

POSTER BOOK

**Primo workshop del progetto
"Studio in aree pilota sui riflessi ambientali e
sanitari di alcuni contaminanti chimici emergenti
(interferenti endocrini): ambiente di vita, esiti
riproduttivi e ripercussioni nell'età evolutiva
(PREVIENI)"**

**INTERFERENTI ENDOCRINI: DAI BIOMARKER
ALLA VALUTAZIONE DEL RISCHIO:
IL PROGETTO PREVIENI**

**27 ottobre 2009
Istituto Superiore di Sanità, Roma.**

LIVELLI DI PCB E PBDE IN CAMPIONI DI LATTE MATERNO A ROMA

Silvia Alivernini (a), Luigi Turrio Baldassarri (b), Chiara Laura Battistelli (b)

(a) Centro Nazionale Sostanze Chimiche, Istituto Superiore di Sanità, Roma

(b) Dipartimento Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma

I policlorobifenili (PCB) e polibromodifenileteri (PBDE) sono composti organici aromatici alogenati caratterizzati da elevata stabilità, lipofilicità e persistenza. Si accumulano nella catena alimentare e sono caratterizzati da una presenza ambientale ubiquitaria nei sistemi biologici e negli alimenti.

L'interesse verso questi composti è determinato dagli effetti tossici che provocano sull'uomo. I principali effetti dei PCB sono dermatossicità, epatotossicità, immunotossicità, disfunzioni della funzionalità riproduttiva, alterazione del sistema endocrino ed effetti cancerogeni. I dati di tossicità sui PBDE sono ancora scarsi ma evidenziano disordini nello sviluppo neuronale, effetti a carico del sistema epatico e della tiroide, interferenze nel sistema endocrino.

La principale via di esposizione a PCB e PBDE è la dieta. L'allattamento al seno costituisce la via principale di escrezione dei PCB e dei PBDE che vengono accumulati oltre che nel tessuto adiposo anche nel latte materno a causa della loro elevata lipofilicità. Il latte materno rappresenta per il bambino una grande via di esposizione a queste sostanze nel periodo dell'allattamento e per questo può essere considerato sia un vettore che un indicatore di esposizione a queste sostanze.

In questo studio sono stati determinati i livelli di PCB e PBDE in 13 campioni di latte materno prelevato al terzo mese di allattamento tra il 2005 e il 2007 da donatrici primipare, che hanno vissuto almeno gli ultimi 10 anni a Roma.

I livelli dei PCB determinati nel latte materno sono in linea con quelli osservati in studi italiani ed europei degli ultimi anni. In particolare negli ultimi 20 anni si nota una diminuzione nel tempo dovuto all'adozione di un ampio numero di misure legislative che ne hanno disciplinato la produzione, lo smaltimento, la diffusione anche accidentale nell'ambiente.

I livelli dei PBDE ottenuti sono notevolmente più bassi di quelli relativi ai PCB ed anche per questo affetti da una maggior incertezza analitica. I livelli di alcuni congeneri dei PBDE sono in linea con quelli trovati negli altri paesi europei. Nel caso dei PBDE è difficile evidenziare una tendenza temporale e vista l'aumentata produzione negli ultimi anni è necessario proseguire nel monitoraggio dei livelli di tali sostanze.

RISCHIO-BENEFICIO DEL PESCE: QUANDO IL CONSUMATORE NON SA PIÙ CHE PESCI PRENDERE

Francesca Baldi, Reparto di Tossicologia Alimentare e Veterinaria – Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare. ISS. Francesca.baldi@iss.it

Il consumo di pesce è spesso raccomandato quale componente importante di una dieta sana; tuttavia nel nostro paese, benché patria della dieta mediterranea, tale raccomandazione sembra piuttosto disattesa. La spiegazione potrebbe trovarsi nei gusti e tradizioni culinarie differenti ma anche il costo spesso elevato del pesce e dei frutti di mare in genere (anche se il pesce azzurro, il più consigliato, è molto economico); spesso, però, è anche la preoccupazione per eventuali rischi per la salute derivanti da sostanze contaminanti, in seguito ad allarmi veri o presunti rilanciati periodicamente dai media, a farci rinunciare al consumo di alimenti ittici. Un rischio concreto è che, tra le sollecitazioni a consumare di più questo alimento e l'evocazione di pericoli per la salute, il consumatore non sappia più che pesci pigliare!

La presenza elevata di alcuni contaminanti come il metilmercurio, le diossine, i bifenili policlorurati (PCB) ed altri meno noti, ma indicati dall'EFSA quali **organostannici, PBDE, PFOS/PFOA**: il consumo di alcune specie ittiche può essere un rischio per la salute.

I benefici derivanti dal consumo di una/due porzioni di pesce la settimana, sarebbero superiori ai possibili danni alla salute derivanti dai contaminanti. Soprattutto se il pesce è ricco di PUFA (EPA, DHA: uova di pesce, salmone). Tra i possibili danni alla salute vi sono quelli derivanti dall'eliminazione del pesce dalla dieta: mancato effetto protettivo cardiovascolare e conseguenze negative per lo sviluppo cerebrale infantile.

Differenze tra pesce di allevamento e pesce selvatico

Pesci prevalentemente/esclusivamente da allevamento: salmone, trota iridea, carpa; pesci prevalentemente pescati: tonno, pesce azzurro (aringa, acciuga, sgombro e sardina).

Non esistono grandi differenze tra il pesce selvatico e il pesce di allevamento, in termini sia di sicurezza sia di apporto nutrizionale ad eccezione del salmone del Baltico allevato che è **meno contaminato** di quello pescato.

I livelli di nutrienti e di contaminanti del pesce dipendono in gran parte da: specie, stagione, luogo, dieta, fase di vita ed età. Questi livelli variano ampiamente all'interno di una stessa specie e passando da una specie all'altra, sia per i pesci selvatici che per quelli di allevamento. (EFSA 2004).

Cosa si può fare per ridurre l'esposizione a contaminanti liposolubili nell'acquacoltura:

Contenuto di PCB nella spigola e condizioni di allevamento: Il contenuto di PCB è minore nella spigola allevata estensivamente rispetto a quella allevata seminintensivamente e intensivamente. Anche a parità di peso, il grasso di pesce allevato intensivamente contiene più PCB del grasso di pesce allevato estensivamente.

più il pesce è libero meno è grasso (aumenta la sua attività metabolica) quindi c'è un minore accumulo di contaminanti; inoltre la spigola di allevamento estensivo ha anche minore possibilità di contatto con le deiezioni ed i resti di mangime. (Trocino et al. 2009)

- **Ridurre il contenuto di contaminanti nei mangimi** L'aringa del Mar Baltico, ricca di diossine e PCB, viene usata per produrre mangime per il pesce pregiato (tipo salmone), esponendo il consumatore ad alti livelli di contaminanti. Trattamento delle aringhe con pH drastici (molto acidi o molto alcalini): si estrae molto grasso coi relativi contaminanti liposolubili una massa proteica con pochi lipidi e pochi contaminanti: meno rischioso l'utilizzo delle aringhe per i mangimi. (Marmon et al. 2009)
- **Progetto europeo AQUAMAX (<http://www.aquamaxip.org>)**

Sviluppo e valutazione rischio-beneficio di mangimi innovativi per acquacoltura basati su ingredienti vegetali, per ridurre il rischio di bioaccumulo di contaminanti. **Work in progress**

- **Emerge la necessità di azioni di RC rivolte ai mangimisti ed allevatori !**

Raccomandazioni per ridurre i contaminanti nel pesce

Come pulire e cucinare il pesce in modo da ridurre l'esposizione a contaminanti:

Contaminati liposolubili: tagliare le parti grasse togliendo la pelle e cuocendo correttamente il pesce:

- togliere la pelle poi rimuovere il grasso dalla pancia, dalla linea lungo i fianchi, il grasso lungo il dorso ed infine quello sotto la pelle
- Cucinare e/o mettere in ammollo il pesce non elimina i contaminanti, tuttavia il calore sprigionato attraverso la cottura scioglie parte del grasso facendo in modo che esso sgoccioli via.

Metodi di cottura consigliati:

- Cuoci alla griglia, allo spiedo, mediante bollitura o in forno su una griglia in modo che il grasso possa grondare via.
- Non usare il grasso sgocciolato per preparare salse e sughi.
- I liquidi di cottura (anche il brodo ottenuto dalla bollitura di pesce) non vanno utilizzati

Attenzione alla frittura mediante immersione in abbondante olio: perdita di peso nel pesce 25%-39%, ma aumento dei livelli di mercurio del 45%-75%, *soprattutto con panatura* (probabile riassorbimento dell'olio) (Burger et al. 2003)

- Non mangiare le interiora "roba verde" del granchio e aragosta: possono contenere alti livelli di contaminanti quali PCB, diossine e metalli pesanti.

Conclusioni

Attuare una efficace comunicazione del rischio (**CR**) per prevenire i rischi e massimizzare i benefici derivanti dal consumo di pesce.

Un valido esempio: il sito dell'EPA - US Environmental Protection Agency (<http://www.epa.gov/waterscience/fish/>) diretto al consumatore attraverso l'uso di una terminologia semplice, con interessanti brochure informative scaricabili (anche in lingua spagnola) **indirizzato anche ai bambini** attraverso un gioco interattivo "Fish Kids" nonché un opuscolo da colorare pieno di giochi.

Cercare di "imitare" questo tipo di CR anche in Italia, paese peraltro più piccolo degli USA ma non meno problematico per quanto concerne i rischi di esposizione a contaminanti attraverso la dieta. "Formare" il consumatore significa soprattutto metterlo in grado di attuare una efficace prevenzione che ridurrà le malattie d domani e, quindi, i costi del Sistema Sanitario Nazionale.

EFFETTI DEGLI INTERFENTI ENDOCRINI SULLA DIFFERENZIAZIONE DEL TROFOBLASTO UMANO

Bechi Nicoletta¹, Ietta Francesca¹, Romagnoli Roberta¹, Sorda Giuseppina¹, Bhattacharjee Jayonta¹, Spagnoletti Antonella¹, Paulesu Luana¹

¹*Dipartimento di Fisiologia, Università degli Studi di Siena, Via A. Moro- 53100, Siena, Italia*

bechi4@unisi.it

L'utilizzo industriale ed agricolo di vari prodotti chimici ed additivi alimentari causa il rilascio nell'ambiente di sostanze nocive per gli animali e l'uomo. In particolare, alcune sostanze definite come Interferenti Endocrini (IE) costituiscono un eterogeneo gruppo di contaminanti in grado di mimare l'azione di ormoni naturali ed interferire con il normale funzionamento del sistema endocrino rappresentando così un rischio per la salute riproduttiva. In questo studio abbiamo valutato l'effetto di IE ad azione estrogenica quali: l'Atrazina (ATR), il Bisphenol A (BPA), il dietilstilbestrolo (DES), il para-nonilfenolo (*p*-NP), il resveratrolo (RES) e l'ormone naturale 17 β -estradiolo (E2), sullo sviluppo della placenta umana. La placenta è l'organo che si interpone tra madre e feto e ne media gli scambi di nutrienti e sostanze di rifiuto. Poco si conosce circa l'effetto di IE sullo sviluppo di questo importante tessuto. In questo studio abbiamo utilizzato un modello *in vitro* di espianti di villo coriale da placente umane che ha il vantaggio, rispetto a colture di cellule isolate, di conservare le relazioni paracrine che intercorrono tra i vari componenti cellulari presenti nella placenta. Sottoponendo gli espianti al trattamento con gli agenti chimici a concentrazioni rilevabili a livello ambientale o con il solo veicolo, il solvente in cui l'agente chimico è disciolto (controllo), abbiamo esaminato l'effetto su vari parametri caratterizzanti lo sviluppo placentare. Tra questi, la differenziazione del trofoblasto, valutata mediante dosaggio della concentrazione dell'ormone Gonadotropina Corionica umana (β -hCG) nel medium di coltura e dell'apoptosi cellulare valutata mediante l'espressione delle forme clivate della caspasi-3. I risultati ottenuti hanno dimostrato che gli IE testati svolgono un prevalente effetto incrementante il rilascio di β -hCG da parte degli espianti placentari così come sull'apoptosi del trofoblasto. Questi dati indicano che gli IE possono alterare il normale equilibrio cellulare ed endocrino a livello della placenta e risultare quindi dannosi per la gravidanza e per lo sviluppo del feto.

Biomarcatori ed espressione genica: la scelta di opportuni “housekeeping genes” nello studio dell’esposizione a contaminanti ambientali.

Benedetto A. *, Abete M.C, Prearo M., Squadrone S.

Istituto Zooprofilattico del Piemonte, Liguria e Valle d’Aosta.
Via Bologna 148,
10154, Turin, Italy
creaa@izsto.it

Tra gli approcci disponibili per lo studio degli effetti dell’esposizione ai contaminanti ambientali in sistemi viventi, l’individuazione dei biomarkers costituisce uno dei principali mezzi d’indagine ecotossicologica. La possibilità di monitorare specificamente e precocemente i parametri biologici suscettibili (biomarkers di esposizione) e/o di risposta (biomarkers di effetto) ad eventi di esposizione a sostanze tossiche ha permesso la comprensione e l’approfondimento dei meccanismi biologici alla base dell’omeostasi dei viventi.

