

La prima definizione di Stress Ossidativo risale al 1985 ad opera di Sies H. che così lo descrive come un'alterazione dell'equilibrio tra fattori pro- e anti- ossidanti in favore dei primi che può determinare un potenziale danno (Sies H, 1985).

Il termine stress ossidativo identifica, quindi, una condizione patologica causata dalla perdita del fisiologico equilibrio fra la produzione e l'eliminazione di specie chimiche ossidanti. Le specie ossidanti sono prodotti della normale attività metabolica ed a concentrazione fisiologica, svolgono importantissime funzioni a livello cellulare e sistemico.

In condizioni fisiologiche la cellula mantiene al suo interno uno stato riducente grazie ad un bagaglio di enzimi e molecole che controbilanciano la produzione di ROS. Se la generazione di ROS eccede le capacità antiossidanti della cellula stessa, o si verifica una diminuzione dei meccanismi di detossificazione, si viene ad instaurare una nuova condizione che prende appunto il nome di stress ossidativo (Turner and Lysiak, 2008). Questa condizione sembra giocare un ruolo di primaria importanza in numerose patologie e può provocare effetti tossici attraverso la produzione di specie chimiche reattive che danneggiano le componenti della cellula, incluse proteine, lipidi ed acidi nucleici (Mancuso et al., 2010). Pertanto, livelli non fisiologici di ROS sono deleteri per le cellule ed in particolare per gli spermatozoi che sono tra le cellule più sensibili allo stress ossidativo.

L'eccessiva quantità di ROS, può essere causa di alterazioni strutturali e funzionali dello spermatozoo, poiché la loro presenza in eccesso contribuisce alla perossidazione dei lipidi di membrana, all'ossidazione delle proteine e al danneggiamento del DNA.

Sappiamo che ad oggi, lo stress ossidativo è stato identificato come una delle possibili cause d'infertilità idiopatica: in uno studio in vivo condotto da Pasqualotto, è stato dimostrato che uomini con infertilità idiopatica presentano livelli significativamente più alti di ROS ed un ridotto potere antiossidante, confrontati con pazienti fertili (Pasqualotto et al., 2001).

Diversi studi in letteratura riportano che l'uso di antiossidanti, in uomini infertili, potrebbe migliorare sia la qualità spermatica che i tassi di gravidanze (Ross et al., 2010).

Poiché l'analisi diretta dei ROS è estremamente difficile a causa della loro elevata reattività e breve emivita, lo studio dello stress ossidativo si avvale principalmente di metodi in grado di rilevare le alterazioni da essi indotte su proteine, lipidi e DNA.

La comprensione del danno ossidativo a livello degli acidi nucleici si deve a Mecocci e coll. che, nel 1993, hanno studiato l'ossidazione di specifiche basi del DNA (Lovell et al., 2007). Un buon marcatore biologico di stress ossidativo a livello del DNA è rappresentato dall'8-idrossi-2'-deossiguanosina (8-OHdG). La deossiguanosina (dG) è uno dei costituenti del DNA e se ossidata si trasforma in 8-OHdG. L'analita viene tagliato da enzimi, le endonucleasi, del sistema di riparazione del DNA. Se il DNA non venisse correttamente riparato prima del meccanismo di replicazione, la presenza dell' 8-OHdG condurrebbe alla trasversione da G:C a T:A, mutagenesi o morte cellulare (Shen et al., 2006).

Numerose tecniche analitiche, in questi ultimi anni, sono state utilizzate per sviluppare metodi di quantificazione, tra cui l'elettroforesi capillare con detector elettrochimico ed il metodo immunoenzimatico ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbant Assay).

Tuttavia, questi metodi sono attualmente criticati perché responsabili della possibile formazione spontanea di 8-OHdG durante la fase di estrazione / digestione del DNA degli spermatozoi (Badouard et al. 2008). Recentemente, sono state riportate tecniche emergenti per rivelare 8-OHdG, che impiegano anticorpi (Kao et al. 2008) o proteine leganti (De luliis et al., 2009, Zribi et al. 2010).

