



# BIOMARCATORI DI DOSE EFFICACE: Risultati

P R E V I E N I



Salute riproduttiva e contaminanti

<http://www.iss.it/prvn/>

Cinzia La Rocca

Reparto di Tossicologia Alimentare e Veterinaria

Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare

Istituto Superiore di Sanità

# PREVIENI

P R E V I E N I



Salute riproduttiva e contaminanti

## Monitoraggio biologico nella popolazione

biomarcatori di esposizione —————> osservazioni cliniche



## biomarcatori di dose efficace

**Biomarker of effect:** a measurable alteration within a living organism that, depending upon the magnitude, can be recognized as associated with a health risk (WHO, 1993)

per valutare l'impatto dell'esposizione a interferenti endocrini sulla salute riproduttiva (INFERTILITA')  
e sulle generazioni future (studio trans-generazionale).



# BIOMACATORI DI EFFETTO in campioni di sangue intero

- **Leucociti** cellule del sistema immunitario,  
ruolo nei processi infiammatori,  
invadono altri tessuti: adiposo, epatico, intestinale, riproduttivo  
(es, ciclo ovarico e mestruale)
- **valutazione dell'espressione genica dei recettori:**

**estrogeni: ER $\alpha$ , ER $\beta$**  metabolismo steroideo

**androgeno: AR** metabolismo steroideo

**arilico: AhR** trascrizione enzimi metabolici fegato, sistema immunitario

**proliferatore dei perossisomi: PPAR $\gamma$**  metabolismo e biosintesi  
lipidica

**pregnano X: PXR** trascrizione enzimi metabolici fegato (fase I,II)





# PFOS /PFOA e infertilità

- Uso: contenitori per alimenti, rivestimenti in utensili (Teflon); surfattanti e repellenti in prodotti per la pulizia di pelli, tessuti, additivi nei pesticidi, schiume antincendio, tessuti (GORE-TEX)
- Esposizione: alimenti, polvere casalinga (EFSA 2011)
- Persistenti, bioaccumulano
- Interazione con : ERs, PPARs, PXR (Ren et al., 2009; Takacs and Abbott, 2007).
- In vivo PFOS altera il ciclo estrale dei ratti interferendo con la regolazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-ovario e provocando ritardo di ovulazione e aborti (Austin et al., 2003)
- Correlazione con fertilità ridotta e time to pregnancy più lungo (Fei et al., 2009; Lau et al., 2006; Governini et al., 2011 ).
- Ridotti livelli di testosterone plasmatico, ridotta qualità del seme sono stati riscontrati in uomini con livelli di PFOA/PFOS più elevati rispetto ai controlli (Joensen et al, 2009).



# DEHP/MEHP e infertilità

- DEHP (il più noto e probabilmente il più tossico degli ftalati) e MEHP (il suo metabolita)
- Plastificanti, additivi in prodotti in PVC
- Uso vietato nelle pellicole a contatto con gli alimenti e nei giocattoli per bimbi sotto i 3 anni
- non bioaccumula, ma diffusi livelli di DEHP nella popolazione anche italiana (Latini, *Clinica Chimica Acta* 2005, )
- DEHP antagonista del 17beta-estradiolo nel legame ER, modula AhR e PPARs (Ghisari M *Toxicol Lett.* 2009, [Krüger T](#), *Toxicology* 2008)
- MEHP antagonista del testosterone nel legame con AR, modulatore di PPARγ ([Laguë E](#) *Endocrinology.* 2008, [Desvergne B](#), *Mol Cell Endocrinol.* 2009)
- L'esposizione di ratti femmine al DEHP sopprime la produzione di estradiolo nelle cellule di granulosa. MEHP sopprime la produzione di FSH e progesterone; (Davis et al, 1994, *Toxicol Appl Pharmacol*)
- Diminuzione della secrezione di testosterone da parte delle Leydig cells [Jones et al, 1993, ]
- Studio caso-controllo in donne ad uno stadio avanzato di endometriosi. Livelli di MEHP e DEHP nel plasma significativamente più alti rispetto ai controlli. [Kim et al, 2011, *Fertil Steril*]
- MEHP inversamente associato con testosterone e estradiolo in uomini infertili. [Meeker et al, 2009, *J Androl*]



# Bisfenolo A

- come polimero: plastiche (policarbonati) & resine di rivestimento per barattoli di latta
- come additivo di altre plastiche: PVC, PET, tubi medicali, giocattoli
- come componente di alcuni fissanti dentali
- Azione estrogenica: agonista di ERalfa e ERbeta, antagonista di AR e ThR
- stimolazione della produzione di prolattina,
- alterazione dello sviluppo delle ghiandole mammarie durante la pubertà e nell'aumento di rischio nel cancro al seno (Fenton, 2006).
- Aumento del volume prostatico, diminuzione della qualità spermatica (Okada, Kai; 2008)
- BPA altera le funzioni della placenta provocando in tal modo aborti ma incide anche sulla mortalità dei neonati per esposizione indiretta degli embrioni ([Tachibana T](#) et al., 2007)
- BPA più elevato sono stati misurati nel siero di donne affette da sindrome ovarica policistica ([Takeuchi T](#) et al., 2004).