In ambito biomolecolare la scelta dei biomarkers passa solitamente attraverso uno screening preliminare dei geni che rispondono nel modello di laboratorio (animale vivo, colture cellulari, ecc..) agli eventi di esposizione sperimentale. Lo screening dei livelli di espressione di un gran numero di geni viene condotto attraverso la tecnica dei DNA Microarray; l’approfondimento e la validazione dei potenziali biomarkers genetici così individuati si conclude con l’analisi in Rt-qPCR, in grado di confermare quanto osservato in fase di screening.

La variazione dei livelli di espressione di specifici geni (up o down regolazione) rispetto ad altri geni caratterizzati da un’espressione basale costante sta alla base della corretta definizione di un biomarkers genetico. La verifica in PCR Real-Time di tali livelli di espressione e’ una tappa obbligata che richiede la normalizzazione degli esperimenti condotti sui biomarkers candidati in un numero di replicati (tecnici e soprattutto biologici) sufficienti contro dei target genetici definiti “Housekeeping”, cioè non suscettibili alle variazioni indotte dai trattamenti oggetto di studio sul modello animale utilizzato.

Nello studio da noi condotto per il monitoraggio di un pesticida organo fosforico (Chlorpyrifos) in ambiente acquatico e’ stato scelto come modello animale la trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*), su cui sono stati disegnati e validati 7 differenti saggi in Real Time PCR su altrettanti housekeeping genes, in grado di garantire, su diverse tipologie di campioni tissutali (fegato, SNC, rene, intestino, muscolo, sangue), un valido sistema di normalizzazione degli esperimenti di gene expression.

La valutazione dei potenziali biomarkers di stress da esposizione al pesticida studiato e’ stata effettuata tramite RT-qPCR secondo il metodo del $\Delta\Delta C_T$ confrontando, per ogni tipologia di campione biologico prelevato da soggetti esposti e non esposti a concentrazioni inferiori all’ LC₅₀ (96h) di Chlorpyrifos, l’espressione in fase acuta dei biomarkers scelti contro 7 diversi housekeeping genes.

Il disegno dei saggi e’ stato effettuato a partire delle sequenze reperite su GenBank® e sul portale G.R.A.S.P. (Genomics Research on All Salmon), scegliendo, dove possibile, regioni codificanti dei geni di interesse (esoni) intervallate da regioni introniche non codificanti, al fine di amplificare tramite Real Time PCR solo i cDNA retrotrascritti dall’RNA messaggero, escludendo eventuale DNA genomico contaminante. Successivamente e’ stata valutata tramite prove in curva standard il

range di linearità e l'efficienza di reazione dei saggi, in modo da accoppiare ai biomarkers in esame il/gli housekeeping genes più adatto/i.

Dai risultati preliminari finora ottenuti si e' dedotto quanto sia importante, a seconda del campione biologico in esame, vagliare scrupolosamente l'opportuna combinazione di housekeeping genes con i biomarker oggetto di studio per minimizzare il rumore analitico sui profili d'espressione, principalmente dovuto, piu' che alle caratteristiche dei saggi, alle differenze biologiche all'interno dei gruppi di animali studiati e soprattutto alla fase di campionamento.

Molteplici meccanismi esercitati dal Bisfenolo A come interferente degli ormoni steroidei femminili

Bolli, A., Bulzomi, P., Galluzzo, P., & Marino, M.

Dipartimento di Biologia, Università "Roma TRE" V.le G. Marconi 446, 00146, Roma.

Il Bisfenolo A (BPA) è attualmente considerato un esempio paradigmatico di interferente endocrino (ED) di origine ambientale, essendo in grado di interferire con la normale azione degli ormoni endogeni a concentrazioni inferiori alla soglia di tossicità. Si ritiene che le proprietà biologiche del composto siano principalmente dovute al suo legame all'isoforma α dei recettori degli estrogeni ($ER\alpha$), considerata il principale mediatore molecolare dell'incremento della proliferazione cellulare indotta da BPA. Ciononostante, due diverse isoforme degli ER sono presenti nei mammiferi, le quali mediano effetti opposti dell'ormone 17β -estradiolo (E2) rispetto alla proliferazione. In particolare, in diverse linee cellulari umane di cancro è stato evidenziato che $ER\alpha$ media le proprietà proliferative dell'ormone, mentre l'isoforma $ER\beta$ è responsabile degli effetti antiproliferativi di E2. Il presente lavoro descrive i meccanismi molecolari tramite i quali il BPA è in grado di indurre proliferazione in diverse linee cellulari tumorali umane, quali cellule di adenocarcinoma della cervice uterina (HeLa) e cellule di carcinoma al colon (DLD-1). I risultati mostrano che sebbene il BPA sia in grado di legare entrambe le isoforme degli ERs con comparabile affinità gli effetti di questa sostanza sulla proliferazione divergono a seconda dell'isoforma presente. Infatti, analogamente ad E2, il BPA promuove l'incremento della proliferazione cellulare nelle cellule HeLa (overesprimenti $ER\alpha$) innescando le stesse vie di trasduzione di segnale. D'altra parte, nelle DLD-1 (contenenti $ER\beta$ endogeno) il BPA non ha effetti, ma questo composto abolisce completamente gli effetti pro-apoptotici di E2. Concludendo, il BPA agisce come un composto mimetico di E2 in presenza di $ER\alpha$, inducendo la proliferazione di cellule di cancro, e come antiestrogeno in presenza di $ER\beta$, bloccando completamente gli effetti protettivi esercitati dal complesso E2: $ER\beta$ sulla crescita tumorale. Tali risultati mettono in luce un ulteriore livello di complessità nei meccanismi molecolari alla base degli effetti del BPA nell'indurre la proliferazione in cellule di cancro. Inoltre, questo composto, silenziando selettivamente le attività di $ER\beta$, potrebbe determinare effetti deleteri maggiori in quei tessuti in cui il complesso E2: $ER\beta$ esercita un'influenza protettiva, quali il sistema nervoso e il colon.

Accumulo dei polibromodifenileteri (PBDE) in esemplari di tonno rosso (*Thunnus thynnus*) del Mar Mediterraneo

Borghesi Nicoletta, Corsolini Simonetta, Focardi Silvano

Dipartimento di Scienze Ambientali “G. Sarfatti”, Università degli Studi di Siena, via P.A. Mattioli, 4, I-53100 Siena, E-mail address: borghesi2@unisi.it

I polibromodifenileteri (PBDE) sono una classe di sostanze ampiamente utilizzate come ritardanti di fiamma nei materiali polimerici in cui si può ipotizzare un rischio di incendio (per es: prodotti elettronici, gommapiuma per tappezzeria, tappeti, materiale per la costruzione, ecc.). I PBDE furono introdotti sul mercato negli anni '60 e la loro richiesta crebbe rapidamente fino alla fine degli '70. Negli ultimi anni l'interesse riguardo l'utilizzo di questi composti e la loro tossicità negli animali è aumentato notevolmente, in quanto a causa del loro ampio utilizzo la loro presenza è stata riscontrata nelle matrici ambientali in tutto il mondo e anche nelle regioni polari. I ritardanti di fiamma bromurati bioaccumulano nei grassi e persistono negli organismi, inoltre biomagnificano attraverso la catena trofica fino ad arrivare alla popolazione umana. In anni recenti, alcune ricerche hanno dimostrato che le concentrazioni di PBDE stanno crescendo rapidamente sia nell'ambiente che nei tessuti umani e nei fluidi corporei. I principali effetti tossici dovuti ai PBDE sono associati ad alterazioni della tiroide e ai meccanismi di regolazione del bilancio ormonale, indicando un possibile rischio soprattutto per neonati e bambini.

L'utilizzo di alcune classi di PBDE, identificati come particolarmente a rischio (penta- e otta-BDE), è vietato o limitato nei paesi dell'Unione Europea e in alcuni stati degli Stati Uniti d'America. Per tutti i PBDE, invece, non ci sono limiti di legge per la presenza negli alimenti, tuttavia è importante monitorare i livelli di questi composti nell'ambiente e negli animali, con particolare attenzione a quelle specie che possono fare parte della dieta della popolazione umana.

In questo studio i livelli e il pattern di accumulo dei PBDE sono stati analizzati nel tessuto muscolare di tonno rosso (*Thunnus thynnus*) del Mar Mediterraneo. La concentrazione media dei PBDE negli esemplari analizzati era di 15 ng/g p.f. e risultava simile a quella riportata per altre specie di pesci dell'area mediterranea e di altre zone dell'Europa. Il BDE47 risultava il più abbondante (27%) seguito dai congeneri 126 e 100 (19% e 18%, rispettivamente). Le classi più abbondanti erano i penta-BDE e tetra-BDE (44% e 41%, rispettivamente). Gli esemplari di tonno rosso sono stati analizzati secondo il sesso degli organismi e le concentrazioni dei PBDE sono risultate statisticamente più elevate nelle femmine che nei maschi (18 e 13 ng/g p.f., rispettivamente; $p < 0,005$). Queste differenze possono essere dovute alla differente taglia degli organismi e al differente periodo del ciclo riproduttivo degli organismi analizzati.

Questi dati confermano la necessità di ulteriori monitoraggi dei livelli dei PBDE negli organismi del Mar Mediterraneo per capire meglio la natura della contaminazione soprattutto in specie destinate all'alimentazione umana.

Molecole di origine nutrizionale come interferenti endocrini: l'esempio del flavanone Naringenina.

Pamela Bulzomi, Alessandro Bolli, Maria Marino.

Dipartimento di Biologia, Università "Roma TRE" V.le G. Marconi 446, 00146, Roma.

Nel corso degli ultimi anni, la conoscenza delle funzioni pleiotropiche regolate dal 17 β -estradiolo (E2) in differenti organi e tessuti si è notevolmente ampliata. Al presente, è chiaro che molte delle funzioni cellulari regolate da E2 dipendono dal legame dell'ormone ai suoi recettori, ER α e ER β , i quali, essendo fattori di trascrizione attivati da legante, determinano la trascrizione dei geni responsivi all'ormone. Tuttavia, E2 è in grado di attivare anche cascate di segnale rapide in virtù della presenza di una piccola frazione di recettori sulla membrana plasmatica. Oltre al legante endogeno, i recettori degli estrogeni sono in grado di legare un'ampia gamma di molecole con strutture chimiche differenti. Tra queste, il flavanone Naringenina (Nar), presente in alte concentrazioni negli agrumi e nel pomodoro, è noto essere in grado di legare entrambe le isoforme del recettore degli estrogeni. Il nostro gruppo di ricerca ha precedentemente dimostrato che in presenza di ER β Nar si comporta come un agonista di E2, mimando gli effetti antiproliferativi dell'ormone in cellule di cancro, mentre, in presenza di ER α , Nar agisce come un antagonista meccanismo-specifico di E2, alterando la localizzazione di ER α sulla membrana plasmatica e, di conseguenza, prevenendo l'associazione di ER α con proteine di membrana (*i.e.*, caveolina 1), di segnale e adattatori molecolari (*i.e.*, C-Src, MNAR), eventi molecolari necessari all'attivazione delle vie rapide indotte da E2. Questi dati hanno quindi evidenziato la capacità di questo composto di origine nutrizionale di interferire selettivamente con le attività extranucleari di ER α . Questa isoforma di recettore media, d'altra parte, attività importanti per alcuni degli effetti protettivi esercitati dagli ormoni estrogeni nella fase fertile della vita femminile. Ad esempio, la capacità di E2 di indurre il differenziamento dei mioblasti è responsabile degli effetti protettivi esercitati da questo ormone nei confronti della degenerazione muscolare. Scopo di questo lavoro è stato quello di valutare la possibilità che Nar possa interferire con le vie di segnale rapide attivate da ER α anche nel tessuto muscolare (*e.g.*, mioblasti di ratto L6). I risultati ottenuti dimostrano che Nar, se somministrata con E2, blocca la capacità differenziante dell'ormone, disaccoppiando anche in questo tessuto l'attività di ER α , sostenendo fortemente il ruolo anti-estrogenico di Nar nei confronti di questa isoforma del recettore degli estrogeni. Pertanto particolare attenzione deve essere posta sull'effetto e sul meccanismo di azione di questi composti di origine nutrizionale, attualmente utilizzati e venduti come prodotti da banco in supermercati e farmacie in virtù dei loro effetti benefici.

INTERFERENTI ENDOCRINI NELLE ACQUE DESTINATE AL CONSUMO UMANO: VALUTAZIONE DELL'ATTIVITA' ESTROGENICA/ANTIESTROGENICA MEDIANTE E- SCREEN ASSAY

Canesi L., Fabbri, R., Gallo G.

DIBIO – Dipartimento di Biologia, Università di Genova, Corso Europa 26, 16132 Genova.
Laura.Canesi@unige.it

L'attività si inquadra nel progetto “Interferenti endocrini (ED) nelle acque destinate al consumo umano”, coordinato e patrocinato da FONDAZIONE AMGA (www.edinwater.com) e riporta i risultati sintetici delle prove di valutazione effettuate mediante il test *in vitro* E-SCREEN (cell proliferation assay), che utilizza una linea cellulare epiteliale di carcinoma mammario umano (cellule MCF/7) particolarmente responsivo agli estrogeni, in quanto sovraesprime entrambe le isoforme dei recettori per gli estrogeni ER α ed ER β .

