



ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

**Workshop**  
**“KILLER INVISIBILI”? INDAGINE SUGLI INQUINANTI CHE ALTERANO IL  
NOSTRO SISTEMA ORMONALE**

4 luglio 2003

Istituto Superiore di Sanità  
Viale Regina Elena, 299 - Roma

## WORKSHOP

### “KILLER INVISIBILI”? INDAGINE SUGLI INQUINANTI CHE ALTERANO IL NOSTRO SISTEMA ORMONALE

4 luglio 2003

organizzato da  
ISTITUTO SUPERIORE DI SANITA'

9:10 Indirizzo di benvenuto

**E. Garaci, Presidente**

Presidente Istituto Superiore di Sanità

9:20 Introduzione ai lavori

**F. Oleari**

Moderatori: **L. Gramiccioni**

**A. Macrì**

9:40 Il Progetto Pilota dell'ISS “ Esposizione umana a xenobiotici con potenziale attività endocrina: valutazione dei rischi per la riproduzione e per l'età evolutiva”. Risultati e prospettive

**A. Mantovani**

10:00 Stili di vita e rischio espositivo a “Endocrine Disrupters”.

**L. Silvestroni**

10:15 Impatto dell'esposizione a “Endocrine Disrupters” sulla struttura della cromatina dello spermatozoo

**M. Spanò**

10:30 Genetica e Farmacogenetica nella risposta estrogenica

**M. L. Brandi**

10 45 Valutazione di miscele complesse di distruttori endocrini

**A. Colacci**

11:00 Coffee break – Conferenza Stampa

11:30 Valutazione dell'esposizione a distruttori endocrini

**A. Di Domenico**

11:45 Il monitoraggio biologico nella valutazione dell'esposizione e degli effetti: qualità e affidabilità delle misurazioni

**M. Patriarca, A. Menditto**

12:00 Impatto sulla funzione tiroidea dell'esposizione a pesticidi

**A. Olivieri**

12:15 Ambiente e funzione tiroidea: vecchi problemi, nuove preoccupazioni  
**A. Pinchera**

12:30 Discussione, Interventi preordinati

13:15 Conclusioni  
**L. Gramiccioni, A. Macri**

13:30 Conclusione dei lavori

**E' stato invitato il Ministro della Salute, G. Sirchia**

## **RELATORI E MODERATORI**

**Maria Luisa Brandi** – Dipartimento di Medicina Interna, Università di Firenze

**Annamaria Colacci** – Laboratorio Meccanismi di Cancerogenesi e Anticancerogenesi, ARPA  
Emilia Romagna, Bologna

**Alessandro Di Domenico, Luciana Gramiccioni, Alberto Mantovani** – Dipartimento Ambiente e  
Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma

**Agostino Macri** – Dipartimento Sanità Alimentare ed Animale, Istituto Superiore di Sanità, Roma

**Antonio Menditto, Marina Patriarca** – Dipartimento Ematologia, Oncologia e Medicina  
Molecolare, Istituto Superiore di Sanità, Roma

**Fabrizio Oleari** – Direzione Generale della Prevenzione, Ministero della Salute, Roma

**Antonella Olivieri** – Dipartimento Biologia Cellulare e Neuroscienze, Istituto Superiore di Sanità,  
Roma

**Aldo Pinchera** – Dipartimento di Endocrinologia, Università di Pisa

**Leopoldo Silvestroni** – Dipartimento di Fisiopatologia Medica, Policlinico “Umberto I°”,  
Università 'La Sapienza', Roma

**Marcello Spanò** – Dipartimento di Tossicologia e Scienze Biomediche, ENEA Casaccia, Roma

## **Responsabile del Workshop**

A. MANTOVANI

Tel. 0649902565

Fax 0649387139

E-mail: [alberto@iss.it](mailto:alberto@iss.it)

## **Segreteria Scientifica**

F. MARANGHI

Tel. 0649902529

Fax 0649387139

E-mail: [maranghi@iss.it](mailto:maranghi@iss.it)

## **Segreteria Organizzativa**

SEGRETERIA PER LE ATTIVITA' CULTURALI

Istituto Superiore di Sanità

Viale Regina Elena, 299 – 00161 Roma

Tel. 0649902611 – 0649903431

Fax 0649387073

E-mail: [segr-sac@iss.it](mailto:segr-sac@iss.it)

## **Ufficio Stampa**

M. TARANTO, I. PURIFICATO

Istituto Superiore di Sanità

Viale Regina Elena, 299 – 00161 Roma

Tel. 0649902950

Fax 0649387154

E-mail: [taranto@iss.it](mailto:taranto@iss.it)

## INFORMAZIONI GENERALI

### **Sede**

Aula Pocchiari, Istituto Superiore di Sanità  
Viale Regina Elena, 299 – Roma

### **Destinatari**

Il Workshop è rivolto a Media ed operatori laureati di Enti di Ricerca, del Servizio Sanitario Nazionale, ANPA-ARPA nonché provenienti dai Ministeri della Salute, Ambiente, delle Politiche Agricole e Università e della Ricerca Scientifica impegnati in attività di valutazione e comunicazione del rischio nell'ambito degli effetti sulla salute di sostanze con attività endocrina.

### **Iscrizione**

La partecipazione è gratuita.

Per motivi organizzativi si prega di comunicare la propria adesione alla Segreteria Scientifica **entro il 30 giugno 2003**.

### **Attestato di partecipazione**

Al termine della manifestazione sarà rilasciato un attestato di partecipazione a chi ne farà richiesta.

**Per ogni informazione inerente al Workshop si prega di contattare al Segreteria Scientifica.**

# **Il Progetto Pilota dell'ISS**

**“ Esposizione umana a xenobiotici con potenziale attività endocrina: valutazione dei rischi per la riproduzione e per l'età evolutiva”.**

**Risultati e prospettive**

**Alberto Mantovani**

*Istituto Superiore di Sanità, 00161,*

*Roma, Tel. ++39 06 4990 2565;*

*e-mail: [alberto@iss.it](mailto:alberto@iss.it)*

# OBIETTIVI

## Valutazione del Rischio:

- **Pericoli (*Hazard*):** quali effetti ?
- **Esposizione:** biomarkers
- **Suscettibilità:** fattori genetici/ metabolici

**Progetto pilota:** identificare priorità  
rete di competenze interdisciplinare

## Le UNITA' OPERATIVE

- Alterazioni dello sviluppo riproduttivo (ISS, con collaborazioni: CNR Pisa, Univ. Roma “Tor Vergata”, Firenze, Chieti)
- Fertilità umana (Univ. Roma “La Sapienza”)
- Cellule germinali ed embrione preimpianto (ENEA Casaccia)



## Le UNITA' OPERATIVE (II)

- Effetti recettore-mediati  
(Univ. Firenze)
- Interazioni fra ED (IST Bologna)
- Valutazione dell'esposizione (ISS, collaborazione con Univ. Brescia)
- Etilen Bisditiocarbammati e tiroide  
(ISS, collaborazioni con ASL Firenze)
- Stirene e tiroide (univ. Pisa)

# PERICOLI (*Hazard*)

- Effetti “**ritardati**” sullo sviluppo

in seguito ad esposizione **prenatale**

Lindano: modello di composto persistente con effetti endocrini complessi

➤ Effetti in animali (M & F) giovani e/o sessualmente maturi

➤ Effetti “simil-estrogenici” (conf. **DES**)

➤ Prenatale > lattazione (fase > esposizione)

➤ Parametro critico: qualità ed integrità dei gameti maschili (anche per il **DES**)

## PERICOLI (II)

- Estrogeni nello sviluppo riproduttivo maschile  
(*down-regulation*)

Il pene fetale umano è ricco di recettori per gli estrogeni

Modello in vitro: cellule muscolari di pene fetale risponde a sostanze con attività endocrina

# PERICOLI (III)

Tiofanato metile: fungicida “poco tossico”  
ma metabolizzato a benzimidazoli (*tiroide?*)

Ratti esposti in utero:

assenza di effetti su crescita e sviluppo

alterazioni sottili a carico di tiroide

(follicoli - 20%, maggiore immaturità) e

corticosurreni (- 10% area ghiandolare )

- dosi alte (DE debole)

- significato funzionale a lungo termine ?

# PERICOLI (IV)

- **Fertilità: lindano**

Esposizione durante la fecondazione: letalità o ridotta moltiplicazione cellulare degli embrioni pre-impianto (*esito: abortività precoce ?*).

- **ER di membrana sullo spermatozoo umano *downregulation*: Tamoxifen: effetto antagonista**

DE estrogenici “deboli” (bisfenolo A, ottilfenolo polietossilato) nessun effetto (deboli ? Agonisti di recettori nucleari ?)

# ESPOSIZIONE

- **Biomarcatori in gruppi ad elevata esposizione**

-Situazioni di elevata esposizione lavorativa (**serre, disinfestatori**) a potenziali DE

(atrazina, clorurati, benzimidazoli..):

+ “time to pregnancy”

+ abortività

nelle compagne **non esposte** dei lavoratori

# ESPOSIZIONE (II)

- cont. **Biomarcatori**

## Studi in corso:

- pesticidi clorurati e metalli pesanti in pazienti con patologie endocrino-metaboliche
- funzione tiroidea ed esposizione al pesticida mancozeb (biomarcatore il metabolita etilene tiourea) in lavoratori agricoli del Chianti
- Stirene (fabbrica di vetroresina, Toscana)
- PCB (episodio di contaminazione alimentare, Lombardia)

# ESPOSIZIONE (III)

Intanto possiamo dire che:

- messa a punto di un modello di scheda per l'anamnesi dell'esposizione
  - esposizione diffusa, ma a livelli non allarmanti
  - buoni biomarkers: indicatori di funzionalità tiroidea
- Il problema miscele: come valutarle ?  
metodo biologico *in vitro* per valutare miscele di PCB in siti contaminati



# SUSCETTIBILITA'

- Fattori genetici in patologie su base endocrina

- polimorfismi dell'aromatasi: modulano significativamente il rischio di osteoporosi (molti DE sono inibitori dell'aromatasi)

- polimorfismi ER  $\alpha$  e  $\beta$ , e PR: esistono nella popolazione, non associati al rischio di leiomiomi uterini

- carcinoma colon-retto: forte attività di 17 beta-idrossisteroide deidrogenasi, con conversione alle forme di estrogeni più attive

# Altre Ricadute del Progetto

- Comunicazione ed informazione

Sito tematico <http://www.endodisru.iss.it>  
<http://www.iss.it/sitp/dist/index.html>

- Altri progetti nazionali a coordinamento ISS attinenti ai DE

*“Esposizione ad organoalogeni persistenti e salute riproduttiva femminile” (E.De Felip)*

*“Analisi del rischio negli alimenti da contaminanti ambientali” (L.Gramiccioni)*

# LE PRIORITA'

## •Pericoli:

Effetti ritardati sullo sviluppo (sviluppo di endpoints “meno convenzionali”:  
istomorfometria, qualità/integrità dei gameti)

Integrare le conoscenze biomediche di base (embriologia/endocrinologia) nella  
analisi del rischio dei DE

# LE PRIORITA' (II)

- **Esposizione :**

necessità di valori di riferimento

esposizione a miscele: sviluppo di biosensori

fattori personali, culturali e sociali che modulano l'esposizione

(alimentazione, stili di vita..)

# LE PRIORITA'(III)

- **Suscettibilità**

polimorfismi recettoriali e/o enzimatici come biomarcatori di suscettibilità

Possibili interazioni con sequenze genomiche non codificanti (HERV), ma con ruolo regolatorio e modulate da steroidi

# LE PRIORITA'(IV)

- **Suscettibilità (cont.)**

Possibili interazioni con stati dismetabolici prevalenti nella popolazione (es., status iodocarente, celiachia)

Maggiore attenzione all'esposizione a distruttori endocrini anche in relazione ad effetti non riproduttivi (es., sistemi nervoso ed immunitario) soprattutto in fasce vulnerabili della popolazione

## WORKSHOP “KILLER INVISIBILI”? INDAGINE SUGLI INQUINANTI CHE ALTERANO IL NOSTRO SISTEMA ORMONALE

Roma, 4 luglio 2003

Progetto Ministero della Salute “Esposizione Umana a Xenobiotici con Potenziale Attività Endocrina: Valutazione del Rischio per la Riproduzione e per l’Età Evolutiva”

Unità Operativa 3: Valutazione di alterazioni indotte in cellule germinali e in embrioni di topo durante la fase pre-impianto da composti con potenziale attività a livello endocrino

Responsabile Scientifico: Dr. Marcello Spanò, Sezione di Tossicologia & Scienze Biomediche, BIOTEC-MED ENEA, Roma

Titolo: Impatto dell’esposizione a EDC sulla struttura della cromatina dello spermatozoo

### SLIDE

Perché è importante comprendere la struttura della cromatina dello spermatozoo e delle sue eventuali alterazioni? Per rispondere a questa domanda è utile ricordare alcuni momenti salienti dell’ultima fase della spermatogenesi, la spermiogenesi, in cui avviene la trasformazione di una cellula convenzionale, come lo spermatide rotondo, in una cellula veramente peculiare ed altamente mobile, lo spermatozoo. Accanto alla profonda metamorfosi cellulare, anche il nucleo subisce un impressionante processo di compattazione associato alla riorganizzazione nucleoproteica che prevede la progressiva sostituzione degli istoni (somatici e testicolari) con protamine (nell’uomo e nel topo di 2 tipi prevalenti, PRM1 e PRM2), proteine basiche a basso peso molecolare, ad alto contenuto di arginina e cisteina, che andranno a costituire il componente proteico più abbondante nel nucleo spermatico, dopo l’attivazione del locus genico delle protamine e delle proteine di transizione situato sul cromosoma 16.

### SLIDE

Il meccanismo di transizione istoni/protamine è molto complesso e finemente regolato. Gli istoni vengono prima fosforilati, acetilati, ubiquinati. Quindi assistiamo all’intervento delle proteine di transizione (nell’uomo e nel topo di 2 tipi, TP1 e TP2) per mantenere una struttura intermedia nei siti di deposizione delle protamine e favorire l’eliminazione degli istoni. I domini di arginina sulle protamine favoriscono la doppia elica del DNA ad assumere una struttura toroidale in maniera indipendente dalla sequenza nucleotidica. Ogni molecola di protamina viene avvolta da una spira di DNA, di circa 11 bp, intercalando prevalentemente il solco minore dell’elica. La cromatina si organizza in loops costretti in specifici domini topologici, di lunghezza media specie-specifica (nell’uomo circa 27 kb) ancorati alla

matrice nucleare, collassando infine secondo una configurazione a ciambella. Durante il passaggio nell'epididimo, quindi a livello extratesticolare, si formano ponti S-S intra- ed inter-molecolari tra i residui SH cisteinici che stabilizzano ulteriormente l'assemblaggio cromatinico. Il legame con ioni zinco (la PRM2 è una zinc-finger protein) compatta ulteriormente questa struttura. Anche il DNA non rimane inerte durante la sostituzione degli elementi proteici della cromatina. Enzimi ubiquitari della matrice nucleare, come le topoisomerasi II, agiscono per eliminare il superavvolgimento negativo per rilassare eventuali tensioni nelle strutture sottoposte a movimenti torsionali molto intensi, apportando dei tagli opportuni, riparati durante la riorganizzazione strutturale, soprattutto nella fase di spermatidi in allungamento. Al termine del processo, lo spermatozoo maturo differenziato terminalmente, di forma specifica per ogni specie, è caratterizzato da un materiale genetico circa 6 volte più compatto di un cromosoma mitotico e occupa un volume 40 volte inferiore a quello di una cellula somatica tipica. In pratica, 1 m di DNA lineare nudo viene accomodato in un nucleo lungo circa 2 micron contenente circa 300 milioni di protamine.

#### SLIDE

Sembra che la natura abbia elaborato questo processo per: (1) proteggere e rendere altamente resistente il complemento aploide del genoma paterno (il nucleo che è inerte trascrizionalmente e manca di meccanismi di riparo) alle numerose aggressioni ambientali durante il suo tragitto nel sistema riproduttivo maschile prima e poi in quello femminile, fino al momento della fecondazione; (2) riprogrammare il genoma paterno ad esprimere un appropriato set di geni durante gli stadi più precoci della riattivazione genomica globale embrionale. Inoltre, la sperimentazione animale ha fornito numerose evidenze che se il maschio viene trattato con sostanze mutagene prima della fecondazione, queste si possono evidenziare sul DNA (nel caso dell'acrilamide anche sulle protamine) dello spermatozoo che mantiene comunque la stessa efficienza di fecondazione. La trasmissione del genoma paterno difettoso può avere però conseguenze negative per lo sviluppo dell'embrione e per lo stato di salute della progenie. Sembra quindi che il processo di riorganizzazione nucleoproteica debba essere completato correttamente affinché lo spermatozoo esprima il suo progetto genetico. Questa ipotesi di lavoro prevede che alterazioni nel corretto processo di condensazione della cromatina, che possono intervenire a qualsiasi livello, in uno o più dei partners molecolari coinvolti, possano impattare negativamente sulle funzioni primarie dello spermatozoo. Questo tipo di alterazioni ovviamente non è accessibile all'analisi convenzionale secondo le linee guida WHO per l'esame della qualità del seme (valutazione del numero, concentrazione, motilità e morfologia degli spermatozoi) e potrebbero essere alla base di una larga percentuale di infertilità maschile definita idiopatica.

#### SLIDE



Al tempo stesso, è stato ripetutamente osservato che anomalie della struttura cromatinica dello spermatozoo diventano più frequenti quando la qualità del seme si degrada, cioè proprio nei pazienti con problemi di fertilità e che costituiscono i candidati per le procedure di fecondazione assistita. Si è visto che: (1) una eccessiva persistenza di istoni è associata a condizioni di subfertilità per una ridotta stabilità cromatinica ed aumentata instabilità genomica; (2) l'assenza completa di PRM2 è associata ad una condizione di sterilità; (3) alterazioni nel normale rapporto PRM1/PRM2 (che in condizioni normali è circa 1) sono alla base di alcune condizioni di subfertilità.

SLIDE

Da 3 anni a questa parte, inoltre, sono stati caratterizzati modelli murini knock-out che non esprimono proteine essenziali al processo di riorganizzazione cromatinica della spermiogenesi. Topi knock-out per l'espressione delle protamine, delle proteine di transizione, delle proteine che processano la PRM2, sono tutti caratterizzati da un fenotipo sterile.

SLIDE

Il nostro gruppo ha inoltre recentemente dimostrato che la % di spermatozoi con aberrazioni della cromatina, impatta negativamente sul potenziale di fecondità umano della popolazione generale in condizioni normali e quando questa % raggiunge un certo valore, la probabilità di diventare podri diventa trascurabile, indipendentemente dal numero, motilità e morfologia degli spermatozoi. Questi risultati sono stati confermati anche da uno studio condotto indipendentemente negli USA con la stessa metodica su una popolazione con caratteristiche simile a quella considerata nel nostro studio.

SLIDE

Ancora, si stanno accumulando negli ultimi 5 anni una serie crescente di osservazioni ssecondo cui la presenza di una frazione elevata di spermatozoi con difetti del materiale genetico, oltre ad essere più comune in individui con problemi di fertilità, è associata ad una percentuale di successi più bassa nelle procedure di fecondazione assistita. Maggiore è la percentuale di spermatozoi aberranti minore è la probabilità di condurre a termine una gravidanza.

All'ENEA stiamo cercando di affrontare, nell'uomo come nel topo, il problema costituito dallo studio delle alterazioni del materiale genetico dello spermatozoo maturo. Nell'ultimo decennio la nostra conoscenza sulla fisiologia e vulnerabilità del nucleo dello spermatozoo sono molto aumentate anche grazie alla disponibilità di metodiche citologiche e molecolari quali FISH, Tunel, Comet, SCSA. Nei nostri labotatori ci siamo dotati di alcune di queste tecniche e le stiamo utilizzando per esperimenti di tossicologia riproduttiva e nell'ambito di complessi studi epidemiologici. Per ciascuno di questi metodi

si stanno studiando i rispettivi vantaggi/svantaggi, i livelli di complementarità, i domini di applicazione clinico/tossicologico. Vorrei far notare che queste metodiche sono di tipo non invasivo e costituiscono dei “bridging biomarkers”, possono essere cioè impiegati in varie specie animali anche per l’ottenimento di stime del rischio riproduttivo per l’uomo.

SLIDE

Possiamo quindi concludere che le anomalie della cromatina e difetti del DNA dello spermatozoo hanno rilevanza clinica e tossicologica e possono essere utilizzate per complementare le informazioni fornite da altri tipi di test nonchè per aumentare la sensibilità degli esperimenti di tossicologia riproduttiva attraverso un approccio integrato con altre metodiche.

SLIDE

Il trend negativo ed in crescita, dal dopoguerra ad oggi, di una serie di disturbi del sistema riproduttivo maschile (deterioramento della qualità del seme del maschio occidentale, aumento dell’incidenza del cancro testicolare e di vari tumori ormono-dipendenti, aumento dell’incidenza di orchidismo e ipospadia, aumento della richiesta delle tecniche di fecondazione assistita che può riflettere indirettamente un calo del potenziale di fecondità, aumento dell’incidenza di endometriosi, pubertà più precoce) ha indotto 10 anni fa Sharpe e Skakkebek a formulare l’ipotesi estrogenica in cui si formalizzava la possibilità che composti con attività estrogenica (naturali e/o artificiali) potessero interferire con l’asse ipofisario-gonadale influenzando il normale sviluppo del sistema riproduttivo maschile. Nel frattempo venivano alla luce drammatici effetti su alcune specie di animali selvatici (pesci maschi che producevano vitellogenina, una proteina tipica degli individui femmine; molluschi a sesso indifferenziato “imposex”, alligatori con difetti dei caratteri sessuali primari, ermafroditismo negli orsi polari, diminuzione della popolazione delle colonie di foche artiche, ecc.) collegabili con un pesante inquinamento con una serie di composti antropici, in genere organoclorurati persistenti. Sono passati 7 anni dalla pubblicazione del lavoro di Toppari et al. in cui si indicavano una serie di composti di rilevanza ambientale ed occupazionale con attività estrogenica (o anti-androgenica) strutturando l’era degli Endocrine Disruptors quali responsabili di queste patologie. Negli ultimi anni quindi si è cercato di dimostrare il reale pericolo di questi composti per l’omeostasi dell’intero equilibrio ormonale umano. Noi ci occuperemo solo dell’aspetto legato agli ormoni sessuali. In questo contesto, le evidenze epidemiologiche sono elusive, anche se chiari effetti a questo livello sembrano essere l’eccesso di nascite di sesso femminile riscontrato a Seveso dopo l’incidente della diossina (correlate all’esposizione delle madri ma non del padre) e, questa notizia è di poche settimane fa, un lavoro svedese ha analizzato individui giovani con cancro testicolare ed ha trovato correlazioni con i livelli di esposizione ad una serie di composti considerati EDC riscontrati nelle madri.

