



Inquinamento ambientale e fertilità maschile

Inquinanti ambientali e stili di vita scorretti contribuiscono al declino della fertilità maschile nei paesi industrializzati, misurare gli effetti genomici e epigenetici nel gamete maschile è importante per poter attuare le politiche di prevenzione

DOI 10.12910/EAI2017-042

di **Giorgio Leter, Francesca Pacchierotti, Eugenia Cordelli e Claudia Consales**, ENEA

Dedichiamo questo articolo al nostro amico e collega Marcello Spanò, pioniere delle ricerche condotte all'ENEA sull'impatto dei fattori ambientali sulla fertilità maschile

Secondo le più recenti stime dell'ONU si prevede che la popolazione mondiale arriverà a 9,7 miliardi di individui nel 2050, eppure insieme a questo dato anche il numero di persone infertili è aumentato negli ultimi 50 anni e le stime danno questo dato in crescita. Attualmente, secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), il 15-20 % delle coppie nei paesi industrializzati ha problemi nel concepimento di figli. Le cause che contribuiscono a determinare tale percentuale sono varie: oltre a fattori genetici, l'inquinamento ambientale, lo stile di vita e le condizioni socio-economiche sembrano essere quelle prevalenti. L'infertilità di coppia è attribuita nel 35% circa dei casi al partner femminile, nel 30% al partner maschile; nel 20% dei casi si rilevano problemi in ambedue i partner e nel 15% dei casi l'origine rimane sconosciuta (infertilità idiopatica). Una recente meta-analisi dei dati sulla conta spermatica di oltre 40.000 individui di paesi occidentali indica una riduzione di oltre il 50 % tra il 1973 e il 2011 [1], confermando con grande autorevolezza il trend precedentemente osservato.

Per alcuni aspetti l'infertilità maschile presenta alcune caratteristiche peculiari, proprie della genesi e dello sviluppo dell'apparato riproduttivo maschile che lo rendono suscettibile all'azione di inquinanti ambientali e di quelli derivanti da scorretti stili di vita quali il tabagismo e l'alcolismo. Oggi, numerosi studi sperimentali ed epidemiologici hanno dimostrato in modo solido che il fumo ha effetti nocivi sulla salute riproduttiva maschile agendo a diversi livelli, dalla riduzione del potenziale di fertilità alla induzione e trasmissione di alterazioni ereditarie [2].

Lo sviluppo del gamete maschile,

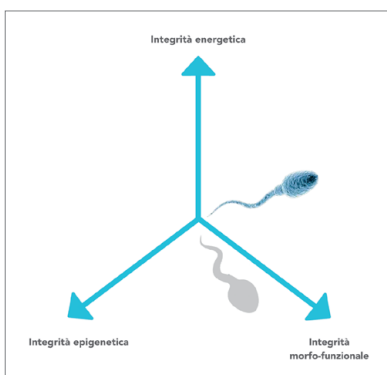


Fig. 1 Le tre dimensioni dell'integrità dello spermatozoo

lo spermatozoo, è regolato dagli ormoni del sistema endocrino, di cui anche gli organi riproduttivi fanno parte, attraverso il complesso processo della spermatogenesi che ha inizio all'età puberale e continua per il resto della vita della persona. Negli ultimi decenni, alcune sostanze chimiche di uso industriale (plasticanti, biocidi, metalli pesanti e altre) sono state disperse nell'ambiente e costituiscono una fonte di esposizione per l'uomo e gli ecosistemi. Tra queste sostanze alcune si comportano come ormoni esogeni e interferiscono con il sistema endocrino già a partire dallo sviluppo fetale e postnatale e successivamente, nell'omeostasi della fisiologia ormonale dell'individuo adulto. Queste sostanze sono state definite interferenti endocrini (EDC dall'acronimo inglese). Malgrado l'utilizzo di alcune di queste, come il poli-cloro-bifenile (PCB), il dicloro-difenil-tricloroesano (DDT) e il bisfenolo-A (BPA) siano state bandite in molti paesi già da diversi anni, concentrazioni rilevabili sono tuttora presenti nell'ambiente e all'interno degli organismi, tra i quali l'uomo, poiché tali sostanze tendono ad accumularsi nei lipidi corporei. Studi di laboratorio con-

dotti su modelli cellulari e animali hanno evidenziato che l'esposizione a questa classe di composti induce alterazioni delle funzioni tiroidea e riproduttiva, con diminuita sopravvivenza dei nati e alterazioni nello sviluppo. Anche studi epidemiologici su popolazioni umane hanno rilevato un'associazione tra i livelli di questi inquinanti e una riduzione della fertilità.