In queste cellule, estrogeni naturali come il 17 β -estradiolo (E2), estrogeni sintetici (17 α -Ethinilestradiolo, Estrone) ed interferenti endocrini ad azione estrogenica (quali ad es: alchilfenoli) inducono la proliferazione cellulare. Dei test *in vitro* utilizzati per lo screening degli interferenti endocrini ad azione estrogenica/antiestrogenica, l'E-SCREEN su rappresenta il più elevato livello di complessità biologica (Soto et al. 1995. Environ. Health Perspect. 103:113-122).

L'attività sperimentale del gruppo ha avuto come obiettivo iniziale quello di valutare la sensibilità e specificità del test nel rilevare gli analiti scelti per la sperimentazione, anche in funzione del solvente scelto per le soluzioni sulle procedure sperimentali, e l'applicabilità del test per testare gli estratti di matrici acquose. Successivamente, l'E-SCREEN è stato utilizzato per valutare estratti provenienti da campioni di acqua in Entrata e in uscita dagli impianti di potabilizzazione al fine di valutare l'efficienza del trattamento nella rimozione di eventuali IE ad azione estrogenica/antiestrogenica presenti nei campioni.

In tutti i campioni è stato valutato il l'effetto proliferativo (PE) come indice di Estrogenicità degli estratti confrontato con quello dell'estrogeno naturale E2. Contemporaneamente è stata valutata anche l'Anti-estrogenicità come percentuale di inibizione dell'effetto proliferativo massimo indotto dall'E2 da parte di un campione.

I dati ottenuti utilizzando gli estratti forniti da un acquedotto del Nord-Italia hanno permesso di confermare che il saggio di E-SCREEN può essere utilizzato con successo nella determinazione della ATTIVITA' ESTROGENICA ed ANTIESTROGENICA di sostanze contenute nell'acqua potabile. Il saggio permette di evidenziare l'eventuale rimozione/addizione di potenziali IE durante il trattamento di potabilizzazione. Sono in corso le analisi per la valutazione di campioni provenienti da altri acquedotti che partecipano al progetto.

LA VALUTAZIONE MORFOFUNZIONALE DELLA TIROIDE NEL GABBIANO REALE MEDITERRANEO (*LARUS MICHAHELLIS*) QUALE BIOMARKER DI CONTAMINANTI AMBIENTALI AD INTERFERENZA ENDOCRINA.

CECCHERELLI R^{1*}, RONCETTI G², PESARO S¹, RENZONI G¹, LUBAS G², GAMBI R¹,
PREZIUSO F², ROSSI G¹

¹Università di Camerino, Facoltà di Scienze Veterinarie. Matelica, ITALY; lindaerenato@libero.it

²Università di Pisa, Facoltà di Medicina Veterinaria. Pisa, ITALY

ABSTRACT

A differenza di altre città del nord Europa, la nidificazione del gabbiano reale (*Larus michahellis*) nelle città italiane è un fenomeno abbastanza recente ma in forte aumento come dimostrano i rilevamenti in alcune città come Trieste e Roma (Benussi et al., 1994; Benussi e Bembich, 1998; Varrone e Fraticelli, 2002).

Le abitudini alimentari di questa specie, particolarmente adattabile, sono note a tutti. Una specie piscivora che negli anni si è trasformata in onnivora adattandosi a qualsiasi fonte alimentare: dai piccioni catturati a terra, a giovani rondoni catturati in volo fino a scarti trovati in discarica. Proprio questo adattamento ha portato la specie a contatto molto stretto con l'uomo e soprattutto con i suoi prodotti di scarto. Senza dubbio, in questa ottica, il gabbiano reale può essere considerato un importante bioaccumulatore di tossici ambientali.

Come dimostrato in diversi studi (Boas M. et al. 2006, Saita E. et al. 2004), la struttura morfofunzionale della tiroide nelle specie aviari è significativamente alterata da inquinanti ambientali. In funzione di queste evidenze scientifiche è nato il nostro studio il cui scopo è stato quello di valutare le alterazioni della funzionalità tiroidea dei gabbiani in un centro di recupero ai fini di monitorare indirettamente la possibile presenza di alcuni contaminanti ambientali. Lo studio sull'attività endocrina della tiroide nel gabbiano reale (*Larus michahellis*) si è svolto durante il periodo 2007-2008, presso le strutture del CRUMA-LIPU (Centro Recupero Uccelli Marini e Acquatici). I principali obiettivi di questo studio sono stati: individuare il fisiologico range della concentrazione del TT4 e del fT4 nel plasma del gabbiano reale mediterraneo (*Larus michahellis*); valutare una possibile correlazione fra concentrazione ormonale e stato istologico dell'organo. A questo proposito sono stati esaminati 50 gabbiani tramite prelievo ematico per la valutazione della concentrazione del TT4 e del fT4. Previa anestesia con isofluorano, sono state eseguite quindi due celioscopie: una per l'identificazione del sesso con metodica standard e l'altra per effettuare una biopsia tiroidea con accesso craniale attraverso il sacco aereo clavicolare. Sono state infine correlate la concentrazione della tiroxina, il sesso dei soggetti, la loro età e lo stato istologico della tiroide, al fine di valutare la possibile influenza dell'ambiente sui parametri esaminati. Grazie all'ausilio dell'esame biotico è stato definito il range fisiologico della concentrazione del TT4 e del fT4 nel plasma del gabbiano reale in accordo con lo stato istologico della ghiandola. Dai risultati non è emersa alcuna relazione statisticamente significativa fra il sesso, l'età e la concentrazione ormonale dei soggetti analizzati, così come non è stata evidenziata relazione significativa fra alterazioni istologiche e concentrazione ormonale, pur osservando quadri patologici anche di rilievo a carico della ghiandola. Si può quindi concludere che: a) la valutazione della funzionalità tiroidea tramite il semplice dosaggio plasmatico di TT4 e fT4 non rappresenta un metodo valido per l'individuazione di condizioni di patologia della ghiandola; b) l'esame istologico, non alterando la funzionalità tiroidea (valutazione effettuata con doppio campione a 260 giorni), indica una percentuale interessante di alterazioni morfologiche della ghiandola e si attesta quale gold standard per la valutazione patologica della medesima (SCHMIDT, 2002); c) la valutazione delle alterazioni

morfofunzionali della tiroide nel gabbiano reale mediterraneo, specie fortemente sinantropa, può rappresentare un interessante test di rilevamento indiretto di inquinamento ambientale.

References

CROCE A, (2002): *Animali esotici da compagnia*. Poletto, Milano. Pp. 251-252;329;371;382;402-403;405;418;421;458-459;462-464.

MURRAY M.J. (1997): *Diagnostic Techniques in avian medicine*. *Seminars in avian and exotic pet medicine* 6; 2. Pp. 48-54.

SCHMIDT R. E. (2002): *Avian thyroid metabolism and diseases*. *Seminars in avian and exotic pet medicine* 11; 2. Pp 80-83.

McNabb F.M. & Fox G.A. 2003: *Avian thyroid development in chemically contaminated environments: is there evidence of alterations in thyroid function and development?* *Evolution and development* 5; 1. pp. 76-82. review.

SPECIAZIONE DELL'ARSENICO E VALUTAZIONE DEL RISCHIO: EVIDENZE SULL'ATTIVITA' ENDOCRINA DELL'ARSENICO INORGANICO

Silvia Ciardullo, Federica Aureli, Marilena D'Amato, Andrea Raggi, Francesco Cubadda
*Reparto Tossicologia Alimentare e Veterinaria, Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare,
Istituto Superiore di Sanità, Roma*

I composti dell'arsenico (As) esistenti in natura sono alcune decine e il bioaccumulo preferenziale di alcuni di essi in luogo di altri dipende da fattori biologici e ambientali. La speciazione dell'As, ovvero la sua distribuzione fra le diverse forme chimiche (specie), riveste un'importanza cruciale nella valutazione del rischio legato all'esposizione a questo elemento attraverso la dieta in quanto le diverse specie presentano differente tossicità. I composti inorganici dell'As sono potenti cancerogeni umani e un'esposizione cronica a queste specie determina numerosi altri effetti avversi quali ipercheratosi, ipertensione, diabete mellito e disturbi respiratori, neurologici, cardiovascolari. Fra le forme di arsenico inorganico, l'As trivalente è più tossico dell'As pentavalente. I composti mono e dimetilati dell'As pentavalente (acidi metilarsonico e dimetilarsonico) presentano tossicità inferiore, mentre gli analoghi trivalenti sono labili ma altamente tossici. I tiocomposti dell'As (dove un atomo di S sostituisce un atomo di O) sono più tossici degli analoghi contenenti ossigeno e sono oggetto di numerosi studi recenti riguardanti il loro ruolo nei processi metabolici che coinvolgono l'As. Vi è poi un gran numero di altre specie organiche dell'As che sono ritenute atossiche, anche se il numero di composti identificati è in continua crescita e alcuni di essi non sono pienamente caratterizzati dal punto di vista tossicologico.

Gli organismi marini (pesci, crostacei, molluschi) presentano concentrazioni molto elevate di As totale legate alla capacità di bioaccumulo di un arsenocomposto innocuo, l'arsenobetaina, verosimilmente dipendente da processi di adattamento alla salinità. Nei molluschi e soprattutto nelle alghe (oggetto di consumo alimentare in Estremo Oriente) prevalgono gli arsenoribosidi, apparentemente atossici ma ancora non pienamente caratterizzati. Nei prodotti ittici di acqua dolce, l'arsenobetaina riveste un ruolo meno preminente e la presenza di altre specie dell'arsenico, anche inorganiche, è molto legata all'esposizione ambientale. Nelle matrici alimentari le concentrazioni di As totale sono generalmente basse, ma aumenta il peso delle forme più tossiche. La matrice che desta maggiore preoccupazione è il riso, un alimento di base per estese popolazioni, nonché i prodotti da esso derivati (es. il latte di riso). Infine nelle matrici grasse (olio di pesce, pesci grassi) l'arsenico è presente sotto forma di arsenolipidi, composti che solo negli ultimi anni cominciano a essere studiati sistematicamente in termini d'identità chimica ed effetti biologici.

La presenza nell'acqua destinata al consumo umano di As in concentrazioni vicine o superiori al valore guida provvisorio di 0,01 mg/L stabilito dall'OMS costituisce un problema sanitario che investe milioni di individui in numerose aree del mondo, trattandosi quasi esclusivamente di As inorganico la cui origine risiede nella particolare geochimica degli acquiferi. Anomalie geochimiche possono determinare la presenza di elevate concentrazioni di As inorganico anche in alcune specie vegetali e animali che hanno limitate capacità di biotrasformazione delle forme inorganiche dell'elemento.

Ricerche recenti hanno stabilito che l'As inorganico è un potente interferente endocrino che interagisce con la gran parte degli ormoni steroidei. A concentrazioni molto basse esso sembra alterare la funzione del recettore glucocorticoide quale fattore di trascrizione. L'alterazione dell'espressione genica mediante meccanismi recettoriali sembra coinvolgere anche gli ormoni mineralcorticoidi, il progesterone e gli androgeni. Particolare attenzione viene rivolta agli effetti a lungo termine conseguenti a un'esposizione durante lo sviluppo intrauterino e postnatale, sia per la facilità con cui l'As inorganico attraversa la placenta sia per la vulnerabilità degli individui durante i primi stadi dello sviluppo.

Alla luce di queste evidenze, appare urgente disporre da una lato di un limite aggiornato per la massima assunzione tollerabile di As inorganico e dall'altro di accurate stime di esposizione all'As inorganico mediante la dieta per la popolazione italiana e in particolare per gruppi potenzialmente a rischio in ragione di fattori specifici (abitudini alimentari, aree a rischio geochimico, fascia d'età). A questo proposito è importante sottolineare che l'EFSA sta completando una nuova valutazione del rischio per la salute umana legato alla presenza di arsenocomposti negli alimenti e la relativa opinione è attesa a breve.

Progetto per la valutazione e la prevenzione dell'esposizione alimentare a contaminanti tossici persistenti ed emergenti, attraverso lo studio della dieta e la messa a punto di metodi di rilevazione innovativi: risultati preliminari

(2) Corrado F., (1) Cavallo S., (2) Esposito M., (2) Galiero G., (2) Serpe L., (3) Compagnone D.,
(3) Mascini M., (1) D'Ambrosio R., (1) Colarusso G., (1) Baldi L.
(1) ORSA – Osservatorio Regionale Sicurezza Alimentare, IZSM Portici
(2) Istituto Zooprofilattico del Mezzogiorno – Portici (Na)
(3) Dipartimento di Scienze degli Alimenti - Università di Teramo

In generale, l'esposizione a contaminanti tossici persistenti nella popolazione avviene soprattutto attraverso gli alimenti. Dati provenienti dai piani di monitoraggio ambientale ed alimentare, su base georeferenziata, nonché indagini epidemiologiche descrittive condotte sulla popolazione attraverso i registri tumori e malformazioni, indicano le aree del territorio in cui potenzialmente la popolazione è maggiormente esposta a tali contaminanti.

Il monitoraggio dei contaminanti tossico-persistenti quali PCDDs, PCDFs, DL-PCBs, NDL-PCBs, BRFs, PFOC, in particolare in alcuni alimenti più suscettibili di contaminazione (es: pesci) rappresenta uno strumento indispensabile per la valutazione dell'esposizione umana a tali sostanze .

