



SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

Dipartimento Salute della Donna e Medicina Territoriale
Azienda Ospedaliera S. Andrea



MINISTERO DELL'AMBIENTE
E DELLA TUTELA DEL TERRITORIO E DEL MARE



Abstract Book

Sommario

BIOMARKERS OF EARLY EXPOSURE IN MYTILUS GALLOPROVINCIALIS TREATED WITH POLYCHLORINATED BIPHENYLS MIXTURE : A PROTEOMIC APPROACH	3
Ambrosio L, Dal Piaz F, Russo R, Anastasio A Mantovani A, De Tommasi N, Severino L.	
PROGETTO PREVIENI: APPROFONDIMENTO SUI BIOMARCATORI DI EFFETTO IN SOGGETTI INFERTILI CON BASSA CONTAMINAZIONE	4
Bergamasco B, La Rocca C, Tait S Caserta D, Ciardo F, Fanello E, Focardi S, Guerranti C, Stecca L, Moscarini M, Mantovani A.	
EFFETTI DEL BISFENOLO A SULL'ORGANISMO FEMMINILE	5
Bordi G, Mallozzi M, Ciardo F, Maniglio P, Caserta D.	
CONTAMINANTI CON AZIONE DI INTERFERENTI ENDOCRINI IN ALIMENTI PROVENIENTI DA FILIERE CORTE DELLA TOSCANA MERIDIONALE: RISULTATI PRELIMINARI	7
Fanello, E, Perra, G, Guerranti, C.	
ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF SOME ITALIAN HONEYS AGAINST PATHOGENIC BACTERIA	8
Fidaleo M, Zuorro A, Lavecchia R.	
HONEY: A NATURAL ANTIMICROBIAL AGENT AGAINST FOODBORNE PATHOGENS?	9
Fidaleo M, Zuorro A, Lavecchia R.	
EFFETTI DI NANOPARTICELLE DI TiO_2 SUL SISTEMA RIPRODUTTIVO NEL RATTO SPRAGUE-DAWLEY	10
Gisoldi CI, Maranghi F, Tassinari R, Moracci G, Mantovani A.	
CONSAPEVOLEZZA DELLA QUALITA' DELLA VITA E DELLA SALUTE RIPRODUTTIVA TRA STUDENTI UNIVERSITARI (PREMIATO)	11
Maniglio P, Bordi G, Mallozzi M, Ciardo F, Caserta D.	
IMMUNOMODULATION OF TWO FOOD CONTAMINANTS (AFLATOXIN B1 AND AFLATOXIN M1) IN JURKAT CELLS AND BONE MARROW MURINE DENDRITIC CELLS	13
Russo R, Luongo D, Campanile G, Bergamo P, Rossi M, Severino L.	
BIOSENSOR: ADVANCED METHODOLOGY FOR DETECTION OF OCHRATOXIN A IN FOOD OF ANIMAL ORIGIN.	14
Russo R, Varriale A, Pennacchio A, Iozzino L, Anastasio A, Florio S, D'Auria S, Severino L.	
NON DIOXIN-LIKE POLYCHLORINATED BIPHENYLS: VALIDATION STUDY OF A SCREENING METHOD ACCORDING TO EC DECISION 657 / 2002	15
Serpe FP, Russo R, Ambrosio L, Florio S, Esposito M, Severino L.	
EFFETTO IN VITRO DEL PARA-NONILFENOLO SU CELLULE DI TROFOBLASTO UMANO	17
Spagnoletti A, Ietta F, Ermini L, Bechi N, Romagnoli R, Paulesu L.	
PCB ED ESPOSIZIONE UMANA: IDENTIFICAZIONE E VALUTAZIONE DI BIOMARCATORI PRECOCI DI EFFETTO IN MODELLI IN VITRO RAPPRESENTATIVI DELL'APPARATO DIGERENTE	18
Stecca L, La Rocca C, Tait S, Mantovani A.	
NOT ONLY DNA - EPIGENETIC CONTRIBUTION OF SPERM TO REPRODUCTION (PREMIATO)	19
Stocchi V, Consales C, Benassi B, Leter G, Eleuteri P, Grollino MG, Cordelli E, Villani P, Pardini MC, Bartoleschi C, Uccelli R, Pacchierotti F, Spanò M.	

BIOMARKERS OF EARLY EXPOSURE IN *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS* TREATED WITH POLYCHLORINATED BIPHENILS MIXTURE : A PROTEOMIC APPROACH

Ambrosio L^{1,2}, Dal Piaz F¹, Russo R², Anastasio A², Mantovani A³, De Tommasi N¹, Severino L²

1 Faculty of Pharmacy, University of Salerno; 2 Faculty of Veterinary Medicine, University of Naples Federico II, ;

3 Istituto Superiore di Sanità.

Polychlorinated biphenils (PCBs) are persistent organic pollutants largely distributed in the environment, widely used in the past in open-systems (like paints, surface coating, and plasticizers) and as a dielectric fluid for transformers and capacitors in closed applications. PCBs have always been used in mixtures and numerous congeners are now present in the hydrosphere. Bivalves and especially mussels are very good indicators of marine pollution, and so they have been widely used in biomonitoring programs all around the world. The highlight of biomarkers of early exposure in tissues of animals, exposed to contaminants under study, or in food matrices, accidentally contaminated, allows to identify the contamination in place before any adverse effects occurring in animals and the environment, on the other hand to lay the foundations for a possible development of a screening method in food matrices. A proteomic approach is proposed to achieve these goals. Proteomic analysis are increasingly regarded as an effective tool to understand the global changes that involve a large number of proteins, often interacting with each other within a complex biological system. The identification of significant changes in the levels of protein expression after exposure to an environmental pollutant can make significant assumptions about the mechanism of action of the contaminant. The aim of the current study was to identify a biomarker of early exposure through a proteomic approach.

In this study we used *Mytilus galloprovincialis* experimentally exposed to a PCB mixture for different periods under controlled conditions. The edible parts were taken, homogenized, lyophilized and then stored at -80 ° C until analysis. Extracted proteins were quantified according to Bradford method and separated by two-dimensional electrophoresis (2-DE). The protein spots in gels were visualized by 0,1% Coomassie Brilliant Blue staining. Gel images were obtained using a Image Scanner. Image analysis included spot detection, quantification and normalization, and matching.

Our results showed a well conserved protein pattern regardless of the treatments, demonstrating that the exposition to low levels of PCB mixture did not impair the normal physiological function of the mussels. However, the levels of a restricted number of proteins were clearly and reproducibly affected by the treatment; therefore, these polypeptides were considered promising biomarker candidates. In conclusion, even if further studies are needed to validate these findings, our data demonstrated that proteomic approach represents a valuable tool for identifying biomarkers of exposure to environmental contaminants.