## SLIDE

Il framework teorico in cui ci muoviamo ora, formalizzato da Skakkebaek e colleghi nel 2001, prevede che le diverse patologie prima descritte siano in realtà intercorrelate rappresentando sintomi diversi e di differente entità ascrivibili ad un'unica patologia, la sindrome disgenica testicolare, e che le alterazioni subite durante momenti critici dello sviluppo gonadale maschile nello stadio fetale, a seconda del tipo cellulare colpito (Sertoli, Leydig, gonociti) produrranno, con diversi gradi di severità e concomitanza di sintomi, una serie di patologie che saranno rilevabili solo dopo la nascita, mentre la causa scatenante va ricercata in una lesione irreversibile durante gli stadi precoci dello sviluppo embrio-fetale. Queste lesioni possono essere imputate al corredo genetico individuale, ma è proprio a questo livello che possono agire gli EDC. Vorrei far riflettere sulla portata di questa ipotesi teorica che intuitivamente prevede uno sforzo interdisciplinare per affrontare il problema. Prima era il pediatra che riscontrava le anomalie alla nascita (ipospadia, orchidismo, che per definizione hanno una causa fetale), poi vari anni dopo l'oncologo riscontrava un carcinoma testicolare, ancora più tardi un endocrinologo e/o un andrologo riscontrava un quadro dispermico. Se siamo in presenza di diversi aspetti di un'unica sindrome, questa non può più essere delegata ad una moltitudine eterogenea di specialisti senza collegamento. Epidemiologi, tossicologi, chimici vanno a completare questa task force per capire meglio le cause e gli effetti sulla specie umana andando anche a simulare le esposizioni in altri sistemi animali. Vorrei ancora aggiungere che l'ipotesi estrogenica ha costituito il volano anche per gli studi di fisiologia umana e sotto questo impulso trainante (è la riproduzione umana in pericolo per la presenza nell'ambiente di EDC?) sono stati compiuti passi fondamentali sulla comprensione di base, a livello molecolare e cellulare, della fisiologia e patologia del sistema endocrino.

## SLIDE

Per ritornare al problema costituito dall'esposizione in utero, è qui che si ipotizza sia massima l'efficacia degli EDC, in queste finestre critiche dello sviluppo, in questi intervalli temporali caratterizzati dall'attivazione di diversi eventi dinamici dell'organizzazione di tessuti ed organi che costituiscono periodi durante i quali le esposizioni possono avere il massimo potenziale di influenzare post-natalmente, in periodi pre- o post-puberali, la competenza riproduttiva. Soprattutto quella maschile, così dipendente dall'orchestra ormonale che prevede la partecipazione dinamica dell'espressione di recettori per gli ormoni steroidei variabile nel tempo e nello spazio. A questo livello, in queste finestre di suscettibilità, si stanno concentrando gli studi di tossicologia e così pure, nel nostro progetto, il contatto tra i composti chimici e le cellule germinali maschili è stato realizzato durante una finestra temporale molto precoce. Passiamo ora alla sperimentazione effettuata nel corso di questo progetto che riguarda studi miranti a caratterizzare alcuni effetti riproduttivi del Lindano.

## SLIDE

Il Lindano è un insetticida introdotto nell'ambiente nei primi anni 50, bandito o comunque ad uso ristretto a partire dagli anni 70, lo si può rintracciare nelle matrici ambientali e nei liquidi biologici.

SLIDE

Il nostro schema sperimentale prevedeva la seguente modalità di trattamento delle femmine gravide e i vari endpoints enzimatici, istologici, citologici e citofluorometrici per la valutazione degli effetti a livello testicolare.

SLIDE

L'esposizione è quindi avvenuta durante fasi sensibili dello sviluppo gonadale. Cosa succede infatti in questa settimana critica per la formazione degli organi riproduttivi maschili? Sotto l'attivazione di una particolare sequenza di geni responsabili della formazione della gonade maschile (e della regressione dell'apparato riproduttivo femminile che altrimenti avverrebbe di default), abbiamo la formazione e migrazione delle cellule primordiali germinali, la colonizzazione della gonade indefferenziata, il suo differenziamento verso la gonade maschile, la proliferazione delle cellule di Sertoli, il differenziamento delle cellule di Leydig, l'inizio della sintesi di testosterone, la comparsa dei recettori LH. Quindi, una serie notevole di bersagli critici.

SLIDE

Passiamo ora ai risultati di questo approccio integrato. A 60 giorni dalla nascita, durante le prime onde spermatogeniche, a livello enzimatico, abbiamo notato effetti dose-dipendenti per quanto riguarda sia la latticodeidrogenasi che per la sorbitolodeidrogenasi. Consistentemente, anche il numero di spermatidi allungati resistenti alla sonicazione ha subito una riduzione dose-dipendente, anche questo consistente con la riduzione del peso testicolare degli animali trattati. Tutti questi effetti, nel caso del Lindano ma non del DES, mostravano una tendenza a rinormalizzarsi a 100 giorni dopo la nascita, dopo un ulteriore ciclo completo spermatogenico.

SLIDE

Sempre a livello testicolare, mediante flow cytometry, siamo riusciti a scoprire anche un'alterazione nella distribuzione delle cellule germinali nei diversi compartimenti differenziali, soprattutto a carico della componente aploide, riflesso di anomalie indotte nella cinetica della spermatogenesi. Anche in questo caso si tratta di effetti reversibili, in quanto a 100 giorni c'è un recupero dei valori simili a quelli di controllo.

## SLIDE

Per valutare alterazioni nella cromatina del gamete maturo abbiamo utilizzato la tecnica SCSA capace di rilevare in maniera integrata alterazioni della cromatina spermatozoaria imputabili sia a rotture del DNA che ad una insufficiente sostituzione protaminica. Sorprendentemente abbiamo riscontrato un aumento dose-dipendente di spermatozoi con cromatina alterata, anche in questo caso effetti reversibili. Quest'ultimo dato ci ha sorpreso in quanto era il primo caso che un composto appartenente alla classe degli EDC, assolutamente non mutageno, abbia potuto indurre effetti tipici di composti mutageni, ma con quale meccanismo di azione?

## SLIDE

Il Lindano non lega il recettore degli estrogeni, non interferisce con il legame tra DHT e ABP, ma è stato recentemente dimostrato che il Lindano può influenzare il metabolismo steroideo a livello mitocondriale, soprattutto inibendo StAR, un elemento chiave nella sintesi degli androgeni a partire dal colesterolo.

## SLIDE

Quindi, il Lindano può inibire la sintesi di T nelle cellule di Leydig e, consistentemente, noi abbiamo apprezzato una moderata iperplasia delle cellule di Leydig, sede della sintesi testosteronica, negli animali trattati. Un lavoro recente di genomica ha dimostrato che uno dei geni bersaglio down-regolati dal testosterone è quello della DNA topoisomerasi II, quell'enzima chiave nella riorganizzazione cromatinica allo stadio di spermatidi che opera rotture sul DNA per favorire la transizione da istoni a protamine. Quindi la nostra ipotesi basa il possibile meccanismo di azione del Lindano sulla riduzione della sintesi di testosterone. È stato dimostrato che topi knockout per LHR (FORKO) hanno bassi livelli di testosterone ed aumentata instabilità cromatinica negli spermatozoi. Questo apre una finestra che riguarda quell'area più complessa ed ancora non completamente chiarita costituita dagli effetti paracrini del testosterone sulle cellule germinali che, tra l'altro, non esprimono l'AR ma l'ER.

## SLIDE

Infine, sono stati portati a termine due esperimenti tesi a valutare gli effetti *in vivo* del Lindano sulle prime fasi della segmentazione embrionale. Nel primo esperimento, topi femmine CD-1 di 5-7 settimane, sincronizzate nel loro ciclo estrale, sono state trattate per via orale con 3 somministrazioni giornaliere consecutive di Lindano alle stesse dosi, 15 e 25 mg/Kg. Le femmine sono state quindi accoppiate con maschi non trattati. 24 ore dopo le femmine fecondate sono state quindi sacrificate per recuperare gli

embrioni allo stadio di 2-4 cellule. Per valutare i possibili effetti del Lindano sui processi di maturazione dell'ovocita e fecondazione, mediante analisi al microscopio invertito, è stata determinata la percentuale di embrioni arrestati alla prima divisione di segmentazione e quella di embrioni con grave alterazione della morfologia (lisi, distacco dalla zona pellucida). E' stato osservato un aumento dose-dipendente della percentuale di embrioni andati incontro a lisi o al distacco della zona pellucida, che ha raggiunto la significatività statistica alla dose più alta saggiata. Con la dose più alta di Lindano, la % di embrioni degenerati aumentava fino al 48%. Nel secondo esperimento, topi femmine dello stesso ceppo ed età di quelle utilizzate nel primo esperimento, sincronizzate nel loro ciclo estrale, sono state trattate con 3 somministrazioni giornaliere consecutive di Lindano (15 o 25 mg/Kg) a partire dalla diagnosi positiva di tappo vaginale e sacrificate 3 ore dopo l'ultima somministrazione. In questo esperimento, si sono recuperati gli embrioni a livello di morula, e mediante microscopia in fluorescenza, sono stati rilevati il numero di blastomeri/embrione, la percentuale di nuclei allo stadio di metafase o anafase per la determinazione dell'indice mitotico (IM), l'eventuale presenza di fenomeni apoptotici o di micronuclei. Non sono stati evidenziati effetti statisticamente significativi imputabili al Lindano. In conclusione, gli esperimenti descritti hanno messo in evidenza effetti di questo composto alla dose più alta saggiata sia nella fase di maturazione dell'ovocita all'interno del follicolo (aumento dei fenomeni di lisi durante il primo ciclo di segmentazione) forse imputabili alla dimostrata inibizione delle comunicazioni intercellulari tra oocita e cellule del cumulo con conseguente inibizione dei processi di maturazione del follicolo. Tali alterazioni potrebbero influire anche sulla successiva competenza dell'ovocita a superare il primo ciclo di segmentazione e la fase critica di riattivazione del programma di trascrizione genica.

SLIDE

Questi i nostri risultati in questo progetto pilota italiano supportato dal Ministero della Salute pubblicati quest'anno sulla rivista *Reprod Toxicol*. Ma cosa accade al di fuori dei nostri confini nazionali?

SLIDE

Gli EDC costituiscono un problema emergente sia a livello ambientale che sanitario. Organizzazioni che se ne occupano: ONU/WHO/UNEP, OECD, EPA. Firmato a Stoccolma nel 2001 una convenzione che deve eliminare 12 POPs dal pianeta, altri sono in lista.

SLIDE

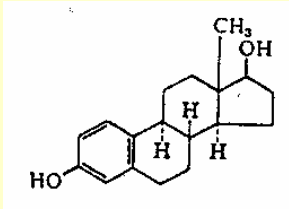
L'UE ha investito pesantemente nel V FP, anche attraverso una dedicated call i cui progetti sono confluiti nel cluster CREDO.

SLIDE

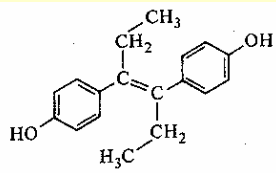
Il nostro gruppo dell'ENEA è coinvolto in uno di questi che dovrà determinare il rischio riproduttivo per la specie umana della contaminazione da PCBs per via alimentare. Allo scopo verranno analizzate una serie di popolazioni europee tra cui gli Inuit groenlandesi che hanno i livelli più alti di contaminazione ematica da questi composti, questo perché che prodotti industriali sono emigrati dai siti originari di produzione ed utilizzo, sono migrati nelle varie matrici ambientali, sono stati veicolati nell'atmosfera, per questioni di temperatura hanno trovato pace nell'Oceano Artico. Sono quindi entrati nella catena alimentare ed, essendo lipofili, si sono accumulati nel grasso degli animali (pesci e mammiferi) che costituiscono la fauna artica, di cui l'Inuit è il predatore finale. Il gradiente di contaminazione da PCBs (composti a vita media molto lunga, decenni) verrà anche seguito in altre popolazioni di pescatori svedesi della costa orientale ed occidentale la cui dieta è quasi esclusivamente ittica.

# PLEOMORPHISM OF THE ESTROGEN RESPONSE

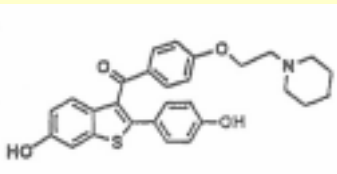
## Animal Estrogens 17 $\beta$ -Estradiol,...



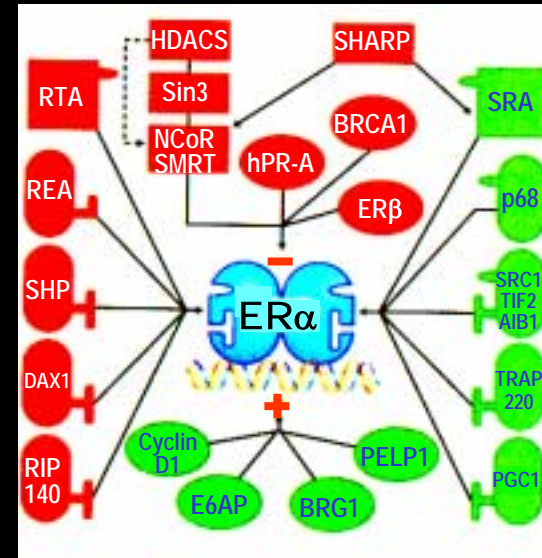
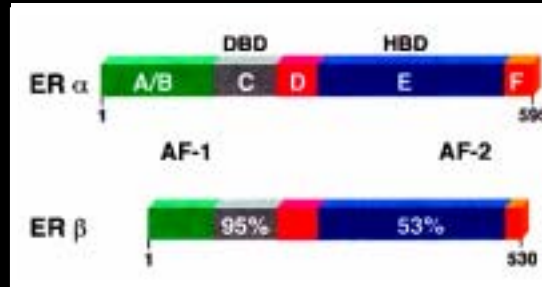
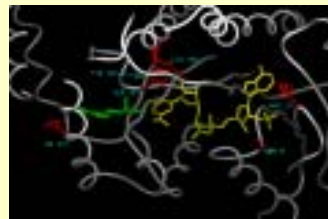
## Estrogenic Drugs DES,...



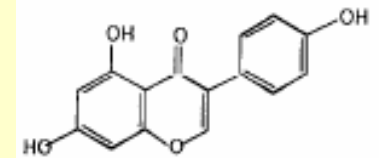
## SERMs Raloxifene,...



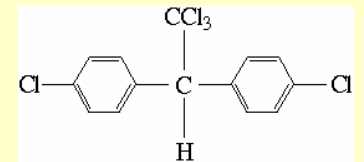
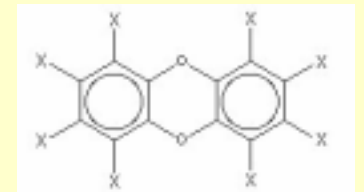
## Metabolic Enzymes Aromatase,...



