

SINDROME DELLA DISGENESI TESTICOLARE: UN SAGGIO PROSTATA-MEDIATO PER INDIVIDUARE SOSTANZE CHIMICHE CHE POTREBBERO ALTERARE LO SVILUPPO RIPRODUTTIVO MASCHILE

Daniele Marcoccia (a,b), Laura Narciso (a), Antonella Smeriglio (a,c), Domenico Trombetta (c),
Stefano Lorenzetti (a)

(a) Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Istituto Superiore di Sanità, Roma

(b) Dipartimento di Biologia, Università Roma Tre, Roma

(c) Dipartimento di Scienze del Farmaco e dei Prodotti per la Salute, Università di Messina, Messina

Introduzione

I disordini del sistema riproduttivo maschile come l'infertilità, il criptorchidismo, l'ipospadia, la ridotta dimensione dei testicoli e la scarsa qualità dello sperma, oltre ad avere una associazione con patologie genetiche (es. 45X/46XY) (1) sono stati collegati all'esposizione a fattori ambientali come gli interferenti endocrini (*Endocrine Disrupting Chemicals*, EDC) (2).

Lo sviluppo del cancro al testicolo (*Testicular Germinal Cell Cancer*, TGCC) rappresenta il tumore maligno più comune negli uomini in giovane età ed è spesso associato all'esposizione di sostanze in grado di alterare il normale metabolismo ormonale come i suddetti EDC (3). Il TGCC origina da un precursore comune pre-invasivo delle cellule germinali testicolari definito CIS (*Carcinoma In Situ testis*) (4), le cui cellule tumorali originano dai gonociti che non riescono a differenziare in spermatogoni a causa della disfunzione delle cellule del Sertoli e/o del Leydig (5). Le cellule del Leydig, in particolare, sono le cellule del testicolo che producono l'ormone steroideo testosterone, il quale è necessario non solo per una corretta spermatogenesi ma anche per il completo sviluppo delle ghiandole accessorie: prostata e vescicole seminali (6). Tale funzione è altamente compromessa dall'esposizione *in utero* a sostanze anti-androgeniche (es. plasticizzanti come il di-*n*-butil ftalato/DBP e alcuni pesticidi come la vinclozolina/VIN e il linuron/LIN) o sostanze estrogeno-simili (es. il plasticizzante bisfenolo A/BPA) (7).

È stato proposto che l'insieme di patologie come il TGCC, l'ipospadia, il criptorchidismo e le alterazioni della spermatogenesi che riducono la qualità del seme sono condizioni fisiopatologiche che possono essere considerate sintomi della sindrome della disgenesi testicolare (*Testicular Dysgenesis Syndrome*, TDS), una malformazione congenita che insorge durante il primo periodo dello sviluppo fetale (8). Alterando il normale funzionamento degli ormoni steroidei sessuali nello sviluppo e nella omeostasi urogenitale durante l'esposizione *in utero* (9), gli EDC possono impedire la normale evoluzione del sistema riproduttivo maschile, la corretta organogenesi dell'epididimo e delle ghiandole accessorie come la prostata e le vescicole seminali (4) e quindi indurre TDS.

Obiettivi

Come è noto dalla letteratura è possibile riprodurre la TDS in molti modelli sperimentali animali mediante esposizione *in utero* a contaminanti ambientali come ad esempio gli ftalati e alcuni pesticidi (10).

I tessuti bersaglio che comunemente vengono utilizzati per valutare il corretto funzionamento dell'apparato riproduttivo maschile raramente includono la funzionalità della prostata. Nei modelli sperimentali animali, infatti, la prostata è un bersaglio tossicologico considerato spesso solo in termini di morfologia e dimensioni ma non funzionalmente anche perché la caratteristica principale dell'epitelio prostatico umano, la secrezione del *Prostate-Specific Antigen* (PSA), è assente nei roditori (11). Il PSA è un marcatore della funzionalità della prostata, normalmente utilizzato nell'indagine clinica dell'adenocarcinoma prostatico. Il gene che codifica per il PSA è un bersaglio molecolare controllato dall'azione degli androgeni e dalla via di trasduzione del segnale mediata dal recettore degli androgeni (*Androgen Receptor*, AR).