References

- Apraiz et al., Molecular and Cellular Proteomics, 2006, 4:1274-1284
- Dondero et al., Science of the Total Environment, 2010, 408:3775-3786
- Leroy et al., Ecotoxicology and Environmental Safety, 2010, 73:343-352
- Lopez et al., Marine Biotechnology, 2005, 7:396-404

PROGETTO PREVIENI: APPROFONDIMENTO SUI BIOMARCATORI DI EFFETTO IN SOGGETTI INFERTILI CON BASSA CONTAMINAZIONE

Bergamasco B¹, La Rocca C¹, Tait S¹, Caserta D², Ciardo F², Fanello E³, Focardi S³, Guerranti C³, Stecca L¹, Moscarini M³, Mantovani A¹

1 Reparto di Tossicologia Alimentare e Veterinaria, Dip. Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare Istituto Superiore di Sanità; 2Dipartimento di Salute della Donna e Medicina Territoriale, Università di Roma "Sapienza", Ospedale S. Andrea; 3Dipartimento di Scienze Ambientali, Università di Siena
mail: cinzia.larocca@iss.it
tel: 06 4990 2405-3530

PREVIENI è un progetto pilota interdisciplinare sul monitoraggio degli Interferenti Endocrini (IE) in relazione alla salute riproduttiva (<http://www.iss.it/prvn>). Lo scopo principale del progetto è quello di integrare biomarcatori di esposizione interna (IE quali PFOS, PFOA, MEHP, DEHP, BPA), biomarcatori di dose efficace (recettori nucleari quali ER α , ER β , AR, PXR, AhR, PPAR γ) e risultati clinici, in relazione sia alle condizioni di infertilità che ai livelli di esposizione di distinti IE, in diverse aree campione rappresentative di differenti scenari espositivi.

Lo studio prende in esame, per ogni sito, coppie infertili e coppie di controllo fertili, in cui sono stati valutati i livelli ematici degli inquinanti ambientali (biomarcatori di esposizione) e la modulazione dell'espressione genica di un pannello di recettori nucleari (NR) misurata in leucociti di sangue periferico (biomarcatori di effetto).

In particolare, per questo approfondimento, nell'ambito dei siti di Roma e di Ferrara considerati dal progetto, sono stati selezionati, tra i soggetti con fattore d'infertilità, quelli che presentavano un pattern di contaminazione analogo ai controlli, dunque con livelli di IE inferiori o uguali al LOD tranne che per il MEHP nel caso di Roma e per PFOA e MEH per Ferrara e comunque paragonabili a quelli misurati nei soggetti fertili. Lo scopo di questo approfondimento è quello di evidenziare le possibili differenze di espressione recettoriale, al fine di individuare possibili biomarcatori precoci di effetto. I risultati hanno mostrato differenze di espressione recettoriale tra il gruppo di controllo e quello con fattori di infertilità, sia per il sito di Roma che per quello di Ferrara. Nel primo caso si sono evidenziate maggiori espressioni recettoriali nelle donne, mentre nel secondo caso negli uomini. Inoltre, i soggetti di Roma hanno mostrato valori di espressione recettoriale maggiori di quelli di Ferrara, benché l'andamento del pannello recettoriale per ER α , ER β , AR e PXR sia simile in entrambe le aree. Paragonando i valori di espressione recettoriale dei soggetti con valori di IE paragonabili ai controlli con quelli che invece hanno livelli di IE determinabili, si nota che, in questi ultimi, i valori dell'espressione recettoriale sono più elevati, evidenziando così l'influenza dei contaminanti sulla risposta recettoriale. In conclusione, lo stato di salute dei soggetti influisce sull'espressione dei recettori e la presenza di IE determina un incremento di tale espressione. I risultati indicano che il pannello di recettori selezionati può essere considerato un biomarcatore di effetto utile a discriminare soggetti aventi un differente stato di salute riproduttiva anche quando i livelli di esposizione a inquinanti ambientali sono al disotto dei limiti di rilevabilità strumentale, o presenti nello stesso pattern dei soggetti fertili.

Ringraziamenti: Lo studio rientra nel progetto PREVIENI (ISS-Ministero dell'Ambiente, prot n°Q75)

EFFETTI DEL BISFENOLO A SULL'ORGANISMO FEMMINILE

Bordi G, Mallozzi M, Ciardo F, Maniglio P, Caserta D.

Dipartimento salute della donna e medicina territoriale, Università "Sapienza" di Roma

Il BPA e' un monomero di piccole dimensioni che viene polimerizzato principalmente per la sintesi di policarbonato e resine epossidiche.

Tali sostanze vengono impiegate nella produzione di recipienti per uso alimentare, quali bottiglie, biberon, tazze, caraffe, stoviglie e scatole metalliche, nonché pellicole, rivestimenti interni di lattine, tini per il vino, sigillanti e riempitivi dentali, cd, dvd e scontrini.

I legami chimici tra le molecole di BPA non sono stabili e dunque fattori fisici e/o chimici, tra i quali calore ed acidità, possono comportarne il rilascio dai materiali che lo contengono.

Nei Paesi industrializzati, la popolazione risulta esposta al BPA principalmente mediante l'ingestione, l'inalazione e il contatto cutaneo. La contaminazione dell'uomo e' confermata dal riscontro di tale composto chimico nelle urine, nel plasma, nel liquido amniotico, nella placenta, nel latte materno e nei vari tessuti corporei, in particolare in quello adiposo.

Gli studi in vitro e i saggi in vivo hanno mostrato che il BPA può avere effetto estrogenico mediante l'attivazione di alcuni geni controllati da promotori sensibili agli estrogeni.

L'obiettivo del presente studio e' stato quello di valutare l'effetto dell'esposizione al BPA a livello multisistemico mediante la raccolta e l'analisi della letteratura inerente alle conseguenze che tale disregolatore endocrino comporta a livello dei singoli apparati.

RISULTATI

Azione sul feto

L'esposizione al BPA inizia dall'epoca fetale in quanto tale sostanza chimica è in grado di attraversare la placenta, entrando così in contatto con il feto durante il suo sviluppo. Gli effetti avversi sono maggiori durante il periodo prenatale dal momento che il feto presenta una limitata capacità di metabolizzazione epatica che lo rende, dunque, maggiormente suscettibile(1).

Azione sul sistema nervoso

Il bisfenolo mima l'azione degli ormoni estrogeni inibendo l'azione di questi ultimi nello sviluppo neuronale. Alcuni studi, inoltre, dimostrano che l'esposizione al BPA e' associata ad alterazioni comportamentali quali l'iperreattività, aumento dell'aggressività(2), disturbi dell'apprendimento e della memoria(3), ambiguità sessuale ed aumento della suscettibilità alla dipendenza da droghe.

Diabete e obesità

Sebbene le isole pancreatiche e gli adipociti non siano considerati classici bersagli estrogenici, entrambi esprimono recettori per gli estrogeni. L'esposizione cronica al BPA sembrerebbe implicata nell'induzione di insulino-resistenza e nella patogenesi di iperinsulinemia cronica, obesità, diabete di tipo II e sindrome metabolica(4).