## Phytoestrogens Genistein,...



## Industrial Compounds Dioxin, DDT,...

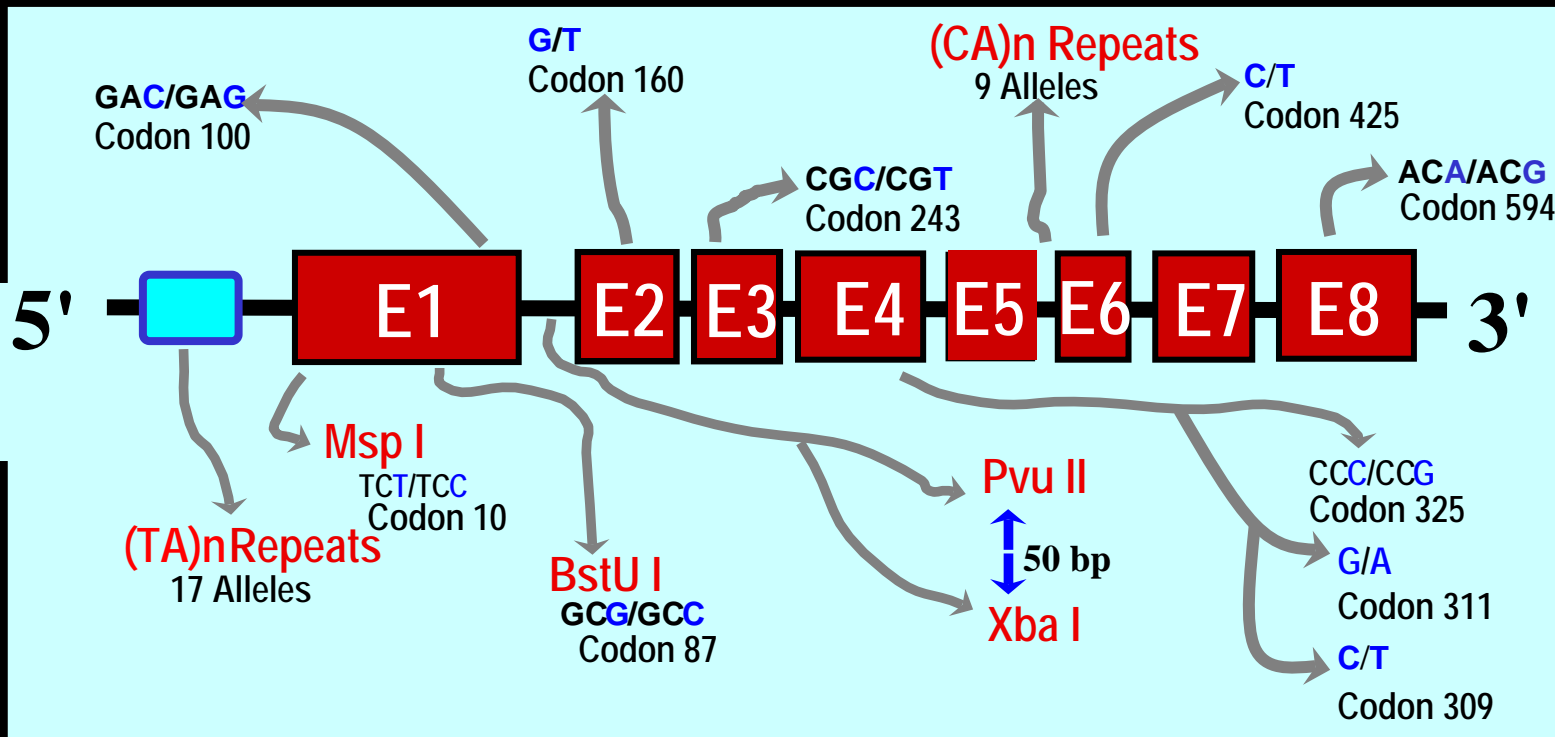




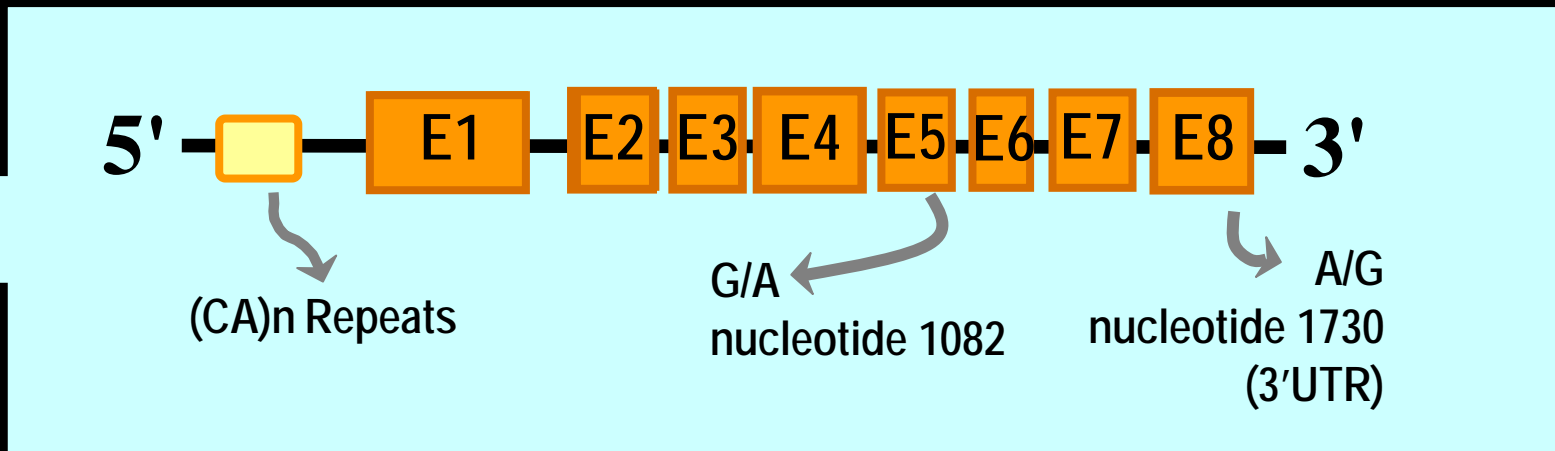
# GENETIC STUDIES

# Polymorphisms at the Human Estrogen Receptors Genes Loci

*ER $\alpha$*



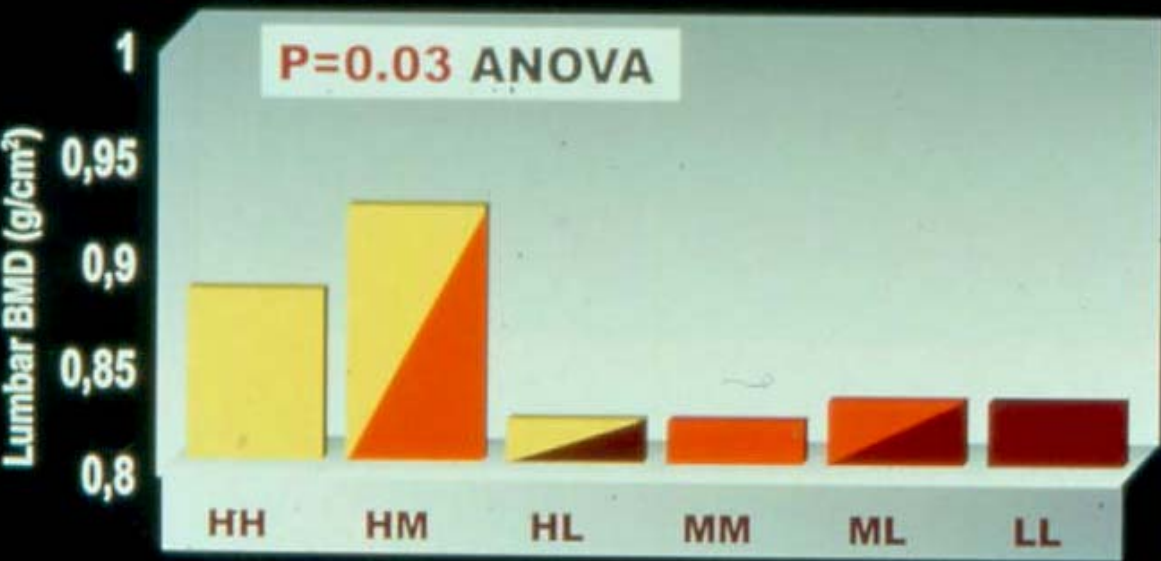
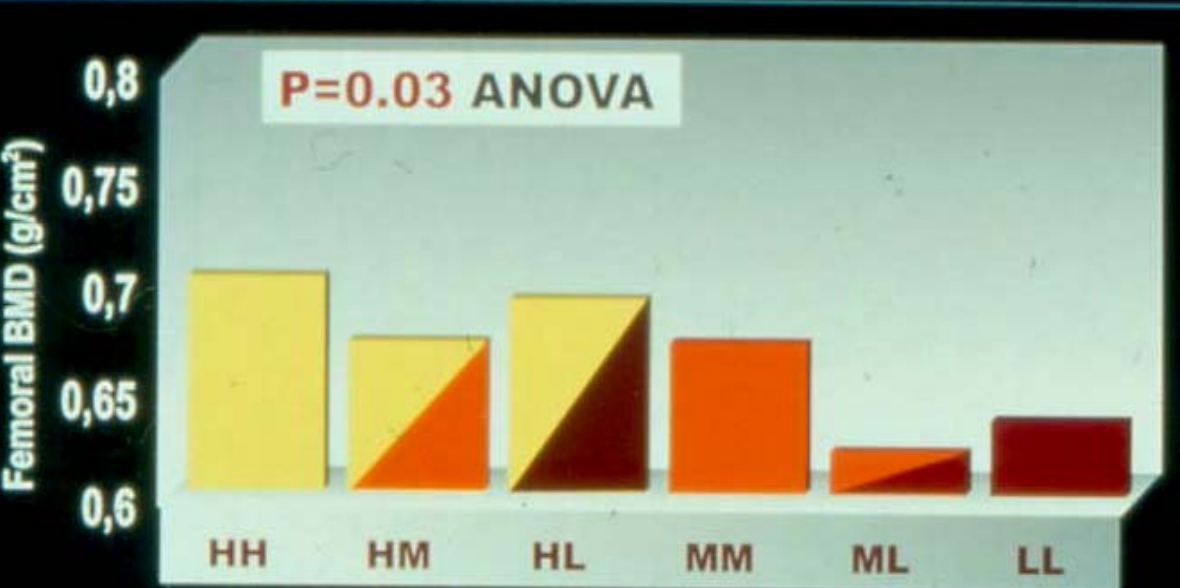
*ER $\beta$*



# ER $\alpha$ Gene Polymorphisms: Association Studies

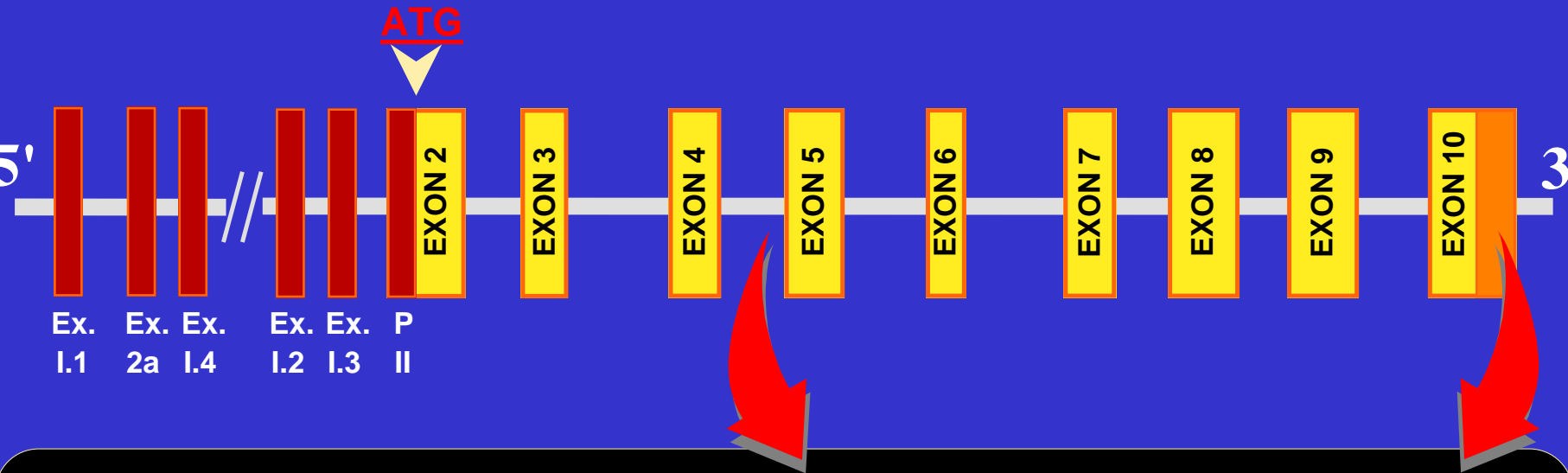
- Osteoporosis
- Osteoarthritis
- Rheumatoid Arthritis
- Hyperparathyroidism
- Alzheimer's Disease
- Anxiety
- Parkinson's Disease
- Coronary Artery Disease
- Serum Lipid Levels
- Mammary Cancer
- Endometrial Cancer
- Menopausal Age
- Pregnancy Rate
- Spontaneous Abortion

# ER $\alpha$ Gene TA Repeats Length and BMD



**Genotypes**  
**H= high** (>20 Repeats)  
**M= medium** (20-15 Repeats)  
**L= low** (< 15 Repeats)

# AROMATASE GENE (CYP19)



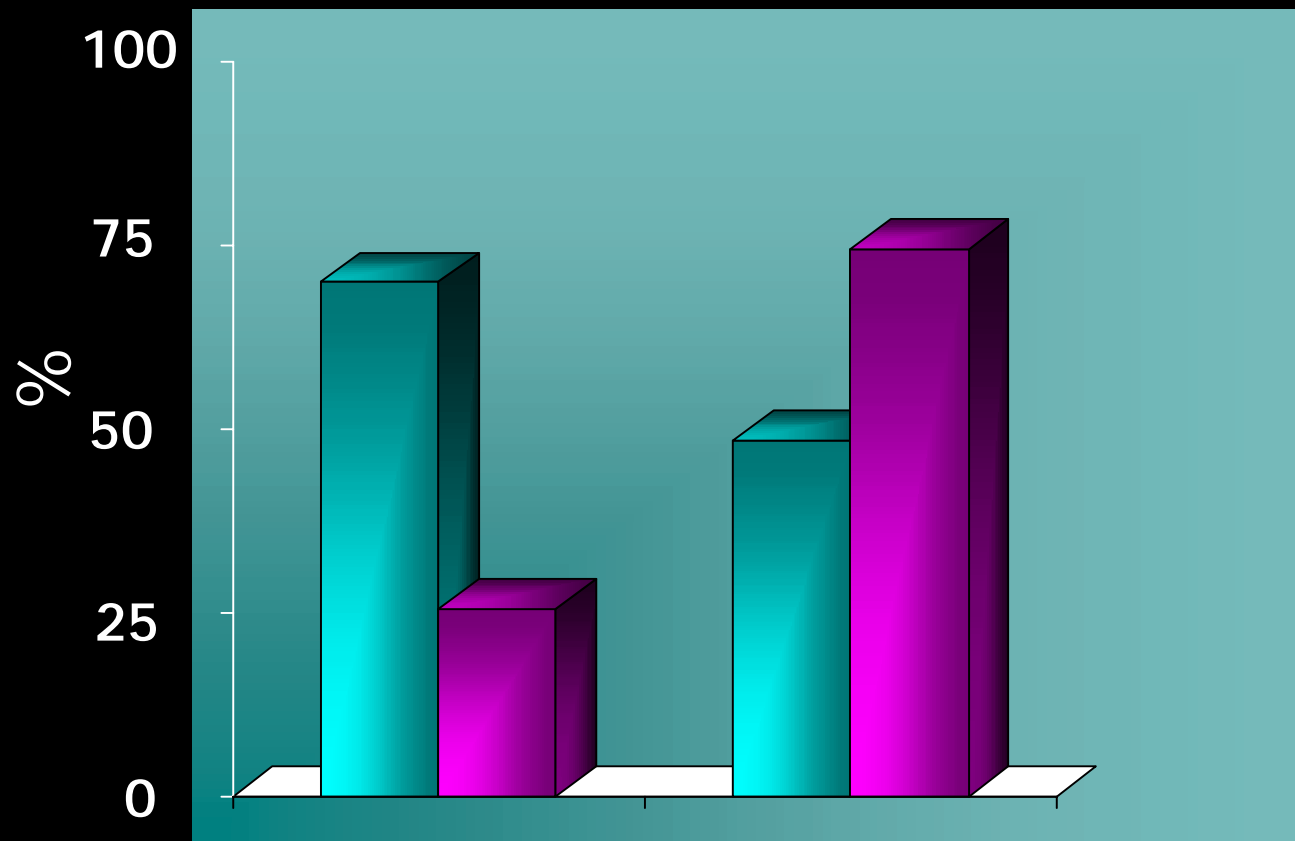
The **(TTTA)<sub>n</sub> repeat polymorphism in intron 4** is in strong linkage disequilibrium with a **C-T substitution in exon 10 (3' UTR)**

T allele → High TTTA repeat length

- ↑ high activity phenotype (↑CYP19 mRNA)
- ↑ switch of promoter (Ex I.3 > Ex I.4)

*(Kristensen VN, et al. Oncogene 2000)*

# Distribution of Aromatase Alleles in 350 Post-menopausal women



$\chi^2$  Test  
P<0.001

TTTA r.

low

high

low

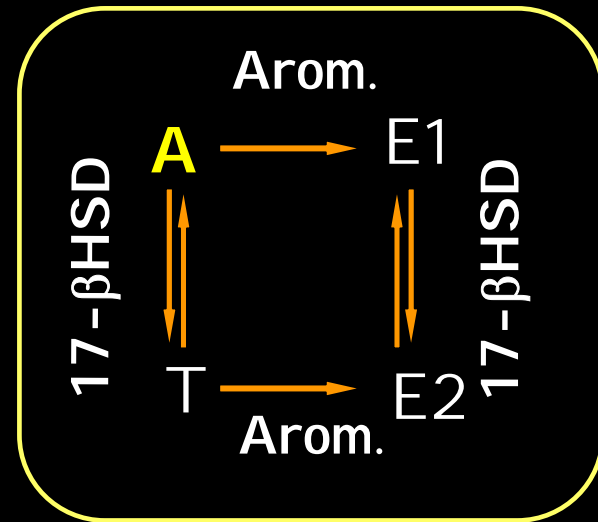
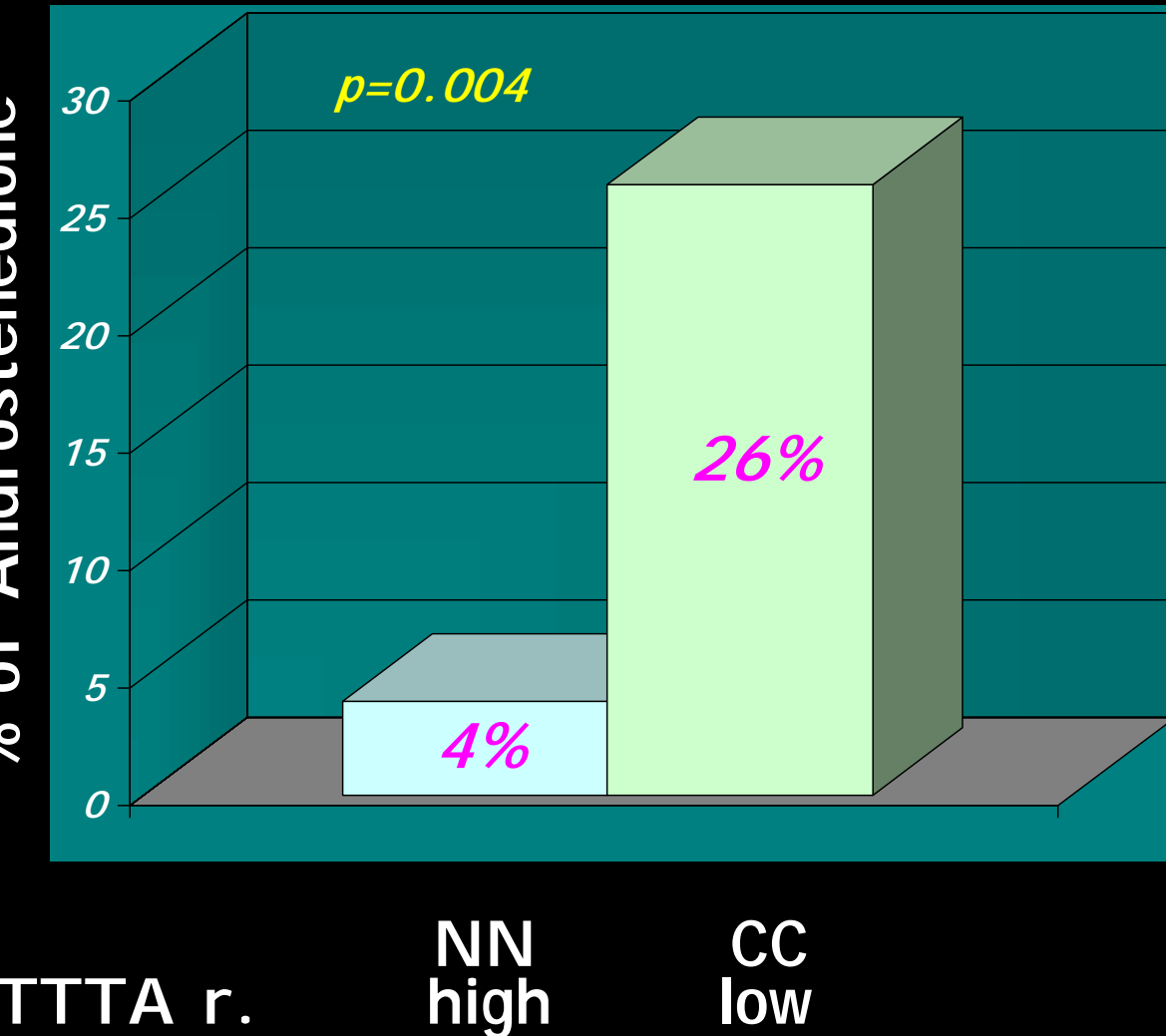
high

Diagnosis

OP

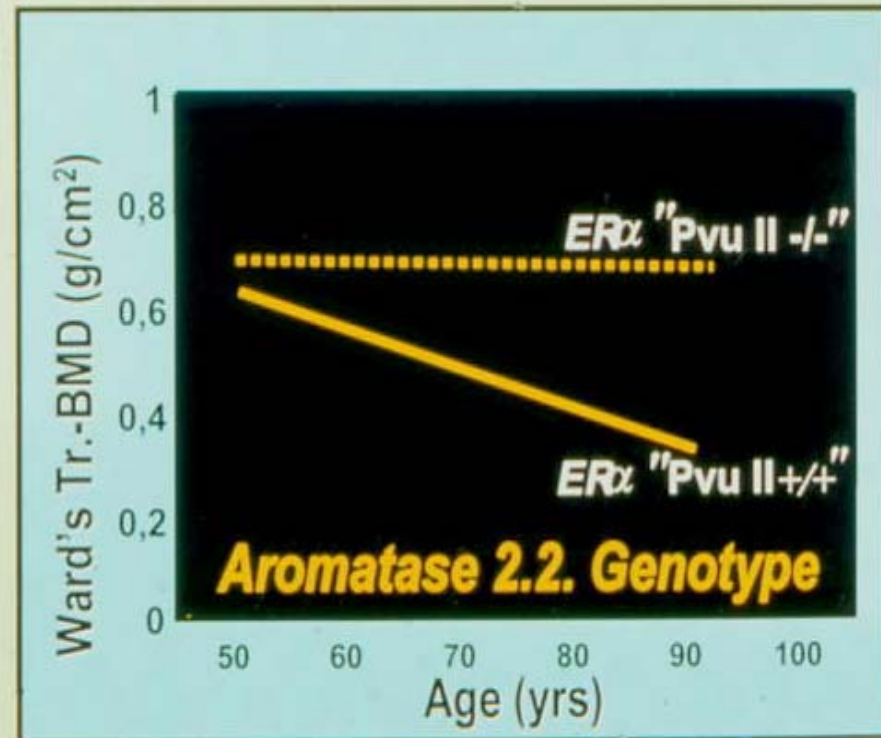
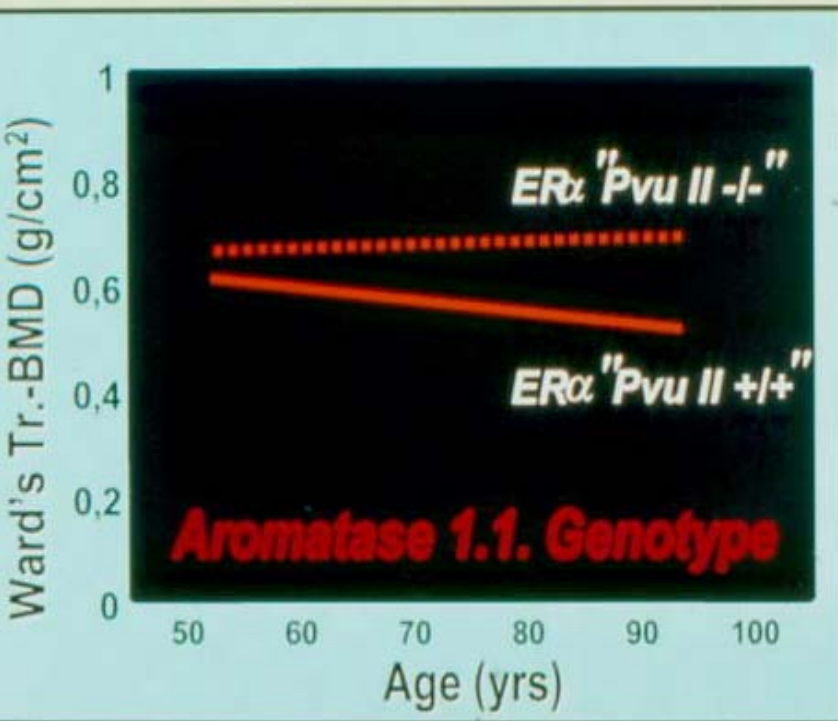
N-OP

# ANDROSTENEDIONE PRODUCTION BY FIBROBLASTS WITH OPPOSITE AROMATASE GENOTYPE



# Aromatase (CYP 19) Genotype and Ward's Triangle BMD

Linear regression analysis vs. age, according to Pvu II ER $\alpha$  gene RFLP (N=300 elderly men)





# PHARMACOGENETIC STUDIES

# Pharmacogenetic Mechanisms which Influence Pharmacotherapy

Genes associated with altered metabolism of drugs (eg, tricyclic antidepressants)

Genetic variants which produce an unexpected drug effect (eg, haemolysis in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency)

Genetic variation in a drug target (eg, variants of the  $\beta$ -adrenergic receptors alter response to  $\beta$ -agonists in asthma)

# SNP<sub>s</sub> Hold Promise for Individualized Medicine

## What is a SNP?

Different people can have a different nucleotide or base at a given location on a chromosome

... G G T A A C T G ...  
... G G C A A C T G ...



