

Relazione tra esposizione a bisfenolo A e B ed endometriosi

L. COBELLIS, A. PANARIELLO, M.R. CAMPITIELLO, A. NOCERINO,
C. PACILIO, M.E. SALZILLO, M.A. CASTALDI, O. BOCCIA, A. BORRELLI

RIASSUNTO: Relazione tra esposizione a bisfenolo A e B ed endometriosi.

L. COBELLIS, A. PANARIELLO, M.R. CAMPITIELLO, A. NOCERINO, C. PACILIO, M.E. SALZILLO, M.A. CASTALDI, O. BOCCIA, A. BORRELLI

Obiettivi. I distruttori endocrini sono sostanze capaci di interferire con il sistema riproduttivo ed implicate nella patogenesi di patologie ginecologiche come l'endometriosi. I bisfenoli A e B (BPA e BPB) sono utilizzati nella sintesi della plastica ed ampiamente presenti nell'ambiente. L'obiettivo dello studio è valutare la correlazione tra esposizione a BPA e BPB e comparsa di endometriosi.

Materiali e metodi. Attraverso analisi di HPLC e spettrometria di massa sono stati identificati e quantificati BPA e BPB nel siero di 51 donne sane e 58 con diagnosi laparoscopica di endometriosi.

Risultati. I livelli di bisfenolo sono risultati inferiori al limite di quantificazione (LOQ) in tutte le 51 pazienti sane, mentre nelle pazienti affette da endometriosi il BPA è stato ritrovato in 30 soggetti ed il BPB in 16, sebbene sia stato possibile quantificarli, rispettivamente, solo in 15 e 10 campioni nei quali il livello degli analiti era superiore al LOQ.

Conclusioni. Questi risultati suggeriscono l'esistenza di una relazione tra endometriosi e concentrazioni ematiche di BPA e di BPB e quindi esposizione a tali agenti.

SUMMARY: Relationship between endometriosis and exposure to BPA and BPB.

L. COBELLIS, A. PANARIELLO, M.R. CAMPITIELLO, A. NOCERINO, C. PACILIO, M.E. SALZILLO, M.A. CASTALDI, O. BOCCIA, A. BORRELLI

Background. Endocrine disruptors are substances which are able to interfere with the female reproductive system and are possibly implicated in the development of some gynaecologic pathologies such as endometriosis. Bisphenol A and B (BPA and BPB) are used in the synthesis of plastics and widespread in the environment. The aim of this study was to assess the relationship between endometriosis and exposure to BPA and BPB.

Material and methods. A sensitive HPLC method with fluorescence detection and mass spectrometry was developed for the determination of BPA and BPB in human blood serum from 51 healthy women and 58 patients with laparoscopic proven endometriosis.

Results. The analysis of sera from healthy and endometriotic women emphasized the absence of bisphenols in all the 51 healthy patients, whereas BPA was found in 30 sera and BPB was found in 16 sera in the group of 58 patients with endometriosis.

Conclusions. Our results suggest the existence of a relationship between endometriosis and BPA and/or BPB exposure.

KEY WORDS: Endometriosi - Interferenti endocrini - Bisfenolo A - Bisfenolo B - HPLC - Spettrometria di massa.
Endometriosis - Endocrine disruptors - Bisphenol A - Bisphenol B - HPLC - Mass spectrometry.

Introduzione

L'endometriosi è una patologia complessa ed enigmatica i cui aspetti eziopatogenetici rimangono scarsamente delucidati (1). Tra le possibili cause sono diversi gli studi che ipotizzano il ruolo di specifici inquinanti ambientali, ed in particolare degli interferenti endocri-

ni (EDs) dei quali è stata sperimentalmente evidenziata la capacità di interagire con il sistema riproduttivo. Recenti ricerche hanno riguardato i bisfenoli A e B, due EDs ai quali l'uomo è esposto con elevata frequenza e che agiscono con una duplice funzione, sia da antagonisti recettoriali che da attivatori della trascrizione genica (2, 3). Il bisfenolo A (BPA) ha assunto particolare rilievo tra gli interferenti endocrini a causa della sua ampia distribuzione in un'ampia varietà di prodotti di consumo (contenitori metallici, barattoli per uso alimentare, adesivi, stabilizzanti per il PVC); ulteriori applicazioni sono la produzione di ritardanti di fiamma, di rivestimenti protettivi e materiali compositi impiegati nel settore odontoiatrico (4-6) nonché l'impiego come additivi nell'in-

dustria farmaceutica (7, 8). L'obiettivo dello studio è valutare la correlazione tra esposizione a BPA e BPB e comparsa di endometriosi.