Apparato riproduttivo

L'effetto del BPA sulla capacità riproduttiva femminile è controverso, tuttavia in alcuni studi è stato correlato ad anomalie della meiosi e del cariotipo, ad alterazioni della qualità ovocitaria e ad abortività ricorrente(5).

Il BPA sembrerebbe inoltre alterare l'asse neuroendocrino coordinante il sistema riproduttivo, mediante una diminuzione dell'espressione genica del GnRH, con conseguente rischio di sviluppo di PCOS, pubertà e menopausa precoce(6).

Infine, l'azione inibitoria del BPA sull'aromatasi con conseguente aumento della produzione di estrogeni, nonché la sua azione di rilascio di citochine pro-infiammatorie quali IL-6 e TNF- α potrebbero giocare un importante ruolo patogenetico nell'endometriosi(7).

Tiroide

In alcuni modelli murini è emerso che il BPA interferisce con la funzione tiroidea mediante l'azione antagonista del T3, l'inibizione dell'attività tireoperossidasi e la modulazione dell'espressione dei geni tiroide-correlati, sebbene quest'ultimo meccanismo non sia ancora acclarato(8).

Mammella

Come riportato da studi condotti su specie animali, il BPA risulterebbe coinvolto nella patogenesi del cancro della mammella tramite l'incremento della proliferazione cellulare, la diminuzione dell'apoptosi e l'up-regolazione dei coattivatori dei recettori steroidei - quali SRCs 1-3, erbB3 e aumento dell'Akt signalling - nella ghiandola mammaria(9).

Apparato cardiovascolare

Concentrazioni elevate di BPA sono state riscontrate in pazienti affetti da patologie cardiovascolari quali ipertensione, infarto del miocardio e promozione di aritmie cardiache. Quest'ultima associazione, in particolare, risulta predominante nelle pazienti sesso femminile, dove pazienti affetti da motori sensibili agli estrogeni. L'azione estrogenica nel sesso femminile tramite un'azione pro di sesso femminile, nelle quali il BPA, attivando i recettori per gli estrogeni di tipo β (ER β), promuoverebbe un'azione pro-aritmica estrogeno-correlata mediante l'aumento del re-uptake degli ioni calcio.(10)

CONCLUSIONI

I recenti studi segnalano effetti avversi sugli animali esposti al BPA durante lo sviluppo, talvolta anche a concentrazioni inferiori rispetto all'attuale dose giornaliera tollerabile. Oltretutto il sinergismo tra due o più interferenti endocrini può amplificare significativamente la tossicità di ogni singolo composto mediante quello che viene definito "effetto cocktail". La disamina della recente letteratura scientifica mostra un trend positivo nell'evidenziare gli effetti avversi esercitati dal BPA sulla salute dell'uomo.

Come riportato dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), gli alimenti restano la principale fonte di esposizione al BPA. In attesa che le attuali evidenze scientifiche vengano implementate è bene seguire alcune semplici accortezze che consentono di ridurre l'esposizione al BPA, quali il controllo della marcatura di bottiglie e contenitori di plastica, l'eliminazione dei biberon e delle tazze di plastica con graffi e abrasioni, l'evitare di mettere a contatto i contenitori in plastica con liquidi o cibi caldi o bollenti.

Nel contesto attuale, comunque, risulta evidente come la riduzione dell'esposizione delle fasce di popolazione più suscettibili - donne in gravidanza, neonati e bambini, dotati sistemi di detossificazione ed eliminazione delle sostanze estranee ancora immaturi - debba rappresentare un obiettivo prioritario non solo per le Società Scientifiche ma anche per le Istituzioni preposte alla salvaguardia della salute pubblica.

CONTAMINANTI CON AZIONE DI INTERFERENTI ENDOCRINI IN ALIMENTI PROVENIENTI DA FILIERE CORTE DELLA TOSCANA MERIDIONALE: RISULTATI PRELIMINARI

Fanello, E., Perra, G., Guerranti, C.

Dipartimento di Scienze Ambientali, Università degli Studi di Siena, Via Mattioli, 4 – 53100 Siena

fanello@unisi.it

Scopo di questo studio è stato quello di valutare i livelli di alcune classi di contaminanti (DDT e suoi metaboliti, PFOS e PFOA), che presentano effetti nocivi sulla salute e sulla funzionalità del sistema endocrino e la sfera riproduttiva, in prodotti alimentari provenienti dal territorio della provincia di Siena.

Per garantire la provenienza dei prodotti, questi ultimi sono stati reperiti direttamente presso i produttori o presso mercati “a km zero” delle province di Siena e Grosseto. Il vantaggio di un’indagine di questo tipo è rappresentato dal fatto di poter considerare i prodotti alimentari della “filiera corta” come una sorta di indicatori della qualità del territorio stesso, proprio per il legame inscindibile tra qualità dell’ambiente e degli organismi che ci vivono e che rappresentano o, a loro volta, producono gli alimenti. Le sostanze presenti nell’ecosistema interagiscono con gli organismi, i quali, durante la loro vita, possono venire in contatto con molti contaminanti e, durante i processi di scambio di materia ed energia con l’ambiente, possono arricchirne i propri tessuti. Dal momento che molti contaminanti ambientali rappresentano un pericolo per la salute è necessario un approfondimento delle conoscenze sui livelli di contaminanti negli alimenti stessi.

Lo studio ha permesso, di confrontare i risultati con quelli di studi prima effettuati su alimenti di diversa provenienza e di determinare le differenze di contaminazione tra i prodotti locali ed i prodotti di altra origine, contribuendo a valorizzare le tipologie di prodotto meno contaminate.

Le concentrazioni del PFOS e PFOA sono risultate al di sotto del limite di rilevabilità del metodo in tutti i campioni provenienti dalla “filiera corta” dalla provincia di Siena e, per quanto riguarda quelli provenienti dalla provincia di Grosseto, i livelli sono risultati molto basse.

Nei campioni provenienti dalla “filiera corta”, per quanto riguarda il DDT ed i suoi metaboliti, le categorie di campioni di origine vegetale hanno mostrato sempre concentrazioni non rilevabili. Sia *pp'*DDT che *op'*DDT non sono mai stati riscontrati in questo studio. Nell’ambito delle categorie di alimenti carne e latticini, tra i metaboliti del DDT il composto prevalente è risultato il *pp'*-DDE (>95%), presente peraltro in basse concentrazioni; solo in un numero limitato di campioni si è riscontrata la presenza degli altri metaboliti del DDT. Livelli di contaminazione relativamente più elevati dei metaboliti del DDT sono stati riscontrati nei latticini probabilmente per la presenza di una consistente percentuale di lipidi, sia perché i contaminanti lipofili, potenzialmente accumulati nel tessuto adiposo di ovini e bovini, vengono mobilizzati durante la produzione di latte. La presenza del solo *pp'*-DDE suggerisce che questo derivi dall’assunzione diretta del metabolita in seguito alla degradazione di DDT nell’ambiente e/o da un suo accumulo lungo le catene alimentari, piuttosto che dall’esposizione, dell’organismo che rappresenta l’alimento o dal quale l’alimento deriva, al principio attivo. In conclusione, molte concentrazioni ottenute sono inferiori ai LOD, mentre i valori di concentrazione della Σ DDT e dei PFC al di sopra della soglia sono risultati molto bassi nei campioni provenienti dalla “filiera corta” analizzati fino a questo momento, portando ad escludere la possibilità di riportare effetti negativi dovuti all’azione di interferenza sul sistema ormonale di tali composti. I risultati ottenuti in questo studio, per i PFC, sono caratteristici di una contaminazione “a spot”, sicuramente più significativa a livello del singolo campione analizzato, piuttosto che a livello generale delle tipologie di prodotti prese in esame. Tutti i composti indagati sono risultati in concentrazioni molto basse, un’ulteriore riscontro dell’elevata qualità dei prodotti analizzati. Tali risultati preliminari possono rappresentare un mezzo per valorizzare i prodotti agroalimentari stessi, dando al tempo stesso, un’indicazione di scarsa contaminazione dell’ambiente dal quale provengono.