## What is a SNP map?

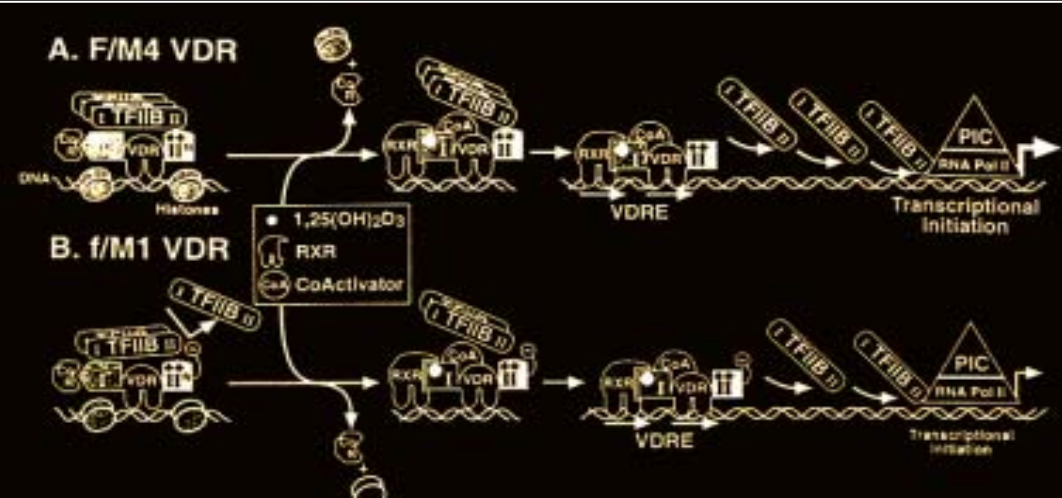
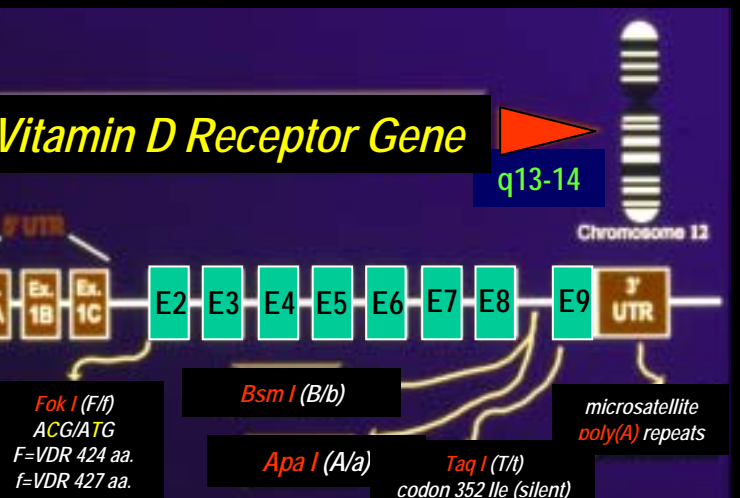
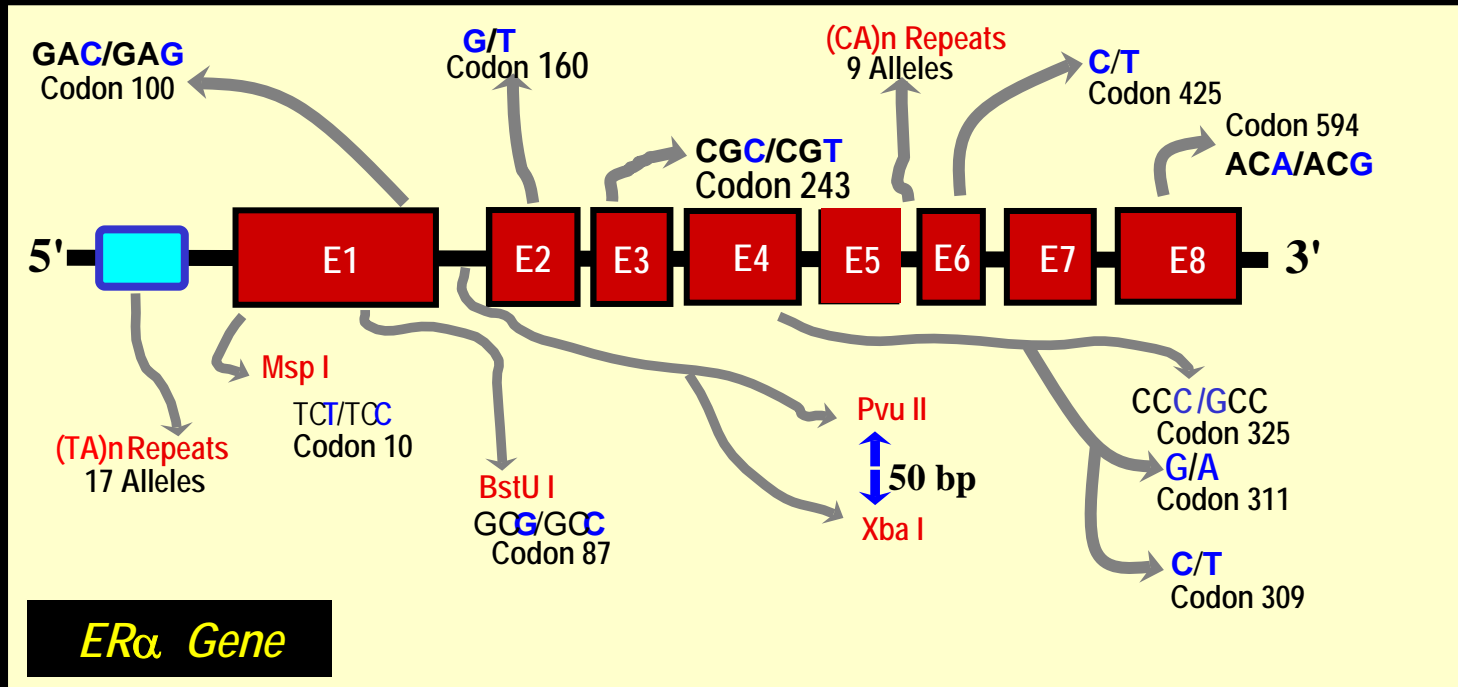
Location of SNP<sub>s</sub> on human DNA



Human DNA

*99.9% of the DNA is the same between two individuals and is the remaining 0.1% that accounts for the differences among people, representing 3 million differences in the DNA of unrelated individuals*

# Reciprocal Influences of polymorphisms within a gene



# Genotypes Versus haplotypes

## Genotypes

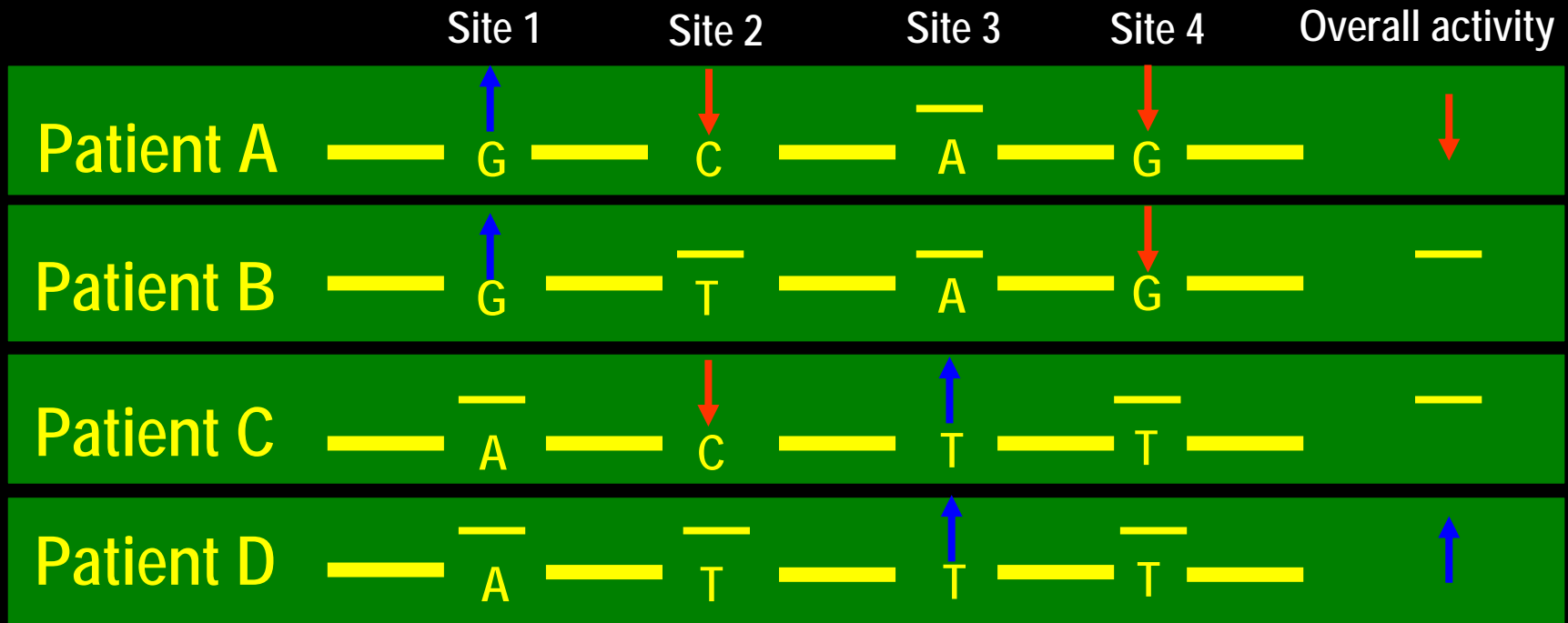
		Site 1		Site 2	
Patient A	—	G:A	—	T:C	—
Patient B	—	G:A	—	T:C	—

## Haplotypes

		Site 1		Site 2	
Patient A	—	G	—	T	Maternal Chromosome
	—	A	—	C	Paternal Chromosome
Patient B	—	G	—	C	Maternal Chromosome
	—	A	—	T	Paternal Chromosome

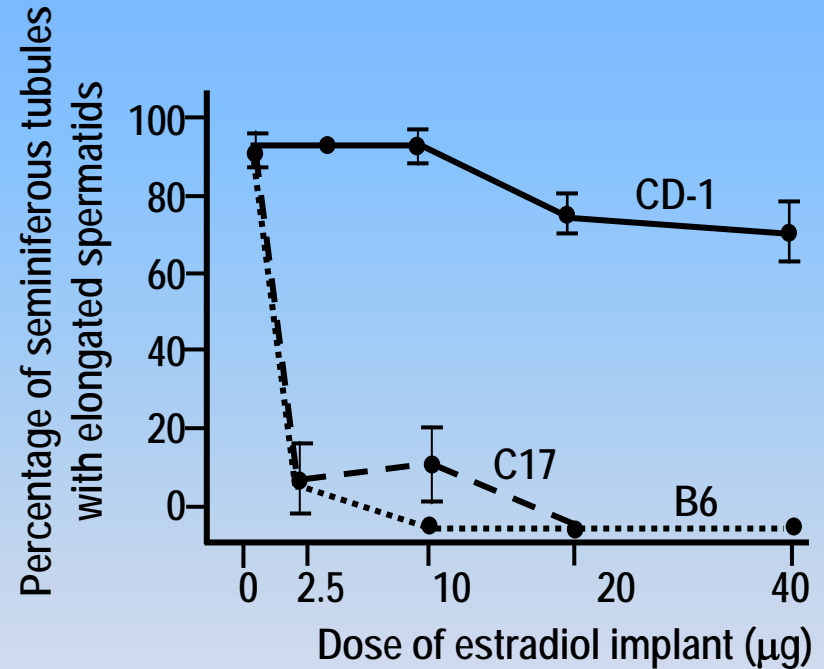
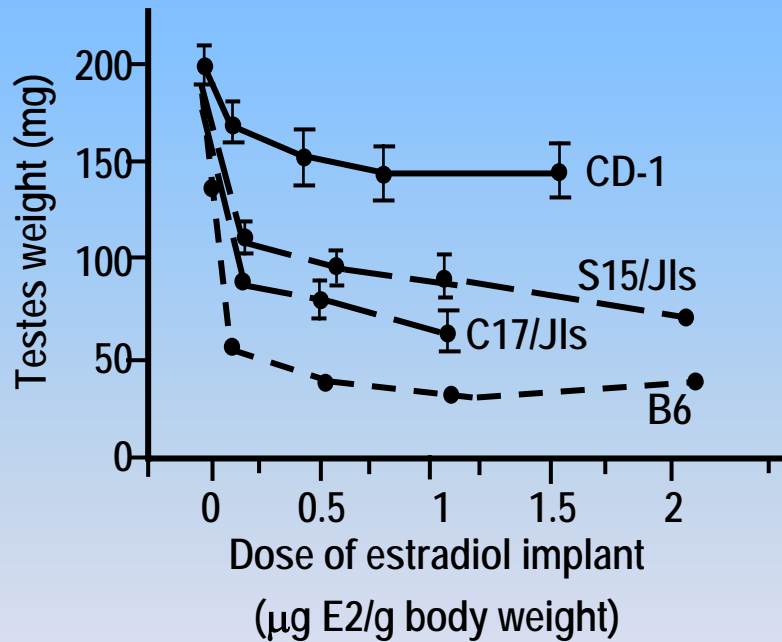
Genotypes identify the sequences from both maternal and paternal copies of a gene, while haplotypes reveal which sequence is on which chromosome

# The overall activity of a gene reflects the sum of the effects of each genetic variation

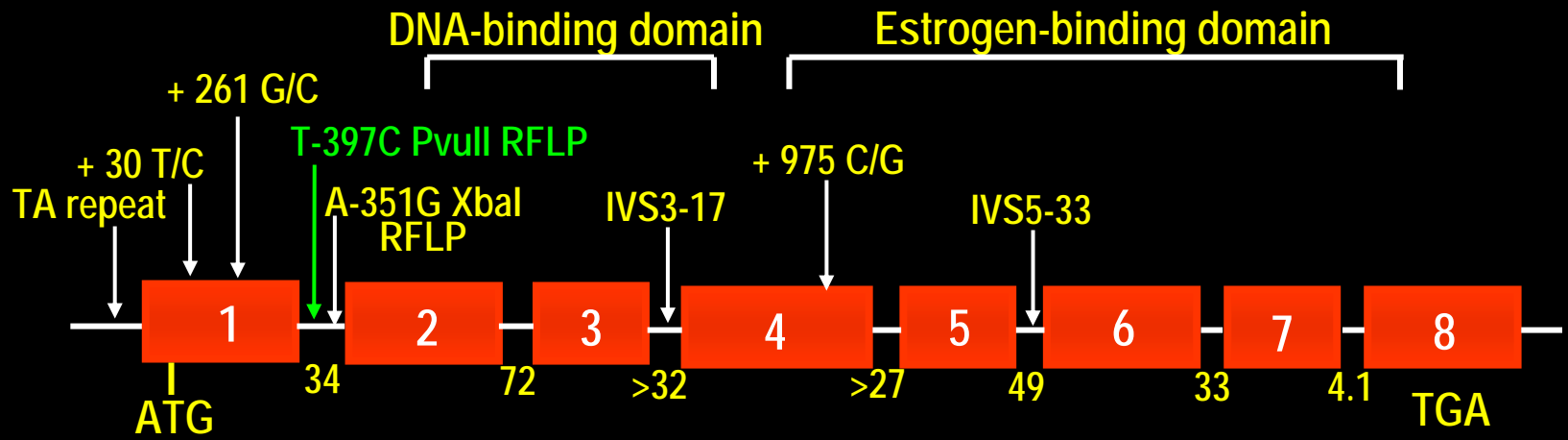
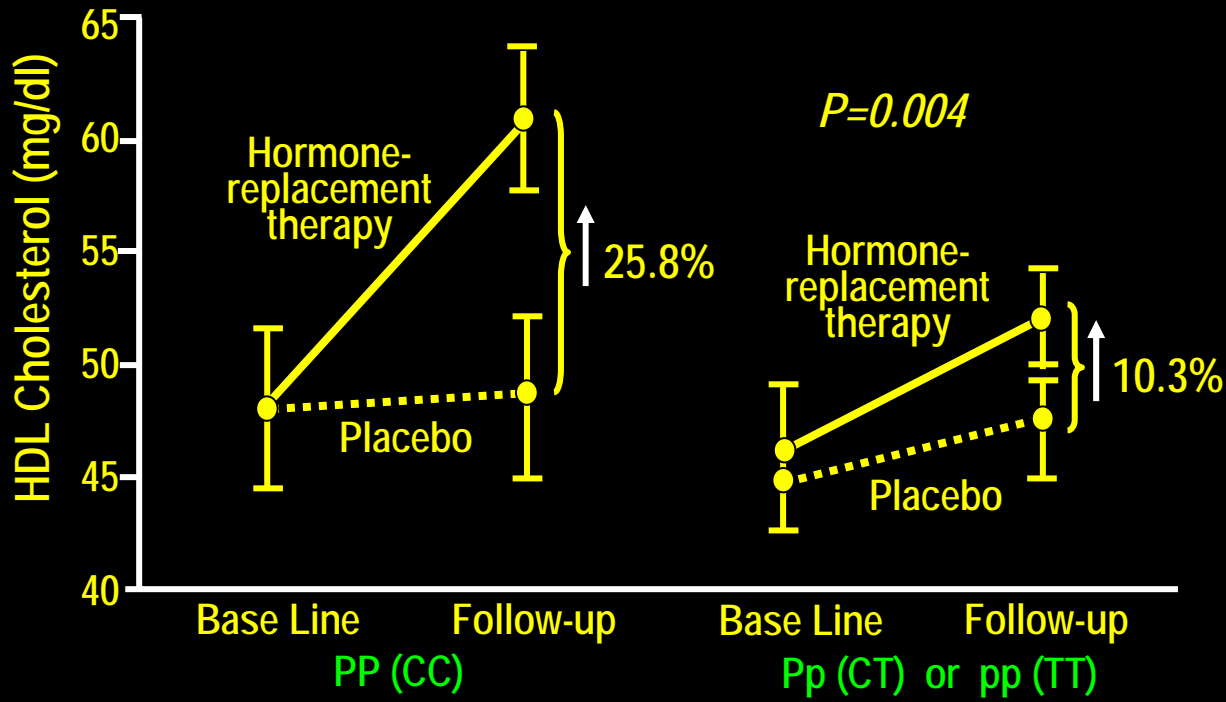


Green arrows indicate variants that increase gene activity, red arrows indicate decreased activity, and black lines indicate unchanged activity. For the sake of simplicity, each patient is shown as having only one haplotype of this gene. Haplotypes are more powerful than single variants when seeking correlations between gene activity and drug response

# Genetic Variation in Susceptibility to Endocrine Disruption by Estrogen in Mice

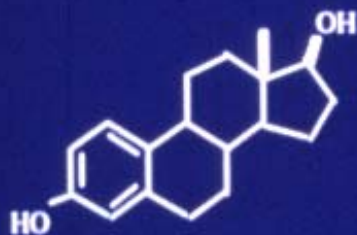


# Estrogen-receptor polymorphisms and effects of estrogen replacement on high-density lipoprotein cholesterol in women with coronary disease

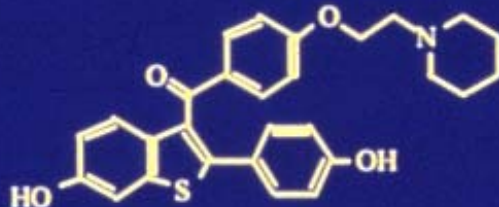




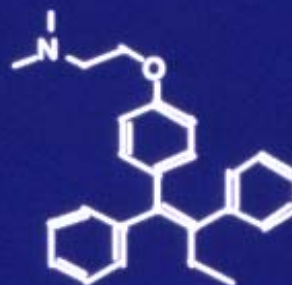
# Chemical Structure of Estradiol and Selected SERMs



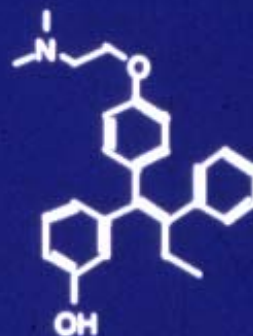
**Estradiol**



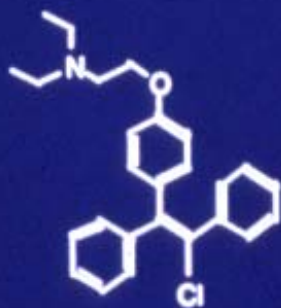
**Raloxifene**



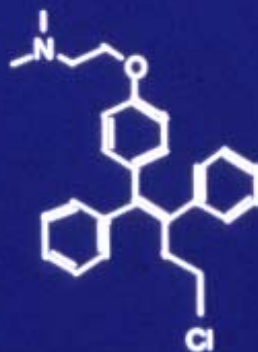
**Tamoxifen**



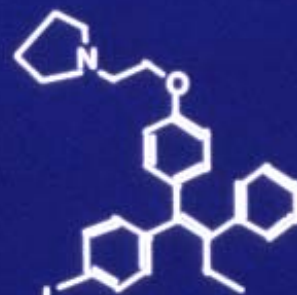
**Droloxifene**



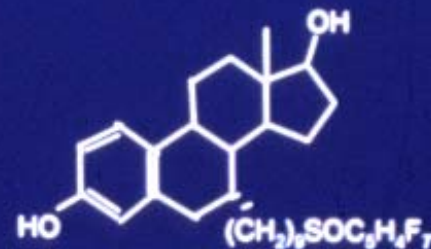
**Clomiphene**



**Toremifene**

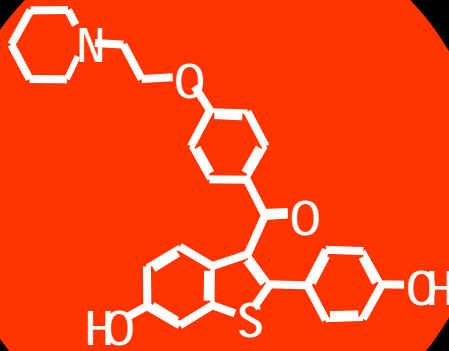


**Idoxifene**



**ICI 182,780**

# Raloxifene: Pharmacogenetics



Genetic variation in a drug target (eg, ER<sub>s</sub>, coactivators, responsive elements)

Genes associated with altered metabolism of drugs (eg, glucoronidation)

Genetic variants which produce drugs' adverse effects (eg, Factor V Leiden)

# **MICROARRAY APPLICATIONS**

A microarray image showing a grid of small spots. The spots are primarily red, with some green spots scattered throughout. The background is dark. The text "Microarray for expression studies" is overlaid in the center in a yellow, italicized font.

