



UNIVERSITÀ
POLITECNICA
DELLE MARCHE

Dipartimento scienze
della vita e
dell'ambiente

Corso di laurea
SCIENZE BIOLOGICHE

ESPOSIZIONE AMBIENTALE E SALUTE RIPRODUTTIVA: GLI EFFETTI NOCIVI DEGLI INQUINANTI SULLA SPERMATOGENESI E SULLA FERTILITÀ MASCHILE

*ENVIRONMENTAL EXPOSURE AND REPRODUCTIVE HEALTH: THE ADVERSE EFFECTS OF
POLLUTANTS ON SPERMATOGENESIS AND MALE FERTILITY*

Tesi di laurea di:
Razzano Alessia

Sessione autunnale
Anno accademico 2023/2024

Relatore:
Prof.ssa Maradonna Francesca

INTRODUZIONE

Che cos'è l'infertilità maschile?

È la ridotta capacità riproduttiva dell'uomo, dovuta ad un'insufficiente produzione di spermatozoi o ad anomalie nella qualità degli spermatozoi prodotti.

Cause principali:

- fattori legati allo stile di vita → fumo, alcol, dieta povera e squilibrata, stress;
- fattori ambientali → esposizione a sostanze chimiche, radiazioni, tossine.

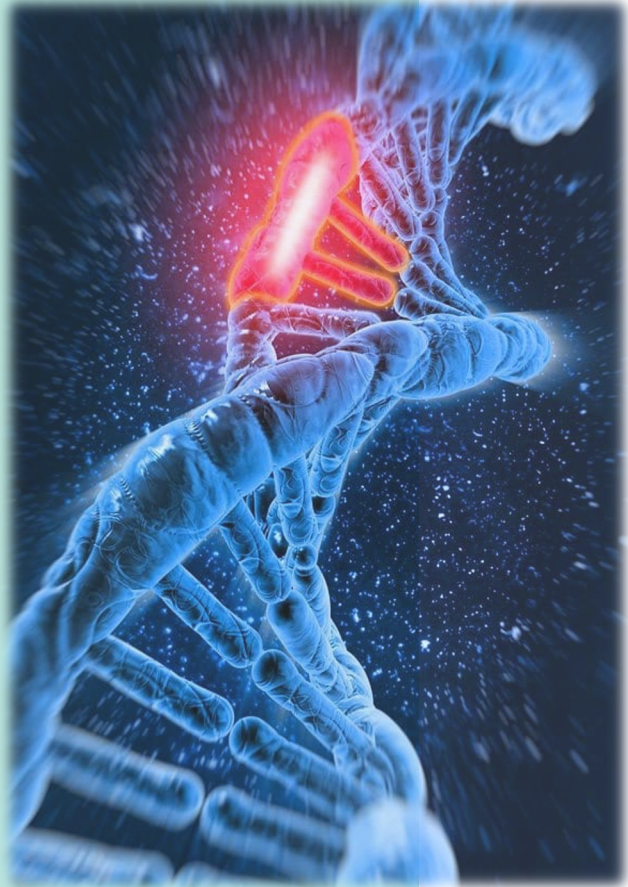




IMPATTO DEGLI INQUINANTI SULLA FERTILITÀ

Cosa provocano gli inquinanti nelle cellule spermatiche?

- Squilibrio dei ROS;
- variazione dei rapporti canonici protamine/istoni e PRM1/PRM2;
- alterazione della concentrazione di metalli in tracce;
- alterazione dell'espressione dei miRNA.