Questo progetto di ricerca ha lo scopo di:

- 1) innovare e implementare la valutazione dell'esposizione alimentare, considerando gli alimenti realmente assunti dal consumatore.
- 2) sviluppare tecniche innovative per lo screening/ routine rapidi di sostanze tossiche presenti negli alimenti, di particolare rilevanza per la Sanità Pubblica nell'ambito della sicurezza alimentare, e applicabili nell'ambito di sistemi di autocontrollo basati sull'analisi del rischio, secondo i criteri del "pacchetto igiene".

Il progetto è stato suddiviso in due fasi:

In una prima fase è stato effettuato uno studio epidemiologico sulla base dei risultati dei piani di monitoraggio e sulla base dell'attività ufficiale di controllo, così da individuare le zone a maggior rischio di contaminazione. Dapprima sono stati campionati quasi tutti gli allevamenti bufalini campani e un gran numero di aziende bovine ed ovi-caprine. Dopo la fase di valutazione dell'esposizione alimentare sarà effettuato un controllo, in varie zone delle regioni Campania e Molise, già identificate secondo indicatori epidemiologici, attraverso l'analisi del cibo acquistato in loco e preparato secondo le abitudini locali.

Nella seconda fase, i campioni utilizzati per le analisi, in particolare, quelli in cui sia stato riscontrato un tenore di contaminanti elevato, saranno analizzati con test di screening alternativi, in particolare, saranno sviluppati metodi innovativi, tra cui una serie di biosensori basati su recettori biomimetici ottenuti tramite progettazione razionale computazionalmente assistita. I recettori saranno infatti ottenuti attraverso la modellizzazione e simulazione dei siti di legame fra target ed elementi di riconoscimento biologico già conosciuti. Un set possibile di recettori (p.es. peptidi) sarà quindi sintetizzato, testato per il legame al fine di selezionare i recettori con caratteristiche analitiche adeguate. Successivamente seguirà l'accoppiamento a sistemi di trasduzione di segnale potenzialmente miniaturizzabili e a basso costo quali sensori elettrochimici e piezoelettrici. E' attesa la rivelazione dei contaminanti in tempi brevi secondi o minuti. Verranno di seguito sviluppati modelli predittivi, per valutare il comportamento dei biosensori nell'individuazione dei target.

Lo sviluppo di tecniche innovative sarà atto all'applicazione di analisi degli alimenti, ma permetterà anche di studiare sia il comportamento dei contaminanti tossico-persistenti in un sistema cellulare di tumore della mammella umano estrogeno responsivo, sia di valutare l'immunotossicità,

contribuendo ad approfondire le conoscenze indispensabili per una corretta valutazione del rischio tossicologico per l'uomo.

Le finalità del progetto saranno quelle di fornire prototipi per analisi di screening rapido e di facile utilizzazione per la rivelazione di IPA, di diossine e PCB diossina simili, le cui performance saranno valutate con metodi di riferimento ufficiali.

La Sanità Pubblica potrà usufruire delle nuove tecnologie acquisite e promuovere sul proprio territorio e su quello nazionale ed internazionale la divulgazione di queste nuove strategie.

Bibliografia

Neugebauer Frank, Esposito Mauro, Opel Matthias, Pöpke Olaf, Gallo Pasquale, Cavallo Stefania, Colarusso Germana, Rosa D'Ambrosio, Sarnelli Paolo, Baldi Loredana, Iovane Giuseppe, Serpe Luigi. THE ITALIAN BUFFALO MILK CASE – RESULTS AND DISCUSSION OF PCDD/F- AND DL-PCB ANALYSIS IN MILK, FEEDING STUFF AND SOIL SAMPLES FROM CAMPANIA, ITALY.

29th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants (Dioxin 2009) August 23-28, 2009. Beijing, China. Mascini M, Del Carlo M., Compagnone D., Cozzani I., Tiscar, P. G., Mpamhanga C. P., Chen B. "Piezoelectric Sensors Based on Biomimetic Peptides for the Detection of Heat Shock Proteins (HSPs) in Mussels" *Analytical Letters*, 39, 1–16, 2006.

**PRESENZA DI INTERFERENTI ENDOCRINI NEL SANGUE DI ESEMPLARI DI
CARETTA CARETTA NEL MAR MEDITERRANEO**

Emiliano Fanello, Guido Perra, Cristiana Guerranti, Stefania Ancora, Simonetta Corsolini,
Maria Cristina Fossi, Silvano E. Focardi
Dipartimento di Scienze Ambientali "G. Sarfatti", Università degli Studi di Siena, Via P.A.
Mattioli, 4 - 53100 Siena

Per la corrispondenza: fanello@unisi.it

I composti perfluoro alchilati (PFC), dei quali i più diffusi sono il perfluorottano sulfonato (PFOS) e l'acido perfluorottanoico (PFOA) sono composti ampiamente utilizzati in numerosi prodotti a largo uso (tessuti di rivestimento, tappeti, materiali plastici, pellicole fotografiche etc.), grazie alle loro proprietà idro-olio repellenti. I PFC sono poco degradabili nell'ambiente, rappresentano un pericolo per molti organismi ed esistono evidenze scientifiche che indicano un probabile bioaccumulo ed un effetto di interferenza sul sistema endocrino. Diversi studi scientifici hanno rilevato la presenza di tracce di PFC in campioni di sangue e fegato di pesci, tartarughe, uccelli e mammiferi di ecosistemi marini in diverse aree geografiche. L'obiettivo di questo lavoro è stato quello di valutare la presenza di PFOS e PFOA, in campioni di sangue di tartaruga marina *Caretta caretta*, utilizzando metodiche di campionamento non distruttive. In collaborazione con i centri di recupero tartarughe marine (CRTM) nell'ambito del progetto EU LIFE2004/NAT/IT/187/TARTANET, sono stati reperiti campioni di sangue intero provenienti da 48 esemplari. Concentrazioni rilevabili di PFOS sono state riscontrate in 12 esemplari provenienti da Lesina; i valori presentano un *range* di concentrazioni molto simile, da 2,23 ng/g a 3,95 ng/g peso fresco (p.f.), mentre il valore più basso rilevato (1,54 ng/g p.f.) è riferito all'unico esemplare proveniente da Talamone. Infine, due esemplari provenienti da Linosa mostrano rispettivamente concentrazioni pari a 1,27 ng/g p.f. e 28,51 ng/g p.f.

HACCP tossicologico nella catena alimentare: il sistema BEST

Chiara Frazzoli^{1,3}, Roberto Dragone^{2,3}, Alberto Mantovani^{1,3}

¹Reparto di Tossicologia Alimentare e Veterinaria e Centro di Collaborazione OMS/FAO per la Sanità Pubblica Veterinaria, Dip.to di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Istituto Superiore di Sanità

²Istituto dei Sistemi Complessi, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Roma

³Noodles Onlus, Nutrition & food safety and wholesomeness, www.noodlesonlus.org

Nell'ambito della sicurezza alimentare sostenibile, le produzioni agro-zootecniche, oltre alle qualità organolettiche e al collegamento con il territorio, dovrebbero tutelare la salute dei consumatori, nonché la prevenzione dei rischi per la salute della generazione futura.

L'esposizione a interferenti endocrini e altri contaminanti tramite le filiere alimentari può avvenire in diverse fasi della produzione ed in diversi punti critici di rischio, ad esempio in seguito all'uso di sostanze (ad esempio taluni antiparassitari) nella produzione delle materie prime, a contaminazione ambientale, al rilascio da materiali a contatto, nonché alla presenza di componenti "naturali" indesiderate sia nell'ambiente (ad esempio taluni metalli e micotossine) sia durante i processi di trasformazione (ad esempio gli IPA).

Il sistema HACCP, convenzionalmente rivolto al *biohazard*, è lo strumento comunemente utilizzato per la gestione dell'intera filiera; d'altra parte, la stretta correlazione fra produzione alimentare ed impatto ambientale rende cruciale la valutazione dell'eco-tossicità associata alle pratiche agro-zootecniche. Il BEST (brevetto PCT/2009/000293) è stato sviluppato come sistema prototipo per la diagnostica alimentare e l'eco-tossicità, utilizzabile per l'implementazione del sistema HACCP con indici di tossicità e l'applicazione di routine lungo il processo di produzione.

Il BEST integra una griglia di (bio)indicatori, principalmente relativi a enzimi del metabolismo e funzioni mitocondriali, derivanti da una combinazione di biosensori e sensori operanti in parallelo. L'approccio del BEST si basa sull'identificazione e monitoraggio dell'esposizione a miscele di sostanze bioattive (sia tossiche sia protettive) presenti nelle matrici reali della vita aziendale, nonché sulla gestione precoce di variazioni anomale di tali attività biologiche (parametri di qualità) mediante (bio)indicatori di esposizione totale, (bio)indicatori di dose efficace e parametri chimico-fisici.

Il BEST è concepito per un agevole recepimento in filiera, in base alla centralità della variabilità *storica* dei parametri della specifica realtà produttiva, la facilità d'uso, l'adattabilità e l'economicità. La ricerca sperimentale e lo sviluppo industriale del BEST per la messa in opera nelle specifiche linee di produzione potrebbe essere una delle risposte all'attuale necessità di innovazione tecnologica per: a) l'interfaccia fra analisi chimica e test biologici; b) la sinergia fra ricerca pubblica e industria alimentare.

UTILIZZO DELL'APE IN STUDI DI BIOMONITORAGGIO AMBIENTALE

Albino Gallina, Chiara Manzinello, Nicoletta Dainese, Franco Mutinelli

Centro di Referenza Nazionale per l'Apicoltura, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD); e-mail: agallina@izsvenezie.it

Il biomonitoraggio consiste nella valutazione ambientale globale attraverso l'utilizzo di bioindicatori, cioè di organismi capaci di avvertire con certezza le alterazioni ecologiche dell'ambiente in cui vivono, alterazioni causate da vari tipi di inquinamento o da fattori di stress ambientale. Uno degli organismi più utilizzati nei piani di biomonitoraggio è l'ape. Essa è in grado di esplorare un'area di circa 7 km² e quindi può essere efficacemente impiegata come recettore dello stato di inquinamento di un determinato territorio, perché è facilmente reperibile, è dotata di un efficace apparato sensoriale, è diffusa in tutti gli ambienti, ha un tasso di riproduzione molto elevato che, associato ad una vita media relativamente breve, garantisce un rinnovamento ciclico rapido e continuo della famiglia. Valutando la mortalità, la produzione quantitativa e qualitativa del miele e degli altri prodotti dell'alveare e ricercando su questi la presenza e la quantità di sostanze estranee (antiparassitari, metalli pesanti, idrocarburi policiclici aromatici, policlorobifenili,...) è possibile avere un quadro dello stato di salute del territorio molto tempo prima che queste sostanze manifestino in modo deleterio la loro presenza. Uno studio attuato nella parte orientale del Parco Regionale dei Colli Euganei (comuni di Teolo, Abano Terme, Montegrotto Terme, Galzignano Terme, Battaglia Terme ed Arquà Petrarca) nel periodo giugno-novembre 2004 ha previsto l'utilizzo di 9 postazioni di monitoraggio, nel territorio di ciascun comune, costituite con due alveari provvisti di gabbie underbasket. Sono stati valutati 56 composti appartenenti alla classe generica dei pesticidi. In particolare, possono essere identificati composti clorurati, fosforati e carbammati. La ricerca di cadmio e piombo è stata realizzata impiegando la tecnica elettrochimica della voltammetria di stripping anodico (ASV) con scansione a onda quadra. Nel Parco Regionale dei Colli Euganei, la presenza di una abbondante flora spontanea fa sì che l'ape non sia obbligata a bottinare su colture trattate con antiparassitari permettendo così di ridurre l'impatto di quest'ultimi sull'insetto pronubo o comunque di "diluirne" l'azione. Infatti, durante il periodo in cui è avvenuto il monitoraggio, non si sono mai verificate situazioni di elevata mortalità di api. In altri termini, la mortalità che si può definire naturale, non ha mai superato le 50 api per settimana. La presenza di colture trattate con fitofarmaci così come monitorata attraverso le api non rappresenta un fattore di rischio per l'area oggetto di studio. La presenza di piombo nel miele da nido è risultata compresa fra 214 e 488 ng/g a settembre e fra 55 e 154 ng/g a novembre, mentre quella di cadmio si è attestata fra 4 e 14 ng/g e tra <1 (limite di quantificazione) e 4 ng/g rispettivamente nei prelievi effettuati a settembre e a novembre. La ricerca Finalizzata Sanitaria 2006, finanziata dalla Regione Veneto, ha consentito l'attuazione di uno studio nel territorio dell'ASL 12 Veneziana, in particolare nelle aree costiere e limitrofe della zona industriale di Marghera. Sono state individuate 7 postazioni di campionamento, distribuite nei comuni di Venezia, Marcon e Quarto d'Altino. I prelievi sono stati effettuati nel periodo aprile-ottobre 2008. Sono stati esaminati 183 campioni di api, miele, cera e polline su cui sono stati eseguiti in totale 512 accertamenti di laboratorio. Complessivamente 21 su 58 campioni di api morte e 10 su 52 campioni di cera sono risultati positivi per pesticidi. In 6 su 21 campioni di polline è stata rilevata presenza di pesticidi, mentre la determinazione dei metalli pesanti su 52 campioni di miele ha evidenziato una concentrazione media di cadmio e piombo rispettivamente di 14 ng/g e 72 ng/g. Le concentrazioni rimangono nell'ordine di grandezza dei dati rilevati in passato e comunque in linea con i risultati di altre indagini condotte sul territorio nazionale. Tali riscontri rappresentano quindi l'inevitabile conseguenza della presenza di queste sostanze nell'ambiente. Va tuttavia sottolineato che nonostante la presenza di metalli pesanti nel miele sia oggetto di monitoraggio ufficiale, non esiste a tutt'oggi una normativa specifica che ne definisca il limite massimo di residuo ammesso.