L'Unione Europea ha selezionato 564 sostanze sospettate di essere interferenti endocrini. Di queste, 147 presentano una elevata persistenza ambientale o sono prodotte in grandi volumi. Al momento, di queste, 66 sono state accertate agire come interferenti endocrini (categoria 1) e per altre 52 sono state ottenute evidenze in tal senso anche se non conclusive (categoria 2) [3].

Per la valutazione dell'impatto ambientale sulla salute riproduttiva, tre sono le dimensioni che devono essere prese in considerazione: quella della tossicità con un effetto sul numero e sulla capacità fecondante degli spermatozoi, quella della genotossicità con un effetto sulla qualità dell'informazione genetica trasmessa alla prole e quella delle alterazioni epigenetiche, con effetti potenziali sia sulla fertilità che sulla insorgenza di patologie nella prole (Figura 1).

Origine delle alterazioni genetiche nel corso del differenziamento germinale maschile

Lo spermatozoo è il prodotto finale di un processo complesso e delicato chiamato spermatogenesi che porta da una cellula proliferante relativamente indifferenziata, lo spermatogonio, ad una cellula aploide, estremamente specializza-

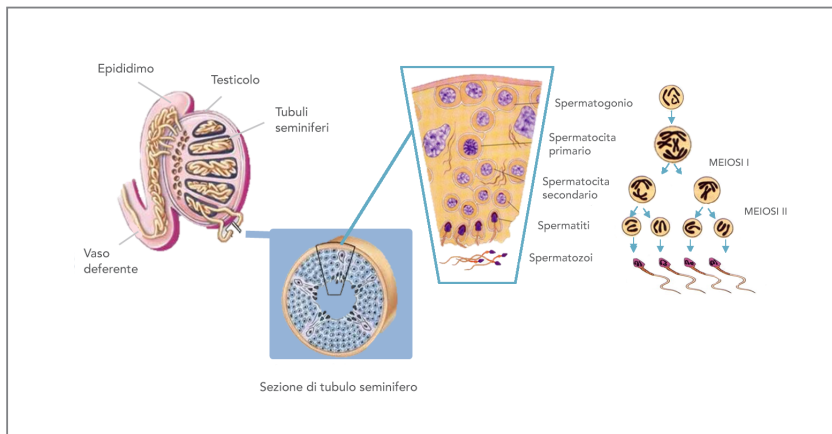


Fig. 2A Il differenziamento germinale maschile avviene all'interno dei tubuli seminiferi nel testicolo. Le cellule man mano che maturano migrano verso il lume del tubulo dal quale sono traslocate all'epididimo. La cellula spermatogoniale dà origine agli spermatociti da ciascuno dei quali, attraverso la meiosi e il successivo differenziamento (spermiogenesi) derivano 4 spermatozoi

ta, dalla morfologia aerodinamica, capace di muoversi e fecondare l'ovocita (Figura 2).

Durante questo processo, che nell'uomo dura più di 70 giorni, gli spermatogoni vanno incontro a varie divisioni mitotiche differenziandosi poi, in parte, in spermatociti primari che dopo due successive divisioni meiotiche daranno origine agli spermatidi rotondi. Da ogni spermatocita si otterranno quattro spermatidi rotondi che inizieranno la fase di spermiogenesi. La maturazione post-meiotica comporta profondi cambiamenti morfologici, lo spermatide perde infatti gran parte del citoplasma, assume una forma affusolata e si forma il flagello. Contemporaneamente, le proteine associate al DNA vengono sostituite rendendo la cromatina estremamente compatta. L'intero processo è finemente regolato e la diversità di tipi cellulari della spermatogenesi si riflette in una diversa suscettibilità all'esposizione ad agenti nocivi. La deregolazione del processo può avere effetti negativi sulla quantità

e sulla qualità del prodotto finale, lo spermatozoo, con un conseguente impatto sulla fertilità maschile. Va inoltre considerato, che, poiché lo spermatozoo è deputato alla trasmissione dei caratteri ereditari maschili da una generazione alla successiva, un possibile danno genetico può avere un impatto rilevante sulla fertilità e sulla salute della prole. La fase replicativa degli spermatogoni è potenzialmente soggetta ad errori nella duplicazione del DNA, in questa fase quindi gli spermatogoni sono particolarmente sensibili

all'induzione di mutazioni geniche *de novo* mentre durante la meiosi, quando avviene la ricombinazione tra cromosomi omologhi, sono più frequenti le alterazioni cromosomiche. Uno stadio estremamente sensibile al danno genomico è costituito dalla lunga fase di maturazione post-meiotica. Durante questa fase infatti, l'eventuale presenza di elevati livelli di specie chimiche reattive dell'ossigeno (ROS) di natura endogena ed esogena ed il processo di sostituzione delle proteine nucleari, che implica l'introduzione di rotture della doppia elica di DNA, concorrono a favorire la formazione di rotture nella molecola di DNA.