Poiché alcune delle sostanze usate come pesticidi o plasticizzanti sono in grado di indurre la TDS, ma possono anche influenzare negativamente lo sviluppo e l'organogenesi della ghiandola prostatica, il nostro scopo è stato quello di utilizzare un saggio funzionale della ghiandola prostatica – quale l'analisi della secrezione del PSA in linee cellulari umane di epitelio prostatico – al fine di individuare le sostanze chimiche con proprietà androgeniche o anti-androgeniche che potrebbero compromettere l'attività dell'epitelio prostatico e, quindi, capaci di interferire con la fertilità maschile. La linea cellulare di epitelio prostatico umana utilizzata, LNCaP, presenta un recettore androgeno/AR mutato (AR^{T877A}) tipico delle prime fasi della progressione dell'adenocarcinoma prostatico (12). Le cellule LNCaP sono regolate dagli androgeni e sono in grado di secernere PSA (13,14).

Il nostro sistema modello è un approccio integrato di valutazione della tossicità riproduttiva prostata-mediata che integra due bersagli tossicologici: la citotossicità, analizzata mediante saggi di vitalità cellulare (*MTS assay*), e il saggio funzionale di secrezione del PSA (*PSA secretion assay*), usata come biomarcatore di effetto cellula-specifico, per ottenere uno *screening* di sostanze chimiche che, come potenziali EDC, in seguito ad esposizione *in utero* portano alla formazione di malformazioni congenite come la TDS.

Materiali e metodi

Il sistema modello *in vitro* utilizzato si basa su cellule umane di adenocarcinoma prostatico metastatico denominate LNCaP. Le cellule sono state mantenute in coltura in piastre da 96 pozzetti a 37°C, in un'atmosfera umidificata al 5% di CO₂ in terreno sintetico RPMI1640 contenente 2 mM glutammmina, 10% (v/v) siero (*Fetal Bovine Serum*, FBS), 100 U/mL penicillina-streptomina e 0,25 µg/mL di amfotericina B. Prima di effettuare i trattamenti con le sostanze chimiche di interesse, le cellule LNCaP sono state sincronizzate per un'intera notte in un terreno privo di siero, lavate con una soluzione di tampone fosfato-salino 1x PBS, pH 7,2 w/o Ca⁺² e Mg⁺², e successivamente poste in coltura per 24 ore con un terreno completo contenente 10% *charcoal-stripped* FBS (siero in cui sono stati eliminati gli ormoni steroidei per non alterare la risposta agli interferenti endocrini con attività ormone-simile). Le cellule sono state trattate per 72 ore con le sostanze chimiche oggetto di studio: il diidrotestosterone (DHT) è stato utilizzato come sostanza androgenica di riferimento; la 2-idrossi-flutamide/2-OH-FTA come composto anti-androgenico di riferimento; il DMSO (dimetilsolfossido) impiegato come veicolo per solubilizzare le diverse sostanze chimiche di interesse, e bisfenolo A/BPA, di-*n*-butil ftalato/DBP, vinclozolina/VIN, linuron/LIN come molecole di interesse. Tutte le sostanze chimiche sono state saggiate in curve dose-risposta nello spettro di concentrazioni da 0,000001 mg/mL a 1 mg/mL.

A fine trattamento, per quantificare la secrezione del PSA, metà del terreno di coltura è stato prelevato e analizzato mediante un saggio fluoro-immunometrico (*Dissociation-Enhanced Lanthanide Fluorescent Immunoassay*, DELFIA) che permette la misurazione contemporanea

sia del PSA libera che quella totale “ProStatus™ PSA Free/Total kit DELFIA®” (Perkin Elmer). Il resto della coltura cellulare è stato utilizzato per determinare la vitalità cellulare e indirettamente l’attività proliferativa delle cellule mediante il saggio “Cell Titer 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay” (Promega).

Risultati e discussione

La TDS è una sindrome con una patogenesi principalmente dipendente dall’ambiente con una componente legata alla predisposizione genetica (5). Molti studi mostrano che l’esposizione *in utero* a sostanze anti-androgeniche ed estrogeno-simili spesso presenti nell’ambiente, come i già citati pesticidi o plasticizzanti, può portare a disordini e sintomi riconducibili alla sindrome della TDS (3) e ad altre malattie connesse al sistema riproduttivo maschile (15).

La prostata, sebbene sia una ghiandola accessoria, è essenziale per la fertilità maschile perché il fluido prostatico da essa secreto contiene le callicreine, tra cui anche il PSA, che permettono la liquefazione e la coagulazione del fluido spermatico, attività necessarie per il corretto funzionamento degli spermatozoi (5, 6, 16). Perciò un limitato funzionamento dell’epitelio prostatico può essere associato all’infertilità maschile (17).