*Microarray for expression studies*

# Our estrogen response gene cassette (1)

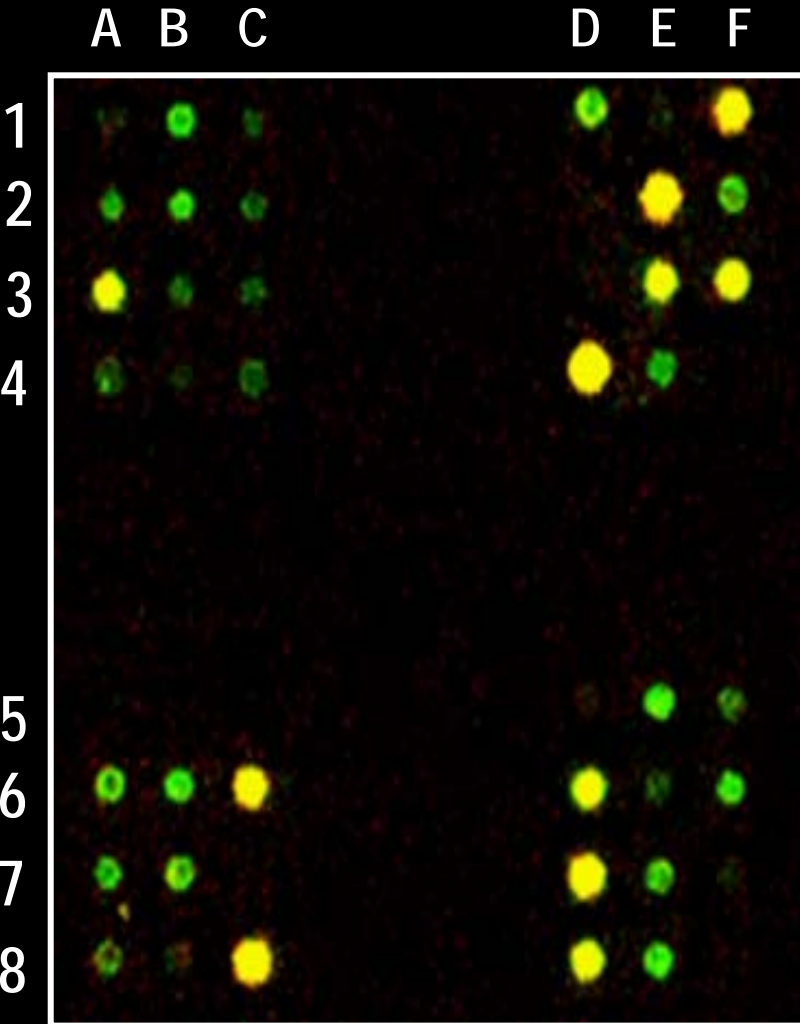
## GENE

Intestinal trefoil factor (ITF3; TFF3)  
 nat1 (gene for arylamine-N acetyl-transferase)  
 hgata 3 (mRNA for transacting T cell specific transcription factor)  
 hepatocyte nuclear factor 3 alpha (hnf-3-alpha)mRNA  
 Prolactin-induced protein (PIP)  
 mRNA for cardiac gap junction protein  
 Breast cancer, estrogen regulated liv1 protein (liv1) mRNA  
 X box binding protein 1 (xbp-1) mRNA  
 Type-angiotensin-II receptor (human, liver, mRNA, 2268 nt, AGTR2)  
 mRNA for lung amiloride-Na+ channel protein (NCA)  
 Nonspecific crossreacting antigen mRNA  
 Neuropeptide-y- receptor-y1-(npyy1)  
 Thymidylate synthase (TYMS)  
 H.sapiens cks1s1 mRNA for Cks1 protein homologue  
 Mitochondrial cytochrome C oxidase II subunit  
 Heat shock protein 27  
 Early growth response gene Alpha  
 H.sapiens CpG DNA genomic MseI fragment  
 gamma-Actin  
 Ribosomal protein L31  
 Elongation factor 1 alpha  
 Hmnb33 protein  
 Poly(A) + polymerase (PAP)  
 28S ribosomal RNA  
 Cytokeratin 19 (CTK 19)  
 Mitosis-specific  
 X q28 placento express  
 Wilms' tumor-related protein (WT-P)  
 Coupling protein G alpha subunit (alpha -S2)  
 Mitochondrial DNA  
 Non-Muscle myosin alkali light chain  
 Human H3.3 histone, class B  
 Clone 23770 mRNA  
 S3 ribosomal protein  
 p300 (SWI/SNF complex)  
 BRG-1 (SWI/SNF complex)  
 E6-AP (UBE3A)  
 L7 (RPL7)  
 NCoA-52 (nuclear receptor coactivator)  
 P68 (RNA helicase, DEAD/H)  
 PBP (PPAR binding protein)  
 BAG1 (Bcl2 binding protein)  
 SRC-1/NcoA-1/ERAF-160  
 SRC-2/TIF2/GRIP1/NcoA-2  
 SRC-3/RAC3/pCIP/AIB1/ACTR  
 TIF1 alpha  
 Tip60 TAT interactive protein)  
 TRIP1 (Thyroid receptor interactor protein)  
 Metallothionein II  
 P13 kinase  
 AKT3  
 RIP140 (NRIP1)  
 Bcl-2  
 Rho GDIa (Rho guanine dissociation inhibitor)  
 Islet-1 (ISL1)  
 ER beta  
 ER alpha  
 COMT  
 CYP1A1  
 CYP19 (ARO gene)  
 CYP17 (steroid 17-alpha-hydroxylase)  
 GST (glutathione S-transferase)  
 c-Jun  
 Jun(NH2) terminal kinase (JNK1)  
 PDZK1  
 GREB1a  
 GREB1b  
 CREB1c  
 \_ecithin: cholesterol acyltransferase (LCAT)  
 Ribosomal protein S6  
 H.sapiens mRNA for Drosophila female sterile homeotic (RING3)  
 Human scar protein  
 ATP synthase alpha-subunit  
 Ferritin H chain  
 Ribosomal protein L7  
 Laminin receptor homology  
 23kD highly basic protein  
 Coupling protein G alpha subunit (alpha-S1)  
 Lupus p70 (Ku-p70) autoantigen protein  
 Ribosomal protein L41 mRNA  
 Elongation factor 1- gamma  
 Human acidic ribosomal phosphoprotein Po  
 Human HBV associated factor (XAP4)  
 Fau mRNA  
 Mitochondrial genes for several tRNAs  
 Ribosomal protein S15 alpha  
 Ribosomal protein S17  
 Cytokeratin 18 (K18)  
 Ubiquitin gene  
 Oxytocin  
 c-fos  
 c-myc  
 TGF-alpha  
 Lactoferrin  
 Prolactin  
 Cathepsin D  
 Complement 3  
 ARA 70  
 Calmodulin  
 p270 (SWI/SNF complex)  
 BAF-57 (BRG1 associated factor 57, SWI/SNF complex)  
 pCAF (p300/CBP-associated factor, SWI/SNF complex)  
 CBP (CREB binding protein, SWI/SNF complex)  
 BRG1 (Brahma-related gene 1)  
 ERK1 (Extracellular signal-regulated kinase 1)  
 ERK2 (Extracellular signal-regulated kinase 2)  
 PGC1 (PPAR gamma coactivator 1)  
 TRAP220 (Thyroid hormone receptor associated protein complex)  
 DRIP150 (Vitamin D receptor interacting protein)  
 DRIP36  
 DRIP205  
 DRIP130  
 DRIP92  
 DRIP80  
 SRC  
 CD38  
 Matrilysin-gene (MMP7)  
 Rar-responsive-(tig1)-mRNA  
 Omega-light-chain-protein 14.1-(Ig-lambda-chain-related)-gene  
 Guanylate-binding-protein-isoform-1-(GBP-2)-mRNA  
 Cystis fibrosis antigen (CFAg)  
 Gp 39  
 mRNA for antileukoprotease (alp) from cervix uterus  
 Mesothelial keratin k7 (type II) mRNA  
 ERBB2  
 NCoR2  
 NCoR1  
 REA (repressor of estrogen receptor activity)  
 SHP  
 SMRT (Silencing mediator of retinoid and thyroid hormone action)  
 SMRTE (Silencing mediator retinoid and thyroid h. action extended isoform)  
 HDAC1 (Histone deacetylase 1)  
 BRCA1  
 BRCA2  
 HET-SAF-B (HET/scaffold attachment factor B)  
 Lipoproteina lipasi (LPL)  
 Estrogen responsive factor (EREF)

# Our "estrogen response" gene cassette (2)

WNT5a  
Galanin  
Insulin  
Cyclooxygenase-2 (Cox-2)  
Cyt P450-cholesterol side chain cleavage (P450 SCC)  
3 beta-hydroxy-5-ene steroid dehydrogenase  
Oxytocin receptor (OXTR)  
Cytochrome 450 1B1 (CYP1B1)  
Pro-neurotensin/pro-neuromedin N  
Neurotensin (NTS)  
Survivin  
Thymidilate synthase  
DNA topoisomerase II (top2)  
Keratinocyte growth factor (KGF)  
Keratinocyte growth factor receptor  
Polymerase (RNA) III (DNA directed) (62kD) (RPC62)  
RNA polymerase I 16 kDa subunit  
Angiotensinogen  
Calbindin D-9k  
COX7RP  
Efp (estrogen-responsive finger protein)  
Growth hormone secretagogue receptor  
Estrogen inducible phosphatase PP5  
Low density lipoprotein receptor  
Follistatin FST  
inhibin, beta A (activin A, activin AB alpha polypeptide) (INHBA)  
Inhibin, beta C (INHBC)  
Inhibin, alpha (INHA)  
Collagenase  
Collagenase inhibitor  
Insulin-like growth factor 1 receptor (IGF1R)  
Insulin-like growth factor 2 receptor (IGF2R)  
Osteoprotegerin (OPG)  
Osteopontin (OPN)  
Lipoxygenase (ALOX12B)  
Core binding factor alpha1 subunit (CBFA1)  
Creatine kinase B  
Interleukin 1 receptor, type I (IL1R1)  
Colony stimulating factor 1 (macrophage) (CSF1)  
Spi-1 proto-oncogene  
Insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP3)  
Thrombospondin (TSP)  
Interleukin 8 (IL8)  
IL-8 receptor  
Gap junction protein, alpha 1, 43kD (connexin 43)  
Prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase (PTGS1)  
Neuropilin-1 (Npn-1)  
Neuropilin-2 (Npn-2)  
CYP2B  
Collagenase-3 (metalloproteinase 13, MMP13)  
Interferon gamma (IFNG)  
Leptin  
Alpha 2u-Globulin (AUG)  
Lactoferrin (HLF2)  
WNT8d  
WNT6  
WNT10a  
WNT5b  
WNT4  
WNT3  
WNT16  
WNT2B (transcript variant WNT-2B2)  
WNT2B isoform 1  
Glutathione peroxidase (GPX5)  
p38 mitogen activated protein (MAP) kinase  
MAP Kinase 1  
MAP Kinase 4  
enoyl-CoA hydratase  
Acyl-CoA dehydrogenase  
Ras p21 protein activator  
Protein kinase C (delta)  
Myb  
Inhibitor KB kinase  
Calcium-sensing receptor (CaSR)  
Bone sialoprotein (BNSP)  
Osteocalcin (OC)  
LH receptor  
Proliferating cell nuclear Antigen (PCNA)  
Alkaline phosphatase (ALP)  
Type 1 Procollagen alpha 1 (COL1A1)  
Type 1 Procollagen alpha 2 (COL1A2)  
Plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1)  
Tartrate resistant acid phosphatase (TRAP)  
Receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL)  
5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2A (HTR2A)  
Calcitonin receptor (CALCR)  
PTH Receptor  
Parathyroid hormone/PTH-related peptide receptor (PTH/PTHrP)  
Androgen receptor (AR)  
Platelet glycoprotein IIIa (GPIIIa)  
type 1 angiotensin II receptor (AGTR1)  
alpha-subunit of prolyl 4-hydroxylase  
3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase (HMGCR)  
Cholesterol 7-alpha hydroxylase (CYP7)  
Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR)  
5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase reductase (MTRR)  
Neuropeptide Y (NPY)  
Choline acetyltransferase (CHAT)  
RAF1  
A-RAF  
B-RAF  
RXR alpha (retinoid X receptor alpha)  
EBBP (Estrogen responsive B-box protein)  
hAG-2 (human Anterior Gradient -2)  
MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein-1)  
Fra-1  
Transforming growth factor, beta 1 (TGFB1)  
Transforming growth factor, beta 2 (TGFB2)  
TGF-beta 3  
IL-1  
Interleukin 1, alpha (IL1A)  
IL-1 beta  
IL-2  
IL-4  
IL-6  
IL-12  
IL-10  
TNF alpha  
LIF (Leukemia Inhibitory Factor)  
NOS (Nitric Oxide Synthase)  
iNOS (inducible Nitric Oxide Synthase)  
eNOS  
CRH (corticotropin releasing hormone)  
PGE2 (human Prostaglandin receptor)  
matrix metalloproteinase 2 (MMP2)  
Matrix metalloproteinase 3 (MMP3)  
Matrix metalloproteinase 1 (MMP1)  
KLK12 (Kallikrein 12)  
Glutathione reductase (GSR)  
Glucose 6-Phosphate dehydrogenase (G6PD)  
Glutathione peroxidase (GPX1)  
Glutathione peroxidase (GPX2)  
Glutathione peroxidase (GPX3)

# Preliminary results



A1 Prog Rec	B1 C-fos	C1 P300	D1 C-fos	E1 Arabid	F1 C-myc
A2 VDR	B2 PP5	C2 BRCA1	D2 PP5	E2 GAPD	F2 NCOR1
A3 ERB	B3 TGFa	C3 SRC1	D3 CASR	E3 TFF1	F3 NCOR2
A4 REA	B4 HPRT	C4 P/CAF	D4 aTUB	E4 VRb2	F4
A5 PR2	B5 CAL	C5 BRCA	D5 ARA	E5 GAPD	F5 Cyph
A6 VDR2	B6 C-fos	C6 SRC	D6 PP5	E6 TFF1	F6 NCOR
A7 ERb	B7 ESR	C7 P/CAF	D7 CASR	E7 VRb	F7 Puc 19
A8 REA	B8 HPRT	C8 P/CAF	D8 aTUB	E8 VRb	F8

# Estrogen Response Study Group at the University of Florence

## Functional Biology

Valentina Martineti  
Annamaria Carossino  
Roberto Carossino  
Gianna Galli  
Raffaella Recenti  
Elisabetta Piscitelli  
Jacopo Bartaloni  
Barbara Pampaloni  
Roberto Zonefrati

## Clinical Studies

Laura Masi  
Alberto Falchetti  
Emanuela Colli  
Antonietta Amedei  
Valentina Ghinoi  
Rosario Imbriaco

## External Collaborations

CCBR-Denmark  
University of Aberdeen  
Erasmus  
Mayo Clinic  
Arhus University  
Southampton Epidemiology Center  
NIEHS/NIH Research Triangle Park  
University of Rome  
University of Siena  
University of Milano  
University of Brescia

## Genetic Studies

Annalisa Tanini  
Francesco Franceschelli  
Nicoletta Fossi  
Lucia Guazzini

## Pharmacogenetics

Sandra Silvestri  
Francesca Del Monte  
Gigliola Leoncini  
Francesca Marini  
Lucia Picariello

## Microarray Technology

Carmelo Mavilia  
Debora Strigoli  
Alessia Gozzini  
Isabella Tognarini

## Study Groups' Coordination

IOF Group of Study on Pharmacogenetics  
SIOMMMS Group of Study on Genetics of Osteoporosis

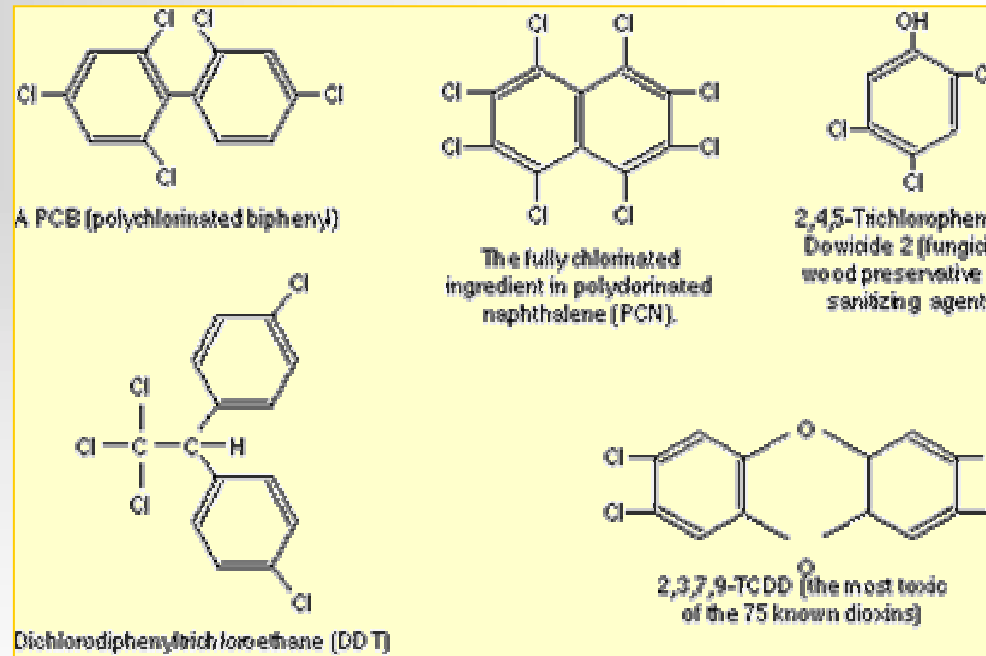


# Valutazione di miscele complesse di distruttori endocrini

“Killer invisibili”? Indagine sugli inquinanti che alterano il nostro sistema ormonale,  
Roma 4 luglio 2003

# Policlorurati Bifenilici (PCB): la dimensione del problema (1)

- Miscela complesse a diverso grado di clorurazione
- Ampiamente prodotte ed estensivamente usate:
  - Condensatori
  - Trasformatori
  - Altri apparecchi elettrici
- Alta persistenza ambientale



# Policlorurati Bifenilici (PCB): la dimensione del problema (2)

---

- Bioaccumulo nella catena alimentare
  - Concentrazione di congeneri molto più tossici delle miscele commerciali
  - Alta solubilità nei lipidi
  - Lento metabolismo e tasso di escrezione basso
  - Esposizione umana:
    - Aria
    - Acqua
    - Sedimenti
    - Terreno
    - Cibo
-

# Problemi correlati agli studi su PCB

---

- Singoli PCB non sono disponibili
  - La sintesi produce dibenzofurani policlorurati altamente reattivi che possono determinare una sovrastima della tossicità
  - In singole dosi i PCB non sono molto tossici e, pertanto, negli studi animali sono state sempre utilizzate dosi molto alte
-

# Composizione tipica (%) dei PCB commerciali

	Aroclor					Clophen		Kanechlor		
	1016	1242	1248	1254	1260	A30	A60	300	400	500
Mono-CBs	2	1	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙
Di-CBs	19	13	1	⊙	⊙	20	⊙	17	3	⊙
Tri-CBs	57	45	21	1	⊙	52	⊙	60	33	5
Tetra-CBs	22	31	49	15	⊙	22	1	23	44	26
Penta-CBs	⊙	10	27	53	12	3	16	1	16	55
Esa-CBs	⊙	⊙	2	26	42	1	51	⊙	5	13
Epta-CBs	⊙	⊙	⊙	4	38		28	⊙	⊙	⊙
Octa-CBs	⊙	⊙	⊙	⊙	7		4	⊙	⊙	⊙
Nona-CBs	⊙	⊙	⊙	⊙	1		⊙	⊙	⊙	⊙
Deca-CBs	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙		⊙	⊙	⊙	⊙

# Correlazioni struttura – tossicità

## Struttura

- PCB co-planari
  - Clorosostituzioni in para e meta
    - Scarso ingombro sterico con gli idrogeni vicini che consente una libera rotazione intorno al legame fenile-fenile.
- PCB mono-orto clorurati
  - una o più cloro-sostituzioni solo in posizione orto.
    - Gli orto-sostituenti tendono a creare legami rigidi dovuti a una interferenza sterica tra cloro e idrogeno

## ■ Tossicità

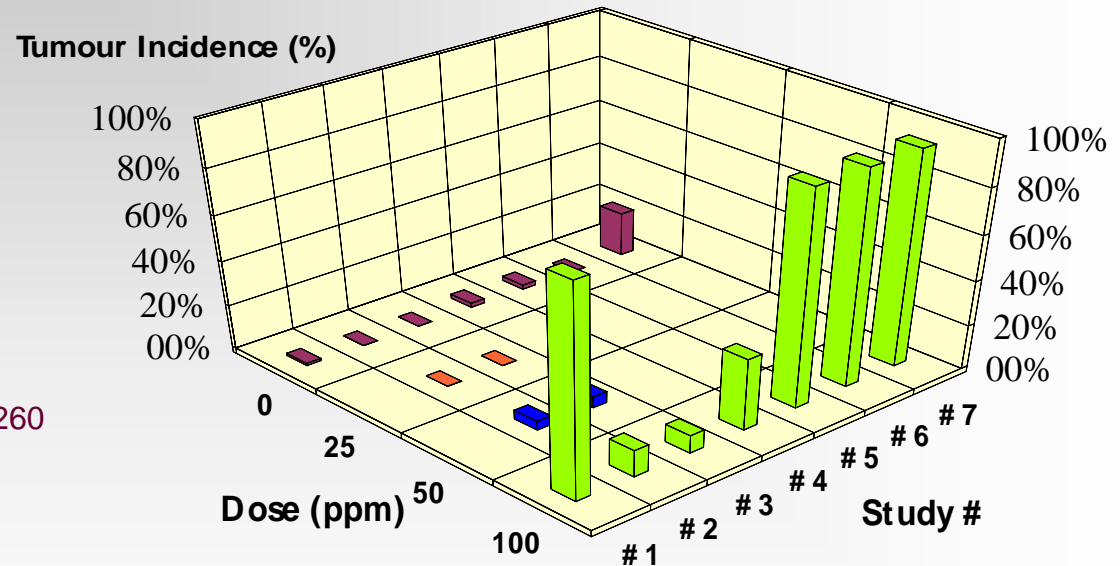
- Le molecole co-planari sono più tossiche (es. sviluppo dell'atrofia timica causata da perdita di linfociti corticali)
- Gli orto-isomeri hanno una più alta affinità con i recettori per gli estrogeni e una più elevata attività estrogenica
- I differenti isomeri reagiscono con recettori endocrini differenti

# Cancerogenicità da PCB

## Dati sperimentali

- Ottenuti solo con miscele commerciali, a dosi alte,
- Sufficiente evidenza di cancerogenicità

Liver tumor incidences in rats from lifetime exposure studies, 1975–1985



#1 Kimbrough et al, 1978; F Sherman, 1260

#2 NCI, 1978; M Fisher, 1254

#3 NCI, 1978; F Fisher, 1254

#4 Schaeffer et al., 1984; M Wistar, Clophen A30

#5 Schaeffer et al., 1984; M Wistar, Clophen A60

#6 Norback and Weltman, 1985; M Sprague-Dawley, 1260

#7 Norback and Weltman, 1985; M Sprague-Dawley, 1260

# Cancerogenicità da PCB

---

## ■ Studi sull'uomo

- Basati su esposizioni occupazionali
- Evidenza inadeguata di cancerogenicità.