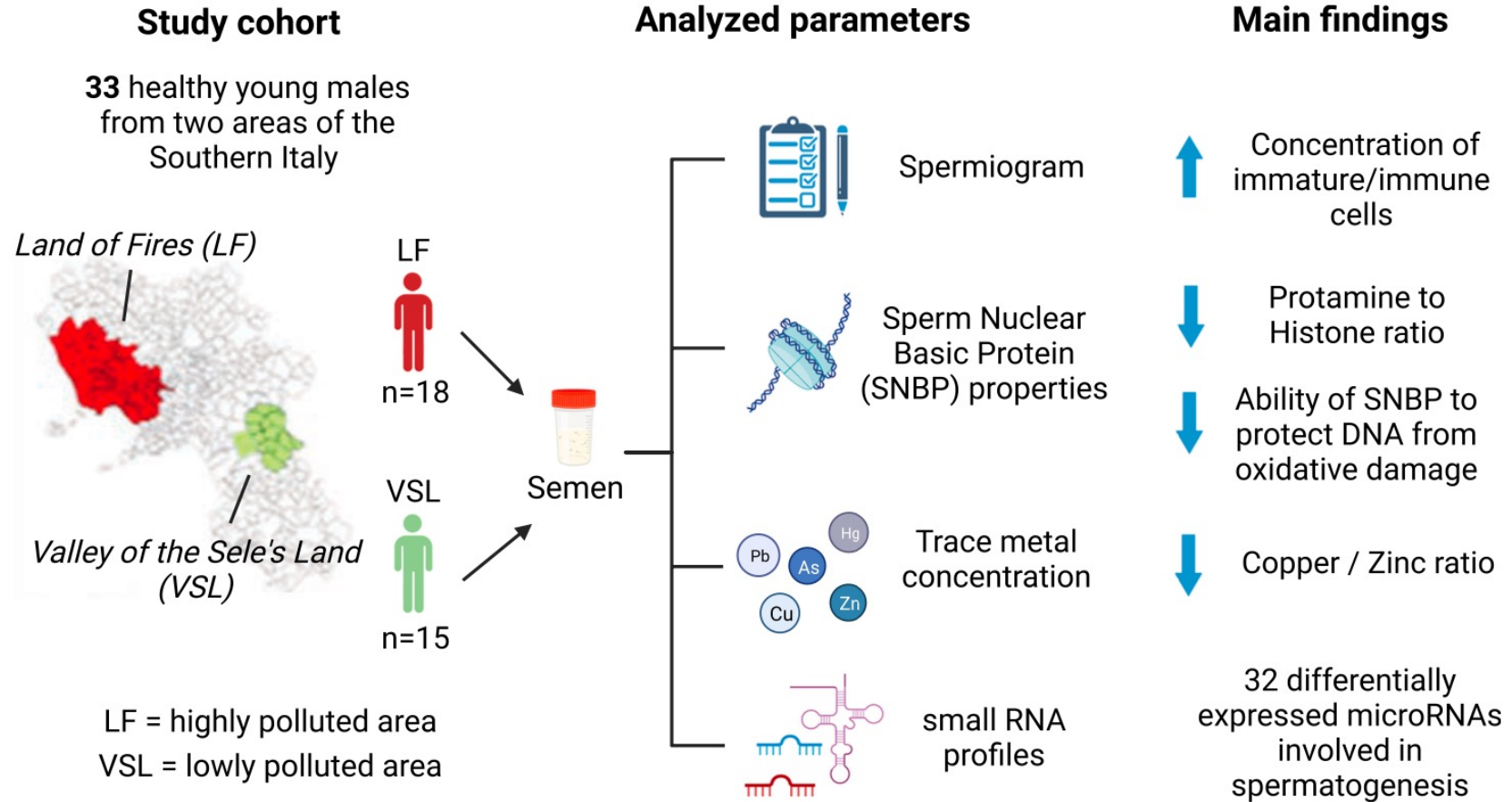
IMPATTO DEGLI INQUINANTI SULLA FERTILITÀ

Conseguenze:

- danni ossidativi al DNA spermatico;
- alterazione della compattazione del DNA;
- inibizione dell'attività enzimatica;
- alterazione della regolazione dell'espressione genica.

SCOPO DELLO STUDIO: verificare se e come l'esposizione agli inquinanti influenza negativamente la fertilità negli uomini.

MATERIALI E METODI



RACCOLTA DEI CAMPIONI

- Effettuata dopo 3-4 giorni di astinenza sessuale;
- parametri valutati: volume, pH, concentrazione, motilità totale e progressiva, morfologia, concentrazione di cellule rotonde.

ESTRAZIONE DELLE SNBP

- Eseguita impiegando tre diverse soluzioni → favoriscono la lisi cellulare, la protezione del DNA e la purificazione delle proteine.

ANALISI ELETTROFORETICA
DELLE SNBP

- Tecnica elettroforetica impiegata: AU-PAGE → separa le proteine in base alla carica;
- importante per rilevare l'eventuale presenza di SNBP anomale.

ANALISI DEL LEGAME SNBP-
DNA

- Utilizzo del plasmide pGEM3, di *Escherichia coli*, che simula la struttura super avvolta del DNA spermatico;
- tecnica elettroforetica impiegata: EMSA.