Materiali e metodi

Pazienti

Sono state selezionate 109 donne, in età fertile, affette da dismenorrea, dolore pelvico cronico o con diagnosi ultrasonografica di cisti ovarica. Le pazienti sono state sottoposte a laparoscopia diagnostica ed in rapporto all'esito dell'intervento sono stati definiti due gruppi: il primo costituito da 58 donne con diagnosi laparoscopica di endometriosi confermata istologicamente e stadiale, di età compresa tra i 21 ed i 42 anni (gruppo pazienti); il secondo comprendente 51 donne sane di età compresa tra i 18 ed i 44 anni (gruppo controllo).

A ciascuna paziente è stato somministrato un questionario al fine di raccogliere informazioni utili per l'analisi statistica dei risultati, ovvero dati riguardanti stile di vita, attività quotidiane e lavoro. Per ciascun soggetto reclutato nello studio (pazienti e controlli) sono stati raccolti 5ml di sangue in provette di vetro (Vacu-test) al fine di evitare la contaminazione dei campioni ematici dai bisfenoli eventualmente rilasciati da contenitori in plastica. Le provette sono state centrifugate a 3000 rpm per 20 minuti ed il surnatante trasferito in *vials* di vetro. È stato, successivamente, riportato per ciascun siero il codice identificativo della paziente corrispondente ed i campioni sono stati congelati a -20°C per un tempo massimo di una settimana.

Metodi

Lo standard di bisfenolo A (purezza minima $\geq 99\%$) è fornito dalla Sigma-Aldrich (UK) mentre il bisfenolo B (purezza minima $\geq 99\%$) dalla TCI Europa (Zwijndrecht, Belgium). Tutti i reagenti e le sostanze chimiche utilizzate per entrambi gli analiti in esame e per l'HPLC sono della Carlo Erba (Milano, Italia).

Il sistema HPLC/FL utilizzato per la determinazione di BPA e BPB in matrice ematica è costituito da una pompa LC 10ADVP (Shimadzu, Giappone), un iniettore 7725 con un loop da 20 μL (Rheodyne, Cotati, USA) ed un detector a fluorescenza (Waters 470). Il tampone utilizzato come fase mobile è costituito da una miscela di acetonitrile/tampone fosfato a pH 6.0 (35:65 v/v); la colonna cromatografica impiegata è una C-18 Onyx Monolithic (100x4.6 mm) fornita dalla Phenomenex (USA). Lo spettrometro di massa utilizzato per identificare univocamente gli analiti separati mediante analisi HPLC/FL è uno spettrometro API 2000 a triplo-quadrupolo dotato di una sorgente ESI (Elettrospray ionization source) della Applied Biosystem (MDS Scienx, Foster City, CA, USA).

Trattamento dei campioni

Allo scopo di evitare procedure di estrazione complesse è stata utilizzata nel presente studio una colonna cromatografica (per l'analisi HPLC/FL dei sieri) con una fase stazionaria di tipo monolitico; questo tipo di fase è scarsamente influenzata dalla presenza di interferenze dovute alla matrice biologica e ciò ha consentito di mettere a punto una procedura di estrazione rapida e di semplice utilizzo.

I campioni, pertanto, sono stati trattati secondo il seguente protocollo: 300 μL di siero sono stati aggiunti a 150 μL di una miscela di acetonitrile/tampone fosfato (35:65 v/v) a pH 6.0; sono stati, successivamente, aggiunti 150 μL di acido perclorico (25% w/v) al fine di far precipitare le proteine. La miscela così ottenuta è stata agitata su vortex per 10 secondi e centrifugata a 3000 rpm per 5 min. Il surnatante è stato raccolto ed utilizzato per l'analisi mediante HPLC/FL.