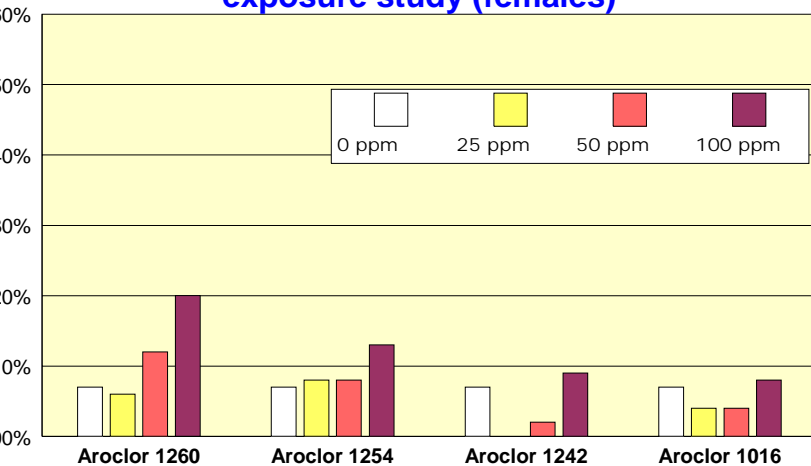
Probabile cancerogeno per l'uomo!?

---

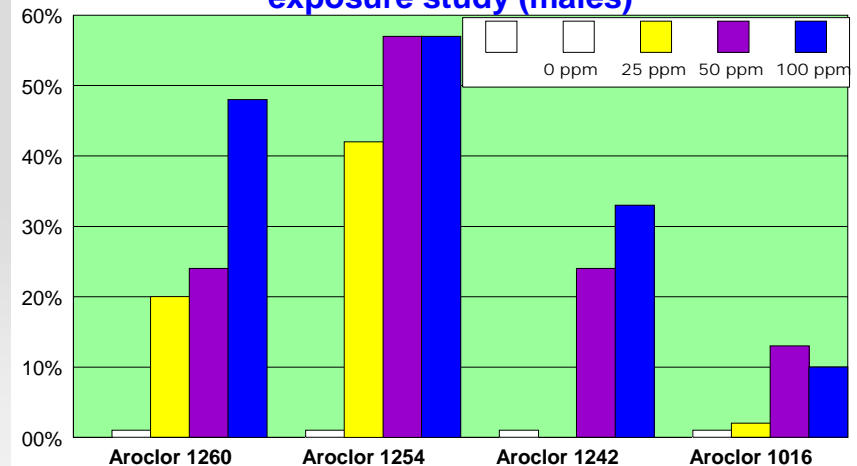


# Correlazioni struttura – cancerogenicità

Liver tumor incidences in rats from 1996 lifetime exposure study (females)



Liver tumor incidences in rats from 1996 lifetime exposure study (males)



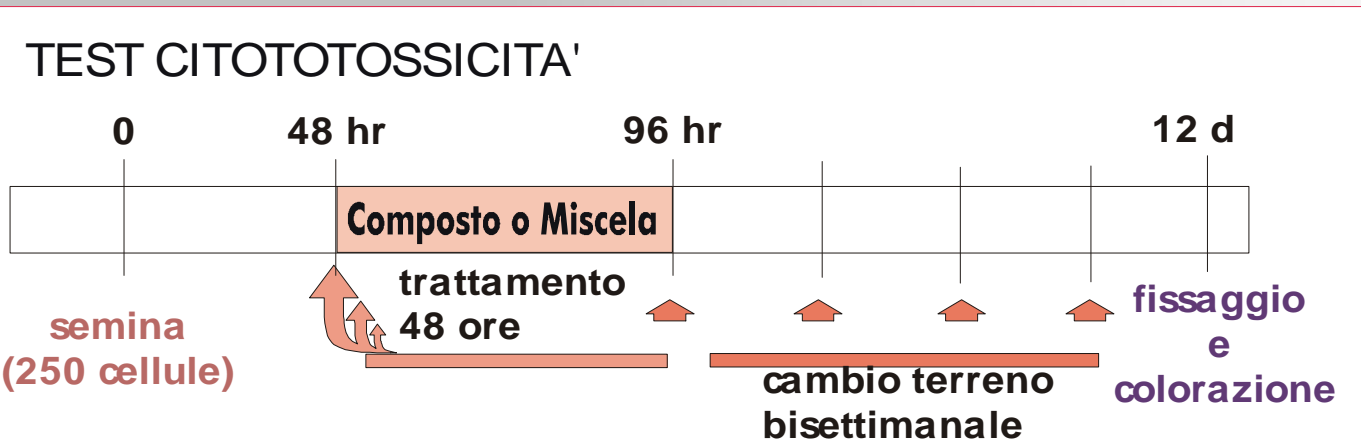
- La cancerogenicità non correla con la struttura
- Il potenziale cancerogeno non sembra dipendere dal contenuto di cloro

# Il modello BALB/c 3T3

---

- Test di trasformazione utilizzato per anni nello screening dei cancerogeni e attualmente in validazione per lo screening dei promoventi
  - Protocollo modificato
    - Incrementa l'efficienza clonale
    - Riduce la risposta agli effetti chimici
    - Aumenta le capacità metabolizzanti
    - Incrementa le comunicazioni cellulari
    - Aumenta la sensibilità ai cancerogeni
    - Migliora la specificità del modello
-

# PROTOCOLLO

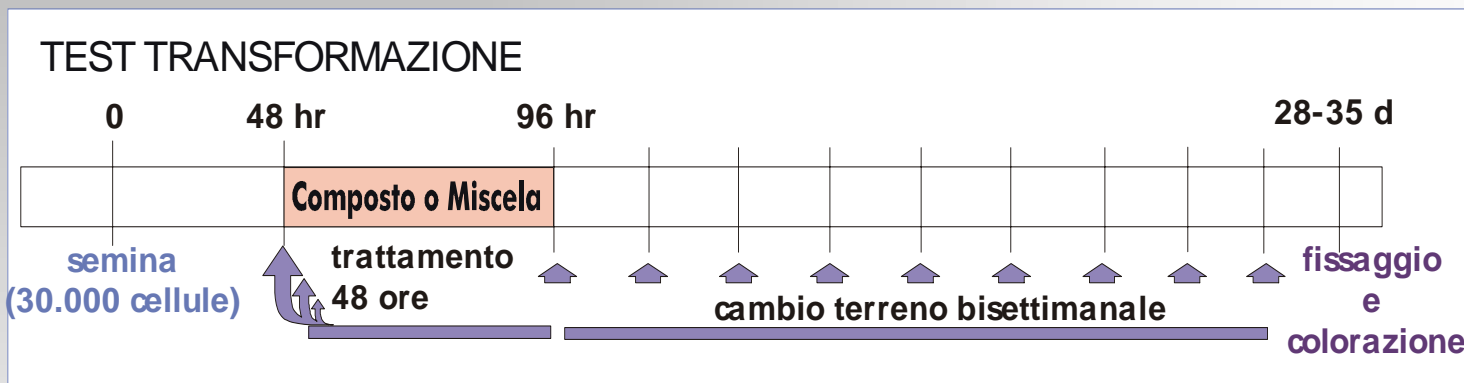


endpoint = efficienza clonale  
(CE)

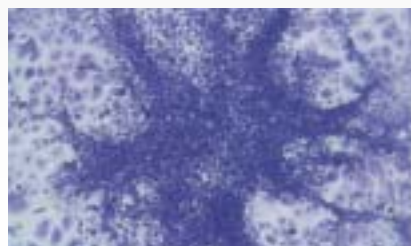
Endpoint finale = frequenza di trasformazione

TF = numero foci/efficienza clonale

# PROTOCOLLO



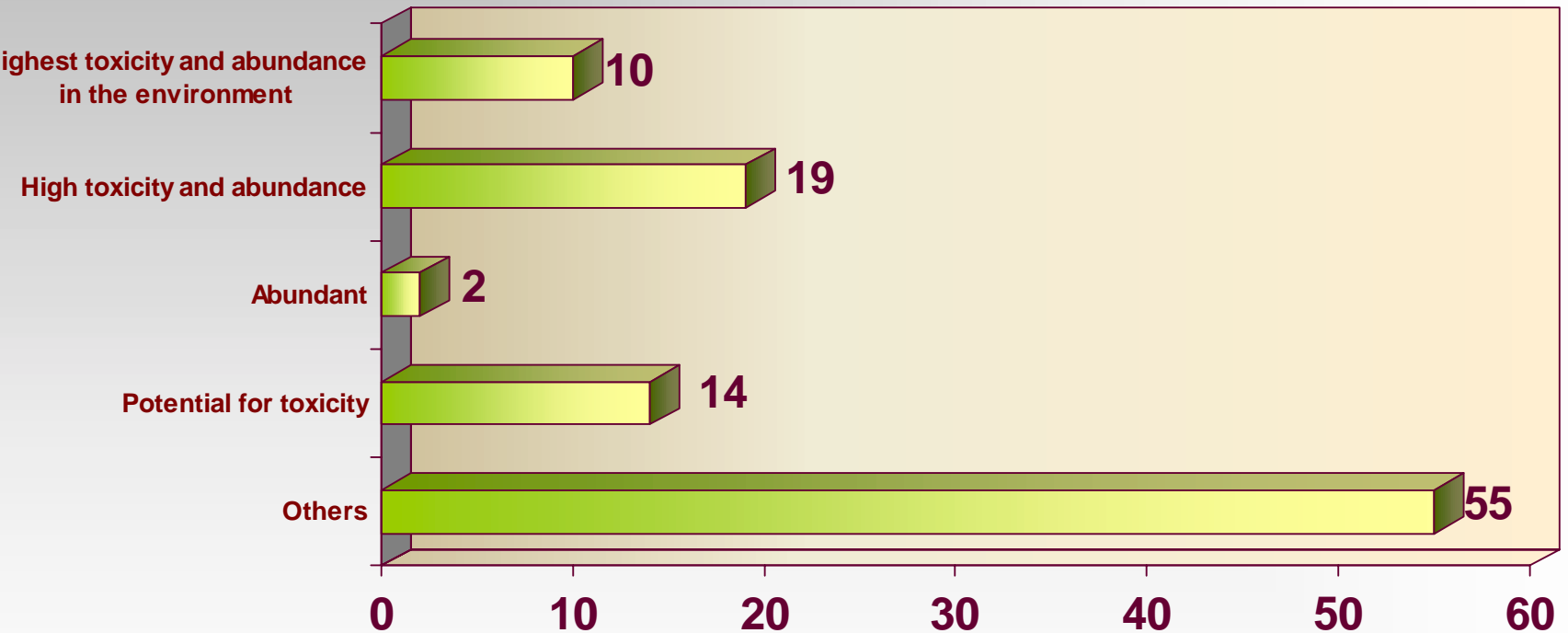
endpoint = formazione foci



# Studio di una miscela ambientale di PCB: GC/MS Analysis

	<b>Aroclor 1260</b>	<b>Aroclor 1242</b>	<b>Campione C1</b>	<b>Campione C4</b>
<b>Number of identified congeners</b>	48	58	74	61
<b>Standard nominal concentration</b>	98	99	-	-
<b>Concentration from GC/MS analysis (mg/L)</b>	91,9	94,5	88,5	139,8
<b>Total Aroclor concentration (mg/L)</b>			92,7	0,58
<b>Aroclor 1260 concentration (mg/L)</b>			66,3	0,47
<b>% Aroclor 1260</b>			71,5 %	79,8%

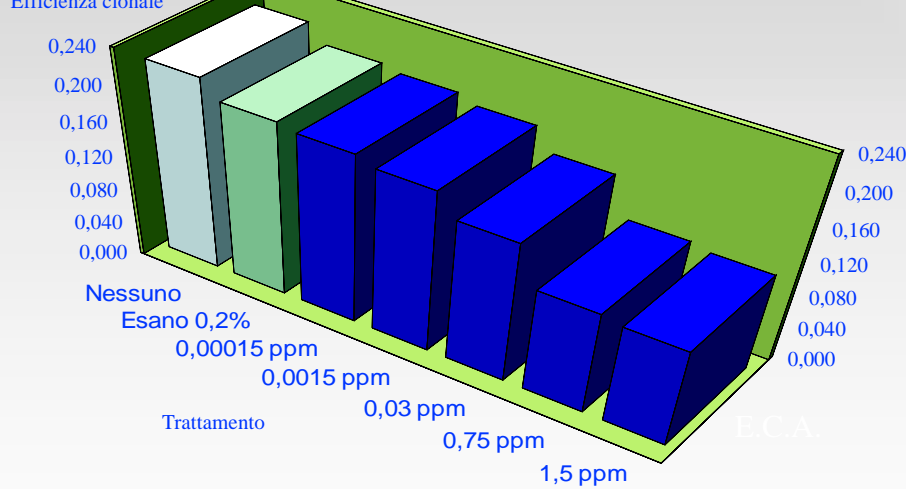
# Studio di una miscela ambientale di PCB: classificazione dei congeneri



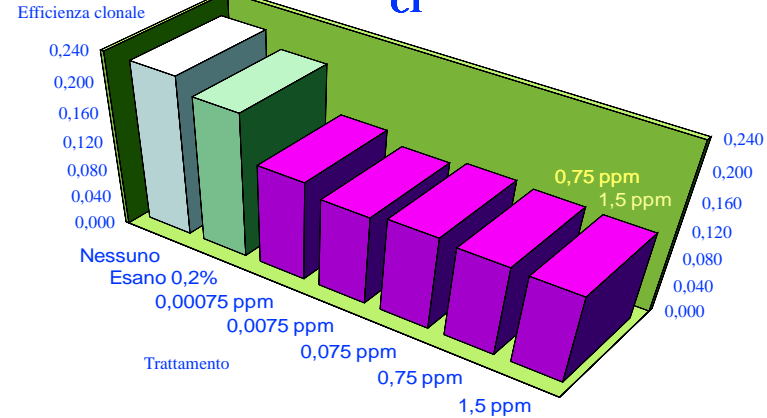
(Source EPA (1996) PCBs cancer dose-response assessment and application to environmental

# Studio di una miscela ambientale di PCB: comparazione degli effetti citotossici

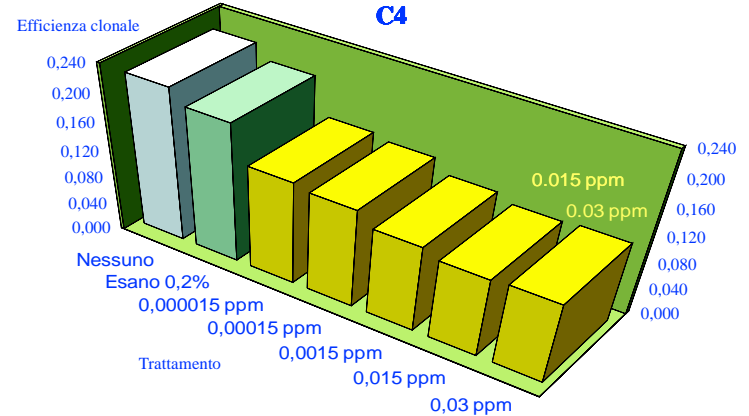
### AROCLOR 1260



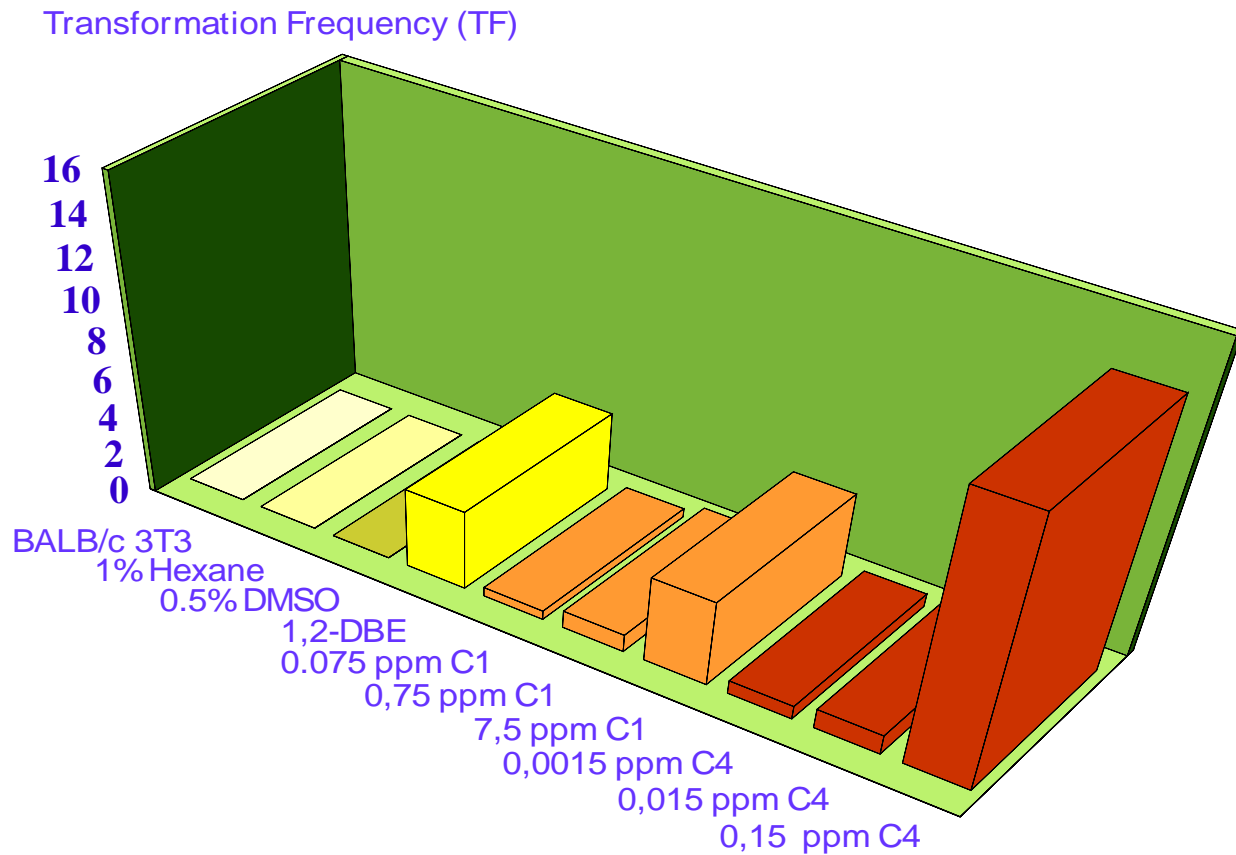
### C1



### C4



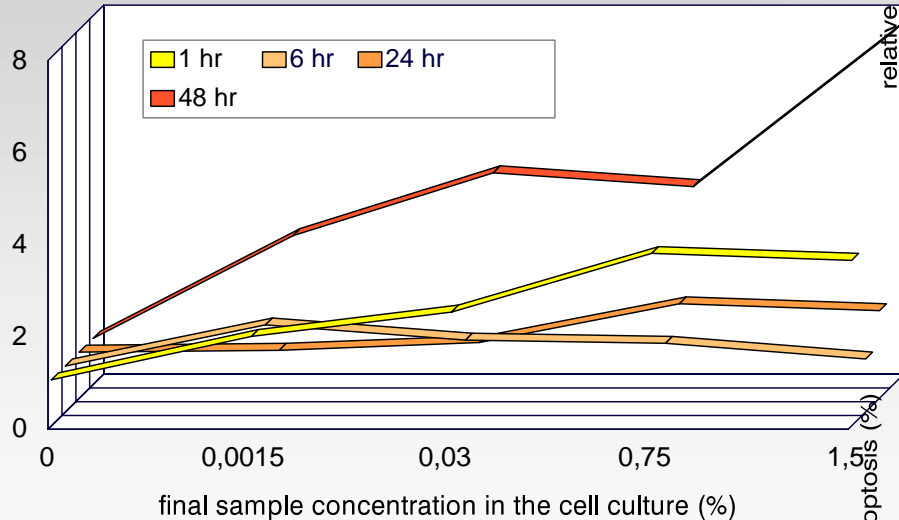
# Studio di una miscela ambientale di PCB: frequenza di trasformazione



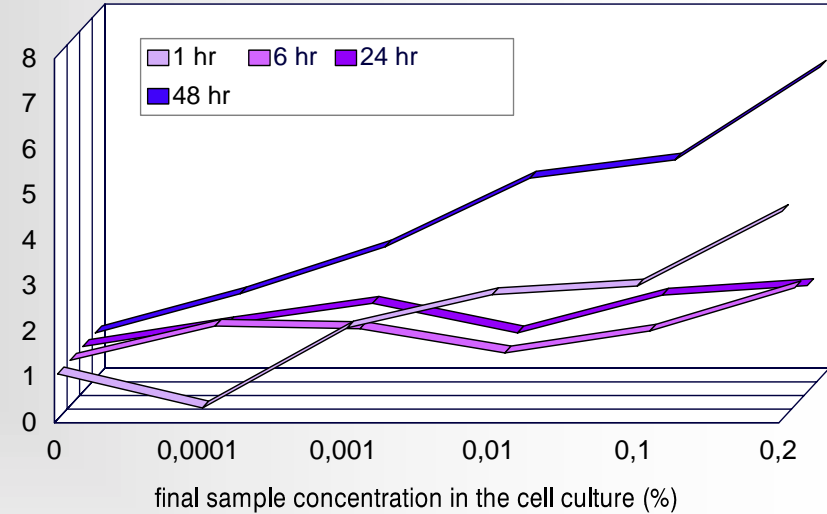


# Induzione di apoptosi come end-point di danno tossicologico

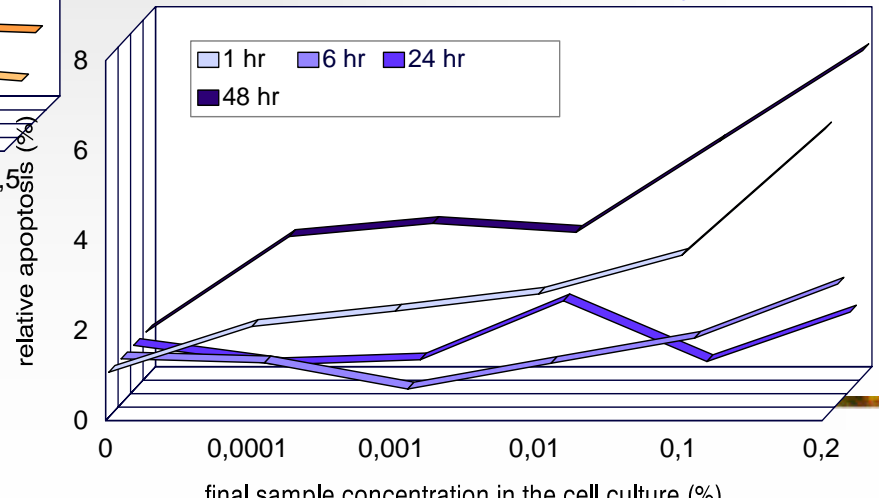
*In situ apoptotic effects by Aroclor 1260*