In un recente studio (Cambi M et al. 2013), in particolare, sono stati confrontati due metodi per rilevare 8-OHdG a livello delle cellule spermatiche: l'OxyDNA Kit e tecniche di immunocitochimica. L'OxyDNA kit è basato sull'utilizzo di una sonda fluorescente coniugata a FITC di legame a 8-OHdG; la fluorescenza può essere monitorata sia tramite microscopia a fluorescenza che citometria a flusso (eccitazione 495 nm, emissione 515 nm). La procedura di immunocitochimica si avvale, invece, dell'utilizzo di anticorpi monoclonali diretti contro una sequenza di 8-OHdG.

Pertanto la rivelazione di 8-OHdG a livello spermatico, insieme ad altre metodiche di analisi del liquido seminale, utilizzate di routine, potrebbe fornire ulteriori informazioni sulla fertilità maschile.

## Referenze

- Badouard C, Me´ne´zo Y, Panteix G, Ravanat JL, Douki T, Cadet J & Favier A** (2008) Determination of new types of DNA lesions in human sperm. *Zygote* 16 9–13. (doi:10.1017/S0967199407004340)
- Cambi M, Tamburrino L, Marchiani S, Olivito B, Azzari C, Forti G, Baldi E, Muratori M.** (2013) Development of a specific method to evaluate 8-hydroxy,2-deoxyguanosine in sperm nuclei: relationship with semen quality in a cohort of 94 subjects. *Reproduction*; 145: 227–235.
- De Iuliis GN, Thomson LK, Mitchell LA, Finnie JM, Koppers AJ, Hedges A, Nixon B & Aitken RJ** (2009) DNA damage in human spermatozoa is highly correlated with the efficiency of chromatin remodeling and the formation of 8-hydroxy-20-deoxyguanosine, a marker of oxidative stress. *Biology of Reproduction* 81 517–524. (doi:10.1095/biolreprod.109.076836)
- Kao SH, Chao HT, Chen HW, Hwang TI, Liao TL & Wei YH** (2008) Increase of oxidative stress in human sperm with lower motility. *Fertility and Sterility* 89 1183–1190. (doi:10.1016/j.fertnstert.2007.05.029)
- Lovell M.A., Markesbery W.R.** (2007) Oxidative DNA damage in mild cognitive impairment and late-stage Alzheimer’s disease. *Nucleic Acids Res*;35:7497–7504. doi: 10.1093/nar/gkm821.
- Mancuso M, Orsucci D, Logerfo A, Rocchi A, Petrozzi L, Nesti C, et al.** (2010) Oxidative stress biomarkers in mitochondrial myopathies, basally and after cysteine donor supplementation. *J Neurol.* 2010;257:774–781
- Pasqualotto FF, Sharma RK, Kobayashi H, Nelson DR, Thomas AJ Jr & Agarwal A** (2001). Oxidative stress in normospermic men undergoing infertility evaluation. *Journal of Andrology* 22 316–322.
- Ross C, Morriss A, Khairy M, Khalaf Y, Braude P, Coomarasamy A, et al.** A systematic review of the effect of oral antioxidants on male infertility. *Reprod Biomed Online.*;20:711–723.
- Turner T. T., Lysiak J. J.** (2008) Oxidative stress: a common factor in testicular dysfunction. *Journal of Andrology.*29(5):488–498. doi: 10.2164/jandrol.108.005132
- Zribi N, Feki Chakroun N, El Euch H, Gargouri J, Bahloul A & Ammar Keskes L** (2010). Effects of cryopreservation on human sperm deoxyribonucleic acid integrity. *Fertility and Sterility* 93 159–166. (doi:10.1016/ j.fertnstert.2008.09.038)