La ghiandola prostatica non è uno degli organi comunemente considerati per valutare le possibili malformazioni congenite perché la sua organogenesi termina durante la pubertà e coincide con la prima spermatogenesi. È stato però dimostrato che l’esposizione *in utero* a composti chimici come gli ftalati (18) modula il segnale mediato dal recettore per gli androgeni AR presente sul tessuto prostatico e l’esposizione a sostanze estrogeno-simili (come il BPA) (19) può causare un effetto di femminilizzazione e impedire il normale sviluppo della prostata. Altri interferenti endocrini utilizzati come pesticidi e con attività anti-androgenica come VIN e LIN possono compromettere la sintesi di testosterone portando ad una minore formazione del suo metabolita DHT, attivo prevalentemente a livello della ghiandola prostatica, e diminuire quindi la secrezione del fluido prostatico e del PSA in esso contenuto (13).

La secrezione del PSA è un riconosciuto biomarcatore clinico per il tumore della prostata: nel nostro sistema modello essa permette di valutare lo stato funzionale dell’organo e, integrata ad un saggio di citotossicità generale, che misura la vitalità delle cellule, costituisce un biomarcatore tossicologico (13, 20) utile per effettuare screening per l’identificazione di sostanze anti-androgeniche/simil-estrogeniche che hanno la potenzialità di interferire con il normale sviluppo dell’apparato riproduttivo maschile.

L’obiettivo del nostro studio è stato quindi quello di confermare l’attività androgenica o anti-androgenica di EDC, confrontando l’andamento della secrezione del PSA (libera e totale) con quello di sostanze di riferimento la cui attività risulta essere già nota. Nel sistema modello utilizzato le cellule LNCaP trattate con la sostanza agonista del recettore androgeno AR e attiva fisiologicamente nella prostata, il DHT, hanno mostrato un decisivo aumento della secrezione del PSA presente già alle basse concentrazioni, nell’ordine della pico- e nano-molarità (quelle normalmente presenti in condizioni fisiologiche) (Figura 1a) senza avere un effetto citotossico alle stesse dosi utilizzate (dati non mostrati). La secrezione del PSA nelle cellule di prostata trattate con la 2-OH-FTA mostra un decremento alle basse concentrazioni confermando l’attesa attività anti-androgenica di questo metabolita attivo del farmaco flutamide. Alle alte dosi, però, si osserva un diverso comportamento: un aumento della secrezione del PSA (simile a quello mostrato alle basse concentrazioni delle cellule trattate con DHT); quindi nelle condizioni da noi utilizzate la 2-OH-FTA presenta un duplice comportamento da androgeno-anti-androgeno (Figura 1b) (13). La maggiore concentrazione utilizzata (100 µM) risulta essere citotossica (dati non mostrati) e questo è confermato dalla quasi assente secrezione del PSA.

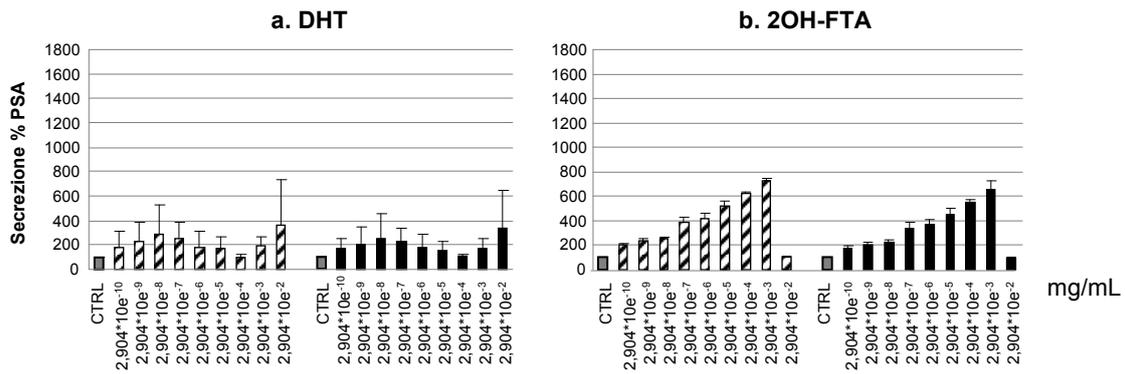


Figura 1. Secrezione del PSA libera (in grigio) e totale (in nero) delle cellule LNCaP dopo trattamento con di-idrotestosterone/DHT e di-idrossi-flutamide/2OH-FTA per 72 ore

Considerando la secrezione del PSA dopo trattamento con DHT (come riferimento di molecola androgenica) e le basse concentrazioni della 2-OH-FTA (come riferimento di molecola anti-androgenica), possiamo confermare che i contaminanti ambientali utilizzati, DBP, LIN, VIN e BPA, sono composti anti-androgenici anche in relazione alla secrezione proteica del PSA (Figura 2) (13).