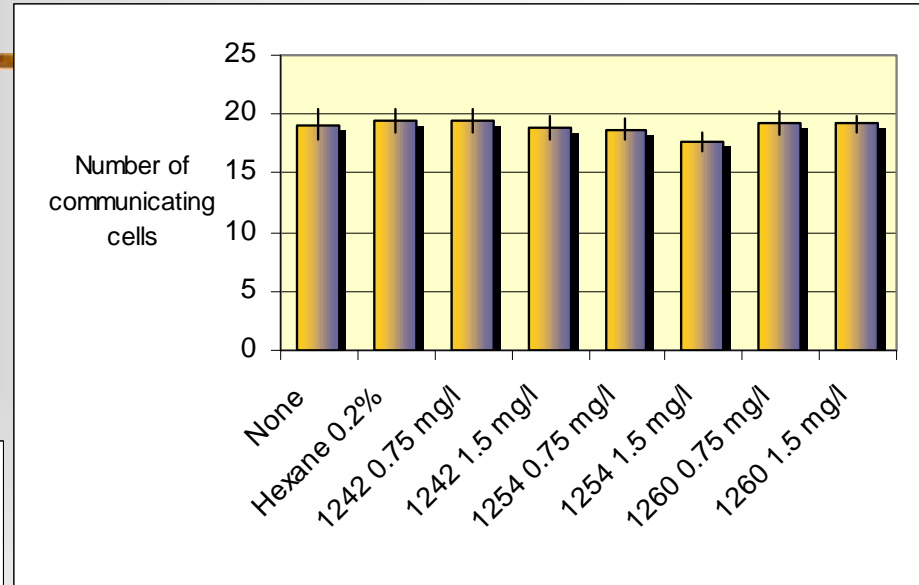
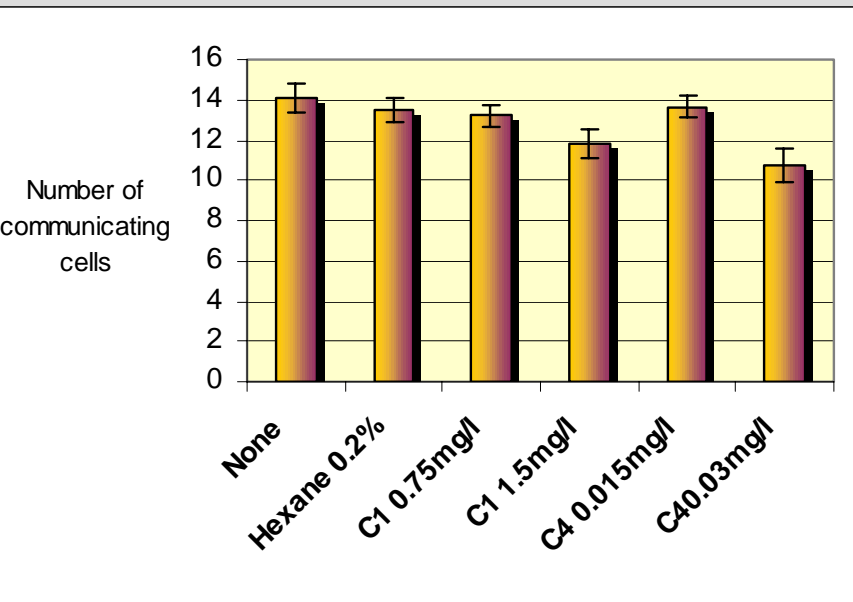
*In situ apoptotic effects by C1*



*In situ apoptotic effects by C4*



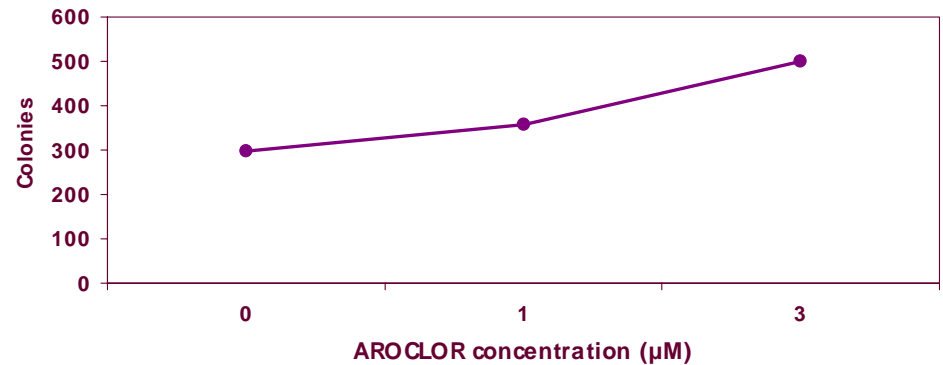
# Inibizione della comunicazione: un ulteriore end-point delle miscele promoventi



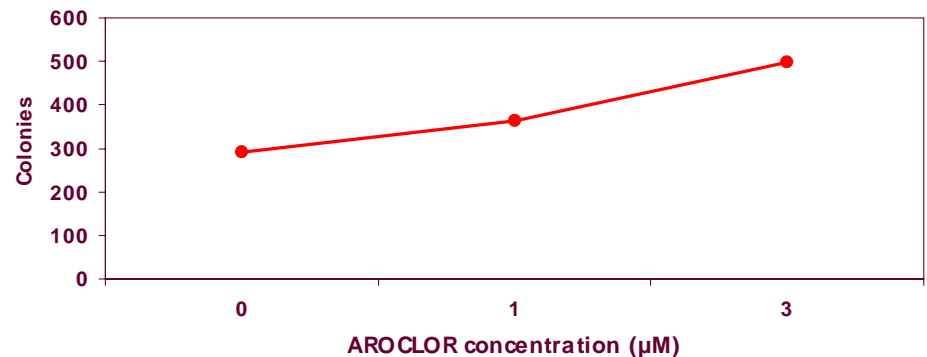
# Modelli di organi target: mammella

- Endpoint
  - clonogenicità (agar soffice)
- Target:
  - Cellule MCF7
  - Cellule TTu2
- Miscela
  - Aroclor 1254

Effect of AROCLOR 1254 treatment on MCF-7 cells



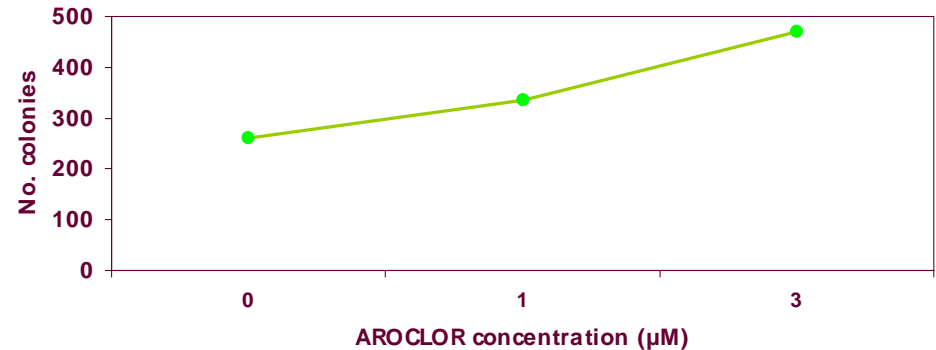
Effect of AROCLOR 1254 treatment on TTu-2 cells



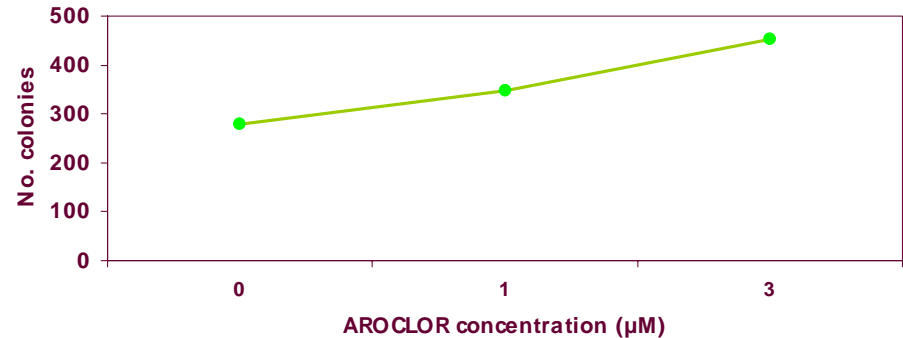
# Modelli di organi target: mammella

- Endpoint
  - clonogenicità (agar soffice)
- Target:
  - Cellule MCF7
  - Cellule TTu2
- Miscela
  - Aroclor 1016

Effect of AROCLOR 1016 treatment on MCF7



Effect of AROCLOR 1016 treatment on TTu-2 cells



# Il monitoraggio biologico nella valutazione dell'esposizione e degli effetti: qualità e affidabilità delle misurazioni

M. Patriarca, Marco Castelli, A. Menditto  
Laboratorio di Biochimica clinica  
Istituto superiore di sanità

Workshop

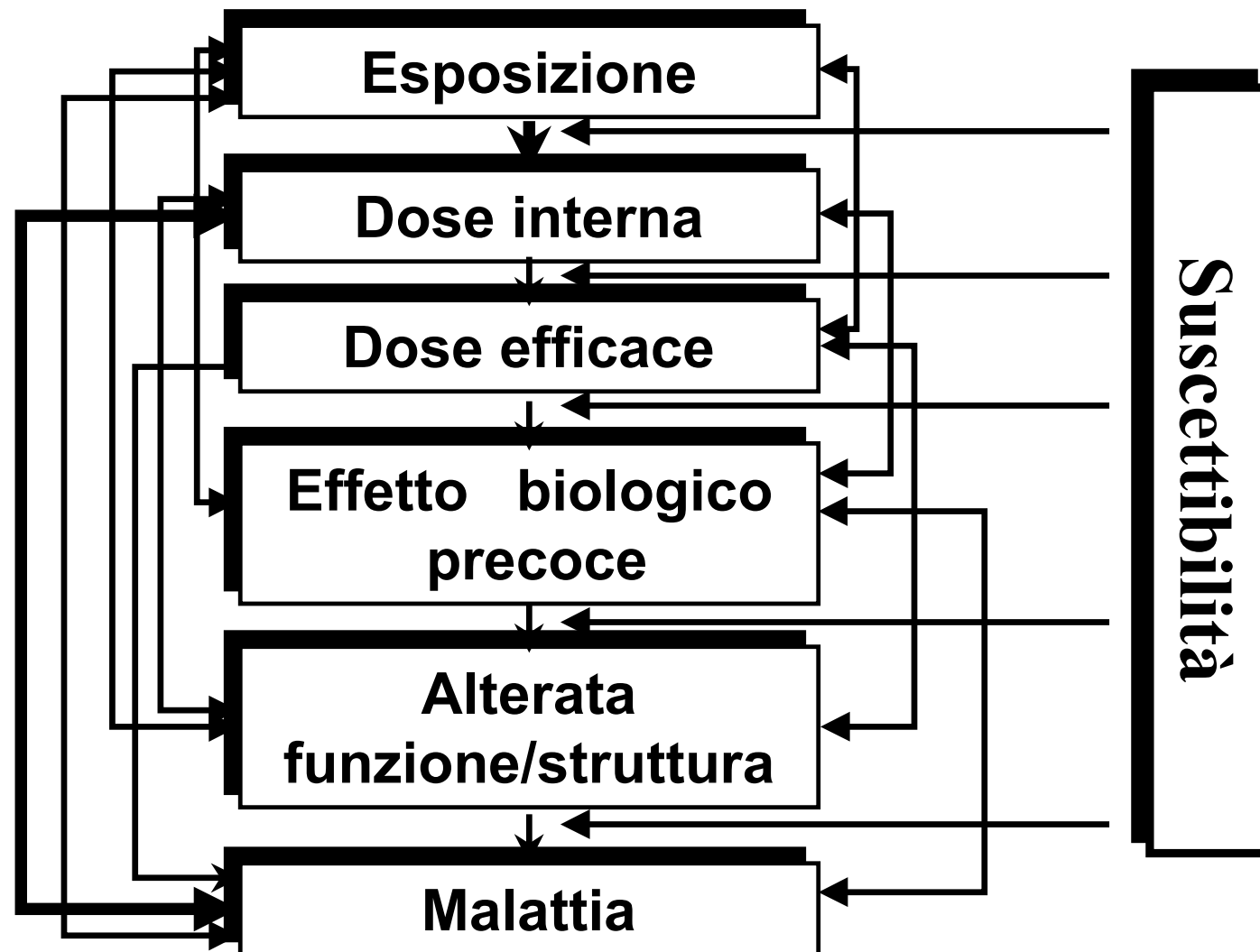
"Killer invisibili ? Indagine sugli inquinanti che alterano che il nostro sistema ormonale"

ISS, 4 luglio 2003

# Monitoraggio biologico

Misurazione, continua o ripetuta, di sostanze potenzialmente tossiche, o di loro metaboliti o degli effetti indotti da questi nei tessuti, nelle secrezioni, nelle escrezioni o nell'aria espirata, al fine di valutare l'esposizione ed i rischi per la salute attraverso un confronto con appropriati valori di riferimento ...  
(IUPAC)

# DALL'ESPOSIZIONE AD INQUINANTI ALL'INSORGENZA DI MALATTIE



## **Indicatore biologico (Biomarker)**

Qualsiasi indicatore che consenta di rilevare un evento in un sistema biologico sia esso di carattere biochimico, molecolare, genetico, immunologico o fisiologico che può influenzare o predire l'insorgenza e l'evoluzione di una malattia



# CLASSIFICAZIONE DEI BIOMARKER

***biomarker di esposizione***

**concentrazione di uno xenobiotico, di un suo metabolita o del prodotto della loro interazione con un componente endogeno**

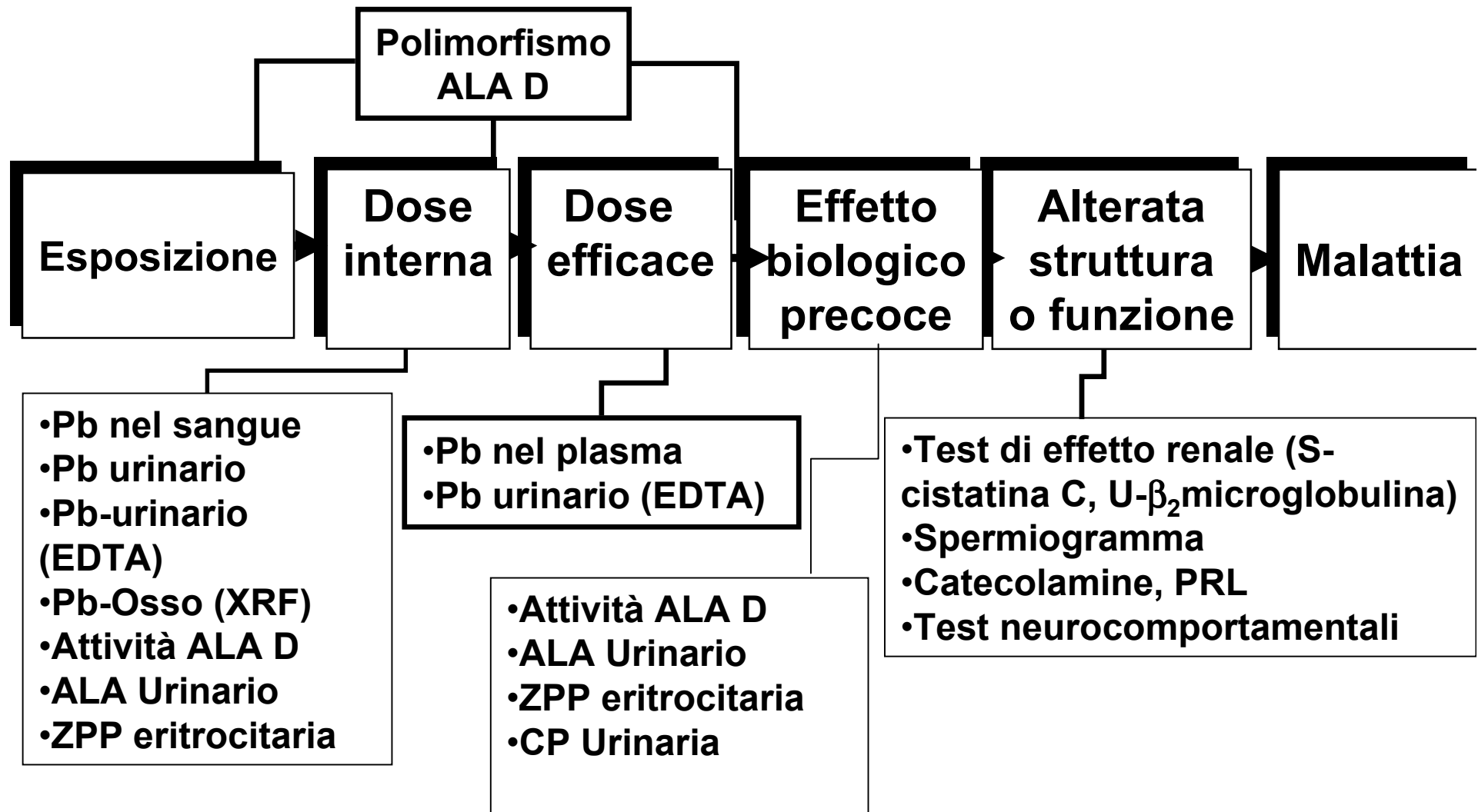
***biomarker di effetto***

**alterazioni biochimiche morfologiche o funzionali rilevabili nell'organismo umano**

***biomarker di suscettibilità***

**indice di predisposizione (ereditaria od acquisita) di un individuo a subire gli effetti di uno xenobiotico**

# Esposizione a Piombo ed Indicatori di Dose, Effetto e Suscettibilità



# STUDI TRANSIZIONALI

Tipo di studio (Scopo)	Caratteristiche
Sviluppo (Sviluppo del Biomarker)	<ul style="list-style-type: none"><li>•Costruiti su studi sperimentali (valutazione della relazione dose/risposta)</li><li>•Dosaggio in campioni umani</li><li>•Valutazione procedure, raccolta, trattamento analisi e conservazione dei campioni</li></ul>
Caratterizzazione (Validazione)	<ul style="list-style-type: none"><li>•Inesattezza, imprecisione, incertezza di misura, limiti di rivelabilità e quantificazione</li><li>•Relazione tra esposizione e biomarker, cinetica</li><li>•Ruolo dei fattori di confondimento (endogeni ed esogeni) e dei modificatori di effetto</li></ul>
Applicato (Utilizzazione in studi trasversali)	<ul style="list-style-type: none"><li>• Valutazione del livello di esposizione di varie popolazioni (valori di riferimento) e ulteriore validazione del biomarker</li></ul>