A causa della progressiva perdita delle funzioni enzimatiche di riparazione del DNA, queste rotture non possono essere riparate efficacemente, pertanto le lesioni indotte in queste ultime fasi della spermatogenesi possono persistere fino alla fecondazione causando alterazioni genetiche nello zigote.

Oggi un crescente numero di dati conferma che se le alterazioni del numero cromosomico insorgono molto più frequentemente nel corso della meiosi femminile, le aberrazioni cromosomiche strutturali e le mutazioni geniche sembrano avere

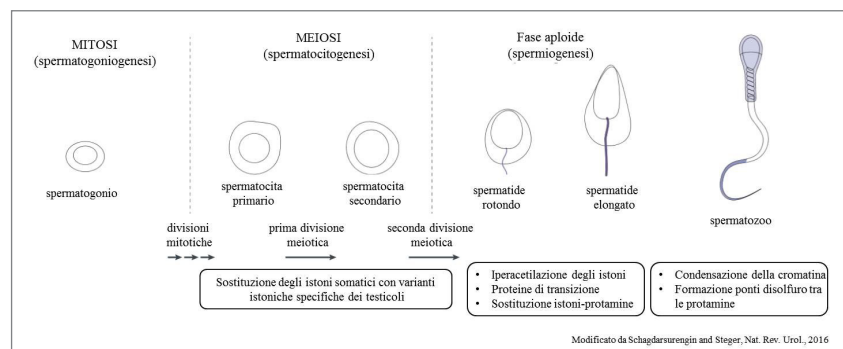


Fig. 2B Durante la meiosi, la maggior parte degli istoni somatici sono sostituiti con le varianti tipiche delle cellule del testicolo. Durante la spermiogenesi, si ha una completa riorganizzazione e condensazione della cromatina, grazie anche alla sostituzione degli istoni con le protamine

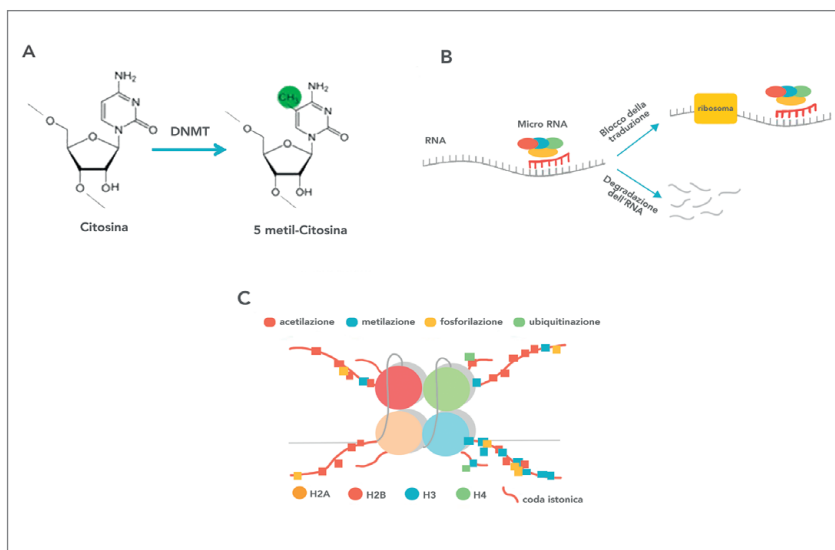


Fig. 3 Principali meccanismi di controllo epigenetico: (A) Metilazione DNA; (B) microRNA; (C) Modifiche istoniche

una prevalente origine paterna. Inoltre è stato osservato che mentre la frequenza di alterazioni del numero cromosomico nella progenie è fortemente dipendente dall'età materna, la frequenza di mutazione aumenta invece con l'età paterna.

A partire dagli anni 60 del XX secolo, numerosi studi sui roditori di laboratorio hanno dimostrato e caratterizzato l'induzione di alterazioni genetiche nel sistema germinale maschile dopo esposizione a radiazioni ionizzanti e molte sostanze chimiche, cui l'uomo può essere esposto in ambienti di vita e di lavoro. In seguito, l'applicazione di nuove tecniche di analisi cellulare e molecolare allo spermatozoo umano ha permesso di confermare alcuni di questi risultati sull'uomo contribuendo in tal modo a raffinare le stime di rischio.