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF SOME ITALIAN HONEYS AGAINST PATHOGENIC BACTERIA

Fidaleo¹ M, Zuorro² A, Lavecchia² R.

¹*Department of Biology and Biotechnology “C. Darwin”;* ²*Department of Chemical Engineering, Materials & Environment, Sapienza University, Roma, Italy*

Some Italian honeys of different floral origin (acacia, orange, chestnut, coriander, eucalyptus, lime, wildflower) and one honeydew honey were investigated for their potential as natural antimicrobials against pathogens commonly associated with wound or burn infections. *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* and *P. mirabilis* were used as test microorganisms. The honeys examined showed moderate to high antibacterial activity, with honeydew, eucalyptus and wildflower honeys being the most effective. MIC values obtained by the agar incorporation method were in the range of 5–20% (v/v). Gram-positive bacteria were more susceptible to the inhibitory action of honey, probably because of their larger outer-membrane permeability to exogenous substances. Overall, the results suggest that some of the honeys considered here might have excellent potential for use in antimicrobial formulations for topical applications.

HONEY: A NATURAL ANTIMICROBIAL AGENT AGAINST FOODBORNE PATHOGENS?

Fidaleo M¹, Zuorro² A, Lavecchia R.²

¹*Department of Biology and Biotechnology "C. Darwin";* ²*Department of Chemical Engineering, Materials & Environment, Sapienza University, Roma, Italy*

In recent years, there has been an upsurge of interest in the use of natural antimicrobials to control the growth or eliminate foodborne pathogens. Honey has been used since ancient times to treat infections, but only recently has its ability to inhibit microbial growth been scientifically proven. The antimicrobial properties of honey, however, appear to be strongly dependent on the geographical origin of the honey as well as the floral source.

In this study we have focused our attention on some Italian honeys of different floral origin (acacia, orange, chestnut, coriander, eucalyptus, lime, wildflower) and a honeydew honey, with the aim to evaluate whether and to what extent they were able to reduce bacterial proliferation. *E. coli* and *S. aureus* were used as test microorganisms to determine the antibacterial activity of the honeys. They were selected as representative of, respectively, Gram-negative and Gram-positive foodborne pathogens. Susceptibility tests were made by standard agar-well diffusion methods and by agar incorporation techniques. In the latter, honey at a concentration of 2.5–25% (v/v) was included in agar plates onto which the two pathogens were subsequently inoculated. All of the honeys tested were found to possess antibacterial activity, with honeydew, eucalyptus, chestnut and wildflower honeys being the most effective. For all of them, we also observed a higher activity against *S. aureus* than against *E. coli*. Overall, MIC values were in the range of 5–20% (v/v). Finally, the antibacterial properties of the honeys were compared with those of a medical-grade Manuka honey, one of the most studied and utilized curative honeys in the world. The results obtained indicate that some of the honeys examined here, such as honeydew honey, had an activity against *S. aureus* and *E. coli* comparable or even superior to that of Manuka honey.

EFFETTI DI NANOPARTICELLE DI TiO_2 SUL SISTEMA RIPRODUTTIVO NEL RATTO SPRAGUE-DAWLEY

Gisoldi CI, Maranghi F, Tassinari R, Moracci G, Mantovani A.

Reparto di Tossicologia Alimentare e Veterinaria, Dip. Di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Le Nanoparticelle (NPs) sono definite come: “entità discrete che hanno dimensione dell’ordine di 100 nm o meno” (EFSA 2011). Le NPs hanno proprietà chimico-fisiche e tossicologiche diverse rispetto alla forma macromolecolare. Il TiO_2 sotto forma di NP è utilizzato come additivo-colorante alimentare, nelle glassature dei prodotti dolciari e incorporato in imballaggi in plastica. Alcuni studi hanno evidenziato effetti a carico dell’apparato riproduttivo di NPs di TiO_2 , quindi, considerando la possibile esposizione della popolazione generale attraverso gli alimenti e l’importanza delle informazioni inerenti a questo ambito, scopo del lavoro è verificare i potenziali effetti tossicologici di NPs di TiO_2 sul sistema riproduttivo maschile e femminile a seguito di esposizione orale a breve termine.

MATERIALI E METODI. Ratti adulti (7/gruppo/sex) sono stati trattati alle dosi di 0, 1, 2 mg/kg-pc-die di NPs di TiO_2 (diametro medio 70 nm) dissolte in acqua distillata, mediante gavaggio, per 5 giorni consecutivi. Lo status di NP è stato raggiunto e mantenuto mediante sonicazione con Sonicator Ultrasonic Cleaner VWR in bagnetto per 15 minuti a temperatura ambiente e alla potenza media/picco di 90/180 Watt.

Durante il trattamento sono stati controllati lo stato di salute, il peso ed il consumo di mangime. Il giorno dopo l’ultimo trattamento (giorno 6) è stato effettuato il prelievo di sangue per la valutazione dei livelli sierici di testosterone ed estradiolo previa anestesia gassosa con isoflurano. Al momento del sacrificio sono stati prelevati e pesati i seguenti organi: testicoli, utero e ovaie. Sugli organi prelevati è stato effettuato l’esame istologico ed istomorfometrico.

RISULTATI. *Maschi:* riduzione significativa del consumo medio di mangime al livello di dose alta e aumento dose dipendente dei livelli sierici di testosterone significativo al livello di dose alta.

Femmine: riduzione significativa dell’incremento ponderale e del consumo di mangime al livello di dose bassa, riduzione dose dipendente dei livelli sierici di testosterone significativo al livello di dose alta.

In entrambi i gruppi non sono stati ottenuti risultati significativi riguardanti i livelli sierici di estradiolo e gli esami istologici ed istomorfometrici.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI. Le NPs non seguono le leggi chimiche, fisiche e tossicologiche delle sostanze chimiche “ordinarie”, ma ne hanno di proprie ed in parte ancora sconosciute, perciò si suppone che possano reagire nell’organismo in modo non ancora prevedibile. Siamo di fronte a materiali talmente piccoli che possono diffondere in tutti gli organi del corpo umano e la tossicologia tradizionale non considera in modo adeguato questi aspetti. Se da un lato c’è quindi notevole interesse per le prospettive tecnologiche, sul fronte opposto ci sono legittime preoccupazioni per i molti aspetti poco conosciuti.