## Studio sull'infertilità (UO 1, UO 2, UO 3)

- **selezione di coppie infertili**

- Area metropolitana
- Area ad agricoltura intensiva
- Medio centro urbano

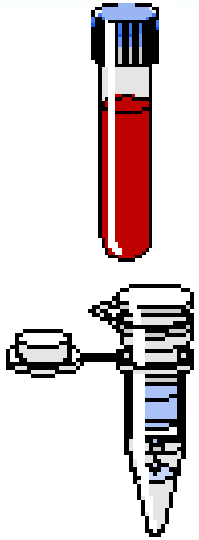
- **prelievi di campioni : sangue**

indagini anamnestiche,  
analisi cliniche e  
radiografiche

quantificazione di  
biomarcatori di  
esposizione

biomarcatori di  
effetto, in relazione  
alla presenza di  
interferenti  
endocrini (IE)

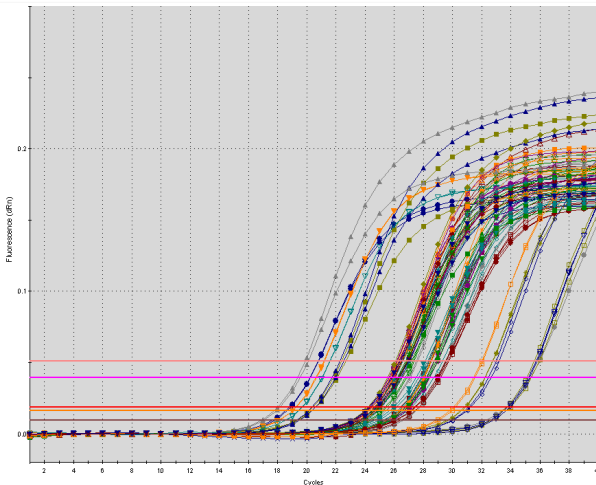
# metodo



1) Prelievo campioni ematici;

2) estrazione di RNA totale;

3) quantizzazione RNA ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ):  
spettrofotometria 260/280 nm in  
assorbanza;



4) retrotrascrizione cDNA;

5) real time RT-PCR:

- GAPDH gene riferimento
- metodo "curva standard"
- diluizione 1:100 in doppio

Espressione genica dei recettori

6) Analisi statistica

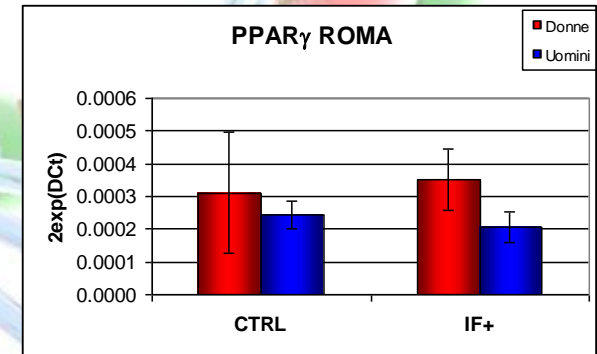
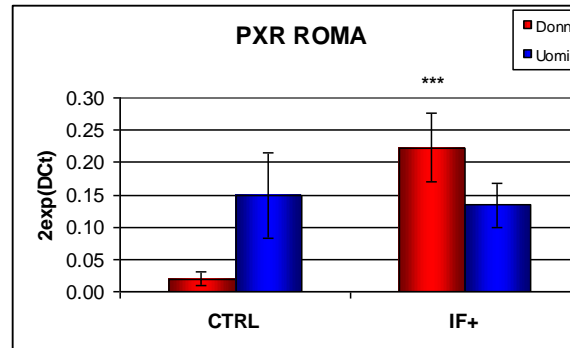
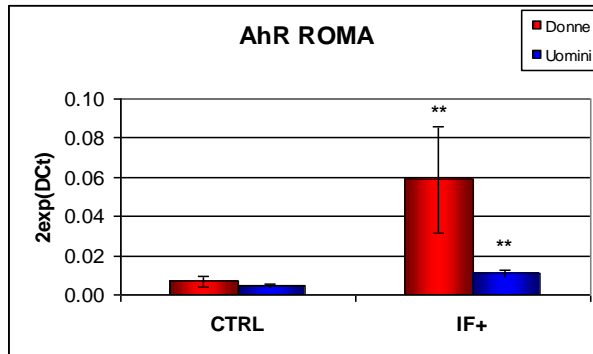
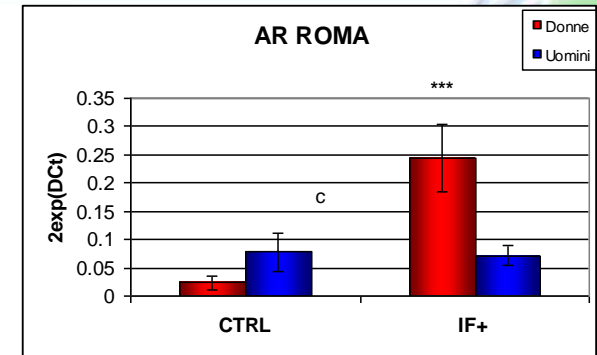
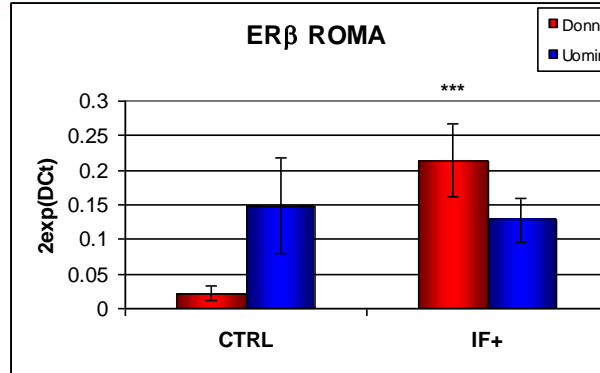
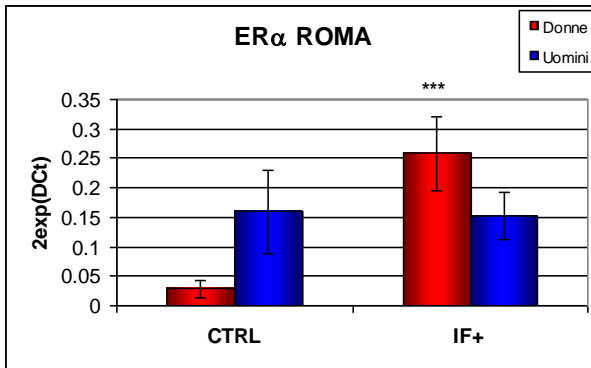