VALUTAZIONE DEL RUOLO
DELLE SNBP NEL
CONTRASTARE IL DANNO
OSSIDATIVO AL DNA

- Eseguita testando diversi rapporti di SNBP e DNA plasmidico, esposti al danno ossidativo indotto da H_2O_2 e $CuCl_2$;
- tecnica elettroforetica impiegata: elettroforesi su gel di agarosio.

ANALISI DEI METALLI IN
TRACCE

- Tecniche impiegate: Spettrometria di Massa al Plasma Accoppiato induttivamente (ICP-MS) e Spettroscopia di Emissione Atomica al Plasma a Microonde (MP-AES);
- importanti per rilevare la presenza di metalli in tracce nel liquido seminale.

ESTRAZIONE TOTALE DELL'RNA

- Prevede diversi passaggi:
 1. centrifugazione del campione, aggiunta di PBS e di una soluzione di lisi;
 2. incubazione e purificazione con colonne di silice;
 3. eluizione dell'RNA dalle colonne;
 4. misurazione della concentrazione mediante un fluorimetro.

VALUTAZIONE DEI LIVELLI DI
mRNA DI PRM1 E PRM2

- Tecnica impiegata: Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR);
- conversione dell'RNA in cDNA e successiva amplificazione;
- valutazione del ciclo soglia che riflette la concentrazione iniziale di cDNA.

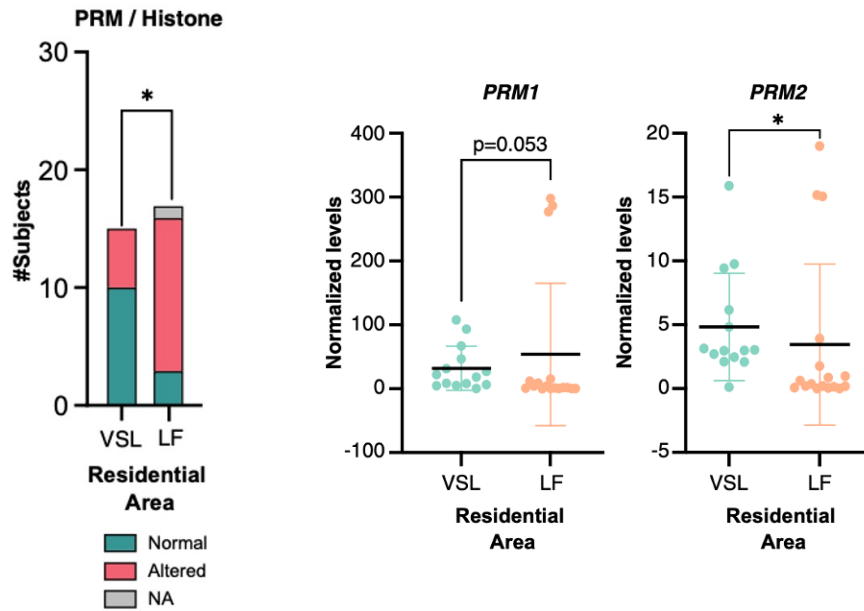
RISULTATI

Residential area Covariate	VSL (n = 15)		LF (n = 18)		p-value Wilcoxon Rank- Sum	p-value Chi-square
	N (%)	Mean (SD)	N (%)	Mean (SD)		
Age		18 (0.4)	18 (1.0)		0.11	
Weight		77 (11.0)	75 (10.0)		0.83	
BMI		24 (2.6)	24 (2.8)		0.54	
Smoking						
No	14 (93.0)		17 (94.0)			1.00
Yes	1 (7.0)		1 (6.0)			
Sperm concentration (million)		39 (26.0)	48 (40.0)		0.65	
Altered (< 15)	3 (20.0)		6 (38.0)			0.50
Normal (≥ 15)	12 (80.0)		10 (62.0)			
Semen volume (ml)		2.4 (1.2)	2.6 (1.4)		0.74	
Altered (< 1.5)	4 (27.0)		4 (25.0)			1.00
Normal (≥ 1.5)	11 (73.0)		12 (75.0)			
Semen viscosity						
V1	12 (80.0)		13 (81.0)			0.72
V2	2 (13.0)		1 (6.0)			
V3	0 (0.0)		1 (6.0)			
V4	1 (7.0)		1 (6.0)			
Progressive motility (%)		28 (21.0)	36 (20.0)		0.29	
Altered (< 32)	8 (53.0)		6 (38)			0.60
Normal (≥ 32)	7 (47.0)		10 (62)			
Total motility (%)		42 (22.0)	49 (23.0)		0.40	
Altered (< 40)	6 (40.0)		4 (25.0)			0.61
Normal (≥ 40)	9 (60.0)		12 (75.0)			
Round cells (10 ⁶ cells/mL)		0.5 (0.4)	1.0 (0.8)		0.04	