Per quanto riguarda le NPs di TiO_2 (da 25nm e 80nm) si è già a conoscenza che vengono ritenute principalmente nel fegato, nella milza, nel tessuto polmonare, nei reni ed altri organi dopo assorbimento nel tratto gastro-intestinale. Inoltre, non sono mostrati cambiamenti istopatologici nel cuore, nella milza, nei polmoni, nei testicoli e nelle ovaie.

I dati preliminari ottenuti nel presente studio mostrano effetti sui livelli sierici di testosterone nei maschi e nelle femmine, senza danni a livello del tessuto. Considerando che il testosterone svolge un ruolo cruciale nella corretta attività del sistema riproduttivo, la diminuzione di tali valori porta ad ipotizzare un’alterata funzionalità di tale sistema sia nei maschi che nelle femmine. Questo studio consentirà quindi di migliorare la valutazione del rischio nei confronti delle NPs di TiO_2 negli alimenti.

CONSAPEVOLEZZA DELLA QUALITA' DELLA VITA E DELLA SALUTE RIPRODUTTIVA TRA STUDENTI UNIVERSITARI

Maniglio P, Bordi G, Mallozzi M, Ciardo F, Caserta D.

Dipartimento Salute della Donna e Medicina Territoriale, Università di Roma "Sapienza"

Introduzione

L'alimentazione equilibrata e lo stile di vita corretto sono importanti determinanti dello stato di salute dei giovani e delle generazioni future. Nella letteratura scientifica è ben noto il ruolo di alcol, fumo, obesità, sedentarietà e inquinanti ambientali nella compromissione dello stato di salute.

Modelli alimentari e stile di vita non corretti in età precoce possono persistere nell'età adulta ed influenzare non solo la qualità della vita in generale, ma anche la salute riproduttiva.

I giovani rappresentano il futuro della famiglia, della società e delle Nazioni. Risulta, dunque, fondamentale aumentare la loro cognizione di benessere fisico e migliorare il loro stile di vita attraverso campagne e servizi atti a promuovere la salute.

Materiali e metodi

L'obiettivo di questo studio è quello di valutare la consapevolezza della qualità della vita e della salute riproduttiva nella popolazione studentesca della Facoltà di Medicina e Psicologia della Sapienza Università di Roma. Sono stati raccolti e analizzati i dati relativi a 120 studenti mediante la distribuzione di un questionario in forma anonima nel quale veniva richiesto di specificare: sesso, età, BMI, tipologia di alimenti consumati durante i pasti, luogo di consumazione dei pasti, mezzo utilizzato per recarsi all'università, attitudine al fumo, quantità e frequenza del consumo di alcool, svolgimento, tipo e frequenza dell'attività fisica, assunzione di farmaci. Inoltre, sono state formulate domande inerenti alla consapevolezza degli studenti della propria qualità della vita, della salute alimentare e dell'influenza dello stile di vita sul potenziale riproduttivo.

Sono state seguite le linee guida proposte dall'INRAN (Istituto Nazionale di Ricerca dell'Alimentazione e della Nutrizione) nella suddivisione del campione in due gruppi in base alla tipologia delle abitudini alimentari: il primo si distingue per una dieta mediterranea, con un consumo giornaliero di prodotti freschi; il secondo si distingue per una dieta basata prevalentemente sul consumo giornaliero di prodotti confezionati, surgelati e precotti.

Risultati

Il campione risulta costituito da 120 studenti, 59 di sesso maschile con età media pari a 21,7 anni e 61 di sesso femminile con età media di 21,8 anni. Il gruppo di studenti di sesso maschile presenta un valore medio di BMI pari a 23 in confronto a un valore pari a 19,9 riscontrato nella popolazione femminile.

Gli studenti appartenenti al gruppo caratterizzato da una dieta mediterranea ammontano a 59, mentre quelli inclusi nella popolazione con attitudine ad un'alimentazione di tipo non mediterraneo sono 61.

Dal confronto tra le due popolazioni prese in esame si rileva che nel secondo gruppo il consumo di bevande alcoliche, l'utilizzo di farmaci e il tasso di sedentarietà risultano significativamente più rappresentati in confronto al primo gruppo ($p=0,04$; $p=0,045$; $p=0,02$ rispettivamente).

Non si evidenziano differenze significative in quanto a consapevolezza degli effetti di alimentazione e stile di vita sulla salute e sulla fertilità.

Complessivamente, nell'ambito di tutto il campione esaminato, il 78% degli studenti che ha compilato il questionario ritiene la propria alimentazione corretta e il 41% esprime il desiderio di ricevere consigli di un esperto in merito allo stile di vita. Per quanto concerne la consapevolezza degli effetti dell'alimentazione e dello stile di vita sulla salute, l'89% degli studenti ritiene che questi incidano molto, l'8,3% in misura minima, il 2,7% ne ignora le conseguenze.

Si evidenzia invece come la consapevolezza delle ripercussioni dell'alimentazione e dello stile di vita sull'alterazione della fertilità sia decisamente inferiore nella popolazione esaminata, dal momento che il 35% ha dichiarato di non esserne a conoscenza, il 35% ritiene influiscano poco o per nulla, e il restante 30% ritiene che giochino un ruolo importante.

Discussione

Da questi risultati si evidenzia che nel gruppo di studenti che seguono una dieta non equilibrata vi è anche una maggiore inclinazione al consumo eccessivo di alcol, all'abuso di farmaci e alla sedentarietà, da cui deriva un sinergismo sugli effetti negativi per la salute. In questa stessa popolazione di studenti, il 67% ritiene peraltro di adottare uno stile alimentare corretto, mostrando come, anche nell'ambito di una popolazione con alto livello d'istruzione come quella inclusa nel nostro studio, vi sia una difficoltà nel riconoscere un modello nutrizionale sano da seguire.

Dalla totalità del campione si evidenzia come la maggior parte degli studenti sia a conoscenza dell'impatto della dieta e dello stile di vita sul benessere fisico, ma non delle conseguenze degli stessi sulla salute riproduttiva.

Conclusioni

Da questo studio emerge la necessità di una sensibilizzazione dei giovani sul tema di una sana alimentazione e sull'importanza delle scelte alimentari, informandoli riguardo ai rischi che una dieta non equilibrata e non controllata può provocare non solo sull'organismo, ma anche sul potenziale riproduttivo. In tale contesto, il miglior modo per prevenire è conoscere.