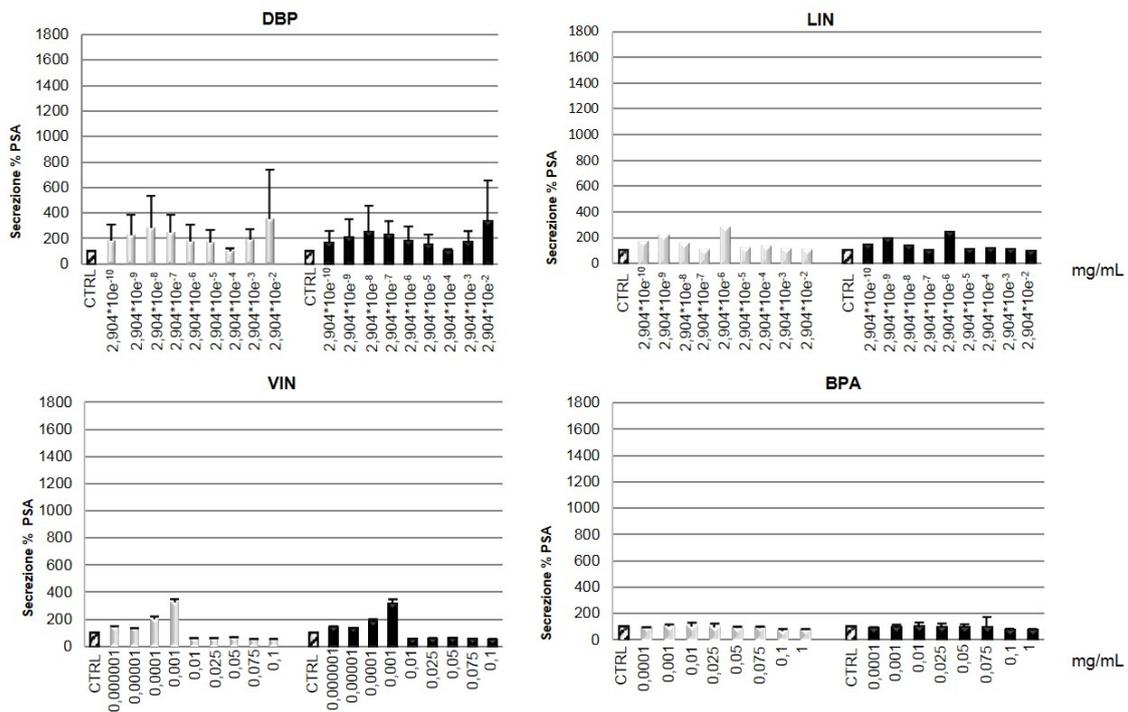


Figura 2. Secrezione PSA libero (in grigio) e PSA totale (in nero) delle cellule LNCaP dopo trattamento con di-n-butilftalato/DBP, linuron/LIN, vinclozolina/VIN e bisfenolo A/BPA per 72 ore

Conclusioni

In questo sistema modello il bersaglio tissutale rappresentato per valutare l'efficienza dell'apparato riproduttivo maschile è la ghiandola prostatica. Tale approccio sperimentale prevede l'integrazione di un saggio di citotossicità, che misura la vitalità cellulare e indirettamente la proliferazione cellulare, e un saggio di funzionalità specifica del tessuto epiteliale della prostata come la secrezione del PSA. Questo approccio può rappresentare quindi un valido supporto per lo screening e l'identificazione di sostanze chimiche che possono alterare l'omeostasi della prostata e, conseguentemente, segnalare quali contaminanti ambientali possono avere effetti su malformazioni congenite, come la TDS, associate a patologie che si sviluppano in età adulta quali le malattie prostatiche (prostatiti, iperplasia prostatica benigna e tumore della prostata) che sono a loro volta associate ad alterazioni della fertilità maschile.