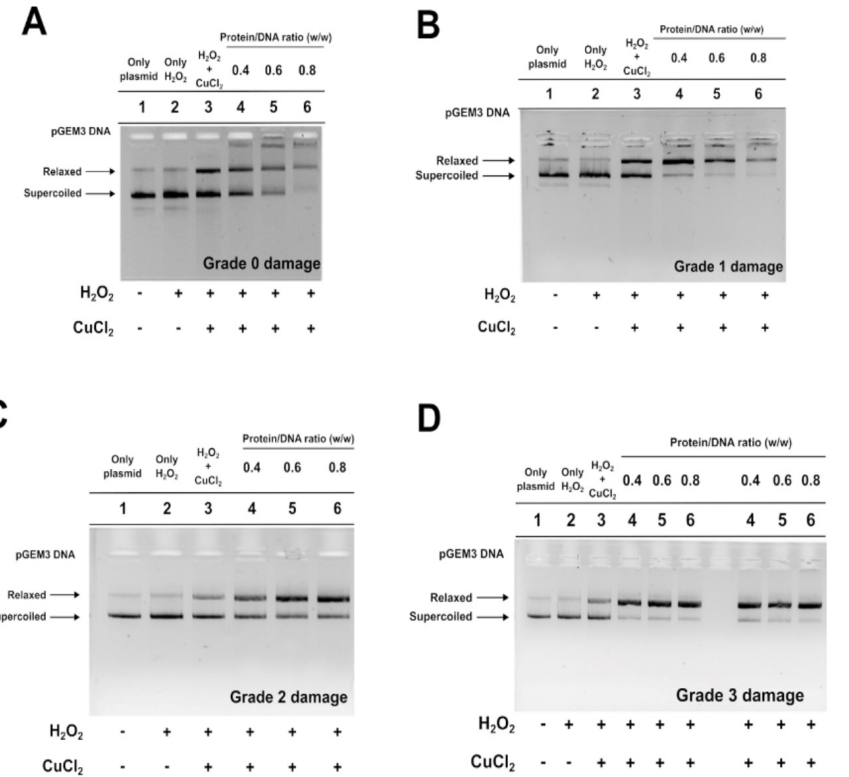
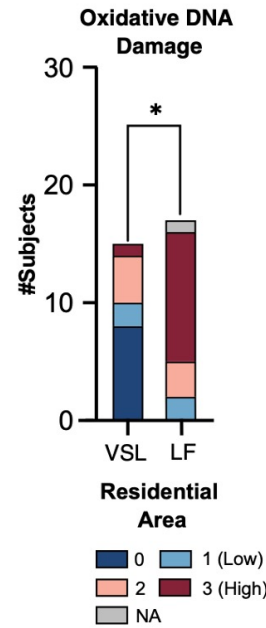
Residential area Variable	VSL		LF		p-value Wilcoxon	p-value Chi-square
	N (%)	Mean (SD)	N (%)	Mean (SD)		
SNBP (%)						
Protamine		73.0 (19.0)		70.0 (15.0)	0.25	
Histone		27.0 (19.0)		30.0 (15.0)	0.25	
Altered protamine/histone ratio						
Yes (≠ 85%/15%)	5 (33.0)		13 (81.0)			0.02
No (= 85%/15%)	10 (67.0)		3 (19.0)			
PRM1/PRM2 ratio		1.2 (0.1)		1.2 (0.2)	0.78	
Altered PRM1/PRM2 ratio						
Yes (< 0.8 or > 1.2)	6 (50.0)		6 (43.0)			1.00
No (range 0.8–1.2)	6 (50.0)		8 (57.0)			
Altered EMSA results						
Yes (> 2.3)	5 (33.0)		16 (100.0)			3.3E-03
No (range 1.6–2.3)	10 (67.0)		0 (0.0)			
Oxidative DNA damage categories*						
Grade 0	8 (53.0)		0 (0.0)			9.1E-03
Grade 1	2 (13.0)		2 (11.8)			
Grade 2	4 (27.0)		3 (17.7)			
Grade 3	1 (7.0)		11 (64.7)			