*condizioni stringenti e cautelative:*

i soggetti **IF** - (soggetti di coppie infertili, in cui solo l'altro partner ha diagnosi di infertilità) sono stati considerati *potenzialmente fertili* e considerati insieme ai controlli fertili

- I valori  $< \text{LOD}$  sono stati considerati e valutati come = **LOD**
- PFOS e PFOA sono stati considerati separatamente nonostante la *probabile analogia di meccanismo di azione*
- Vengono considerati per la discussione i valori statisticamente significativi

# Risultati: Infertili Roma



**TUTTI** significativamente sovraespressi rispetto ai controlli tranne PPAR $\gamma$

Differenze con i controlli Fold Change :

9 ER $\alpha$ , AhR

10 ER $\beta$ , AR

11 PXR

1 PPAR $\gamma$

Infertili n=41

Controllo n=13



Solo AhR significativamente sovraespresso rispetto ai controlli, più vicini al controllo

Fold Change :

0.8-0.9: ER $\alpha$ , ER $\beta$ , AR, PXR, PPAR $\gamma$

2: AhR

Infertili n=28

Controllo n=24

# Risultati: infertili Roma



IE

**Bisfenolo A:** valori medi più alti di  
(nonostante il range di valori sia analogo)  
**PFOS:** distribuzione dei valori spot ma  
spostata verso i valori alti

Biomarcatori di dose efficace

**ER $\alpha$  - ER $\beta$  - AR - PXR - AhR**

*l'espressione di ER $\alpha$  correla con  
forte significatività con  
l'espressione di ER $\beta$ , AR e PXR.*



IE

**Bisfenolo A:** valori medi più alti di  
(nonostante il range di valori sia  
analogo)  
**PFOS:** distribuzione dei valori spot  
ma spostata verso i valori alti

Biomarcatori di dose efficace

**AhR**

situazione molto diversa rispetto  
alle donne (probabili meccanismi  
genere-specifici).

## Biomarcatori di dose efficace

ER $\alpha$ , ER $\beta$ , AR: bersagli diretti di interferenti endocrini (BPA è un riconosciuto agonista degli ERs)

AhR e PXR: "sensori" di esposizione a xenobiotici in quanto regolano la risposta cellulare a stimoli esogeni

