

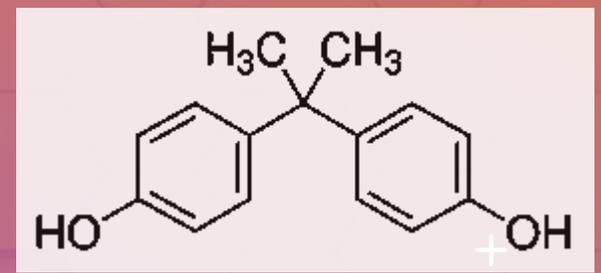


*Corso di laurea in Scienze Biologiche*

“Effetto multigenerazionale  
dell’esposizione gestazionale al *Bisfenolo A*  
sulla funzione spermatica e la fertilità di  
topi maschi”

Tesi di laurea di:  
Esmeralda Salvatore

Relatore:  
Prof.ssa Francesca Maradonna



## 1. Introduzione

Il *bisfenolo A* (BPA) è un composto chimico ampiamente utilizzato per produrre plastica in policarbonato e resine epossidiche che sono sempre più utilizzate per la produzione di numerosi prodotti domestici e industriali.

L'esposizione umana a questo composto avviene quotidianamente attraverso il consumo di cibi e bevande, l'inalazione e il contatto con la pelle.

Il BPA possiede somiglianze strutturali con gli ormoni steroidei, in particolare gli estrogeni, alterandone il normale funzionamento e agendo così da interferente endocrino. Il BPA influisce negativamente sulla riproduzione sia nei maschi che nelle femmine.

La tossicità riproduttiva del BPA non è solo limitata alle popolazioni direttamente esposte, ma viene anche trasmessa alle generazioni successive.





**Il BPA può indurre cambiamenti fenotipici**

multigenerazionali

transgenerazionali

+

o

**La distinzione tra trasmissione multi- e trans-generazionale dei fenotipi parentali è definita dal fatto che una generazione colpita sia direttamente esposta o meno al BPA.**

**L'esposizione di una femmina al BPA durante la gestazione colpisce direttamente le cellule somatiche del feto (F1), ma anche le sue cellule germinali, con effetti sulla F2.**

**→ gli effetti osservati nelle popolazioni F1-F2 sono multigenerazionali.**

**→ le alterazioni fenotipiche osservate nella progenie F3 sono transgenerazionali in quanto non direttamente esposta al BPA.**

**L'esposizione perinatale e puberale agli EDC compromette la motilità dello sperma e l'attività dei recettori steroidei testicolari, influenzando così la fertilità maschile fino alla generazione F3, può causare danni al DNA e disfunzioni proteiche e può riprogrammare le cellule germinali inducendo modifiche epigenetiche (ad esempio, la metilazione del DNA e la modifica degli istoni) che possono portare ad alterazioni del fenotipo nella prole per diverse generazioni.**

**Di conseguenza, i gameti perdono la loro capacità di riparare il DNA danneggiato e vanno incontro a morte cellulare programmata → ciò si traduce in una diminuzione della funzionalità spermatica.**



## 2. Materiali e metodi

Una soluzione stock di BPA è stata sciolta in olio di mais (veicolo/mezzo di base) per ottenere tre diverse concentrazioni di BPA:

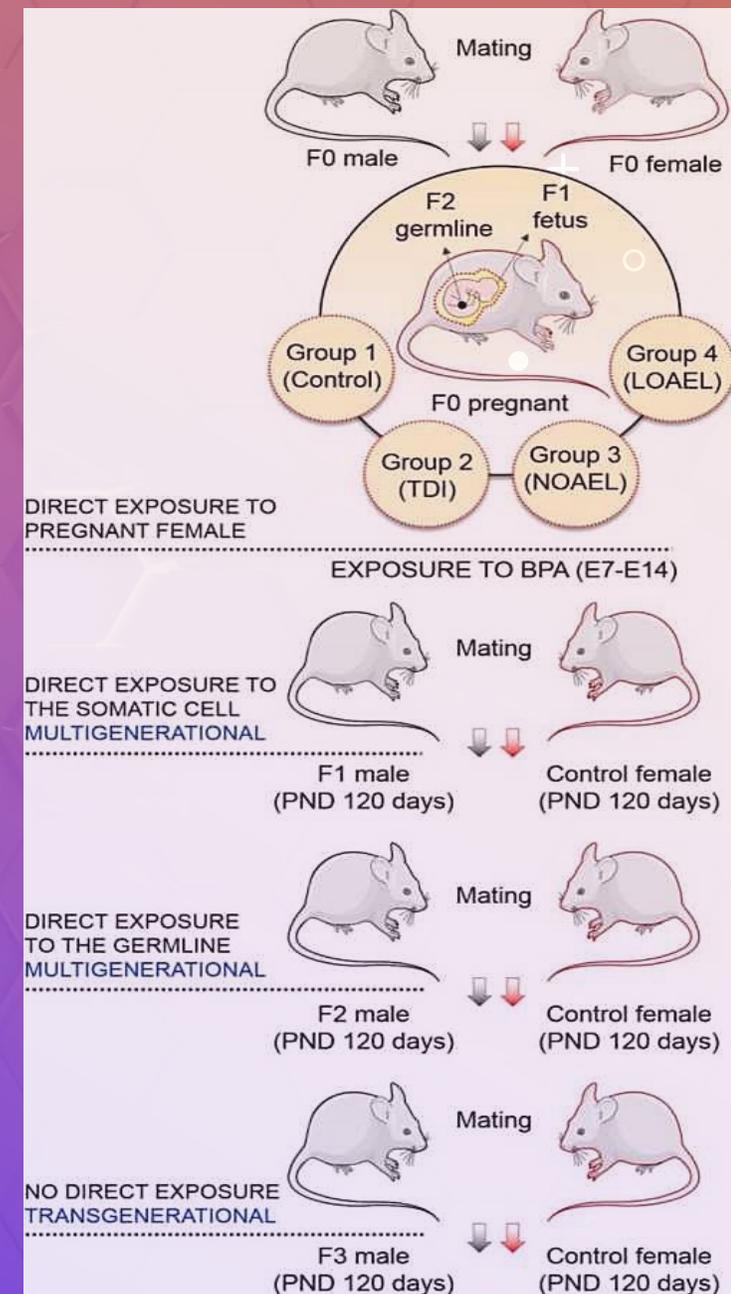
- 50 µg /kg di peso corporeo/giorno -> valore TDI del BPA
- 5 mg /kg di peso corporeo/giorno -> dose NOAEL di BPA
- 50 mg /kg di peso corporeo/giorno -> dose LOAEL di BPA