Analisi mediante cromatografia liquida con rivelatore a fluorescenza (High Performance Liquid Chromatography) (HPLC/FL)

La HPLC è una tecnica che consente di separare analiti anche in miscele complesse in tempi brevi ed è caratterizzata da un elevato potere risolutivo; ogni sostanza, infatti, raggiunge il rivelatore ben separata dalle altre e tutti i componenti della miscela vengono eluiti in pochi minuti. La miscela viene fatta eluire all'interno di una colonna pre-impaccata in grado di legare specifiche sostanze e rilasciarle poi in tempi differenti determinando i tempi di ritenzione (RT, *Retention Time*) caratteristici per ogni molecola e dipendenti dalla diversa affinità che la sostanza ha nei confronti sia della fase mobile sia della fase stazionaria. La separazione e la determinazione del BPA e BPB sono state eseguite utilizzando una colonna C-18 a fase-inversa Onyx Monolithic (100x 4.6 mm) ed una fase mobile costituita da una miscela di acetonitrile/tampone fosfato a pH 6.0 (35:65 v/v). Per ogni analisi HPLC/FL sono stati iniettati 20 μL di campione, eluiti con un flusso di 1 ml/min. L'eluato della colonna cromatografica è stato direttamente connesso alla cella di riferimento del rivelatore fluorimetrico utilizzando una lunghezza d'onda di eccitazione (ex) di 273 nm e registrando la risposta strumentale ad una lunghezza d'onda di emissione (em) di 300 nm.

Tale metodo ha consentito la completa separazione di BPA e BPB caratterizzati da un tempo di ritenzione di 9.57 ± 0.30 min e 12.01 ± 0.40 min, rispettivamente (Fig. 1). Sono state costruite delle rette di taratura analizzando soluzioni standard a concentrazione nota e decrescente di bisfenolo A e bisfenolo B riportando sull'asse delle ascisse la concentrazione degli analiti (ng/ml) e sull'asse delle ordinate l'area del picco cromatografico. Le equazioni delle rette ottenute sono state utilizzate per la quantificazione degli analiti nei campioni reali. Sono stati va-

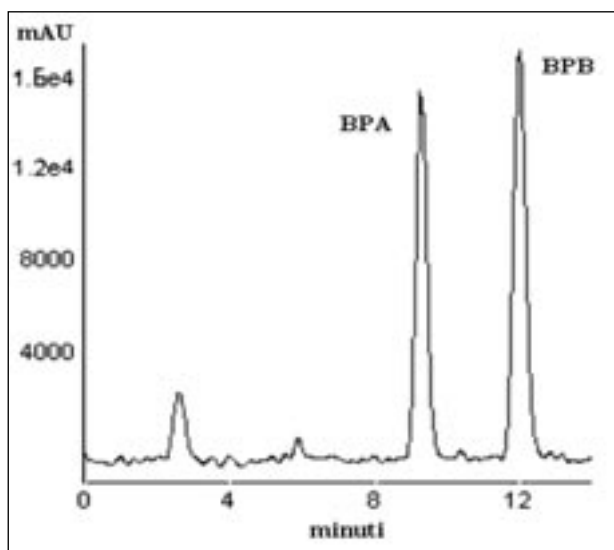


Fig. 1 - Cromatogramma HPLC/FL di una soluzione standard di BPA e BPB.

lutati i limiti di rivelabilità (LOD) e di quantificazione (LLOQ) del metodo analizzando campioni contenenti BPA e BPB a concentrazioni decrescenti e valutando i rapporti segnale/rumore dei picchi cromatografici ottenuti dalle analisi. I valori di LLOQ ed LOD ottenuti sono stati 0.50 e 0.15ng/ml per il BPA e 0.60 e 0.18ng/ml per il BPB.