INTERFERENTI ENDOCRINI COME POTENZIALI OBESOGENI: UTILIZZO DI UN MODELLO *IN VITRO* DI EPATOCITI ‘STEATOSICI’

Grasselli, E., Voci, A., Vergani, L., Fugassa, E., Gallo, G., Canesi, L.

Laboratorio di Fisiologia, Dipartimento di Biologia, Università di Genova. Corso Europa 26, 16132, Genova. Laura.Canesi@unige.it

Il fegato gioca un ruolo fondamentale nell’omeostasi dei lipidi dell’organismo, in quanto regola la loro concentrazione plasmatica ed il loro destino. La ‘Non-Alcoholic Fatty Liver Disease’ (NAFLD) è una patologia degenerativa caratterizzata inizialmente da un accumulo ectopico di trigliceridi nel fegato (steatosi) non legato ad assunzione di alcol, che può poi progredire verso l’infiammazione ed infine la fibrosi/cirrosi (1). L’eziopatogenesi di tale sindrome è multifattoriale: obesità, diabete di tipo 2 e ipertrigliceridemia sono spesso associati con la comparsa della NAFLD (2). E’ stato recentemente proposto che l’aumento della diffusione di queste patologie nei paesi industrializzati possa essere legato all’esposizione cronica a un numero crescente di sostanze organiche xenobiotiche. Queste possono infatti interferire con le normali funzioni fisiologiche svolte dagli ormoni che regolano il metabolismo, come gli ormoni tiroidei o steroidei, agendo come interferenti endocrini (IE) che alterano le normali vie di trasduzione dei segnali ormonali che diventano quindi bersaglio di ligandi lipofilici. La teoria degli ‘Obesogeni ambientali’ propone che alcuni IE possano interferire con il controllo di vie coinvolte nell’adipogenesi, nel metabolismo lipidico e nel bilancio energetico, promuovendo l’obesità (3).

Il nostro gruppo ha recentemente messo a punto un modello *in vitro* di epatociti resi ‘steatosici’ che utilizza colture primarie di epatociti di ratto adulto o linee cellulari di epatoma coltivate in presenza di opportuna miscela di acidi grassi (FFA). Tale modello è stato utilizzato per valutare i meccanismi attraverso i quali gli ormoni tiroidei esercitano effetti anti-steatosici sul fegato.

Le ricerche attualmente in corso sono mirate a chiarire i possibili effetti di alcuni potenziali obesogeni (quali Bisfenolo A, e tributil stagno-TBT, ritardatori di fiamma bromurati) sull’accumulo di grassi nella cellula epatica. In particolare, verranno valutate l’espressione di proteine PAT che regolano il metabolismo delle goccioline lipidiche (LDs-lipid droplets), di geni coinvolti nella regolazione del metabolismo lipidico (Peroxisome Proliferator-Activated Receptors- PPAR α , γ e δ) e delle condizioni di stress ossidativo associate alla steatosi. Verranno presentati dati preliminari relativi agli effetti del Bisfenolo A utilizzato come modello di potenziale obesogeno ottenuti impiegando epatociti di controllo e steatosici.

1. Adams, L.A., Angulo, P.,. Recent concepts in non-alcoholic fatty liver disease. *Diabet. Med.* 22:1129-1133, (2005)
2. Bradbury MW. Lipid metabolism and liver inflammation. I. Hepatic fatty acid uptake: possible role in steatosis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 290:G194-198, (2006).
3. Ubert, M., Nef, S. and Soto, A.M., (Eds). Special Issue: Endocrine Disruptors from the Environment in the Aetiology of Obesity and Diabetes. *Mol. Cell. Endocrinol.* 304: 1-106, (2009)

"La tossicogenomica come risorsa per l'individuazione di biomarcatori molecolari tipici di sostanze che interferiscono con il recettore androgeno: il progetto ReProTect".

S. Lorenzetti¹, I. Altieri¹, E. Arico², I. Canini², L. Castiello², V. Lagatta¹, D. Marcoccia¹, L. Narciso¹, Parlato², D. Salerno², L. Gabriele², A. Mantovani¹.

¹Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare e ²Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze, Istituto Superiore di Sanità, Roma.

Attualmente lo studio degli effetti e dei meccanismi d'azione di una sostanza tossica, grazie alle nuove tecniche di biologia molecolare note come –OMICS che ne studiano i profili d'espressione genica, proteica e della produzione di metaboliti, permette di rilevare in una fase molto precoce l'eventuale sviluppo di una alterazione cellulare o tissutale. In particolare è possibile valutare quali siano i cambiamenti molecolari che precedono l'evento tossico in sé, definendo così una "impronta digitale" ("toxicological signature"), che può essere utilizzata come potenziale marcatore d'effetto per uno specifico composto o per un gruppo di composti con analogo meccanismo/bersaglio.

La messa a punto dell'approccio tossicogenomico per l'identificazione dei composti che interferiscono con il recettore androgeno (AR) è uno tra gli obiettivi del Progetto Europeo ReProTect (finalizzato allo sviluppo di strategie *in vitro* per la valutazione di sostanze tossiche per la riproduzione: www.reprotect.eu), ed in particolare nell'ambito del "Workpackage IV – Cross-cutting Technologies" la nostra unità operativa si è occupata dell'identificazione di un set di geni specifici (la suddetta "toxicological signature") da utilizzare come strumento predittivo per identificare, grazie a differenze nei profili di espressione genica, i potenziali effetti di interferenza endocrina di tipo (anti)androgenico di contaminanti ambientali e alimentari. Ciò consentirà, oltre all'individuazione e selezione di biomarcatori molecolari tipici di sostanze che interferiscono con il recettore androgeno, anche di selezionare *in vitro* ("prioritizzazione") ed in maniera rapida le sostanze con possibile attività endocrina in modo da limitare il numero dei composti da sottoporre a successivi, lunghi e costosi test *in vivo*.

A tal fine è stato studiato, su due linee cellulari di prostata umana androgeni-dipendenti PNT-2 e LNCaP (con differente espressione di AR e diverso potenziale tumorigenico), il profilo di espressione genica di un gruppo di sostanze modello: gli agonisti del AR diidrotestosterone (DHT) e metiltestosterone (MT), gli AR-antagonisti 2-idrossi-flutamide (2OH-FTA) e linuron (LIN, un erbicida che lega AR) e l'antiandrogeno di-*n*-butil-ftalato (DBP, un plasticizzante che ha effetti sovrapponibili al LIN *in vivo* ma senza legare AR).

Tale approccio permetterà di:

1. individuare e selezionare biomarcatori molecolari tipici di sostanze che interferiscono con il recettore androgeno AR;
2. sviluppare un "chip microarray dedicato" capace di distinguere gli effetti (anti)androgenici di composti chimici su linee cellulari di prostata umana.

Gli esperimenti di tossicogenomica finora effettuati hanno evidenziato l'esistenza di una risposta sostanza-specifica diversa in ciascuna delle due linee cellulari utilizzate e AR status-dipendente specifica per sostanze androgeniche o antiandrogeniche.

Inoltre sulle stesse linee cellulari (utilizzando i terreni di coltura delle cellule in crescita sotto trattamento) per valutare la significatività della modulazione dei profili d'espressione genica in rapporto alla predizione di alterazioni funzionali sono stati determinate le concentrazioni di due marcatori d'effetto quali:

- i) la secrezione del Prostate Specific Antigen-PSA (mediante fluorimetria a tempo risolto), un riconosciuto biomarcatore clinico, qui utilizzato come "phenotypic anchoring" (vedi anche abstract no. **XX**);
- ii) il rilascio dello zinco (mediante ICP/MS), un marcatore metabolico della funzionalità della prostata (vedi abstract no. **XY**).

Ringraziamenti. Progetto integrato europeo ReProTect (6thFP EU Integrated Project, contract no. LSHB-CT-2004-503257).

La secrezione dello zinco come biomarcatore di effetto di sostanze che interferiscono con la funzione prostatica.

Stefano Lorenzetti, Federica Aureli, Daniele Marcoccia, Roberta Tassinari, Francesca Maranghi, Francesco Cubadda, Alberto Mantovani

Lo zinco è un elemento in traccia la cui applicazione come biomarcatore della funzionalità prostatica è suggerita dal fatto che nell'uomo le cellule dell'epitelio della ghiandola prostatica lo accumulano per inibire il ciclo di Krebs a livello dell'enzima aconitasi con conseguente accumulo di citrato. L'epitelio della prostata funziona quindi come organo di accumulo dello zinco (concentrazioni circa 10-20 volte superiori a quelle di tutti gli altri tessuti dell'organismo). All'interno delle vescicole di secrezione, le cellule dell'epitelio prostatico utilizzano lo zinco e il citrato accumulati per regolare lo stato conformazionale e il pH necessario a mantenere inattivi gli zimogeni della PSA (prostate-specific antigen) e delle altre proteinasi della famiglia delle kallikreine, che vengono secrete nel fluido prostatico e attivate solo al momento dell'eiaculazione.

I livelli di zinco intracellulare (epitelio della prostata) e sierico sono positivamente associati alla corretta capacità di accumulo dell'epitelio prostatico: *i*) le cellule fisiologicamente "normali" hanno un alto contenuto di zinco intracellulare e proporzionalmente di zinco sierico, *ii*) nell'iperplasia prostatica benigna, le cellule dell'epitelio prostatico tendono ad accumulare più zinco intracellulare e ad aumentare i livelli di zinco sierico, mentre *iii*) le cellule epiteliali tumorali perdono la capacità di accumulare zinco e parallelamente diminuiscono drammaticamente i livelli di zinco sierico.

L'utilizzo dello zinco come biomarcatore metabolico della funzionalità della ghiandola prostatica e, in particolare, della capacità secretoria del suo epitelio ovvero dello zinco extracellulare, può essere applicato a diversi sistemi biologici sia *in vitro* che *in vivo*.

In particolare:

- ✓ nell'ambito del progetto europeo ReProTect, in parallelo agli esperimenti di microarray (vedi abstract "*La tossicogenomica come risorsa per l'individuazione di biomarcatori molecolari tipici di sostanze che interferiscono con il recettore androgeno: il progetto ReProTect*") e alla misurazione della secrezione della PSA (vedi abstract "*La secrezione della PSA: un biomarcatore clinico utilizzabile per lo screening in vitro di possibili interferenti endocrini nella linea cellulare umana di prostata LNCaP*"), la quantità di zinco extracellulare è stata misurata nel terreno di coltura di cellule epiteliali umane prostata-derivate;
- ✓ nell'ambito di uno studio sulla tossicità riproduttiva di un contaminante ambientale, l'etilentiourea (ETU, metabolita dei fungicidi della classe degli etilen-bis-ditiocarbammati) in ratti Sprague-Dawley; i livelli di zinco sono stati misurati nel siero di ratto e comparati con i livelli sierici degli ormoni steroidei e con il peso della ghiandola prostatica;
- ✓ infine, nell'ambito del progetto PREVIENI per lo studio dell'infertilità maschile *sine causa*, i livelli di zinco verranno misurati sia nel siero di 200 coppie infertili che, nei soggetti di sesso maschile, nel plasma seminale per valutarne l'applicabilità in indagini epidemiologiche per lo screening di fattori ambientali con effetti avversi sulla fertilità maschile e/o di coppia.

Ringraziamenti. Progetto triennale PREVIENI (2008-10) finanziato dal Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare; Progetto integrato europeo ReProTect (6thFP EU Integrated Project, contract no. LSHB-CT-2004-503257).

La secrezione della PSA: un biomarcatore clinico utilizzabile per lo screening *in vitro* di possibili interferenti endocrini nella linea cellulare umana di prostata LNCaP.

S. Lorenzetti, L. Narciso, D. Marcoccia, A. Mantovani.

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

Nell'ambito del progetto europeo ReProTect sono stati sviluppati una serie di test *in vitro* per la caratterizzazione di sostanze tossiche per l'apparato riproduttivo maschile e femminile. Un set di tali test sono stati utilizzati in uno studio "a doppio cieco", denominato "feasibility study", per la comparazione degli effetti di 10 sostanze chimiche già caratterizzate *in vivo* per il loro profilo tossicologico/riproduttivo.

La nostra unità operativa ha valutato la possibile interferenza di queste sostanze chimiche sull'attività della prostata, focalizzando la propria attenzione sulla secrezione della PSA, noto biomarcatore clinico utilizzato in campo oncologico per lo screening dell'adenocarcinoma prostatico, ma che dà risultati non univoci in quanto la secrezione della PSA aumenta anche in altre malattie della prostata quali l'iperplasia prostatica benigna e le prostatiti.

I test per la tossicità riproduttiva trascurano la prostata focalizzando l'attenzione sulla spermatogenesi e sulla funzionalità delle diverse cellule presenti nel testicolo (p.es., le cellule del Sertoli e del Leydig) sebbene la fertilità maschile sia strettamente collegata alla funzionalità della prostata, la principale ghiandola accessoria maschile, che è responsabile della produzione e secrezione del fluido prostatico, componente essenziale dell'eiaculato, in quanto fornisce diverse molecole necessarie alla capacitazione spermatica.