AhR regola la differenziazione di cellule del sistema immunitario, T-cell

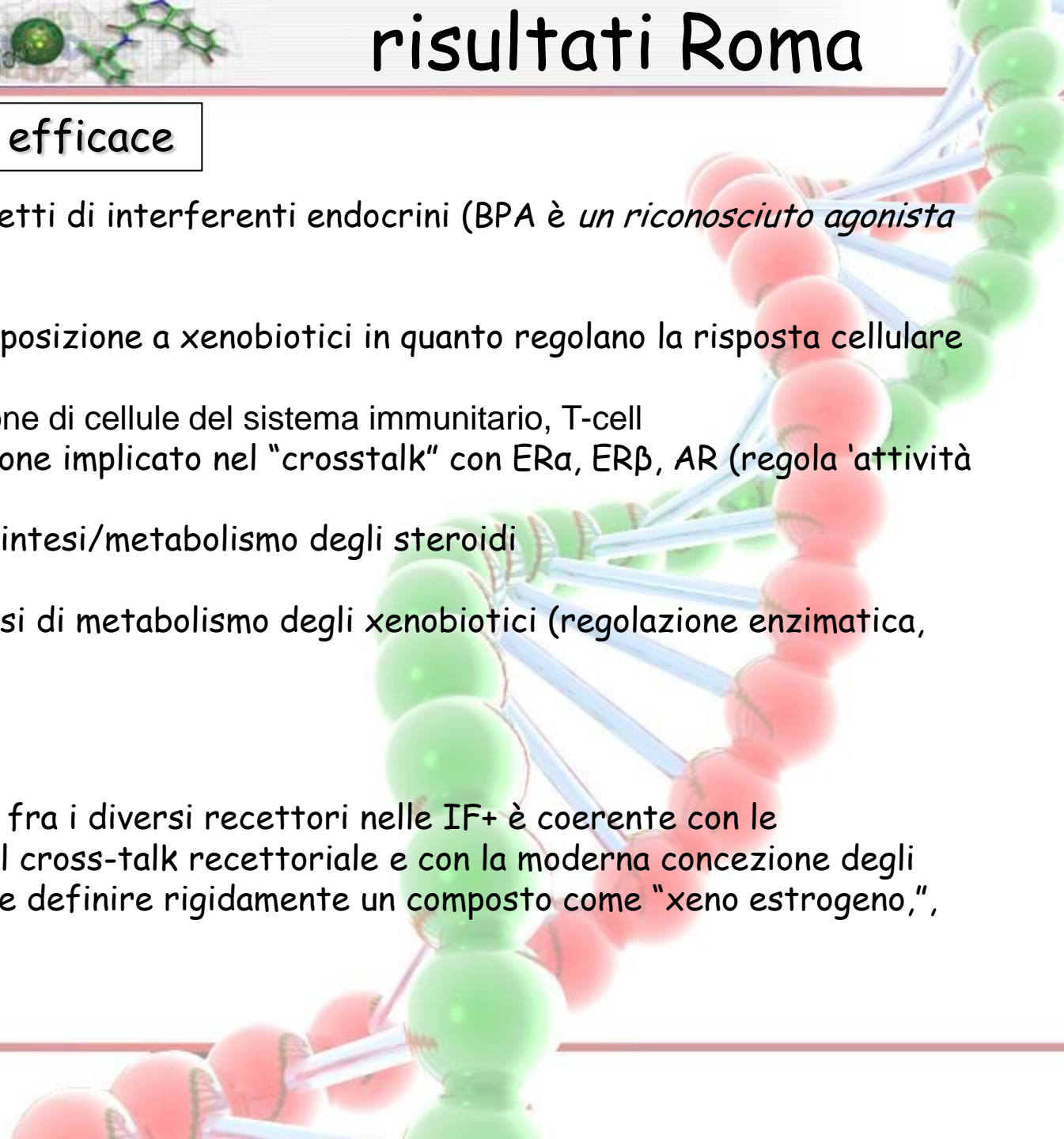
AhR è fattore di trascrizione implicato nel "crosstalk" con ER $\alpha$ , ER $\beta$ , AR (regola l'attività di ER, Swedenborg et al. 2010),

è coinvolto in processi di sintesi/metabolismo degli steroidi

PXR è coinvolto nei processi di metabolismo degli xenobiotici (regolazione enzimatica, Tolson et al., 2010) .

Inoltre:

il dato sulla correlazione fra i diversi recettori nelle IF+ è coerente con le informazioni esistenti sul cross-talk recettoriale e con la moderna concezione degli IE che considera difficile definire rigidamente un composto come "xeno estrogeno", "antiandrogeno", etc.





*ruolo modulatore degli stili di vita:*



ERa correlazione significativa con l'età "avanzata" ( $> 35$  anni)



- *AhR* è più elevato negli infertili *in sovrappeso* ( $BMI > 25$ )
- Il *fumo non influenza* la concentrazione degli IE studiati, ma è associato ad un'espressione più elevata di *PPAR $\gamma$*  (anche se significatività borderline e bassi valori di espressione): *PPAR $\gamma$*  è associato con vie metaboliche attinenti all'infiammazione ed è un bersaglio riconosciuto dell'esposizione a fumo)



Un'attenzione specifica è stata data al sottogruppo di pazienti IF + con:

**Endometriosi:** (patologia di interesse sociale e con patogenesi complessa, che rappresenta un fattore di infertilità meritevole di attenzione specifica)

