4-benzoquinone). Il ruolo fondamentale dell'ubiquinone è di agire come accettore della catena di trasporto degli elettroni nei mitocondri, in quanto rilascia energia per la motilità e come antiossidante contrastando la perossidazione lipidica.

LO ZINCO

Lo zinco è un microelemento e cofattore delle metalloproteasi. Simbologgia un dato significativo di osservazione per sancire la buona riproduttività maschile poiché coinvolto in molti processi biologici tra i quali: sviluppo testicolare, spermatogenesi, capacitazione e reazione acrosomiale. In aggiunta stabilizza la membrana spermatica e garantisce flessibilità metabolica.

L'ACIDO D-ASPARTICO

L'acido D-aspartico, amminoacido endogeno presente nel sistema nervoso ed endocrino, agisce nella regolazione della steroidogenesi e spermatogenesi.



MATERIALI E METODI

La ricerca prevede la selezione di un gruppo di pazienti ($N=x$), in relazione:

- Al settore occupazionale, in particolare saranno valutati solo muratori, lavoratori in ambito metallurgico e ausiliari del traffico, ovvero coloro che sono esposti quotidianamente ai metalli pesanti;
- Età compresa tra i 30 anni e i 50 anni e con nessun tipo di patologia genetica o metabolica;

La fase I consiste nel analizzare il liquido seminale dei pazienti, per verificare la presenza di metalli pesanti.

L'analisi microscopica si avvale di una tecnica che permette tramite lavaggio di separare gli spermatozoi dal plasma seminale da detriti e cellule non vitali, in modo da ottenere solo la frazione migliore, ovvero gli spermatozoi mobili e che siano morfologicamente normali. L'analisi microscopica consente di osservare:

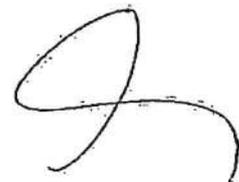
- Vitalità;
- Motilità;
- Concentrazione;
- Morfologia.

Una volta ottenuti i dati dell'esame del liquido seminale espressi come T_0 , i pazienti saranno suddivisi in due gruppi:

- Gruppo di studio di pazienti trattati, per tre mesi con un integratore a base di coenzima q10, zinco e acido D-aspartico 2 volte al dì;
- Gruppo di controllo ovvero pazienti non trattati con terapia.

Terminata la terapia, il liquido seminale dei pazienti del gruppo di studio sarà nuovamente analizzato. I dati saranno espressi come T_1 .

L'analisi verrà eseguita in singolo cieco dallo stesso operatore che in precedenza aveva osservato il liquido prima del trattamento.

 6



Prot 0049905

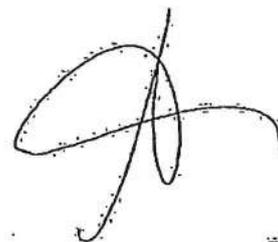
26.3.2021

Figura professionale ricercata: medico specialista in urologia.

Durata del Progetto 12 mesi

Criteri di selezione: valutazione curricula.

Compenso previsto 3000 € annui.



REFERENZE BIBLIOGRAFICHE

- [1] Tutic A, Novakovic S, Lutovac M, Biocanin R, Ketin S, Omerovic N. *The Heavy Metals In Agrosystems And Impact On Health And Quality Of Life* In *Maced J Med Sci*. 2015 Jun 15;3(2):345-55;
- [2] Augusta Chinyere Nsonwu-Anyanwu, Eworo Raymond Ekong, Sunday Jeremiah Offor, Ogar Francis Awusha, Oliver Chukwuma Orji, Ediang Idiongo Umoh, Jennifer Aleruchim Owhorji, Faith Rowland Emetonjor, Chinyere Adanna Opara Usoro. *Heavy Metals, Biomarkers Of Oxidative Stress And Changes In Sperm Function: A Case-Control Study* In *Int J Reprod Biomed (Yazd)* 2019 May 5;17(3):163-174.
- [3] Eremenak Prakash Mathur, Shereen Cynthia D' Cruz. *the effect of environmental contaminants on testicular function* in *Asian J. Androl*. 2011 Jul; 13(4): 585-91
- [4] Stefan S Du Plessis, Ashok Agarwal, Jacques Halabi, Eca Turda. *Contemporary Evidence on the Physiological Role of Reactive Oxygen Species in Human Sperm Function* in *J Assist Reprod Genet*. 2015 Apr; 32(4): 509-20.
- [5] Robert J Aitken, Mark A Baker, Brett Nixon. *Are Sperm Capacitation And Apoptosis The Opposite Ends Of A Continuum Driven By Oxidative Stress?* In *Asian J Androl*. Jul-Aug 2015; 17(4): 633-9
- [6] Dee Unglaud Silverthorn. *In Fisiologia Umana, Un Approccio Integrato (2013), Sesta Edizione. Edizione Italiana A Cura Di Vellea Franca Sacchi.*
- [7] Aminata Touré. *Importance of SLC26 Transmembrane Anion Exchangers in Sperm Post-testicular Maturation and Fertilization Potential* in *Front Cell Dev Biol*. 2019; 7:230.
- [8] C. Yan Cheng and Dolores D. Murk. *the blood testis barrier and its implications for male contraception* in *Pharmacol Rev*. 2012 Jan; 64 (1):16-64.
- [9] Eva Tvrda, Rohan Peer, Suresh C. Sikka, and Ashok Agarwal. *Iron and copper in male reproduction: a double-edged sword* in *J Assist Reprod Genet*. 2015 Jan; 32(1): 3-16.
- [10] Riccardo Talevi, Vincenza Barbaio, Ilaria Fiorentino, Sabrina Braun, Salvatore Longobardi and Roberto Gualtieri. *Protective effects of in vitro treatment with zinc, d-aspartate and coenzyme q10 on human sperm motility, lipid peroxidation and DNA fragmentation.* Talevi et al. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2013, 11:81.
- [11] Robert J. Aitken and Joel R. Drevet. *The Importance of Oxidative Stress in Determining the Functionality of Mammalian Spermatozoa: A Two-Edged Sword* in *Antioxidants (Basel)*. 2020 Feb; 9(2): 111.