Identificazione degli analiti mediante spettrometria di massa

La spettrometria di massa è una tecnica che consente di determinare la struttura delle sostanze in esame mediante la misura del rapporto massa/carica (m/z) dell'analita. I nostri esperimenti sono stati condotti su uno spettrometro di massa a triplo-quadruplo accoppiato con una sorgente ESI (*Elettrospray ionization source*). Dopo l'analisi HPLC/FL dei campioni reali provenienti dal gruppo delle pazienti e da quello dei controlli, le sostanze eluite ai tempi di ritenzione degli analiti sono state analizzate mediante spettrometria di massa al fine di identificare e confermare la presenza di BPA e BPB. Le analisi sono state condotte usando i seguenti parametri: voltaggio della sorgente ionica 5000V, temperatura del gas 250°C, voltaggio di collisione 40 V, voltaggio di ingresso 10 V, voltaggio del cono 200 V. Gli spettri di massa sono stati acquisiti in modalità negativa nell'intervallo di 100-600 m/z (*full scan*).

Risultati

L'utilizzo nel presente studio di una colonna cromatografica (per l'analisi HPLC/FL dei sieri) con una fase stazionaria di tipo monolitico ha consentito di condur-

re in maniera semplice e veloce sia le analisi qualitative sia quantitative dei bisfenoli. Questo tipo di fase stazionaria, infatti, è scarsamente influenzata dalla presenza di interferenze dovute alla matrice biologica; i metaboliti del sangue, pertanto, non hanno interferito in alcun modo con le analisi cromatografiche. Le metodiche analitiche messe a punto sono state utilizzate per l'analisi dei 109 campioni di siero provenienti da soggetti sani (controlli) e da soggetti affetti da endometriosi (pazienti).

Nella Figura 2 è riportato un esempio dei cromatogrammi ottenuti dall'analisi HPLC/FL di un campione controllo e di un campione proveniente dal gruppo delle pazienti. Il primo cromatogramma mostra l'assenza di picchi ai tempi di ritenzione degli analiti (9.57 min e 12.01 min) (a); il secondo, invece, mostra la presenza di entrambi i bisfenoli (b). La presenza di entrambi o di uno solo dei bisfenoli all'interno dei campioni è stata con-

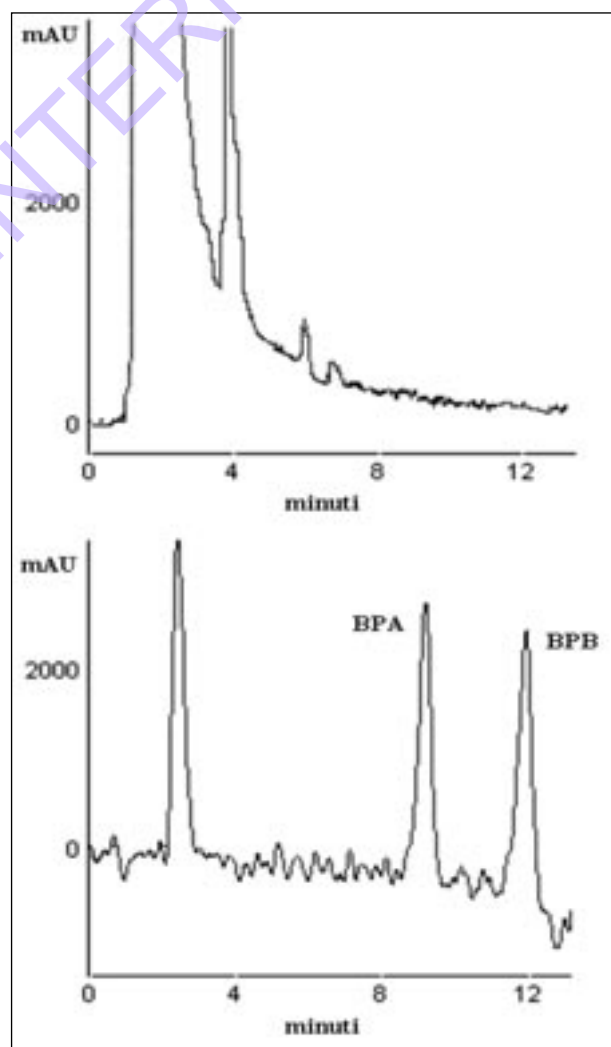


Fig. 2 - Cromatogramma relativo all'analisi HPLC/FL di: a) campione controllo; b) campione paziente con endometriosi.