Premiato quale miglior poster

(valutatore: Prof. Michele Amorena, Dipartimento di Scienze degli Alimenti - Facoltà di Medicina Veterinaria - Università degli Studi di Teramo)

IMMUNOMODULATION OF TWO FOOD CONTAMINANTS (AFLATOXIN B1 AND AFLATOXIN M1) IN JURKAT CELLS AND BONE MARROW MURINE DENDRITIC CELLS

Russo R.¹, Luongo D.², Campanile G.¹, Bergamo P.², Rossi M.², Severino L.¹

¹ Faculty of Veterinary Medicine, University of Naples Federico II; ² Institute of Food Science, ISA-CNR, Avellino.

Aflatoxins (AF) are natural contaminants frequently found both in food and feed. Many of them are genotoxic, cancerogenic and immunotoxic; aflatoxin B1 (AFB1) represents the most potent hepatocarcinogen for both humans and animals. Aflatoxin M1 (AFM1) is the hydroxylated metabolite of AFB1 and excreted with milk. Despite several studies have been carried out about the effects of AFB1 in other immuno-competent cells (1-4), no studies have been performed, at our knowledge, about the effects of AFM1 in cell models we chose. The aim of the current study was to investigate immune effects of AFB1 and AFM1 in two different cellular models: Jurkat human lymphoblastoid cells and bone marrow murine dendritic cells.

Jurkat T cells were exposed to increasing concentration of AFB1 (3-50 μ M) and AFM1 (3-30 μ M) and cellular proliferation was determined by [³H]-thymidine incorporation. Caspase-3 activity and lactate dehydrogenase (LDH) release were measured in supernatants from cells exposed to mycotoxins for 24 hours.

Dendritic cells (DC) were obtained from femurs and tibiae of BALB-c mice (3). Immature DCs were exposed for 6 hours to increasing concentrations of each mycotoxins before adding LPS (1 mg/ml) for further 18 hours. Cell number and viability were assessed by nigrosin dye exclusion assay using a hemocytometer.

We found that AFB1 and AFM1 inhibited the proliferation in Jurkat T cells, as; such a decrease became significant and dose-dependent starting from 15 μ M for both mycotoxins. Interestingly, the exposure of Jurkat cells to both aflatoxins did not modify the activity of caspase 3 in the whole range of concentrations, whereas the levels of the released LDH enzyme resulted significantly increased compared to untreated control, suggesting a cytotoxic effect.

Next, we found that the expression of the accessory and stimulatory molecules in murine dendritic cells; although cytofluorimetric analysis showed an increase of both MHC class II and CD86 surface expression following LPS-treatment, neither AFB1 nor AFM1 influenced DC maturation at any examined concentrations.

In conclusion, the results of the current study suggest that also AFM1, as the parent compound AFB1, could compromise lymphocyte functions but they did not affect DC maturation. Nevertheless, further studies are necessary for investigating if other DC functions are altered by aflatoxins. Studies about the interactions between AFB1 and AFM1 are in progress in our laboratory to understand if synergistic or additive effects can occur in these experimental models.

Keywords: Aflatoxins; Jurkat cells; dendritic cells.

References.

1. Hinton et al., *Toxicol. Sci.* 2003, 73, 362-377
2. Luongo et al., *Toxicon*, 2010, 55:73-80.
3. Russo et al., *Toxicol. Lett.* 2011, 205:179.
4. Russo, et al., *Toxicol. Lett.* 2010, 196:201.
5. Meisssonier et al., *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2008, 231:142-149.

BIOSENSOR: ADVANCED METHODOLOGY FOR DETECTION OF OCHRATOXIN A IN FOOD OF ANIMAL ORIGIN

Russo R¹, Varriale A², Pennacchio A², Iozzino L¹, Anastasio A¹, Florio S¹, D'Auria S², Severino L¹

¹Faculty of Veterinary Medicine, University of Naples, Naples, Italy; ²Institute of Protein Biochemistry - CNR, Naples, Italy.

Ochratoxin A (OTA) is a mycotoxin produced by fungi belonging to *Aspergillus* and *Penicillium* families commonly found as food contaminant in both USA and UE mainly in cereal grains, coffee, cocoa, and spices (1). OTA could contaminate food of animal origin as well, such as pork meat and derived products (2). OTA is of great toxicological concern for the toxic effects in humans and animals which include nephrotoxicity, carcinogenicity, genotoxicity and immunotoxicity (3). Maximum permissible levels in different matrices have also been established for OTA by UE legislation (Reg. CE 1831/2003). As these are quite low, analytical detection methods have to be both sensitive and specific. Therefore, regarding food safety, it is useful to have a sensible and rapid analytical methodologies to be used as screening methods for the detection of levels of OTA in a large number of food samples. Conventional analytical detection methods involve chromatographic analysis, such as HPLC, GC and, more recently, LC-MS and LC-MS (4-5). However, although these techniques are reproducible and very sensitive, extensive protocols of sample clean up are required prior to the analysis; moreover, such analysis are expensive, time consuming and required specialized equipment. An immunochemical analytical method, based on highly specific antigen-antibody interactions, would be desirable, offering several advantages compared to conventional techniques such as low costs per sample, high selectivity, and high throughput. The aim of the current study was to realize an innovative fluorescence assay for the detection of traces of OTA in food samples. Briefly, glutamine binding protein from *E. coli* was conjugated with OTA and then labelled with fluorescein-5-isothiocyanate (FITC). Antibodies anti-BSA-OTA were produced by inoculating rabbits with the antigen. The measurement was carried out by fluorescence correlation spectrometry (FCS). Detection limit was 0.0078 ng of OTA suggesting the application of such experimental strategy for analysis in which high sensitivity detection is required.

In conclusion, the development of highly specific screening methods could be useful to reveal the presence of residues of contaminants in various foods analyzing a large number of samples in a short time so enabling the rapid commercialization of food products and sending to the confirmatory analysis only the positive samples.

Keywords: ochratoxin A; biosensor; food safety.

References

1. Sangare-Tigori et al., [Food Addit Contam.](#) 2006 23(10):1000-1007.
 2. [Jørgensen K](#), [Food Addit Contam.](#) 2005; 22:26-30.
 3. [Pfohl-Leszkowicz A](#) and [Manderville RA](#), *Mol. Nutr. Food Res.* 2007, 51(1):61-99.
 4. Kralj Cigić I and Prosen H, *Int. J. Mol. Sci.* 2009, 10, 62-115.
- Varriale A et al., *Prot Pept Lett.* 2009, 16:1425-1428.

NON DIOXIN-LIKE POLYCHLORINATED BIPHENYLS: VALIDATION STUDY OF A SCREENING METHOD ACCORDING TO EC DECISION 657/2002

Serpe FP^{2,1}, Russo R¹, Ambrosio L¹, Florio S.¹, Esposito M², Severino L¹

1 Università degli Studi di Napoli, Facoltà di Medicina Veterinaria. Napoli

2 Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno. Portici (NA)

Polychlorinated biphenyls (PCBs) are a group of 209 congeners, divided in 12 dioxin-like PCBs (non-ortho substituted) and 197 non dioxin-like PCBs (ortho or mono-ortho substituted). Despite the large number of possible congeners, only about 130 are likely to occur in the commercial mixtures, nowadays banned within EC, and relevant for environment. Among them, six non dioxin-like congeners (28, 52, 101, 138, 153 and 180) represent over the 50% of abundance of all PCBs congeners, and are considered as “indicators”. Food of animal origin, in particular fish, has been recognized to be the main intake pathway for PCBs in the general population (EC SCF, 2000). Indeed, a maximum permitted limit for NDL-PCBs “indicators” in food has been proposed by EC in a draft regulation (DG SANCO 2009) and within Italian PNR (Piano Nazionale Residui), whereas DL-PCBs are already included within European rules (EC Regulation 1881/2006).