**livelli di PFOS più alti** tra le infertili; differenza di espressione significativa

**PPAR $\gamma$ :** recettore bersaglio PFOS

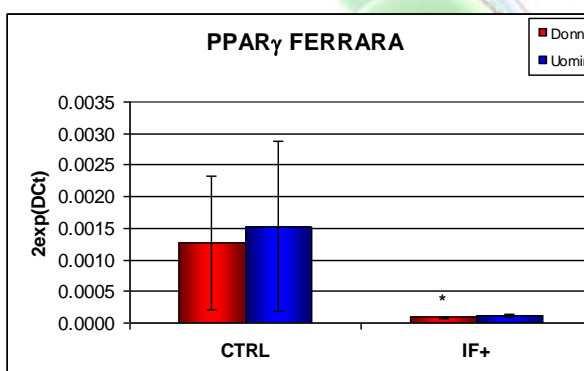
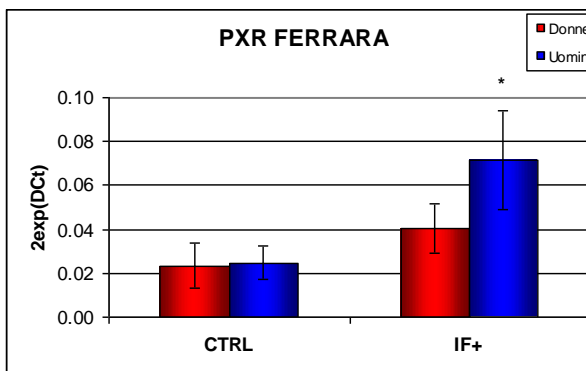
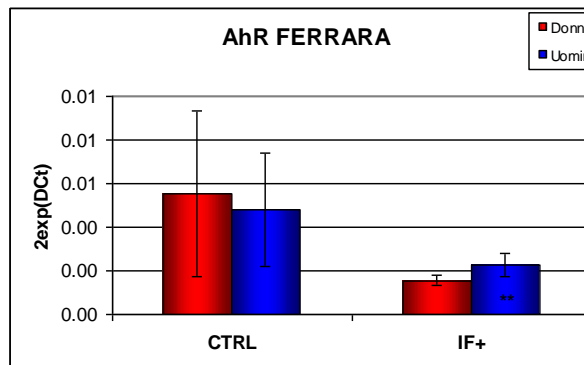
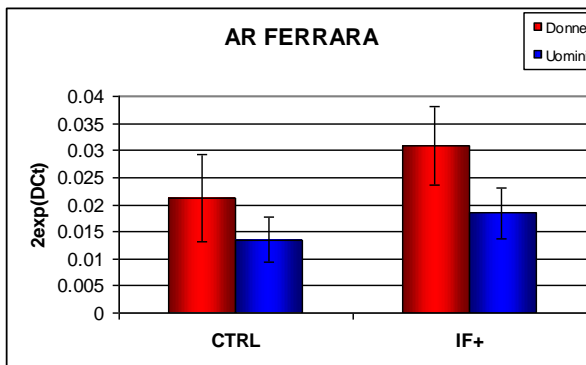
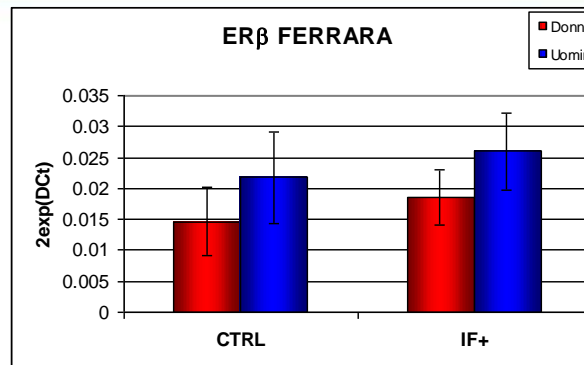
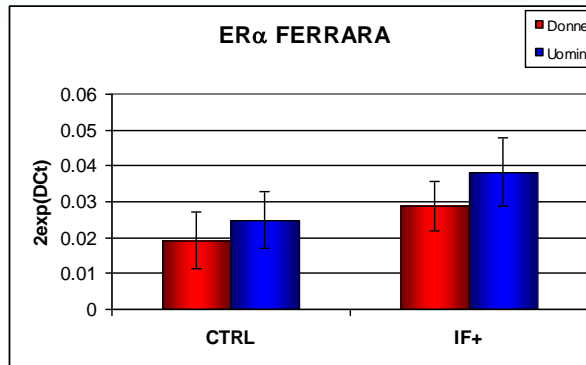
ma anche sovraespressione di **ER $\alpha$ -ER $\beta$ -AR:** i recettori estrogeni espressi in tessuti endometriosici (Obstet et al. 2011; Cavallini et al., 2011; Carneiro et al., 2008)

**Infertilità idiopatica:**

**BPA** (conc maggiore)

**ER $\alpha$ -ER $\beta$ -AR- PXR**

# Risultati: infertili Ferrara



Sovraespressione: ERs, AR e PXR non significativo  
- AhR e PPAR $\gamma$  sottoespressi, quest'ultimo significativamente