L'utilizzo di cellule epiteliali umane prostata-derivate ci permette, quindi, di inserire un "nuovo" biomarcatore - già validato nella pratica clinica - nell'analisi *in vitro* della tossicità riproduttiva.

In particolare, la linea cellulare di prostata umana LNCaP è stata utilizzata come sistema modello poiché è una delle poche linee cellulari di epitelio prostatico ad essere sia androgeno-regolata che PSA-secernente. L'interferenza sull'attività prostatica è stata valutata mediante:

- i) un test generale di citotossicità (saggio di vitalità cellulare noto come MTS assay),
- ii) un saggio funzionale prostata-specifico che misura contemporaneamente la secrezione della PSA libera e totale (saggio fluorimetrico a tempo risolto noto anche come DELFIA).

Le cellule LNCaP sono state trattate sia con le sostanze ad attività ignota sopra menzionate che con alcune sostanze ad attività (anti)androgenica nota ed i risultati ottenuti sia con il test di vitalità cellulare che con quello della secrezione della prostata saranno presentati.

Ringraziamenti. Progetto integrato europeo ReProTect (6thFP EU Integrated Project, contract no. LSHB-CT-2004-503257).

Esposizione a ritardanti di fiamma polibromurati e possibili effetti sul timing della pubertà in una popolazione di adolescenti del Comune di Roma: dati preliminari

Francesca Maranghi¹, Roberta Tassinari¹, Laura Cristofori², Annalisa Deodati², Gian Luigi Spadoni², Giuseppe Scirè², Stefano Cianfarani², Paola Cambiaso³, Marco Cappa³, Ida Pucarelli⁴, Fabiana Accardo⁴, Anna Maria Pasquino⁴, Paola Nardone⁵, Irene Figà-Talamanca⁵, Alberto Mantovani¹

¹ Dip Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare – Istituto Superiore di Sanità; ² Policlinico Tor Vergata – Roma; ³ Ospedale Pediatrico Bambino Gesù; ⁴ Policlinico Umberto I; ⁵ Università degli studi di Roma La Sapienza

I ritardanti di fiamma polibromurati (PBDE) sono composti largamente utilizzati (computer, schermi televisivi, tappezzerie, etc) fra i quali ricordiamo il tetrabromobisfenolo A, l'esabromociclododecano (HBCD) ed i polibromo difenil eteri (PBDE). Presenti in miscela, lipofili, in grado di bioaccumulare e biomagnificare, persistenti nell'ambiente e nella catena alimentare sono classificati come contaminanti persistenti (POPs). Non essendo legati covalentemente al substrato, facilmente vengono rilasciati ritrovandosi come residui in svariate matrici sia ambientali che umane (alimenti soprattutto grassi, latte materno, sangue, etc.). I PBDE sono Interferenti Endocrini (IE - <http://www.iss.it/inte>) poichè in studi sperimentali: i) alterano l'omeostasi tiroidea sia nell'adulto che nell'organismo in sviluppo, ii) i metaboliti idrossilati che si formano a seguito dell'esposizione sono agonisti del recettore estrogenico, iii) sono attivatori del recettore pregnano-X e modulano l'espressione di altri recettori quali quello per l'acido retinoico *in vivo*. Di conseguenza, l'esposizione a PBDE può riflettersi in alterazioni dello sviluppo sessuale sia attraverso l'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi, sia attraverso meccanismi mediati dal pathway dell'acido retinoico o afferenti al metabolismo degli steroidi sessuali. Dati epidemiologici indicano che le bambine oggi raggiungono la maturità sessuale prima rispetto a 30 anni fa ed il numero delle ragazze a cui viene diagnosticato la pubertà precoce è in aumento. Nella maggior parte dei casi, salvo rare forme genetiche, si tratta di forme idiopatiche. Dato che l'esposizione ad IE ad azione estrogenica è stata associata ad alterazioni del timing della pubertà così come alterazioni del pathway della vitamina A e considerando l'esposizione complessiva a miscele di PBDE – ad azione potenzialmente additiva - obiettivo dello studio è quello di effettuare una valutazione del rischio di alterazioni endocrino-mediate nell'infanzia/adolescenza associate all'esposizione dei ritardanti di fiamma polibromurati in modo da poter correlare l'esposizione precoce e prolungata ai PBDE alla comparsa di pubertà precoce idiopatica in individui di sesso femminile di età compresa fra i 2-7 anni afferenti a tre centri romani di endocrinologia pediatrica (Policlinico Università Tor Vergata, Ospedale S. Eugenio, Ospedale "Bambino Gesù"). Lo studio è di tipo caso-controllo in cui sono stati individuati i seguenti gruppi: **GRUPPO A (TELARCA PREMATURO IDIOPATICO)**, **GRUPPO B (PUBERTA' PRECOCE)**, **GRUPPO C (CONTROLLI)**. Prima fase dello studio è quella di identificare alcuni *determinanti di esposizione* di natura alimentare, ambientale e/o associata agli stili di vita, mediante formulario strutturato, rielaborato a partire da un modello originale definito nell'ambito del progetto pilota ISS "Interferenti Endocrini" disponibile su <http://www.iss.it/inte>). Tale formulario, da sottoporre ai genitori delle bambine che afferiscono allo studio secondo le modalità stabilite dalla legge sulla privacy ed a seguito di accettazione mediante consenso informato, è costituito da diverse sessioni che forniscono informazioni in merito alla professione ed alla storia abitativa della famiglia nonché in merito alle frequenze alimentari del soggetto afferente allo studio in fase pre- e scolare. Alle bambine inoltre viene prelevato il sangue per la valutazione diretta dell'esposizione ai contaminanti di interesse. Successivamente, i dati sui determinanti di esposizione e stili di vita, insieme a quelli diretti di esposizione verranno correlati con i dati clinici relativi alla patologia e confrontati con i dati del gruppo di controllo. Questa fase preliminare dello studio ha portato a due risultati di valore per lo studio di fattori di rischio ambientali, specificamente di interferenti endocrini, potenzialmente associati a patologie dell'età evolutiva: - è stato elaborato il questionario strutturato per valutare determinanti di esposizione legati all'alimentazione ed agli stili di vita. Ciò consentirà, insieme con i risultati sui biomarcatori di effetto legati alla pubertà precoce nonché con i biomarkers di esposizione, di valutare popolazioni maggiormente a rischio e potrà fornire un'efficace punto di partenza per strategie di prevenzione. - la selezione delle popolazioni di "casi" e dei "controlli" sulla base di dettagliati criteri di eleggibilità *ad hoc* ha consentito di definire in maniera univoca la popolazione da monitorare sulla base di criteri clinici e di circoscrivere l'analisi a fenomeni patologici di natura idiopatica, la cui patogenesi viene sempre più associata a determinanti di natura alimentare ed ambientale.

- U.S. Environmental Protection Agency, August 11-14, 2003 59.
- Roy JR et al. Med Sci Monit. 2009 Jun;15(6).

Questo progetto è sostenuto da: Convenzione ISS-ISPEL-Min. Salute - P2 Interferenti Endocrini, Fasc Q4C (Resp. Scientifico A Mantovani)

INFLUENZA DELLA DIETA SULLA SENSIBILITA' INDIVIDUALE ALLE RADIAZIONI IONIZZANTI E SULLA LUNGHEZZA DEI TELOMERI.

Francesca Marcon¹, Ester Siniscalchi¹, Domenico Palli², Riccardo Crebelli¹

1) Dip. Ambiente e connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanita', Roma

2) Istituto di Ricerca sul Cancro e Prevenzione, CSPO, Firenze

Il ruolo chiave dei micronutrienti nel controllo della stabilita' del genoma e' ormai ampiamente dimostrato, in quanto proteggono dal danno ossidativo e partecipano al metabolismo e alla riparazione del DNA come cofattori o componenti strutturali enzimatici. Sono minori, invece, le informazioni riguardo agli effetti della carenza di micronutrienti sulla suscettibilita' individuale al danno sul DNA. Nel nostro laboratorio, e' stato condotto uno studio su una popolazione di 82 individui per valutare se l'assunzione dei micronutrienti mediante la dieta potesse influenzare la risposta individuale al danno cromosomico indotto dalle radiazioni ionizzanti, valutato con il test del micronucleo. I risultati ottenuti non hanno dimostrato un'influenza significativa dei fattori nutritivi sulla frequenza dei micronuclei indotti dai raggi X, mentre hanno confermato il ruolo predominante dei fattori genetici sulla sensibilita' alle radiazioni ionizzanti. Inoltre, e' stato osservato un chiaro effetto dell'eta' sui micronuclei indotti dalle radiazioni: i soggetti piu' anziani (>55 anni), infatti, mostravano una frequenza di micronuclei significativamente maggiore rispetto agli individui piu' giovani (rispettivamente $250,8 \pm 54,1$ vs $192,8 \pm 73,4$ micronuclei indotti/1000 cellule analizzate). In accordo con i dati di letteratura, la deficienza di vitamina B e' risultata associata alla maggiore incidenza di danno cromosomico basale, probabilmente in relazione al ruolo centrale dell'acido folico nella regolazione della stabilita' cromosomica, ed e' stato, inoltre, confermato l'effetto dell'eta' e del sesso sulla frequenza spontanea dei micronuclei. Questo studio ha anche evidenziato l'influenza della dieta sulla struttura dei telomeri, regioni terminali dei cromosomi coinvolte nel controllo della stabilita' del genoma. In un gruppo di 56 individui e' stata analizzata la lunghezza media dei telomeri, applicando l'analisi dei frammenti di restrizione mediante Southern blotting. I risultati hanno dimostrato che l'accorciamento dei telomeri e' influenzato in modo significativo dalla deficienza nella dieta di antiossidanti oltre che dall'invecchiamento. Tenendo conto che l'alto contenuto di residui di guanina presenti nella sequenza telomerica (TTAGGG)_n potrebbe rendere i telomeri particolarmente sensibili al danno ossidativo, e' biologicamente plausibile che l'incremento di basi ossidate associato all'eta' e ad una dieta carente di antiossidanti possa indurre disfunzioni dei telomeri. In conclusione, questa ricerca ha evidenziato l'effetto dei micronutrienti sull'omeostasi dei telomeri, confermando il ruolo importante della dieta nel controllo della stabilita' cromosomica.

Accumulo di prodotti farmaceutici e per la cura personale (PPCP) e barriera placentare mediata dalla glicoproteina P in placenta e cordone umani

Mariottini Michela¹, Corsi Ilaria¹, Della Torre Camilla¹, Bechi Nicoletta², Ietta Francesca², Romagnoli Roberta², Paulesu Luana², Bisaccioni Alessandro¹, Focardi Silvano¹

¹Dipartimento di Scienze Ambientali "G. Sarfatti", Università degli Studi di Siena, via P.A. Mattioli 4-53100, Siena, Italia

²Dipartimento di Fisiologia, Università degli Studi di Siena, Via A. Moro- 53100, Siena, Italia

mariottinim@unisi.it

Tensioattivi non-ionici e fragranze sintetiche al muschio sono in grado di mimare gli ormoni naturali. A livello placentare un sistema di pompe cellulari transmembrana ATP-dipendenti (ABC-transporters) assicura una barriera nei confronti di farmaci e molecole sintetiche e naturali. L'esposizione a *p*-NP (nonilfenolo) e a muschi sintetici ed il rispettivo ruolo della barriera placentare (P-gp) sono stati studiati in campioni di placenta e cordone di donne della provincia di Siena e Firenze mediante analisi dei residui tessutali (GC/MS), espressione del gene MDR-1 codificante per la P-gp (PCR) e localizzazione tissutale (immunoistochimica). Per l'analisi sulla funzionalità placentare, è stato condotto uno studio *in vitro* utilizzando espianti di villi corionici da placenta umana esposti a 10⁻⁹M *p*-NP. Concentrazioni (ng g⁻¹ peso secco) significativamente più elevate di *p*-NP ($p < 0,01$) sono state ritrovate nel cordone ombelicale (892,5±984,9) rispetto a quelle determinate nella placenta (11,7±34); al contrario nessuna differenza significativa tra placente e cordoni veniva osservata per i muschi sintetici (cordone 0,8±1,1; placenta 0,7±1,4). L'espressione della P-gp era presente in tutti i campioni analizzati con marcate differenze evidenti sia dall'espressione del gene che dall'immunoistochimica. L'esposizione *in vitro* mostrava un incremento del processo differenziativo del trofoblasto verso la formazione del sinciziotrofoblasto e del processo di apoptosi. Seppur sincizializzazione e apoptosi rappresentino processi fisiologici nello sviluppo placentare, un loro incremento può essere causa di situazioni patologiche gravi per la madre e feto. Gli effetti osservati a concentrazioni di *p*-NP basse, suggeriscono che nella placenta è assente un ruolo di barriera P-gp mediata per il *p*-NP e probabilmente anche per i muschi sintetici. La loro presenza nel cordone conferma quindi un'esposizione fetale con potenziali ripercussioni sul sistema endocrino e per lo sviluppo del feto.

Disinquinamento di acque inquinate da interferenti endocrini: il DMP come modello di ftalati.