PCBs are persistent organic pollutants (POPs) for the environment (WHO, 1993; Stockholm Convention, 2001) associated with several well known adverse effects in humans, commonly attributed to DL-PCBs, although NDL-PCBs have been shown to have tumor promotive activity in mice (Hemming et al., 1993; Strathmann et al., 2006) and co-carcinogenic effects in rats (Tharappel et al., 2002; Bunaciu et al., 2007). Recently, were demonstrated effects of NDL-PCBs on signalling pathways contributing to liver tumor promotion and carcinogenesis (Machala et al., 2009; Al-Anati et al., 2009) and inhibition of apoptosis after interaction with benzo[a]pyrene (Al-Anati et al., 2010).

The aim of the present work was to improve and validate the method for determination of the six NDL-PCBs “indicators” in fishery products, following the providings of the European text reference for methods validation that is Commission Decision 657/2002. Because of the lack of specific MLs (maximum limits), for NDL-PCBs, it was not useful to consider a quantitative confirmatory method; so, a qualitative screening method was validated. EC Decision 657/2002 requires, for a screening method, specificity, ruggedness, precision, recovery and assessment of detection capability (CC β), that is a parameter testing method’s proficiency as regards false-negative rate, where β -error, the probability of false negative responses, has to be less than 5%. Matrices tested were codfish, sea bream, pangasius, tuna, octopus, cuttlefish, squid and mussel and method consisted of organic extraction, digestion of the extracts with H₂SO₄ on diatomaceous earth solid support and solid phase clean-up (Florisil), followed by gas-chromatography with electron capture detection (GC/ECD) analysis and quantification by external standardization. Method respected, for all matrices, all providings of Decision 657/2002, including CC β , and resulted, due to the use of diatomaceous earth solid supports, more simple than other procedures, characterized by analogous performances, commonly used for multiresidual analyses.

References

- Al-Anati L., et al., 2009. Chemosphere 73, S278–S283.
- Al-Anati, L., et al., 2010. Chem. Biol. Interact 182, 191–198.
- Bunaciu, R.P., et al., 2007. Toxicology 239, 147–155.

Commission Decision (EC) 657/2002 of 12 August 2002. Official Journal of the European Union. L 221 (2002) 8.

- Commission Regulation (EC) No. 1881/2006 of 19 December 2006 Official Journal of the European Union, L 364, 20 December 2006.
- DG SANCO 2009. Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain of EFSA (CONTAM Panel), 8 November 2005.
- EC SCF, 2000. Available from: http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out78_en.pdf.
- Hemming, H., et al., 1993. Carcinogenesis 14, 2531–2535.
- Machala M., et al., 2009. Toxicology Letters 189S, S57–S273.
- Stockholm Convention On Persistent Organic Pollutants (POPs). Stockholm, 22 May 2001.
- Strathmann, J., et al., 2006. Toxicol. Sci 93, 34–40.
- Tharappel, J.C., et al., 2002. Toxicol. Appl. Pharmacol 179, 172–184.

WHO, 1993. Polychlorinated biphenyls and terphenyls. World Health Organization (Geneva)

EFFETTO IN VITRO DEL PARA-NONILFENOLO SU CELLULE DI TROFOBLASTO UMANO

Spagnoletti A, Ietta F, Ermini L, Bechi N, Romagnoli R, Paulesu L.

Dipartimento di Fisiologia, Università degli Studi di Siena

Negli ultimi anni la ricerca scientifica ha mostrato un crescente interesse nei confronti di sostanze chimiche presenti nell'ambiente, in ragione della loro capacità di agire in modo ormone-simile e/o di interferire sulle pathways biochimiche che modulano la risposta di vari tessuti ed organi agli ormoni stessi.

Per questa loro proprietà, tali sostanze sono dette "*endocrine disruptor chemicals*" (EDCs). Alcune di queste sostanze, note come xenoestrogeni, sono in grado di mimare l'azione degli ormoni estrogeni rappresentando un pericolo per la salute riproduttiva dell'uomo. In questo studio abbiamo valutato l'effetto del *para*-Nonilfenolo (*p*-NP), un EDC con attività simil-estrogenica, su cellule di trofoblasto derivante da placenta umana. In particolare abbiamo utilizzato una linea cellulare di trofoblasto extravilloso, le cellule HTR8/SV-neo, ed abbiamo analizzato gli effetti del *p*-NP sulla proliferazione, migrazione e invasione cellulare, tre processi coinvolti nella formazione dei villi ancoranti e nel rimodellamento delle arterie spirali materne.

Le cellule sono state esposte per 24, 48 e 72 ore a concentrazioni di *p*-NP simili a quelle ritrovate nell'ambiente e nei fluidi biologici umani quali 10^{-11} M, 10^{-9} M e 10^{-7} M.

I risultati hanno mostrato che l'esposizione al *p*-NP non ha alcun effetto sul processo invasivo né sulla proliferazione delle cellule HTR8/SV-neo mentre diminuisce la capacità migratoria delle stesse cellule soprattutto alle più basse concentrazioni di *p*-NP utilizzate (10^{-11} M, 10^{-9} M). A queste stesse concentrazioni il *p*-NP risulta inoltre indurre il differenziamento delle cellule HTR8/SV-neo mediante endoreduplicazione, un processo fisiologico utilizzato dalle cellule di trofoblasto per arrestare il loro processo invasivo nell'utero materno.

Questi risultati indicano che concentrazioni di *p*-NP pari a quelle ritrovate nelle matrici ambientali e biologiche sono in grado di interferire con il normale processo di placentazione inducendo un precoce differenziamento e contribuendo ad un insufficiente sviluppo placentare.

PCB ED ESPOSIZIONE UMANA: IDENTIFICAZIONE E VALUTAZIONE DI BIOMARCATORI PRECOCI DI EFFETTO IN MODELLI IN VITRO RAPPRESENTATIVI DELL'APPARATO DIGERENTE

Stecca L, La Rocca C, Tait S, Mantovani A.