Differenze con i controlli Fold Change :  
1 ER $\alpha$ , ER $\beta$ , AR, PXR  
Infertili n=17  
Controlli n=17



- sovraespressione: ERs, AR e PXR  
PXR significativo  
- AhR e PPAR $\gamma$  sottoespressi non significativamente

Differenze con i controlli Fold Change :  
1: ER $\alpha$ , ER $\beta$ , AR, PXR  
Infertili n=11  
Controlli n=24

# Risultati: infertili Ferrara



IE

maggiore presenza di PFOA,  
rispetto a Roma

Biomarcatori di dose efficace

PPAR $\gamma$ ↓

significativamente diminuita l'espressione  
di PPAR $\gamma$ , ma molto basso  
correlazione significativa fra ER $\alpha$  e ER $\beta$ ,  
AR, PXR

IE



maggiore presenza di PFOA,  
rispetto a Roma

Biomarcatori di dose efficace

PXR

- negli infertili la concentrazione di **PFOS** nel plasma è positivamente correlata con l'età (bioaccumulo ?)
- gli infertili in *sovrappeso* hanno un'espressione più bassa di PPAR $\gamma$



a FE le indicazioni sono più sottili:

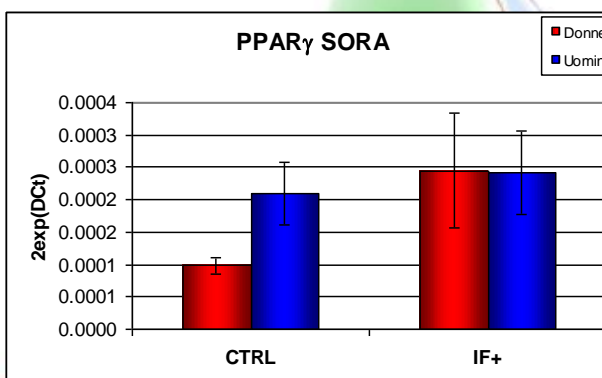
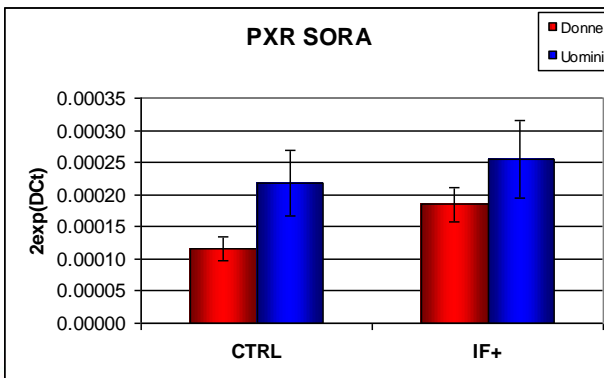
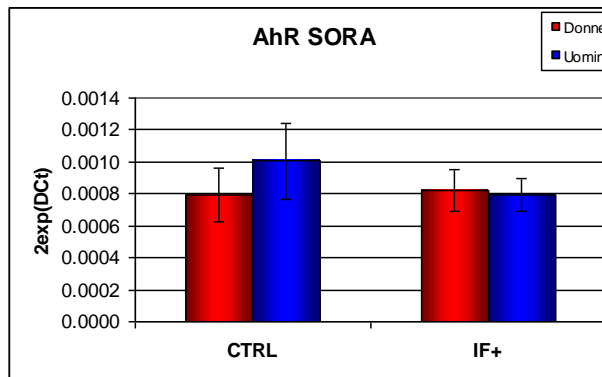
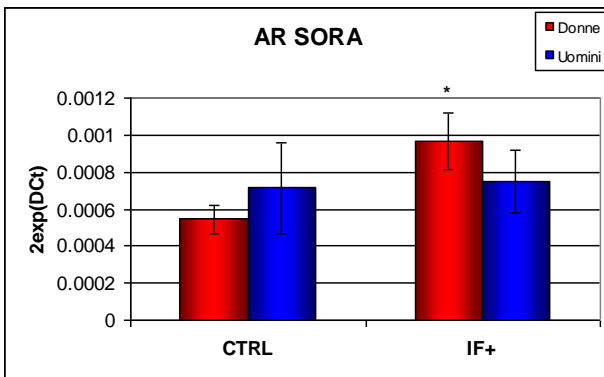
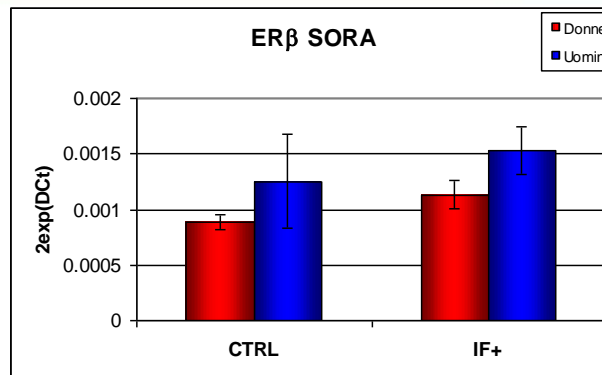
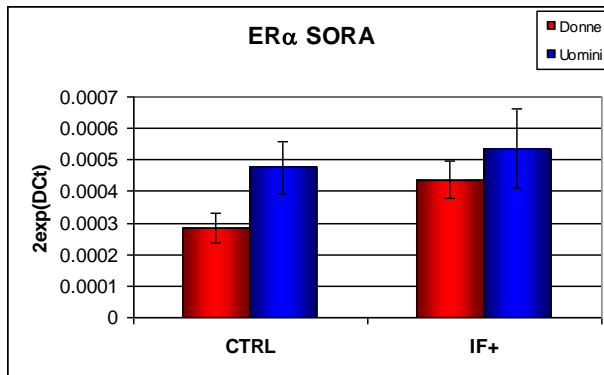
- *infertilità idiopatica:*