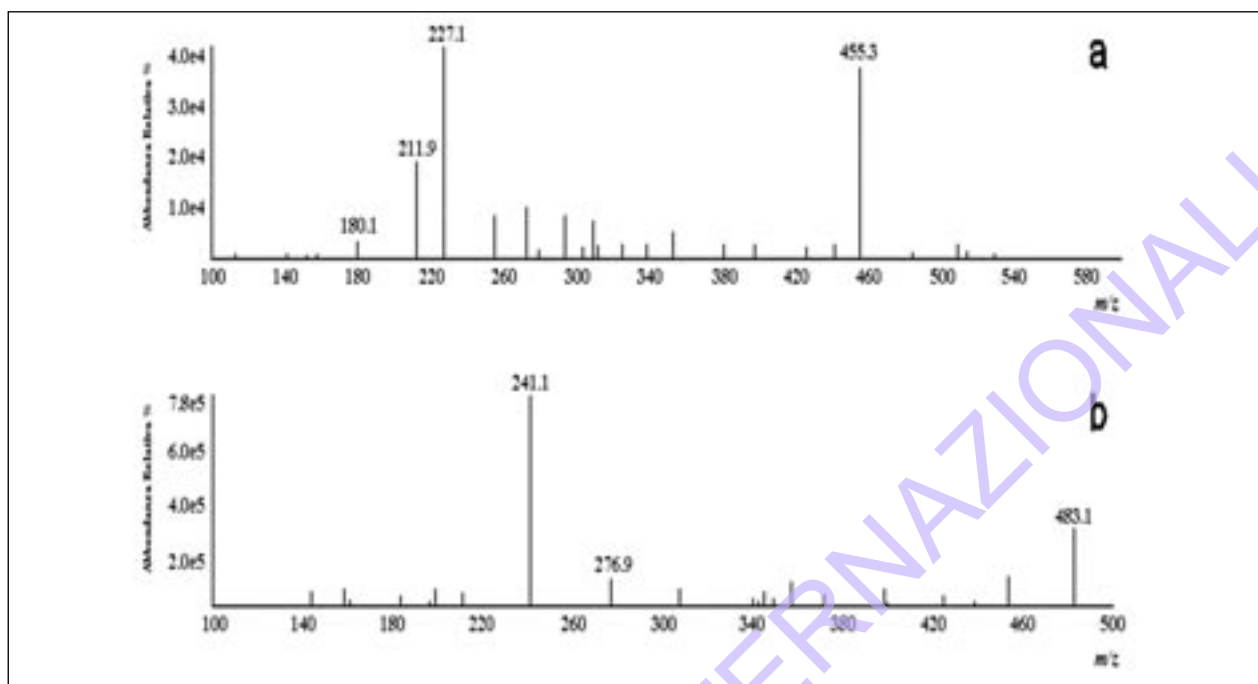


Fig. 3 - Spettri di massa full scan del BPA (a) e del BPB (b).

fermata dall'analisi mediante spettrometria di massa. Nella Figura 3 sono mostrati gli spettri di massa di BPA (a) e BPB (b) ottenuti dall'analisi ESI-MS (*full scan*, modalità negativa) di un campione di siero prelevato da paziente affetta da endometriosi. I livelli di concentrazione di BPA e BPB presenti nei campioni sono stati determinati dalle equazioni delle rette di taratura precedentemente costruite, ovvero inserendo nell'equazione, al posto della y, il valore dell'area del picco cromatografico ottenuto dall'analisi HPLC/FL e risolvendo l'equazione per il valore della x.