Mita L.¹, Nicolucci C.¹, Corrado F.⁴, Iovane G.⁴, Caputo L.², Rossi S.², Mita D.G.^{1,2,3}, Diano N.³

(1) INBB, V.le Medaglie d'Oro, 305, Roma (IT), 00136

(2) IGB "ABT", Via Castellino, 111, Napoli (IT), 80131

(3) Seconda Univ. di Napoli, Dip. di Medicina Sperimentale, Via S.M. di Costantinopoli, 16, Napoli (IT), 80138

(4) Istituto Zooprofilattico del Mezzogiorno, Via Salute 2, Portici (Na), 80055

Il disinquinamento di acque inquinate da Dimetilftalato (DMP), scelto come modello degli ftalati appartenenti alla classe degli interferenti endocrini, è stata realizzata mediante bioreattori utilizzando membrane idrofobiche su cui è stato immobilizzato l'enzima lipasi da *Candida rugosa*. In particolare la lipasi è stata immobilizzata via diazotazione su membrane di polipropilene attivate mediante un reattore plasmico-chimico.

La velocità della reazione enzimatica è stata studiata sia per l'enzima libero che per l'enzima immobilizzato in modo da conoscere le modifiche introdotte dal processo di immobilizzazione. Si è trovato che il processo di immobilizzazione non modifica significativamente la dipendenza dell'attività enzimatica dal pH, mentre determina uno shift dell'optimum della temperatura verso temperature maggiori.

Per quel che riguarda l'enzima immobilizzato, poi, abbiamo studiato la dipendenza della velocità di reazione dalla concentrazione del substrato in condizioni isoterme ($T=25^{\circ}\text{C}$) ed in condizioni non isoterme ($T=25^{\circ}\text{C}$ e $\Delta T=10, 20$ e 30°C).

Si sono trovati incrementi percentuali dell'attività enzimatica, e quindi maggiore degradazione della concentrazione del DMP, crescenti con la differenza di temperatura applicata.

Inoltre è interessante evidenziare che la biodegradazione del DMP mediante bioreattori non isotermi è risultata essere più alta a concentrazioni più basse, come quelle presenti nelle acque reflue, considerando la bassa solubilità in acqua di questo composto.

Il vantaggio nell'utilizzo dei bioreattori operanti in condizioni non isoterme, inoltre, è stato discusso in termini di riduzione dei tempi di disinquinamento.

Bioremediation of waters polluted by endocrine disruptors.

Nicolucci C.¹, Caputo L.², Corrado F.⁴, G. Iovane G.⁴, Bencivenga U.², Mita D.G.^{1,2,3}, Diano N.³

(1) INBB, V.le Medaglie d'Oro, 305, Roma (IT), 00136

(2) IGB "ABT", Via Castellino, 111, Napoli (IT), 80131

(3) Seconda Univ. di Napoli, Dip. di Medicina Sperimentale, Via S.M. di Costantinopoli, 16, Napoli (IT), 80138

(4) Istituto Zooprofilattico del Mezzogiorno, Via Salute 2, Portici (Na), 80055

Many chemical pollutants, known as endocrine disrupting chemicals (EDCs), owing to their ability in interfering with the endocrine system, have become increasingly abundant in raw wastewaters from different industries, such as polymeric resin production, oil refining, and coking plants. In addition polycarbonate plastics, for example, release alkylphenols and phthalates in the waters. When adsorbed by the living systems, humans or wild life, they cause adverse effects spanning from disturbances on the reproductive organs to cancer. For this reason the EDCs concentration in the environmental, and in the waters in particular, must be decreased.

Treatments of wastewaters are usually conducted by conventional methods, either physical or chemical, such as ion exchange, reverse osmosis, UV irradiation. However, these treatments are complex and expensive. This situation is triggering for the development of new technologies, such as the application of bioremediation processes, using biological systems (bacteria, fungi or enzymes) capable of metabolizing or degrading the contaminants.

To reduce the EDCs pollution in waters we have proposed the employment of continuous biodegradation processes in non-isothermal bioreactors. Bisphenol A (BPA) was chosen as model of EDCs. As biological element we used immobilized polyphenoloxidases, laccase or tyrosinase.

The performances of each type of bioreactor proposed, different for the enzyme used (laccase from *Trametes versicolor* or tyrosinase from mushroom), were analysed in respect to the rate of removal.

The occurred bioremediation of the waters processed in our bioreactors was tested by assessing *in vitro*, on the estrogen-responsive human breast cancer cell line MCF-7, the disappearance of the "disrupting effects" of the polluted water after the bioremediation treatment. In this manner, we demonstrated also that the metabolites of the enzyme reaction were less estrogenic than the original pollutant.

Espressione di marker dello stress ossidativo in *Zosterisessor ophiocephalus*

Pascoli F¹, Di Giancamillo A², Negrato E¹, Bertotto D¹, Bosi G², Poltronieri C¹, Domeneghini C², Simontacchi C¹, Radaelli G¹

¹Dipartimento di Scienze Sperimentali Veterinarie, Padova

²Dipartimento di Scienze e Tecnologie Veterinarie per la Sicurezza Alimentare, Milano

INTRODUZIONE – E' noto da anni l'utilizzo di specie acquatiche quali bio-indicatori in programmi di monitoraggio ambientale: nei loro tessuti ed organi si possono infatti riscontrare residui di fitofarmaci, pesticidi e contaminanti, sostanze tutte che possono indurre modificazioni nell'espressioni di geni e proteine provocando alterazioni dell'omeostasi fisiologica (1-3). Lo scopo del presente studio è stato quello di verificare le differenze in alcune molecole, diffusamente studiate sia in mammiferi che in specie acquatiche come marcatori dello stress ossidativo, in siti della Laguna di Venezia a diverso impatto antropico. La specie utilizzata per la sperimentazione è il pesce bentonico *Zosterisessor ophiocephalus* (Teleostei: Gobiidae).

MATERIALI E METODI - Lo studio è stato effettuato su individui di *Z. ophiocephalus* prelevati da 3 differenti siti della Laguna di Venezia (14 animali per sito, 7 maschi e 7 femmine), uno situato in Laguna centrale (Marghera) e due nella Laguna Sud (Porto Canale e Valle di Brenta). Inoltre, sono state allestite delle vasche con acqua di mare artificiale allo scopo di stabulare degli animali per un periodo sufficiente (circa un mese) a detossificarsi; questo al fine di consentire una comparazione non solo tra i diversi siti di campionamento ma anche rispetto ad un controllo privo di contaminanti. Da tutti gli animali sono stati prelevati e processati per l'analisi immunoistochimica i seguenti tessuti ed organi: branchie, fegato, intestino, milza, muscolo, ovaio, rene e testicolo. Inoltre, campioni di fegato sono stati sottoposti ad analisi mediante Western blot. Per entrambe le analisi sono stati impiegati due anticorpi: anti-4-idrossi-2-nonenano (HNE) e anti-nitrotirosina (NT), entrambi marcatori dello stress ossidativo. Dal momento che l'immunoreattività agli anticorpi era localizzata principalmente nei centri melanomacrofagici (MMC), si è proceduto ad una analisi quantitativa degli stessi mediante conteggio su sezioni istologiche di milza.

RISULTATI E DISCUSSIONE – Per entrambi gli anticorpi utilizzati, l'immunoreattività era principalmente localizzata in corrispondenza degli MMC riscontrati a livello dei seguenti organi: fegato, milza, ovaio e rene. In generale, nella milza il numero di tali centri era più elevato rispetto a quello degli altri organi. Pertanto, l'analisi quantitativa è stata condotta su sezioni immunocolorate di questo organo, evidenziando differenze significative tra i tre siti esaminati. Gli animali prelevati dai siti di Marghera presentavano un numero più elevato di MMC, seguiti da Porto Canale e infine da quelli campionati dal sito di Valle di Brenta. Nei pesci, tali centri sono normalmente presenti nel parenchima di diversi organi, ma numerosi autori hanno dimostrato che un loro aumento può essere associato all'esposizione a contaminanti ambientali indicando che tali centri possono fornire un indicatore di condizioni di stress nell'ambiente acquatico (4-5). I risultati dell'immunoistochimica sono inoltre stati confermati dall'analisi dell'espressione sia di HNE che di NT mediante Western blot. Infatti anche in questo caso, l'espressione dei due marcatori era più elevata negli animali prelevati dai siti di Marghera, seguiti da Porto Canale e Valle di Brenta. Nei tessuti degli animali stabulati per la detossificazione non è mai stata osservata espressione dei due marcatori, sia mediante immunoistochimica che Western blot, confermando che le differenze osservate tra i tre siti sono legate all'assunzione di contaminanti.

BIBLIOGRAFIA – 1) Timbrell JA (1998) *Toxicol*, 129, 1-12. 2) Vainio H (1998) *Toxicol Lett*, 102-103, 581-589. 3) Van der Oost R et al (1996) *Aquat Toxicol*, 36, 189-222. 4) Wolke RE et al (1995) Pigmented macrophage accumulations (MMC; PMB): possible monitors of fish health. In: Hargis WJ *Parasitology and pathology of the world oceans*. NOAA technical report, NMFS, Washington, DC, 25, 27-33. 5) Meinelt TR et al (1997) *Environ Sci Pollut Res*, 4, 32-36.

ALTERNATIVE STRATEGIES FOR TESTING IN REPRODUCTIVE TOXICOLOGY: GAMETES AND EMBRYOS

Elena M. Senatore¹ and Giorgio A. Presicce²

¹ARSIAL – Centro Regionale per la Zootecnia; ²Istituto Superiore di Sanità – Reparto di Tossicologia Alimentare

The main aim of reproductive toxicology is the study of any adverse effects induced by chemicals of various kind to mammalian reproduction. This is a complex task as the whole process of reproduction is composed by a multifaceted range of activities insisting at the cellular, tissue, organ and apparatus level. There is a need for reliable alternative testing strategies in order to reduce intrinsic costs and animal experimentation, considering that millions of animals are usually required to detect toxicants affecting reproduction and development. In fact, it has been estimated that only in Europe, in the past year 240 thousand animals have been used and terminated only for studies related to reproductive and developmental toxicity. The EU regulatory framework “Registration, Evaluation and Authorisation of Chemicals” (REACH) therefore, prompting on ethical and feasibility consideration, aims at a reduction of both number of animals and testing costs. This can be achieved by optimizing toxicity testing by employing alternative strategies, and although a number of in vitro models are presently available, they need to be converted into tests of predictive power. The ReProTect consortium, since July 2004, has been created in the effort to replace animal experimentation in reproductive technology by developing new in vitro tests, tissue and sensor technology. Within this framework, the use of gametes and embryos can be a very valuable asset. The main reasons for employing them are to be found in the following consideration: i) unlimited resource of both animal gametes and embryos; ii) consistent within and between laboratory embryo production efficiency and iii) considerable in-depth knowledge of biochemical mechanisms and gene activities in the course of gametes and embryo growth and development. Chemicals of interest can be tested against the potential of oocytes to acquire developmental capacity as well as against the ability of mature spermatozoa to penetrate and fertilize matured oocytes. Several endpoints can be used to verify the possible adverse effect of the chemicals employed: from the completion of the second meiosis following 24 hours of coincubation of immature oocytes with the tested chemicals to the completion of male and female pronuclei following 18 to 20 hours of coincubation of fertilized matured oocytes with the same chemicals. In addition, cytotoxicity can be determined for both maturation and fertilization tests by vital staining of granulose cells and determining the ratio of live to dead cells. Developing embryos, can also be used by evaluating the developmental potential following exposure to tested chemicals. Gene array technology can enhance the predictive power of such tests by analyzing switch on and off of genes. In conclusion, efforts towards the validation of in vitro tests on animal gametes and embryos in the field of reproductive technology, will bring a decrease in the overall number of animals to be tested and provide more detailed information on toxicity mechanisms over a range of different target tissues.

Computational analysis for the Identification of endocrine disruptors in food additives and contaminants

Francesca Spyarakis ^{a,b}, Laura Goracci ^c, Fabio Veneri ^a, Chiara Dall'Asta ^d, Gianluigi Ingletto ^a,
Andrea Mozzarelli ^{b,e}, Gabriele Cruciani ^c, Paolo Benedetti ^c and Pietro Cozzini ^{a,b}.

^aDepartment of General and Inorganic Chemistry, University of Parma, ^bNational Institute for Biostructures and Biosystems, ^cDepartment of Chemistry, University of Perugia, ^dDepartment of Organic Chemistry, University of Parma, ^eDepartment of Biochemistry and Molecular Biology, University of Parma, Italy.

Estrogen receptors are ligand-activated transcription factors belonging to the super family of nuclear receptors, able to mediate a broad spectrum of physiological effects in several organs and tissues, including numerous diseases such as breast and endometrial cancer, osteoporosis, and prostate hypertrophy. A variety of synthetic and natural chemicals are known to bind ER, exerting a certain degree of estrogenic or anti-estrogenic activity [1]. In the search of endocrine disruptors we have previously analyzed the list of food additives included in the Joint FAO-WHO expert committee database (JECFA), using an integrated *in silico* and *in vitro* approach. The study led to the recognition of propyl gallate, as an ER antagonist, and of 4-hexylresorcinol, as a potent transactivator, both active at nanomolar concentration [2]. To expand the investigations to a wider number of potential ER binders, we are currently screening the whole database, considering both food additives and flavoring agents. The ongoing ligand-based virtual screening is performed using the Flap algorithm [3], based on the Molecular Interaction Fields generated through the GRID force field [4], and able to describe small molecules and protein structures using a common reference framework of four-point pharmacophore fingerprints.