Bibliografia

1. Rajpert-De Meyts E, Toppari J, Skakkebaek NE. Testicular tumours with endocrine manifestations. In: DeGroot LJ, Jameson JL (Ed.). *Endocrinology*. 4th ed. Philadelphia: Saunders, 2001. p. 2351-6.
2. European Commission. *European workshop on the impact of endocrine disruptors on human health and wildlife. Report of proceedings, Weybridge, UK, 2-4 December 1996*. (EUR 17549). European Commission; 1996.
3. Schnack TH, Poulsen G, Myrup C, Wohlfahrt J, Melbye M. Familial coaggregation of cryptorchidism, hypospadias, and testicular germ cell cancer: a nationwide cohort study. *J Natl Cancer Inst* 2010;102:187-92.
4. Rajpert-De Meyts E. Developmental model for the pathogenesis of testicular carcinoma in situ: genetic and environmental aspects. *Hum Reprod* 2006;12:303-23.
5. Dalgaard MD, Weinhold N, Edsgård D, Silver JD, Pers TH, Nielsen JE, Jørgensen N, Juul A, Gerds TA, Giwercman A, Giwercman YL, Cohn-Cedermark G, Virtanen HE, Toppari J, Daugaard G, Jensen TS, Brunak S, Rajpert-De Meyts E, Skakkebaek NE, Leffers H, Gupta R. A genome-wide association study of men with symptoms of testicular dysgenesis syndrome and its network biology interpretation. *J Med Genet* 2012;49(1):58-65.
6. Lorenzetti S, Altieri I, Arabi S, Balduzzi D, Bechi N, Cordelli E, Galli C, Ietta F, Modena SC, Narciso L, Pacchierotti F, Villani P, Galli A, Lazzari G, Luciano AM, Paulesu L, Spanò M, Mantovani A. Innovative non-animal testing strategies for reproductive toxicology: the contribution of Italian partners within the EU project ReProTect. *Ann Ist Super Sanita* 2011;47(4):429-44.
7. Sharpe RM, Skakkebaek NE. Testicular dysgenesis syndrome: mechanistic insights and potential new downstream effects. *Fertil Steril* 2008;89(2Supl.):e33-8.
8. Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Main KM. Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Hum Reprod* 2001;16(5):972-8.
9. Toppari J. Environmental endocrine disruptors. *Sex Dev* 2008;2(4-5):260-77.
10. Van den Driesche S, Kolovos P, Platts S, Drake AJ, Sharpe RM. Inter-relationship between testicular dysgenesis and Leydig cell function in the masculinization programming window in the rat. *PLoS One* 2012;7(1):e30111.
11. Olsson AY, Lundwall A. Organization and evolution of the glandular kallikrein locus in *Mus musculus*. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;299(2):305-11.
12. Horoszewicz JS, Leong SS, Kawinski E, Karr JP, Rosenthal H, Chu TM. LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer Res* 1983;43:1809-18.

13. Lorenzetti S, Marcoccia D, Narciso L, Mantovani A. Cell viability and PSA secretion assays in LNCaP cells: a tiered in vitro approach to screen chemicals with a prostate-mediated effect on male reproduction within the ReProTect project. *Reprod Toxicol* 2010;30(1):25-35.
14. Balk SP, Ko YJ, Bubley GJ. Biology of prostate-specific antigen. *J Clin Oncol* 2003;21:383-91.
15. Wohlfahrt-Veje C, Andersen HR, Jensen TK, Grandjean P, Skakkebaek NE, Main KM. Smaller genitals at school age in boys whose mothers were exposed to non-persistent pesticides in early pregnancy. *Int J Androl* 2012;35(3):265-72.
16. Reyes JG, Farias JG, Henríquez-Olavarrieta S, Madrid E, Parraga M, Zepeda AB, Moreno RD. The hypoxic testicle: physiology and pathophysiology. *Oxid Med Cell Longev*. 2012; doi:10.1155/2012/929285.
17. Du Plessis SS, Gokul S, Agarwal A. Semen hyperviscosity: causes, consequences, and cures. *Front Biosci* 2013;5:224-31.
18. Lee HR, Hyun SH, Jeung EB, Choi KC. Bisphenol A and phthalate enhanced the growth of prostate cancer cells and altered TGF- β signaling molecules via an estrogen receptor or androgen receptor-dependent pathway in in vitro and in vivo models. *Reprod Fertil Dev* 2012;25(1):245-6.
19. Levy G, Lutz I, Krüger A, Kloas W. Bisphenol A induces feminization in *Xenopus laevis* tadpoles. *Environ Res* 2004;94(1):102-11.
20. Lorenzetti S, Narciso L, Marcoccia D, Altieri I. A novel in vitro toxicological approach to identify chemicals with a prostate-mediated effect on male reproduction. *J Biol Res* 2011;84(1):36-41.