concentrazione plasmatica di **BPA minore** rispetto a quelle con cause note (**e viceversa** !). Un dato apparentemente in contraddizione con quello di Roma (dove il ruolo complessivo del BPA come fattore di infertilità appare tuttavia molto più evidente): da interpretare in seguito.

- concentrazione plasmatica di **PFOA maggiore** rispetto a quelle con cause note. Un dato molto interessante e coerente con la letteratura.

A FE appare quindi *qualche possibile criticità espositiva* per l'infertilità femminile e maschile, ma il quadro è comunque ben differenziato rispetto a Roma.

# Risultati: infertili basso Lazio



valori di espressione  
recettoriale bassi  
paragonabili al  
controllo  
Solo AR nelle donne  
risulta  
significativamente  
sovraespresso

donne  
Infertili n=18  
Controlli n=7  
uomini  
Infertili n=16  
Controlli n=9



# risultati basso Lazio

infertili

IE

Biomarcatori di dose efficace



PFOA è direttamente correlato *col sovrappeso* (BMI > 25):

il quadro complessivo *non indica* un'interferenza endocrina nella popolazione femminile e maschile infertile



- l'espressione di ER $\alpha$  *correla* con l'espressione di ER $\beta$ , AR e PXR (quadro osservato nelle donne di Roma e di Ferrara)
- *Il fumo non influenza* la concentrazione degli IE studiati, ma è associato ad un'espressione più elevata di PPAR $\gamma$

AR



# considerazioni

## Roma, grande centro urbano:

- *esposizione diffusa a interferenti endocrini* della popolazione adulta
- effetto sulla modulazione recettoriale esteso all'intero pannello di recettori
- correlati con alcuni fattori d'infertilità femminile
- dal confronto dell'espressione dei recettori di tutti i soggetti controllo e IF+ si ha la conferma che il sito di roma è ben distinto dagli altri:

Controllo: uomini maggiore espressione di ER alfa, beta e PXR

IF+: ERalfa, beta AR e PXR AhR nelle donne e ERalfa beta e PXR negli uomini

## Basso Lazio (agricoltura intensiva) e Ferrara (medio centro urbano) presentano un quadro espositivo (ed anche valori assoluti)

- comparabile
- completamente diverso dal grande centro urbano
- e in generale
- con valori minori e non correlati allo stato di infertilità
- quadro espositivo generale è sovrapponibile tra i due siti e nell'ambito di ognuno di essi tra uomini e donne

Tuttavia ambedue **mostrano una maggiore presenza di PFOA**, rispetto a Roma e **BPA** al LOD per Sora

(*ipotesi*: maggiore uso di determinati utensili e metodi di cottura, adiuvante-additivo di pesticidi -anche FE è un'area di agricoltura- scarichi nel Po per FE e ricircolo ambientale)

Biomarker di effetto: spostamenti dei biomarker di effetto paralleli a spostamenti di biomarker di esposizione in ogni gruppo di popolazione considerato