We are also carrying out an *in silico* analysis of a series of food contaminants, as pesticides and ink photoinitiators identified in food beverages [5,6], and chlorinated dioxin derivatives, reported to exert estrogen-related actions via a yet unknown molecular mechanism. The docking/scoring integrated analysis, performed using the GOLD docking algorithm and the HINT scoring function [7,8], suggested that many of the investigated substances may favorably bind to the estrogen receptor. Experimental binding assays will be carried out to verify the computational predictions.

[1] Mueller, SO (2004). Xenoestrogens: mechanism of action and detection methods. *Anal Bioanal Chem* 378, 582-587.

[2] Amadasi, A, Mozzarelli, A, Meda, C, Maggi, A, Cozzini, P. (2009). Identification of xenoestrogens in food additives by an integrated *in silico* and *in vitro* approach. *Chem Res Toxicol* 22, 52-63.

[3] Baroni, M, Cruciani, G, Sciabola, S, Perruccio F, Mason, JS (2007). A common reference framework for analyzing/comparing proteins and ligands. Fingerprints for Ligands and proteins (FLAP): theory and application. *J Chem Inf Model* 2, 279-294.

[4] www.moldiscovery.com

[5] Sagratini, G, Manes, J, Giardinà, D, Damiani, P, Picò, Y (2007). Analysis of carbamate and phenylurea pesticide residues in fruit juices by solid-phase microextraction and liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chrom A* 1147, 135-143.

[6] Sagratini, G, Caprioli, G, Cristalli, G, Giardinà, D, Ricciutelli, M, Volpini R, Zuo, Y, Vittori S (2008). Determination of ink photoinitiators in packaged beverages by gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chrom A* 1194, 213-220.

[7] Kellogg, GE, Burnett, JC, Abraham, DJ (2001). Very empirical treatment of solvation and entropy: a force field derived from $\log P_{o/w}$. *J Comput Aided mol Des* 15, 381-393.

[8] Cozzini, P, Fornabaio, M, Marabotti, A, Abraham, DJ, Kellogg, GE, Mozzarelli, A (2002). Simple, intuitive calculations of free Energy of binding for protein-ligand complexes. 1. Models without explicit constrained water. *J Med Chem* 45, 2469-2483.

Miscele di PCB a livelli di dose reali alterano l'espressione genica di cellule fetali dell'apparato riproduttivo maschile

Sabrina Tait, Cinzia La Rocca, Alberto Mantovani

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

sabrina.tait@iss.it

Con il termine BEEC (Bladder Extrophy-Epispadias Complex) si indica un complesso di malformazioni rare del tratto genitourinario comprendenti l'epispadia, l'estrofia della vescica e della cloaca. Così come per altri disordini anche per la BEEC si ipotizza una patogenesi multifattoriale che implica componenti genetiche ed ambientali.

I contaminanti ambientali con caratteristiche di interferenti endocrini (IE) sembrano costituire potenziali fattori di rischio nella patogenesi di tale malformazione, soprattutto a causa della loro capacità di modulare il bilanciamento degli estrogeni/androgeni durante le fasi critiche dello sviluppo dell'apparato riproduttivo maschile. Diversi studi indicano alcuni IE quali potenziali fattori di rischio per l'insorgenza di malformazioni genito-urinarie frequenti (es. ipospadia, criptorchidismo), ma nessuna evidenza è stata a tutt'oggi fornita circa una loro possibile implicazione nella patogenesi della più rara BEEC. Tra gli IE, i policlorobifenili (PCB) meritano particolare attenzione per la loro diffusa presenza negli alimenti, principale via di esposizione umana, nonché per i meccanismi d'azione che potrebbero essere rilevanti nella patogenesi della BEEC. Pertanto lo scopo dello studio è rivolto a individuare i possibili effetti sullo sviluppo dell'apparato maschile in seguito a trattamento con PCB a livelli di dose realistici ed identificati in studi d'esposizione nella popolazione generale.

I livelli d'esposizione interna per i diversi congeneri di PCB sono stati determinati nella popolazione generale attraverso l'analisi di campioni di tessuto adiposo umano, da cui sono state calcolate le concentrazioni dei singoli congeneri nel siero rispetto al contenuto lipidico serico. Sono state quindi preparate tre miscele utilizzando tali concentrazioni e suddividendo i congeneri in base alle loro somiglianze strutturali nonché alle possibili analogie nei meccanismi d'azione: G1 (potenzialmente estrogenici), G2 (diossina-simili, immunotossici, antiestrogenici), G3 (forte potenziale di bioaccumulo, CYP-attivanti).

Come modello in vitro sono state utilizzate cellule di muscolatura liscia dei corpi cavernosi (hfPSMC) isolate e stabilizzate da feti di 9-10 settimane. La conferma del sesso maschile è stata ottenuta per analisi cromosomica e PCR del gene *sry*, mentre la caratterizzazione della natura muscolare delle cellule è stata effettuata mediante analisi immunocitochimica e citometrica a flusso utilizzando anticorpi specifici verso α -SMA, vimentina e desmina.

Le cellule sono state esposte alle tre miscele di PCB e ne è stata valutata la modulazione nei profili di espressione genica mediante utilizzo della tecnica del microarray. La piattaforma Agilent contenente ~44.000 oligonucleotidi rappresentativi dell'intero genoma umano ha permesso di evidenziare una modulazione globale di 393 geni (fold change \pm 1,2, p-value < 0.01) con una chiara distinzione nei profili d'espressione fra le cellule trattate con i diversi gruppi di PCB. Solo il 12% circa dei geni risultano modulati da tutte e tre le miscele. Inoltre, l'analisi funzionale dei geni modulati ha mostrato un diverso arricchimento nei termini di Gene Ontology relativi ai tre profili d'espressione.

I risultati ottenuti indicano quindi che, a livelli di dose interna reali, le tre miscele di PCB studiate sono in grado di modulare l'espressione di diversi geni, alcuni dei quali critici per lo sviluppo riproduttivo fetale con potenziali effetti a breve o lungo termine. Inoltre, i diversi profili di espressione genica supportano l'ipotesi secondo cui le tre miscele di PCB abbiano modi d'azione diversi e che i geni in comune indichino un effetto totale dell'esposizione a PCB nel tessuto e nella finestra d'esposizione osservati.

Sviluppo di un metodo rapido per la determinazione di anabolizzanti illeciti in bovini di allevamento mediante Cromatografia Liquida accoppiata a Spettrometria di Massa ad Alta Risoluzione

Caterina Trevisan¹, Giulio Pojana², Dagmar Bilanicova², Eligio Sebastiani³, Armando Miliazza³, Leonardo Alberghini¹, Antonio Marcomini²

¹ Dipartimento di Sanita' Pubblica, Patologia Comparata e Igiene Veterinaria, Università degli Studi di Padova

² Dipartimento di Scienze Ambientali, Università Ca' Foscari di Venezia

³ SRA Instruments, Milano

Nell'Unione Europea l'uso di promotori della crescita ad azione ormonale nell'allevamento dei bovini da carne è vietato al fine di tutelare la salute dei consumatori dalla presenza di residui potenzialmente pericolosi nelle carni.

Per ottenere il rispetto del divieto imposto sono previsti dei piani di monitoraggio basati sulla ricerca nel siero o in altre matrici biologiche dei residui delle sostanze che si presume siano utilizzate illecitamente.

Come conseguenza dell'attività di sorveglianza si sono sviluppate alcune strategie di trattamento per eludere i controlli che prevedono, accanto all'uso di sostanze vietate, anche l'uso di sostanze autorizzate per finalità e a condizioni diverse da quelle previste.

La sorveglianza dell'uso dei promotori di crescita richiede quindi la disponibilità di metodi analitici sempre più precisi e accurati per la ricerca dei residui delle sostanze usate in modo illegale.

Si presenta un metodo analitico rapido di screening mediante cromatografia liquida accoppiata a spettrometria di massa ad alta risoluzione a tempo di volo (HPLC-HR-TOF-MS), per la valutazione della presenza di composti estrogenici nel siero di bovini di allevamento.

La separazione cromatografica è stata eseguita su una semplice colonna di arricchimento, utilizzando un gradiente di una fase mobile acqua/metanolo tamponata con acetato d'ammonio.

Grazie all'elevato grado di accuratezza di massa dello strumento utilizzato (<3 ppm), il metodo permette l'accurata conferma strutturale dei composti esaminati ottenendo cromatogrammi con ridottissime finestre di *range* di massa.

Il metodo è stato applicato a una serie di campioni di siero di bovini da carne, provenienti da macelli.

Incidenza della patologia neoplastica del cane e del gatto nelle province di Venezia e Vicenza

Marta Vascellari¹, Elisa Baioni¹, Antonio Carminato¹, Giuseppe Ru², Franco Mutinelli¹

¹IZS delle Venezie, Legnaro (PD); ²IZS del Piemonte Liguria e Valle d'Aosta, Torino

Numerosi studi sono diretti ad indagare l'epidemiologia della patologia neoplastica negli animali domestici, al fine di valutarne l'incidenza, i tempi di sopravvivenza e l'efficacia o meno delle terapie attuate. Inoltre, gli animali da compagnia, condividendo lo stesso ambiente di vita dell'uomo, si sono rivelati ottimi modelli per lo studio del ruolo di diversi contaminanti ambientali nell'induzione della patologia neoplastica. Il cane, in particolare, presenta quadri neoplastici simili a quelli dell'uomo (ad esempio, mammella, vescica, tessuto linfatico), così come una simile risposta biologica ai carcinogeni. Anche i meccanismi coinvolti nell'induzione della neoplasia sembrano essere gli stessi. L'utilizzo di modelli di studio animale, consente infatti di valutare l'insorgenza spontanea e il decorso neoplastico in tempi ridotti rispetto all'uomo, senza l'interferenza di possibili fattori di confondimento (esposizione professionali, fumo, consumo di alcool). Nell'aprile 2005, l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie ha avviato il Registro Tumori delle specie canina e felina delle province di Venezia e Vicenza. Il territorio prescelto risulta di particolare interesse perché in esso sono rappresentati sia ambienti rurali, collinari ed alpini, nonché zone dedicate alle colture intensive e zone prettamente industriali e urbane (per esempio l'area di Marghera - Mestre). Il progetto si prefigge l'obiettivo di produrre dati attendibili di incidenza e di prevalenza della patologia neoplastica spontanea del cane e del gatto nel territorio delle province di Venezia e Vicenza, e di valutare la presenza di eventuali fattori di rischio ambientali in funzione dell'incidenza e della distribuzione geografica delle neoplasie riscontrate. Al fine di stimare correttamente la popolazione canina e felina residente nel territorio, ci si è avvalsi di un'indagine a campione sulla popolazione umana dell'area. E' stato selezionato un campione casuale di 515 utenze telefoniche, stratificato sulla base della dimensione dei comuni della zona. Al campione di famiglie sono state poste domande in merito all'eventuale possesso di animali domestici, al loro numero e caratteristiche (razza, età e sesso). E' stata quindi stimata la dimensione e la struttura per sesso, razza ed età della popolazione animale in esame. Il progetto ha consentito di instaurare una rete di collaborazione con le strutture veterinarie cliniche, che si sono impegnate a rilevare ed inviare al laboratorio le lesioni di sospetta natura neoplastica rilevate nei soggetti residenti nel territorio oggetto di studio. Vengono riportati i dati di incidenza e prevalenza ottenuti nei primi 48 mesi di osservazione. Il tasso totale di incidenza di neoplasie maligne e benigne nella specie canina, calcolato sulle 2 province, è risultato di 288 casi ogni 100.000 cani. I tumori maligni e benigni sono ugualmente rappresentati, così come l'incidenza calcolata nei due sessi. Valutando invece i tassi di incidenza in funzione della razza, i dati indicano che i soggetti di razza pura hanno un rischio 2 volte maggiore di sviluppo di patologia neoplastica rispetto ai meticci. Nella specie felina il tasso di incidenza totale nelle due province è stato di 82 casi ogni 100.000 soggetti. Il tasso di incidenza delle neoplasie maligne calcolato nella provincia di Venezia risulta di 84, contro 55 della provincia di Vicenza. Anche nella specie felina i soggetti di razza pura hanno un tasso di incidenza quasi doppio rispetto agli incroci. Tra i fattori di rischio per lo sviluppo di patologia neoplastica vanno indagate cause di natura genetica, fattori di rischio ambientali, cause virali, esposizione diretta a carcinogeni. La nostra indagine evidenzia come i soggetti di razza pura, quindi sottoposti a selezione genetica, siano più predisposti all'insorgenza di forme neoplastiche. Inoltre, lo studio dell'incidenza delle diverse forme neoplastiche nelle singole razze, consente di evidenziare specifiche predisposizioni di razza. Lo studio della distribuzione dell'incidenza delle diverse forme neoplastiche nel territorio indagato, potrebbe inoltre evidenziare la presenza di fattori di rischio ambientali, da correlarsi ai dati dei registri tumori umani e ai dati di rilevazione ambientale, della presenza di contaminanti. Prossimo obiettivo dello studio sarà valutare più approfonditamente le differenze di incidenza nei comuni delle due province mettendo a confronto le due principali città, Vicenza e Venezia, già oggetto di studio in ambito dei registri tumori umani.