*Categories from 0 to 3 indicate increasing oxidative damage (see Material and Methods)

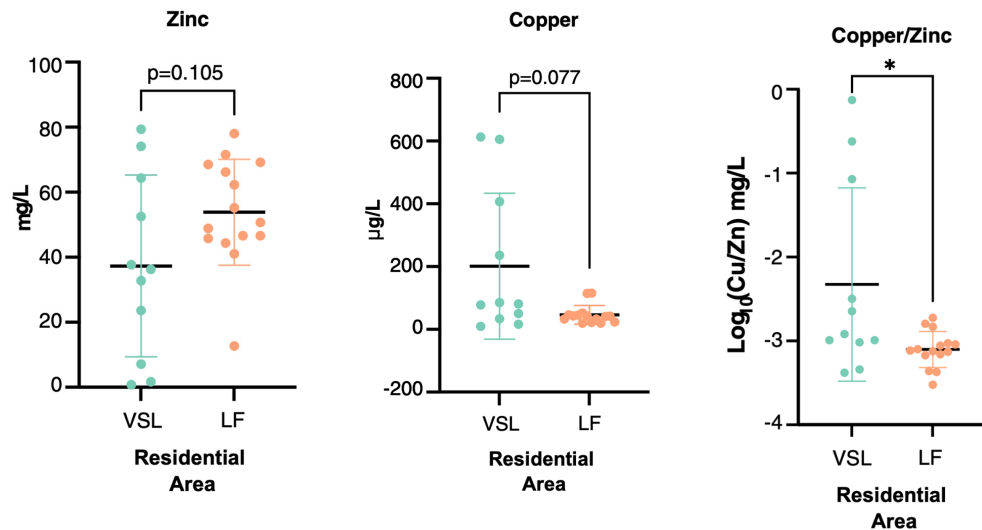
VALUTAZIONE DEL TASSO DI PROTAMINAZIONE (PRM/H)