Reparto di Tossicologia Alimentare e Veterinaria, Dip. Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Istituto Superiore di Sanità, Roma

mail: aurastecca@hotmail.it

tel: 06 4990 3530/2512

I Policlorobifenili (PCB) sono una classe di Interferenti Endocrini (IE) lipofili e persistenti, tossicologicamente molto rilevanti per l'uomo, esposto principalmente per via alimentare. Gli effetti tossicologici dei PCB sono mediati da recettori nucleari (NR) specifici coinvolti in diversi processi cellulari. I congeneri diossina-simili (DL-PCB) interagiscono principalmente col recettore arilico (AhR) e con i recettori estrogenici ($ER\alpha$, $ER\beta$) mediante processi di cross-talk recettoriale mentre i congeneri non-diossina-simili (NDL-PCB) mostrano attività antiestrogenica, affinità per il recettore del pregnano X (PXR) e interferiscono con il legame fra testosterone e recettore androgenico (AR). In questo studio tali congeneri sono stati suddivisi in 3 miscele in base alla loro diversa struttura chimica e al meccanismo d'azione: Mix1, comprendente i congeneri potenzialmente estrogenici; Mix2, comprendente i DL-PCB; Mix3, comprendente congeneri altamente persistenti e maggiori induttori di CYP. Le concentrazioni dei congeneri di PCB nelle 3 miscele utilizzate derivano da livelli di esposizione reale nella popolazione generale, determinati in tessuto adiposo umano.

Poiché l'apparato digerente risulta direttamente esposto a contaminanti alimentari, e in particolare il fegato e il colon, in questo studio sono state selezionate tre linee cellulari stabilizzate come modelli *in vitro* rappresentative dei due tessuti target: le linee epatiche di epatoblastoma (HuH6) e di epatocarcinoma (HepG2) e la linea di adenocarcinoma di colon (DLD1).

Lo scopo dello studio è stato dunque quello di valutare i potenziali effetti dovuti all'esposizione alle miscele di PCB, a livelli di esposizione realistici, mediante l'analisi della modulazione del pannello di recettori ($ER\alpha$, $ER\beta$, AhR, PXR, AR, PPAR γ) sulle tre linee cellulari selezionate. La risposta recettoriale in seguito a esposizione a miscele di PCB sono risultate differenti nelle tre linee cellulari, infatti nelle HUH6, Mix3 modula in modo significativo quasi tutti i recettori ad eccezione di $ER\alpha$ e si osserva una netta differenza nella risposta recettoriale fra le due miscele di NDL-PCB; nelle DLD1 per tutte le miscele di PCB si osserva un'evidente modulazione dell'espressione di $ER\alpha$, $ER\beta$, e AhR, con la modulazione differente di PPAR γ e di AR, quali elementi di diversificazione tra le miscele. Infine nelle HepG2, si osserva una differenza di effetto fra le due miscele di NDL-PCB (Mix 1 e Mix3) soprattutto a carico di $ER\alpha$ ed $ER\beta$ che risultano più simili al controllo in Mix1, modulati entrambi negativamente in Mix3.

I risultati fanno ritenere che i modelli *in vitro* utilizzati siano un sistema adeguato per evidenziare gli effetti dell'esposizione a PCB sulla modulazione genica del pannello di biomarcatori selezionato. Inoltre la diversa modulazione dei NR nelle linee cellulari consente di ipotizzare differenti meccanismi di azione dei PCB a seconda del tessuto esposto. La scelta di analizzare i PCB suddividendoli in 3 distinte miscele ha evidenziato differenze di effetto in seguito a esposizione in particolare per gli NDL-PCB nei quali è possibile distinguere due sottogruppi con modo di azione diverso e per i quali si apre la prospettiva di approfondimento dei meccanismi implicati, permettendo anche l'ulteriore caratterizzazione degli effetti di miscele di PCB.

Ringraziamenti Lo studio è condotto nell'ambito Progetto di Ricerca Finalizzata 2008 "Innovative approaches in the evaluation and prevention of the food exposure to contaminating toxic persistent and emergent, through the study of the diet and the debugging of innovative methods of survey" e del progetto: "Effects of food contaminant mixtures on well know targets of endocrine disrupters exposure: an integrated toxicogenomic-biomarkers approach"

NOT ONLY DNA - EPIGENETIC CONTRIBUTION OF SPERM TO REPRODUCTION

Stocchi V, Consales C, Benassi B, Leter G, Eleuteri P, Grollino MG, Cordelli E, Villani P, Pardini MC, Bartoleschi C, Uccelli R, Pacchierotti F, Spanò M.

Laboratory of Toxicology, Unit of Radiation Biology and Human Health, ENEA CR Casaccia, Rome, Italy

Spermatozoa represent the terminally differentiated cells highly specialized to carry the paternal genome to the oocyte. Genetic integrity of spermatozoa plays a major role in determining the fate of embryonic development. However, male gametes deliver to oocytes more than just the haploid male genome; several epigenetic changes in the mature sperm have been suggested to play a role in the developing embryo; further, alterations in the epigenetic profile have been associated with infertility. Sperm epigenetic signals that can be passed to oocyte include DNA methylation, DNA-associated proteins and RNAs. Although almost completely packaged with protamine, sperm chromatin still retains a variable fraction of histones and it has been conceived that these nucleohistonic regions mark DNA sequences for distinctive processing during fertilization and early embryogenesis. It is now accepted that spermatozoa, although being transcriptionally inactive, harbor a distinct population of RNAs. The biological role of these transcripts is largely unknown. Some of them represent leftover of products expressed in earlier phases of spermatogenesis, but others could be important in fertilization and zygote early development. Furthermore, along with mRNAs, also the presence of small non coding (snc)RNAs has been recently demonstrated in sperm, although their physiological functions are far from being fully determined. Interestingly, some species-specific differences are known between sperm chromatin structural organization and timing of zygotic genome activation.

Regardless of their functions, epigenetic modifications in sperm could represent a marker of spermatogenic dysgenesis possibly due to environmental or pathological causes or could be developed as a predictive parameter in the diagnosis of male infertility.

In our laboratory we have just started the characterization of RNA content in human and mouse sperm. We have first optimized RNA and sncRNA extraction from mouse spermatozoa, in order to devoid samples of genomic DNA and any debris of somatic cells. We then started to characterize mouse RNA in terms of presence of specific fertility-associated transcripts and microRNAs abundance, demonstrating that, besides protamine-1 and -2, murine sperm does contain several specific mRNAs responsible for cell morphology and motility and for driving egg fertilization.

We are also exploring technical approaches to measure global DNA methylation in sperm to be applied in the context of epidemiological studies. In addition to highlighting possible species-specific differences that might help to elucidate the functional significance of epigenetic inheritance, we aim at studying possible variations in relation to fertility and, in the mouse model, to exposure to chemical or physical stressors during spermatogenesis. We will integrate the analysis of these biomarkers with that of chromatin structural alterations and DNA integrity currently applied in our laboratory.

In this poster we present a compilation of literature evidence, together with some preliminary data, on the possible relationship between human fertility and male-mediated epigenetic inheritance, together with available data suggesting that epigenetic changes in sperm might be associated to external exposures of environmental relevance, endocrine interference included.

Premiato quale miglior poster

(valutatore: Prof. Michele Amorena, Dipartimento di Scienze degli Alimenti - Facoltà di Medicina Veterinaria - Università degli Studi di Teramo)