Epigenetica dello spermatozoo ed eredità transgenerazionale

Il termine epigenetica (dal greco επί, epì = «sopra» e γεννητικός,

γεννητικός = «relativo all'eredità familiare») è stato utilizzato per la prima volta nel 1940 dallo studioso scozzese Conrad Waddington per descrivere quei «processi/fattori molecolari intorno al DNA che regolano l'attività genomica indipendente-

mente dalla sequenza del DNA e che sono mitoticamente stabili». In altre parole, con il termine epigenetica ci si riferisce a tutti quei cambiamenti che influenzano l'espressione genica, cioè il fenotipo, senza alterare la sequenza nucleotidica dei geni, cioè il genotipo. Caratteristica dei fenomeni epigenetici è quella di essere fondamentalmente stabili da una generazione cellulare alla successiva, ma nello stesso tempo di rispondere a influenze ambientali con una plasticità molto maggiore di quella connaturata alla sequenza del DNA. Esistono tre meccanismi principali attraverso cui la cellula attua i controlli epigenetici dell'espressione genica: la metilazione del DNA, l'utilizzo di piccole molecole di RNA non codificanti, tra cui i cosiddetti microRNA e le modifiche degli istoni (Figura 3).

La metilazione del DNA consiste nel legame di un gruppo metilico al carbonio 5 di una Citosina posta accanto ad una guanina (CpG) ad opera dell'enzima DNA metil-



transferasi (DNMT) e generalmente comporta l'inattivazione dell'espressione genica.

I microRNA sono RNA a singolo filamento lunghi circa 20 nucleotidi coinvolti nella regolazione dell'espressione genica a livello trascrizionale e post-trascrizionale. Essi inibiscono l'espressione perché interagiscono direttamente con le molecole di RNA messaggero impedendone la traduzione oppure inducendo la loro degradazione.

Gli istoni sono proteine basiche

differenziamento germinale maschile. Durante la spermatogenesi le cellule germinali subiscono diverse modifiche epigenetiche. Gli spermatozoi contengono un corredo di informazioni epigenetiche, a livello della metilazione del DNA, del contenuto di RNA non codificanti e delle modificazioni della frazione istonica residua, essenziale per determinare sia la loro stessa funzionalità che il corretto sviluppo delle prime fasi embrionali. Alterazioni nell'epigenoma dello spermatozoo potrebbero

denza, è fortemente suscettibile ad influenze ambientali, tra cui si annoverano, oltre all'esposizione a vari tipi di sostanze, quali gli inquinanti xenobiotici, anche il cibo, lo stress, il fumo, eccetera (Figura 4).

Per questa ragione, lo stile di vita del padre può avere ripercussioni sullo stato di salute di figli e nipoti. Numerosi studi, infatti, hanno dimostrato, ad esempio, che l'obesità induce nei maschi un cambiamento della metilazione del DNA e della composizione dei microRNA delle cellule testicolari che ha un effetto diretto sulla composizione del grasso dei discendenti (fino alla seconda generazione), rendendo questi individui anche maggiormente predisposti all'insorgenza del diabete. Ancora, è stato dimostrato che se nel periodo dell'accoppiamento i topi maschi sono sottoposti ad una dieta priva di folati, che sono i principali fornitori di gruppi metilici e sono presenti in alimenti quali verdure a foglia verde, arance, fragole, legumi, aumenta in maniera statisticamente significativa il numero degli aborti e di cuccioli con malformazioni, perché il DNA di questi ultimi presenta delle alterazioni nei livelli di metilazione di alcuni geni coinvolti nello sviluppo.