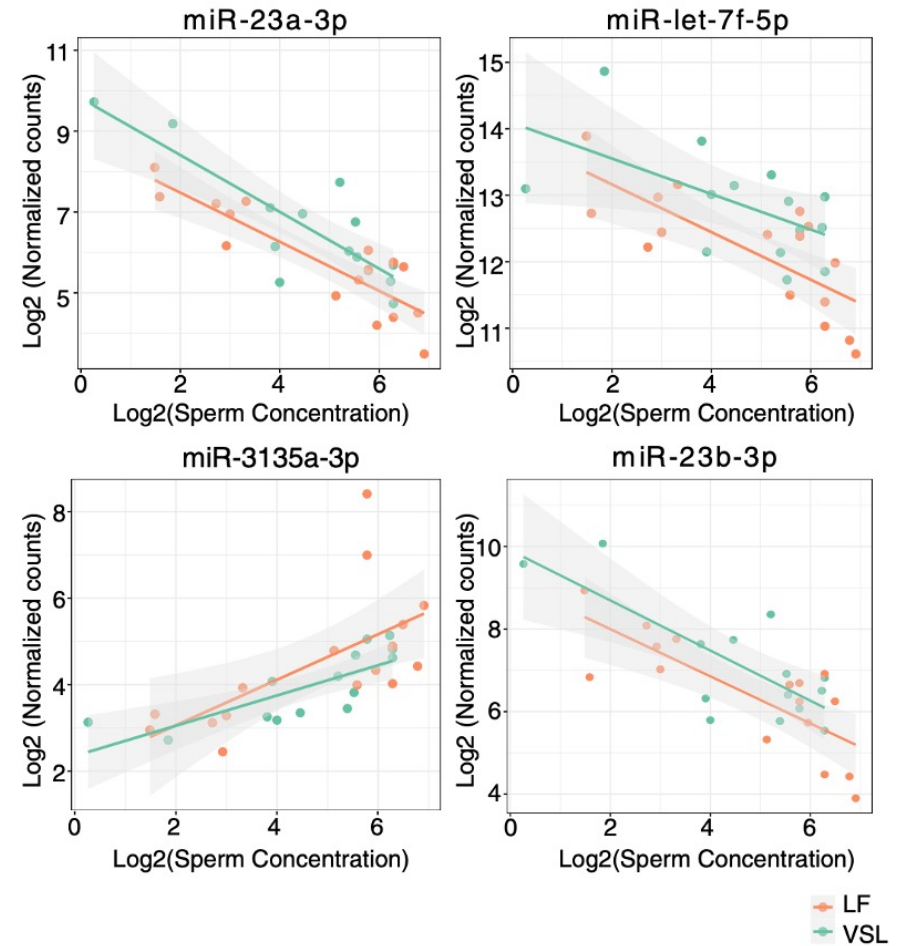
PROTEZIONE DAL DANNO OSSIDATIVO DA PARTE DELLE SNBP



RILEVAZIONE DI METALLI IN TRACCE NEI CAMPIONI DI SPERMA



miRNA RILEVATI NELLO STUDIO



CONCLUSIONE

I risultati ottenuti hanno mostrato una chiara correlazione tra infertilità e inquinamento. Infatti, i soggetti che abitano in una zona ad elevato impatto ambientale, come la Terra dei fuochi, presentano:

- elevati livelli di metalli tossici, come l'arsenico, a causa dell'esposizione a pesticidi e rifiuti tossici;
- carenze e squilibri di metalli essenziali, soprattutto zinco, ed un rapporto Cu/Zn alterato, che contribuiscono alla compromissione della qualità dello sperma e ad un aumento dello stress ossidativo;
- ridotta espressione dell'enzima superossido dismutasi, un enzima coinvolto nella risposta antiossidante;
- alterazione della compattazione del DNA, a causa di un rapporto PRM/H alterato;
- diminuzione dei miRNA, che regolano i geni chiave per la motilità e la protezione dallo stress ossidativo.



ABSTRACT

È stato suggerito che l'esposizione agli inquinanti ambientali possa influenzare negativamente la fertilità maschile. Le tecniche molecolari, integrate alle analisi dello spermogramma, possono fornire informazioni aggiuntive sul potenziale fertilizzante degli spermatozoi.

Lo studio è stato condotto sul seme di 33 giovani uomini sani, provenienti da due aree ad impatto ambientale opposto: la Terra dei fuochi, ad elevato impatto ambientale, e la Valle delle Terre del Sele, a basso impatto ambientale.

Attraverso la profilazione dei miRNA e le analisi sulle proteine basiche nucleari spermatiche (SNBP), è stato osservato che i campioni dei soggetti dell'area maggiormente inquinata presentano una maggiore concentrazione di cellule rotonde, un rapporto protamina/istone inferiore, una ridotta capacità delle SNBP di proteggere il DNA dal danno ossidativo e un rapporto rame/zinco alterato. Motilità e concentrazione spermatica sono, invece, comparabili tra i campioni dei due siti.

È stato inoltre osservato che i livelli di espressione di 32 miRNA, coinvolti in trasporto intraflagellare, risposta allo stress ossidativo e spermatogenesi, sono diversi tra le due aree.

Grazie a questo studio è stato possibile rilevare una chiara correlazione tra inquinamento e fertilità. L'impiego delle tecniche molecolari, ha fornito nuove informazioni sulle alterazioni epigenetiche spermatiche causate dall'inquinamento, non rilevabili tramite lo spermogramma.



SITOGRAFIA

<https://www.sigmaaldrich.com/IT/it/technical-documents/technical-article/genomics/qpcr/data-analysis?srsltid=AfmBOogRNUDR11nXf4gHexAskP3nbzKGMb97GI06LVVv8ENVNXXSW03gy>

<https://www.centrodimedicinabiologica.it/infertilita-maschile-gli-effetti-dell-inquinamento-ambientale/#:~:text=sulla%20qualit%C3%A0%20spermatuca.-,Metalli%20pesanti%20e%20aria%20inquinata,e%20del%20danno%20agli%20spermatozoi.>

https://figshare.com/articles/dataset/Supplementary_Materials_pdf/24187695?file=43891971

<https://academic.oup.com/nar/article/47/D1/D155/5179337>

<https://upbiotech.wordpress.com/2018/12/05/librerie-genomiche-e-di-cdna/>