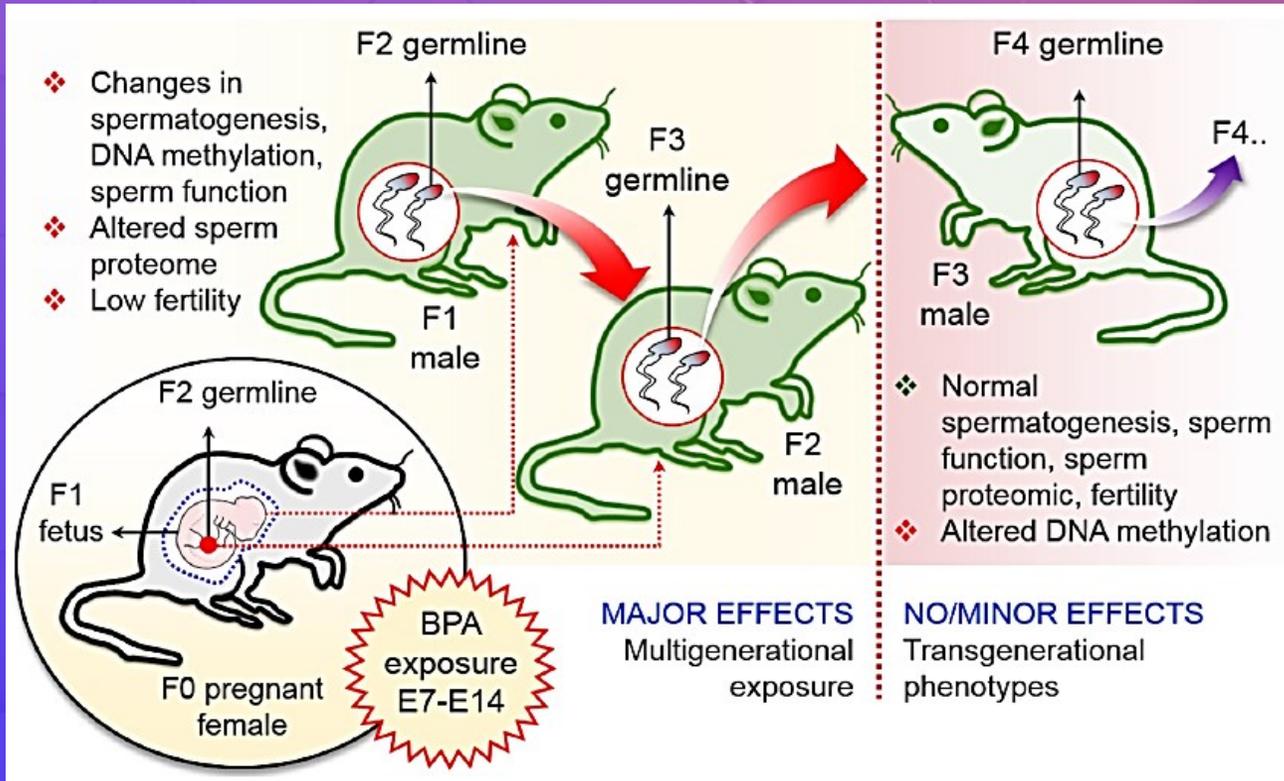
I topi sono stati allevati in gabbie di polisulfone (senza BPA) per 4 settimane prima dell'accoppiamento. In seguito all'accoppiamento, le femmine gravide sono state divise in quattro gruppi:

- gruppo 1 → controllo (solo olio di mais, NO BPA);
- gruppo 2 → TDI 'Tolerable Daily Intake';
- gruppo 3 → NOAEL;
- gruppo 4 → LOAEL.

Le femmine gravide F0 sono state esposte per via orale al BPA ogni giorno dal 7-14 giorno di gestazione (da E7 a E14) e il dosaggio è stato regolato in base alle variazioni giornaliere del loro peso corporeo.

Dopo il parto, sono stati selezionati solo i cuccioli maschi (F1) e sono rimasti con le femmine in allattamento (F0) fino al giorno post-natale 20 (PND 20), in seguito sono stati svezzati in gabbie separate.





Alcuni maschi esposti al BPA e di controllo (senza BPA) sono stati sacrificati e i testicoli e gli spermatozoi sono stati campionati da ogni esemplare.

I maschi rimanenti vengono fatti accoppiare con femmine sessualmente mature al fine di ottenere la F2.

Allo stesso modo i maschi F2, sono stati accoppiati con femmine non esposte al BPA, per generare maschi F3.

In seguito, sono stati raccolti i testicoli da ogni topo; il loro peso è stato misurato e parte del tessuto è stato fissato in paraformaldeide 4% per 24 ore prima dell'esame istologico.