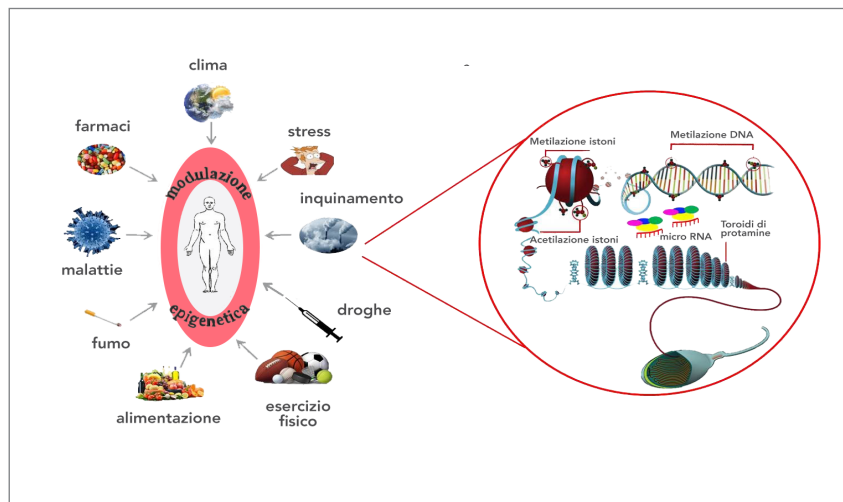


Fig. 4 Nell'uomo lo stile di vita modifica l'epigenoma dello spermatozoo

che, legando il DNA, costituiscono la componente principale della cromatina. Modifiche delle loro code N-terminali, quali la fosforilazione, la metilazione, l'acetilazione e l'ubiquitinazione, determinano una struttura rilassata o compatta della cromatina che favorisce o meno l'espressione genica.

L'epigenetica è fondamentale durante lo sviluppo embrionale, dal momento che la maggior parte dei processi di differenziamento cellulare si basa su fenomeni epigenetici, e svolge un ruolo chiave anche nel

spiegare alcuni di casi di infertilità idiopatica, in cui sembra non esserci alcuna causa evidente per la mancanza di procreazione.

Le modifiche dell'epigenoma dello spermatozoo, oltre a poter comportare problemi di fertilità, possono essere trasmesse alla progenie, diventando, quindi, vere e proprie mutazioni (epimutazioni). Studi sperimentali suggeriscono che queste epimutazioni possano avere conseguenze soprattutto a livello neuro-comportamentale e metabolico.

L'epigenoma, come detto in prece-

Ambiente e fertilità maschile: la ricerca nei laboratori dell'ENEA

L'ENEA negli ultimi 25 anni ha partecipato a diversi studi internazionali che hanno avuto per oggetto la valutazione degli effetti degli inquinanti ambientali sulla salute riproduttiva maschile e in particolare il loro impatto su un eventuale danno al DNA e alla cromatina dello spermatozoo. Nel corso degli anni, all'iniziale valutazione dell'integrità genetica si è aggiunta la dimensione

epigenetica. Tali studi, sia di carattere sperimentale che di epidemiologia umana hanno contribuito a incrementare le conoscenze sul rischio che gli inquinanti ambientali hanno sulla salute riproduttiva.

L'ultimo progetto in ordine di tempo, il progetto europeo (CLEAR) [4, 5], appena concluso, ha preso in esame alcuni composti della classe dei perfluorurati (PFOS e PFOA), utilizzati nei rivestimenti idrorepellenti e an-

timacchia, nei rivestimenti resistenti all'olio per prodotti di carta per uso alimentare, nelle schiume antincendio, nelle vernici. Lo studio ha riguardato una coorte di circa 600 europei che vivono in tre aree diverse del continente. Nei laboratori dell'E-NEA sono stati analizzati marcatori di integrità strutturale della cromatina spermatica e i livelli di metilazione globale del DNA dello spermatozoo. Lo studio, tra i primi a valutare

possibili associazioni tra esposizioni a contaminanti ambientali e metilazione del DNA spermatico, non ha messo in evidenza un effetto dell'esposizione ai composti in esame, ma ha dimostrato variazioni geografiche significative dei marcatori esaminati, suggerendo la necessità di ulteriori indagini per approfondirne le cause.

*Per saperne di più:
giorgio.leter@enea.it*

BIBLIOGRAFIA

1. H. Levine, N Jørgensen, A. Martino-Andrade, J. Mendiola, D. Weksler-Derri, I. Mindlis, R. Pinotti, and S.H. Swan Temporal trends in sperm count: a systematic review and meta-regression analysis, *Hum Reprod Update*. pp 1-14, 2017
2. MA. Beal, CL Yauk, F Marchetti. From sperm to offspring, Assessing the heritable genetic consequences of paternal smoking and potential public health impacts. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 773:26-50, 2017
3. European Commission, Endocrine Disruptors, Which substances are of concern? http://ec.europa.eu/environment/chemicals/endocrine/strategy/substances_en.htm
4. G. Leter et al., Exposure to Perfluoroalkyl Substances and Sperm DNA Global Methylation in Arctic and European Populations. *Environ and Mol Mutagen* 55:591-600, 2014
5. C. Consales et al., Exposure to persistent organic pollutants and sperm DNA methylation changes in Arctic and European populations. *Environ Mol Mutagen*. 57:200-9, 2016