Dall'analisi e dalla quantificazione dei campioni raccolti sono stati ottenuti i seguenti risultati:

- i 51 campioni di siero dei controlli sono risultati con livelli di BPA e BPB inferiori al limite di quantificazione (LOQ) del metodo analitico utilizzato, pari a 0.5 ng/ml e 0.6 ng/ml, rispettivamente;

- dei 58 campioni di siero delle pazienti con endometriosi, il BPA è stato ritrovato in 30 soggetti, ovvero nel 51.7% dei casi, ma è stato possibile quantificarlo solo in 15 campioni nei quali il livello degli analiti era superiore al limite di quantificazione (LOQ) pari a 0.5 ng/ml; è stato ottenuto un range di concentrazione di 0.79-7.12ng/ml ed una concentrazione media di 2.91ng/ml. Per i restanti 15 campioni sono stati ottenuti valori di concentrazione inferiori al limite di quantificazione;

- il BPB, invece, è stato ritrovato in soli 16 campioni di siero delle pazienti con endometriosi, ovvero nel 27.6% dei casi analizzati, ma quantificato in soli 10 cam-

pioni che presentavano livelli di analita superiori al limite di quantificazione (LOQ) pari a 0.6 ng/mL: è stato ottenuto, in questo caso, un range di concentrazione di 0.88-11.94ng/ml ed una concentrazione media di 5.15ng/ml;

- in 9 dei 58 campioni di siero analizzati, inoltre, sono stati ritrovati entrambi gli analiti.

Conclusioni

Nel presente lavoro di ricerca sono state applicate metodologie di HPLC e di spettrometria di massa per l'identificazione di BPA e BPB nel siero, al fine di individuare una possibile correlazione tra il loro livello di concentrazione e la patologia. I risultati ottenuti confermano, come da noi ipotizzato, la presenza di bisfenolo (BPA 51.7%; BPB 27.6%) nei 58 campioni di siero prelevato da donne affette da endometriosi, suggerendo l'esistenza di una relazione tra comparsa di endometriosi e presenza nel sangue di BPA e di BPB e quindi di esposizione a tali agenti.

L'ampia variabilità dei risultati positivi ottenuti (range di concentrazione di bisfenolo: 0.79-11.94 ng/ml) suggerisce, inoltre, che i livelli di concentrazione di bisfenolo possano essere correlati allo stadio di malattia. La conferma che i bisfenoli siano direttamente coinvolti nella patogenesi dell'endometriosi, comunque, richiede ulteriori indagini analitiche ed epidemiologiche.

Bibliografia

1. Ozkan s, Murk W, Aarici A. Endometriosis and infertility: epidemiology and evidence-based treatments. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1127:92-100.
2. Cobellis L, Latini G, De Felice C, Razzi S, Paris I, Ruggieri F, Mazzeo P, Petraglia F. High plasma concentrations of di-(2-ethylhexyl)-phthalate in women with endometriosis. *Human Reproduction* 2003; 18: 1512-1515.
3. Dekant W, Völkel W. Human exposure to bisphenol A by biomonitoring: methods, results and assessment of environmental exposures. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008; 228 (1): 114-34
4. Dash C, Marcus M, Terry PD. Bisphenol A: do recent studies of health effects among humans inform the long-standing debate? *Mutat Res* 2006; 613(2-3):68-75.
5. Kang Jh, Kondo K, Katayama Y. Human exposure to bisphenol A. *Toxicology* 2006;226(2-3):79-89.
6. Mahalingaiah S, Meeker Jd, Pearson Kr, Calafat Am, Ye X, Petrozza J, Hauser R. Temporal variability and predictors of urinary bisphenol A concentrations in men and women. *Environ Health Perspect.* 2008 Feb;116(2):173-8.
7. Jenkins S, Olive DL, Haney AF. Endometriosis: pathogenetic implications of anatomic distribution. *Obstetrics and Gynecology* 1986; 67: 335-338.
8. Oral E, Arici A. Pathogenesis of endometriosis. *Obstetrics and Gynecology Clinic of North America* 1997; 24: 219-233

© CIC EDIZIONI INTERNAZIONALI