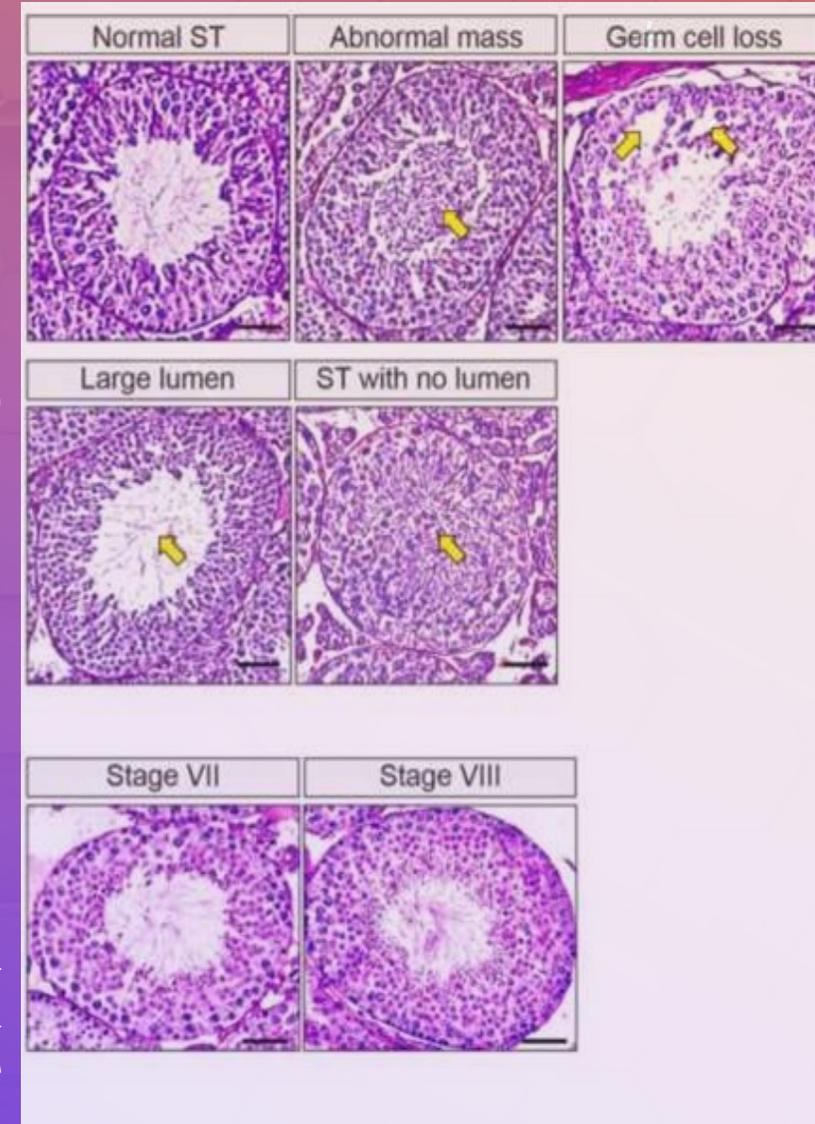
### 3. Risultati

*Effetti dell'esposizione gestazionale al BPA sui testicoli e sull'istologia testicolare dei maschi F1-F3:*

- peso testicolare → inalterato [F1-F3]
- (%) tubuli seminiferi → più alto (anormali) [F1 gruppo NOAEL].  
→ significativamente più alto [F1-F2 gruppo LOAEL].
- (%) cellule epiteliali seminifere allo stadio VIII → significativamente diminuite [F1-F2 gruppi NOAEL e LOAEL].
- (%) cellule epiteliali seminifere allo stadio VII → non differivano tra maschi esposti al BPA e quelli di controllo per tutte le generazioni.

Il BPA alla dose TDI non ha prodotto alcun effetto dannoso.

Si potevano osservare tubuli seminiferi (ST) atipici in quanto caratterizzati da lume assente, in cui era evidenziabile una massa cellulare anormale, e da perdita di cellule germinali. Da questo si deduce che l'esposizione gestazionale al BPA ha influenzato la produzione complessiva di sperma.





*Effetti dell'esposizione gestazionale al BPA sulla conta spermatica, la motilità e lo stato di capacitazione nei maschi F1-F3:*

+

o

(A) Variazione del numero di spermatozoi (milioni / ml) tra il controllo e gruppi trattati con BPA

- **inalterata** alla dose TDI.
- **significativamente più bassa** [F1-F2 gruppo NOAEL e LOAEL].