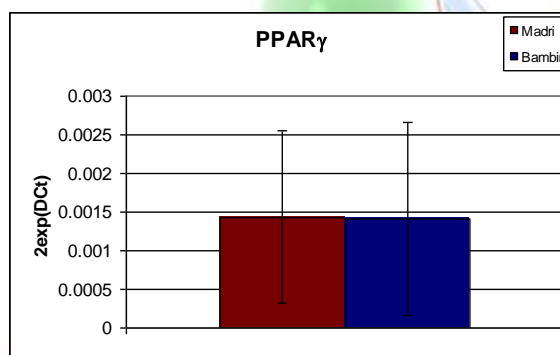
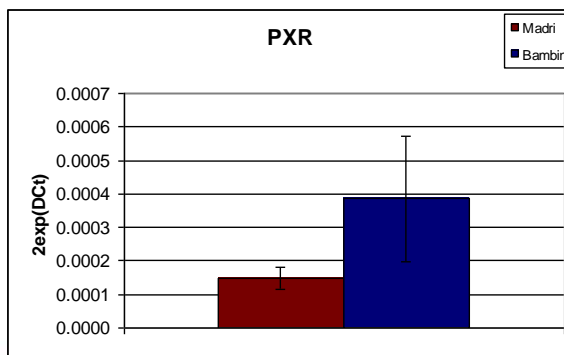
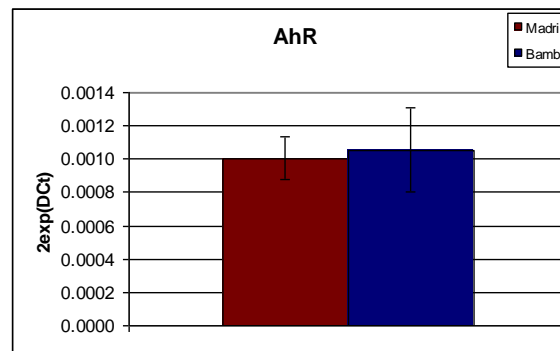
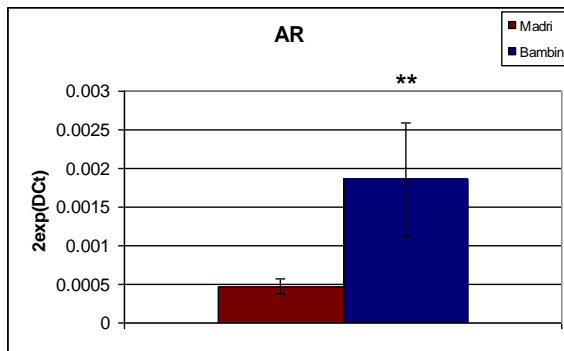
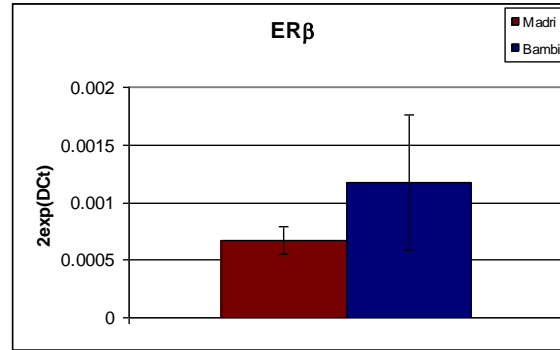
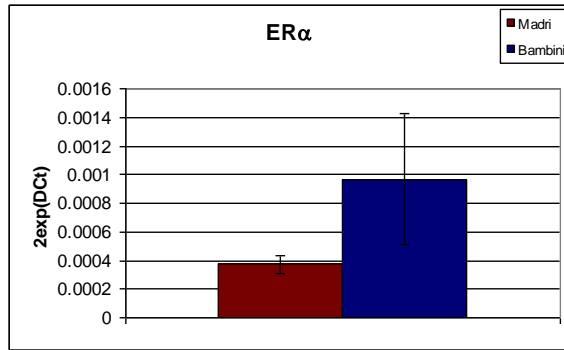




# PREVIENI: ulteriori approfondimenti

- Biomarker di effetto in considerazione di:
- additività di PFOS e PFOA poiché hanno simile pathway
- miscela: soggetti in cui sono presenti la maggior parte degli IE considerati  
PFOS+PFOA+ MEHP+BPA=policontaminati
- Soggetti infertili con bassa contaminazione (v. POSTER)

# Studio pilota trans-generazionale di Roma



10 coppie madre-neonato,  
si osserva un marcato **passaggio trans-generazionale** di:

**MEHP** non c'è alcun filtro placentare, anzi valori  $> 50$  si osservano nel neonato (3/10),  
ma non nella madre

**BPA** apparentemente vi è un qualche filtro placentare (coerentemente con la letteratura), in quanto 10/10 madri presentano valori  $> \text{LOD}$  rispetto a 7/10 neonati e i valori materni tendono ad essere più alti.

Valori bassi di espressione dei recettori, con espressione positiva significativa tra madre-figlio per **AR**

Tuttavia

non può essere trascurato che in gravidanze del tutto priva di problemi, erano presenti livelli significativi di IE definiti "non persistenti", come il MEHP ed il BPA.

Questo dato suggerisce un'esposizione ambientale *diffusa e continua* e deve essere valutato con qualche preoccupazione alla luce dei dati sperimentali sugli effetti a lungo termine di questi IE sul "programming" endocrino-metabolico (per il DEHP/MEHP v. ad es., Maranghi, Lorenzetti et al., Reproductive Toxicology, 2010)

# biomarcatori di dose efficace



Dr.ssa Sabrina Tait  
Dr. Bruno Bergamasco  
Dr.ssa Laura Stecca

Reparto di Tossicologia Alimentare e Veterinaria  
Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza  
Alimentare  
Istituto Superiore di Sanità



Salute riproduttiva e contaminanti

progetto previeni: <http://www.iss.it/prvn/>