(B-C) Variazione della motilità e motilità iperattiva (%) dello sperma tra il controllo e i gruppi trattati con BPA

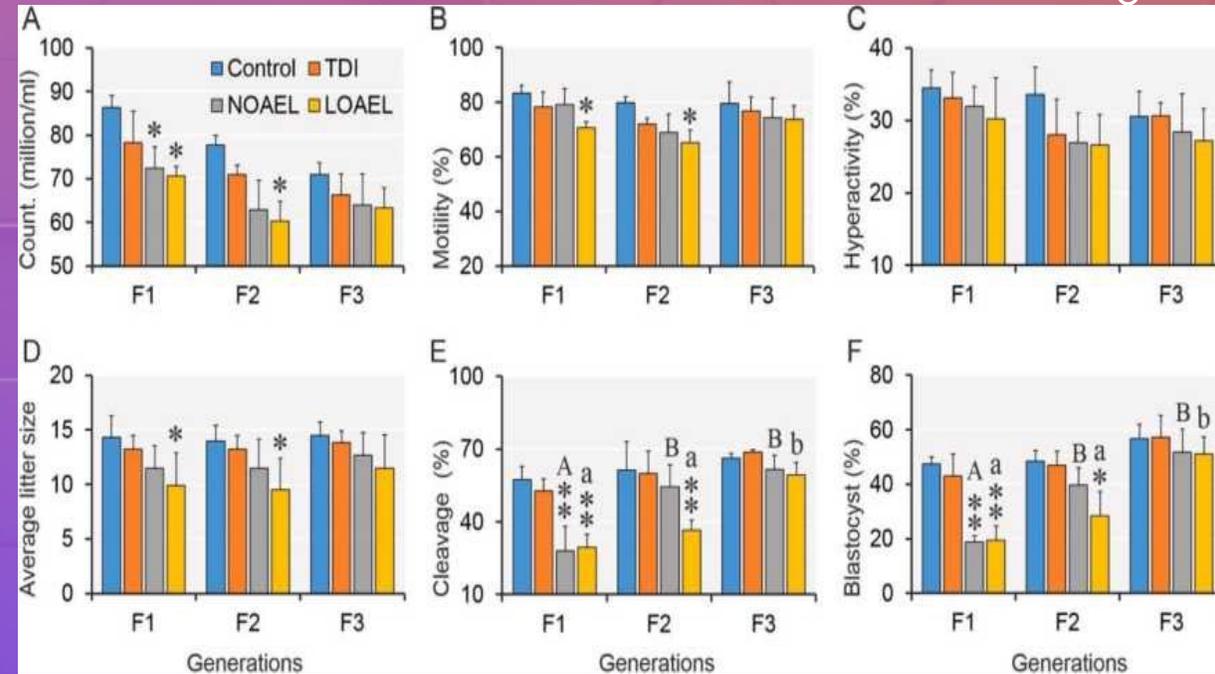
- **inalterata** alla dose TDI e NOAEL.
- **significativamente inferiore** [F1-F2 gruppo LOAEL].

(D) Variazione della dimensione media della cucciolata tra i gruppi di controllo e trattati con BPA

- **inalterata** alla dose TDI e NOAEL.
- **significativamente diminuita** [F1-F2 gruppo LOAEL].

(E-F) Variazione formazione di blastocisti tra i gruppi di controllo e trattati con BPA

- **inalterata** nei gruppi TDI.
- **scadenti** [F1-F2 gruppo NOAEL e LOAEL].



Nessuna delle condizioni di esposizione ha influenzato i parametri dello sperma, sopra descritti, nei maschi F3.



*Effetti dell'esposizione gestazionale al BPA sulla metilazione del DNA e sulle proprietà biochimiche degli spermatozoi F1-F3:*

+

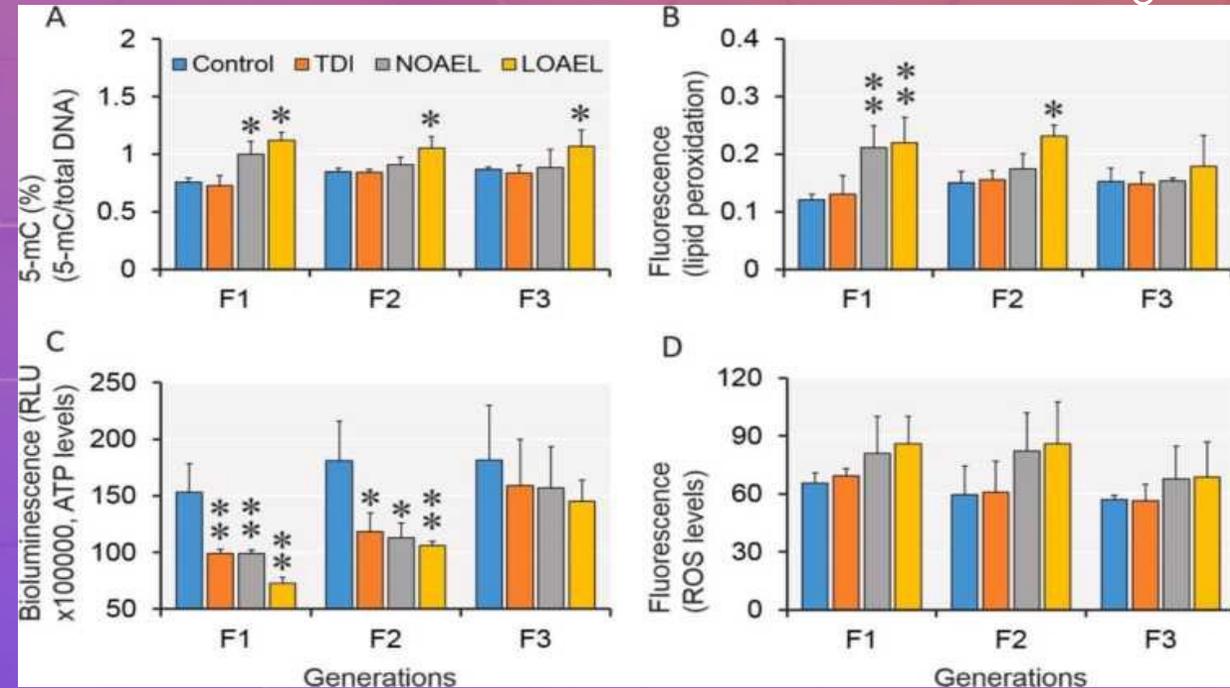
o

(A) Alterazioni nei livelli (%) di 5-metil citosina negli spermatozoi tra gruppi trattati con BPA e controllo  
 → **metilazione conservata alla dose TDI [F1-F3].**  
 → **alterata [F1-F3 gruppo NOAEL e LOAEL].**

(B) Alterazioni nei livelli di perossidazione lipidica.  
 → **inalterati alla dose TDI.**  
 → **significativamente più elevata [F1 gruppo NOAEL e F1-F2 gruppo LOAEL].**

(C) Alterazioni livelli di ATP intracellulare.  
 → **alterati [F1-F2 gruppo TDI/NOAEL e LOAEL].**

(D) Alterazioni livelli di ROS.  
 → **lievemente alterati [F1-F2 gruppo NOAEL e LOAEL].**



Gli spermatozoi di topo necessitano di energia (ATP) per muoversi.  
Pertanto, disturbi nella produzione di ATP cellulare e lievi aumenti di ROS possono portare alla perdita di motilità.



## 5. Conclusione

In sintesi, l'esposizione al BPA alla dose TDI produce effetti trascurabili sulla fertilità maschile. Tuttavia, dosi più elevate di BPA hanno causato alterazioni multigenerazionali agendo sulla fertilità inducendo alterazioni epigenetiche dello sperma.

Alte dosi di BPA hanno compromesso la riproduzione maschile nelle generazioni F1 e F2 (EFFETTO MULTIGENERAZIONALE) alterando la struttura del testicolo e la spermatogenesi, le proprietà biochimiche dello sperma e la diminuzione del numero di spermatozoi, la motilità e la fertilità ma NON quella dei maschi F3 (EFFETTO TRANSGENERAZIONALE).

Le dosi di BPA ritenute tossiche nello studio attuale sono generalmente molto più alte dei livelli di esposizione ambientale negli esseri umani (~50 mg/kg di peso/giorno).

50 mg/kg di peso corporeo/giorno è il valore limite inferiore del BPA sotto cui non dovrebbero essere rilevati effetti avversi.

Malgrado ciò, l'esposizione umana a questa sostanza chimica avviene tipicamente su base giornaliera ed in maniera continuativa superando quindi i livelli tossici qui studiati.



# GRAZIE PER L'ATTENZIONE!

*“Educare la mente senza educare il cuore significa non educare affatto”*

Aristotele