# Requisiti dei risultati di misurazioni

Comparabilità  
nel tempo

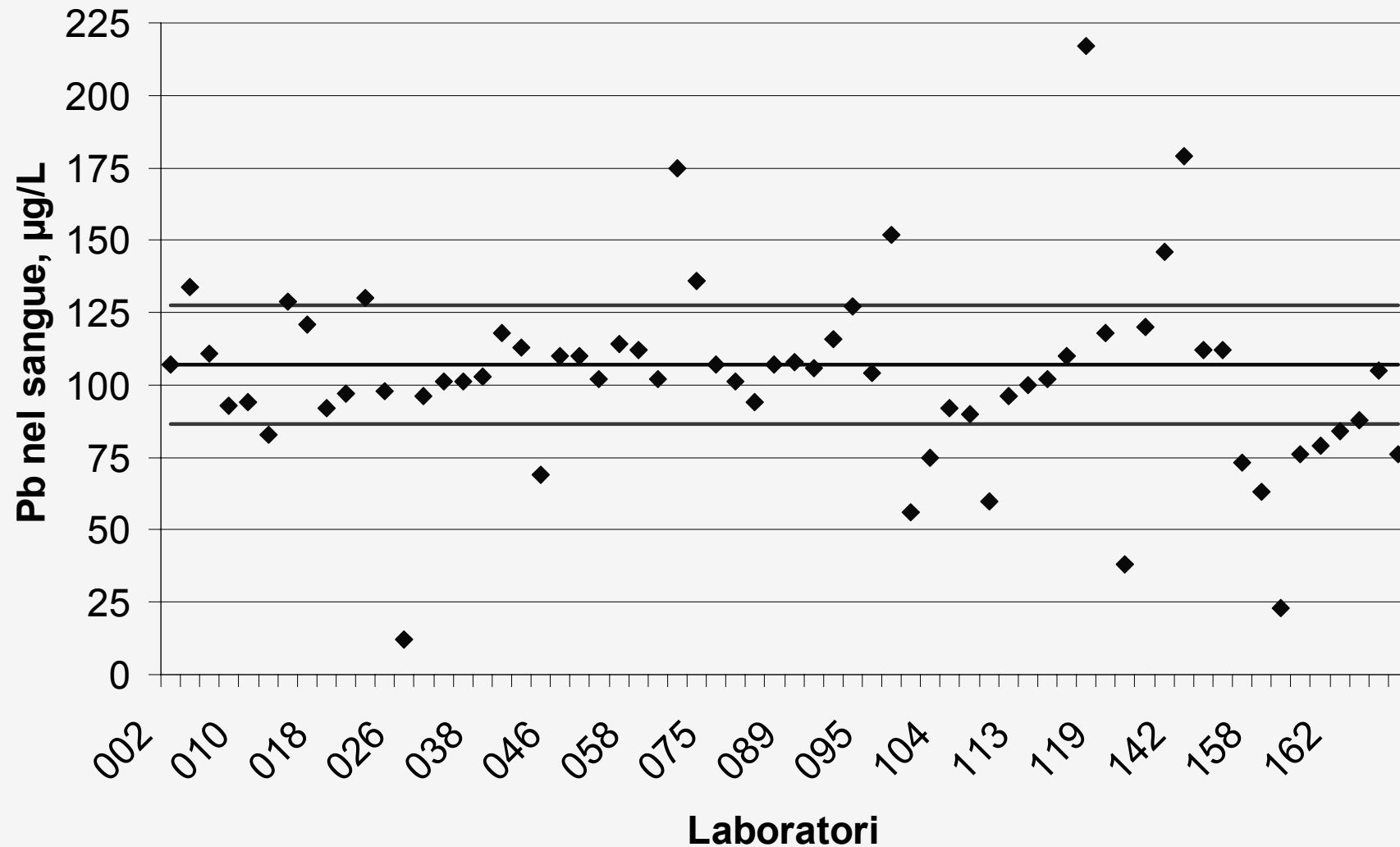
Comparabilità  
tra luoghi diversi

Confronto  
con valori limite  
o intervalli di riferimento



**E' necessario assicurare  
la qualità e l'affidabilità dei risultati analitici**

# Pb nel sangue: risultati confrontabili?



Programma nazionale di valutazione esterna di qualità (Progetto METOS) 2003

# Strumenti operativi

**Implementazione di SQ  
(ISO/IEC 17025:1999 e ISO 15189:2003)**

**Qualificazione del personale**

**Qualificazione della  
strumentazione**

**Materiali di Riferimento Certificati**

**Validazione dei metodi analitici**

**Verifica di una terza parte  
indipendente (accreditamento)**

# FASI DEL PROCESSO DI VALIDAZIONE

- ▶ pianificazione e attribuzione delle risorse (umane e tecniche) da impiegare
- ▶ chiara definizione dei requisiti da soddisfare
- ▶ chiara descrizione del metodo da validare
- ▶ programma operativo che indichi:
  - i parametri da valutare
  - le informazioni deducibili da fonti esistenti
  - gli esperimenti che si intende eseguire
- ▶ registrazione dei risultati
- ▶ elaborazione dei risultati
- ▶ un rapporto scritto
- ▶ confronto con i requisiti
- ▶ dichiarazione di validità (o meno) del metodo all'interno del campo di applicazione stabilito

# PARAMETRI DA VALUTARE PER LA VALIDAZIONE DI METODI ANALITICI

- ▶ Identità
- ▶ Specificità/selettività analitica
- ▶ Limite di rivelabilità (LR) e  
limite di quantificazione (LQ)
- ▶ Intervallo di linearità
- ▶ Sensibilità analitica
- ▶ Precisione
  - Ripetibilità
  - Precisione intermedia
- ▶ Esattezza
- ▶ Robustezza
- ▶ **Incertezza di misura**

EURACHEM. The fitness for purpose of analytical methods. A laboratory guide to method validation and related topics. First edition, 1998 ([www.eurachem.bam.de](http://www.eurachem.bam.de))

IUPAC Technical report. Harmonised guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. 2002 [www.iupac.org](http://www.iupac.org)



# **Incertezza di misura**

Un parametro, associato al risultato di una misurazione, che caratterizza la dispersione dei valori ragionevolmente attribuibili al misurando

ISO, VIM, 1993 (trad. ufficiale)

Stima legata ad un risultato di prova che caratterizza l'escursione dei valori entro cui si suppone che cada il valore vero [del misurando]

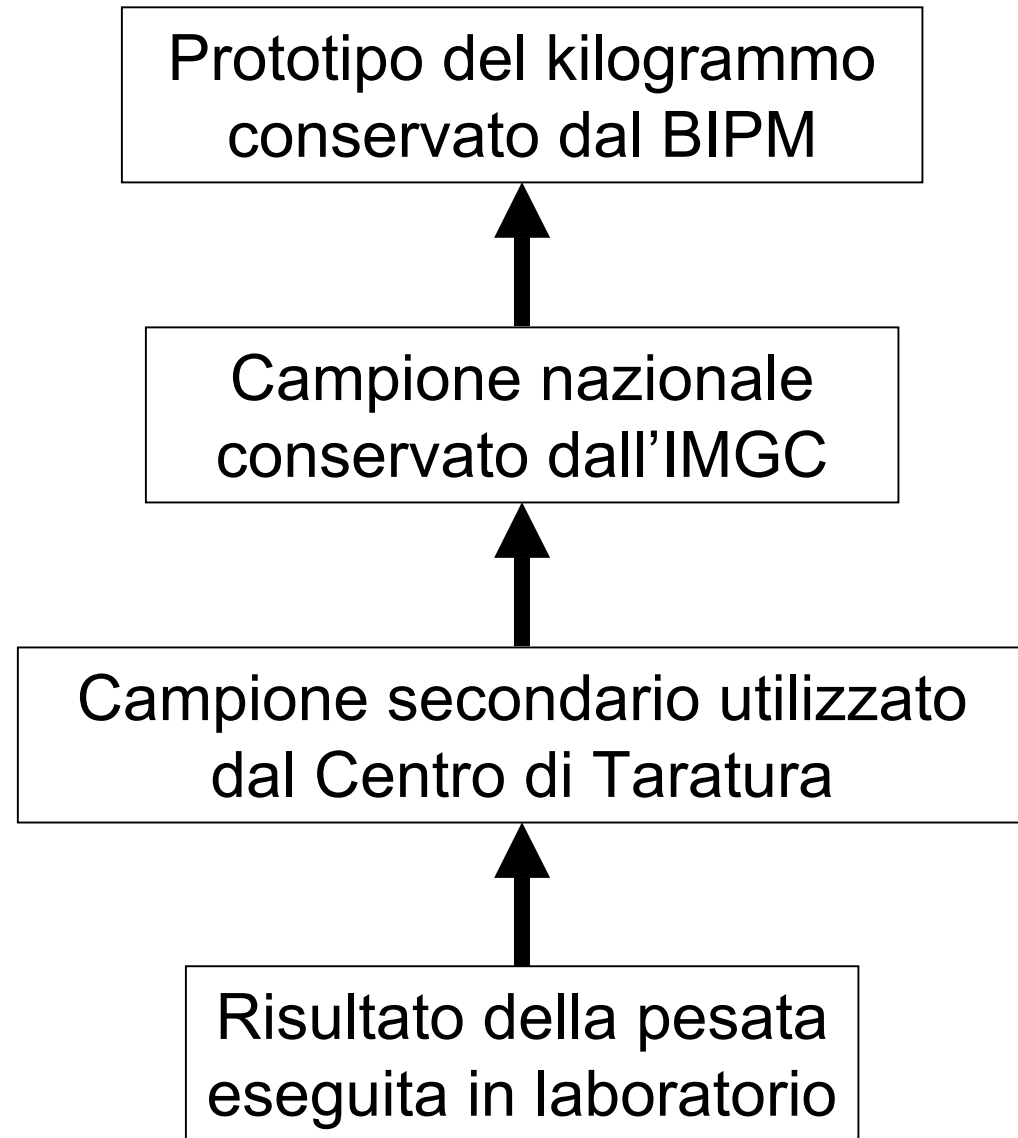
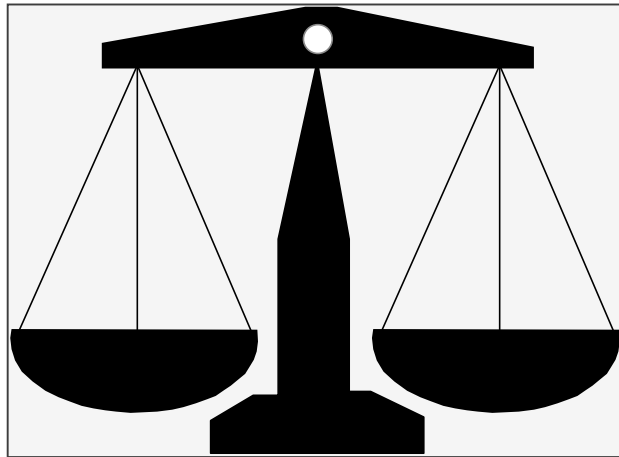
UNI ISO 3534-1:2000

# RIFERIBILITÀ

Proprietà del risultato di una misurazione, o del valore di un campione a cui esso può essere riferito, di cui è espressa l'incertezza rispetto a riferimenti definiti, di solito campioni nazionali o internazionali, attraverso una catena ininterrotta di confronti.

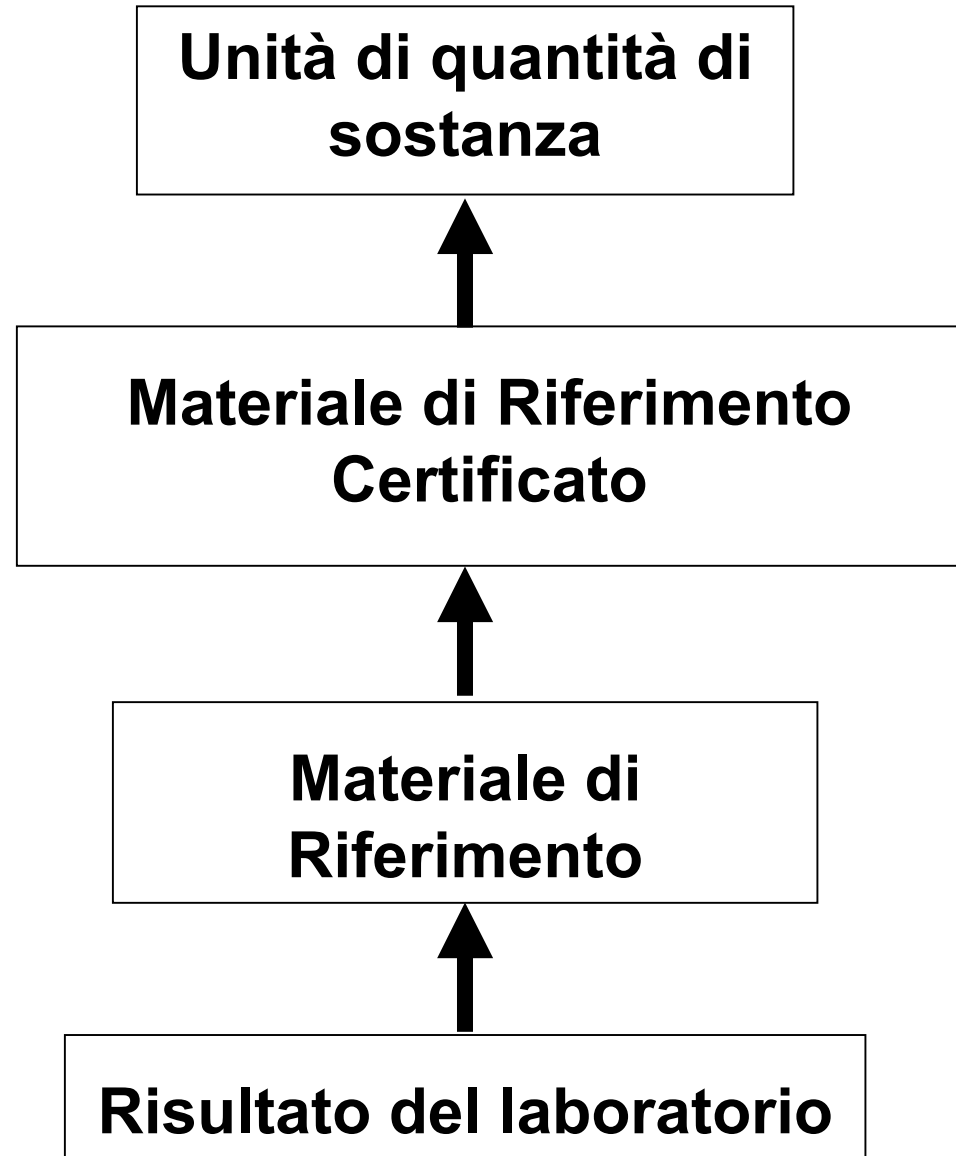
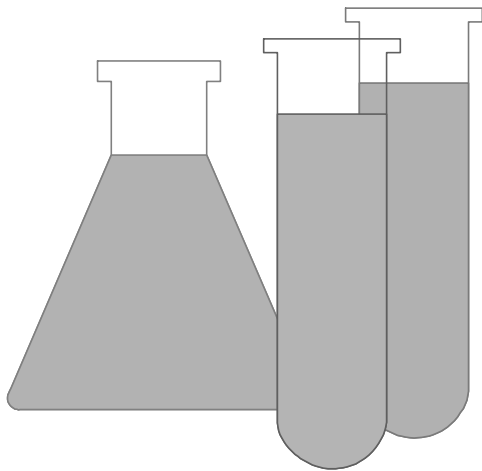
(trad. da VIM, 1993)

# RIFERIBILITÀ

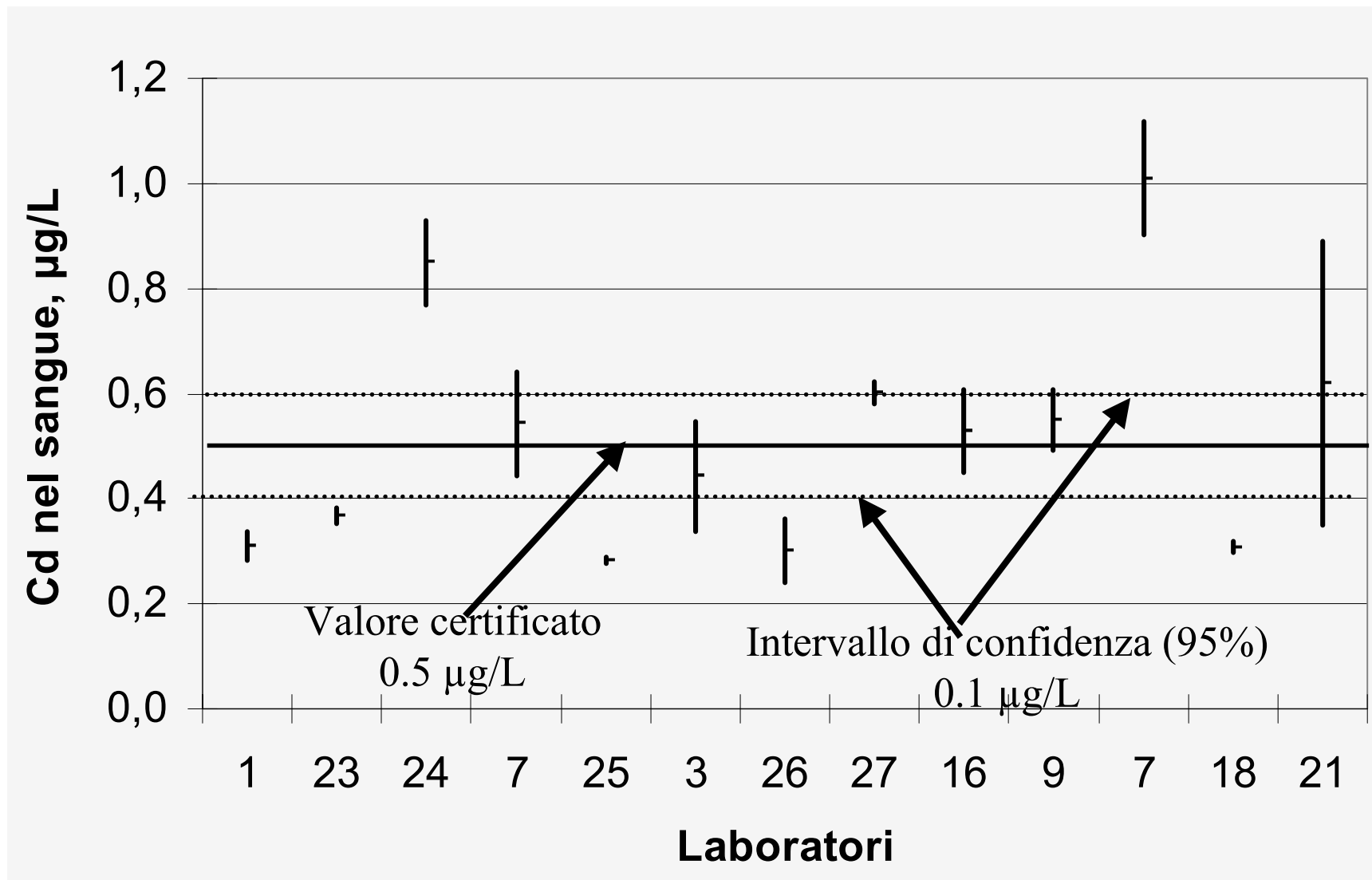


# RIFERIBILITA'

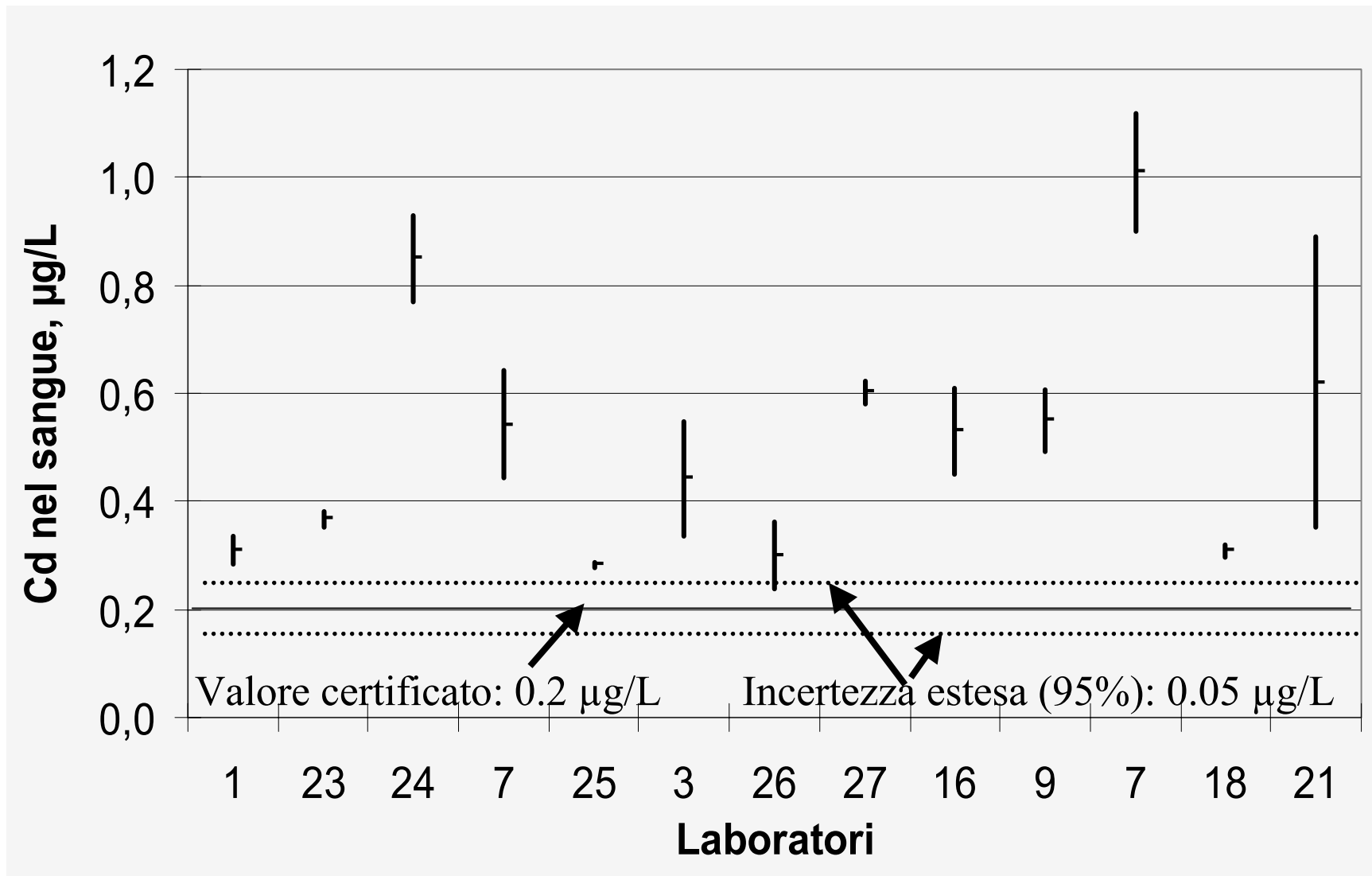
**Nell'analisi  
chimica:**



# Confrontabilità dei risultati analitici: Certificazione di BCR 194, Cd nel sangue (1985)



# Riferibilità dei risultati analitici: Ri-certificazione di BCR 194 mediante IDMS (1998)



# Lo studio in corso sull'esposizione a sospetti ED

Soggetti:	38 pazienti afferenti a un centro day-hospital con disturbi su base endocrino-metabolica
Scheda anamnestica:	informazioni su possibili determinanti di esposizione
Dati analitici:	determinazione di pesticidi clorurati e metalli pesanti (Pb, Cd) nel sangue
Garanzia di qualità dei dati analitici:	validazione dei metodi in accordo alle linee guida internazionali, analisi di materiali di riferimento certificati

# Pb nel sangue: risultati dello studio di validazione

- ▶ Identità
  - ▶ Specificità/selettività analitica
  - ▶ Limite di rivelabilità (LR) e limite di quantificazione (LQ)
  - ▶ Intervallo di linearità
  - ▶ Sensibilità analitica
  - ▶ Precisione
    - ▶ Ripetibilità
    - ▶ Precisione intermedia
  - ▶ Esattezza
  - ▶ Incertezza di misura
- ▶ Implicita (ZETAAS)
  - ▶ Taratura con soluzioni in matrice identica
  - ▶ 2.0 µg/L
  - ▶ 4.1 µg/L
  - ▶ 0-150 µg/L ( $r = 0.999$ )
  - ▶  $m_0 = 41.8 \pm 0.9$  pg
  - ▶ CV= 5.4% a 37 µg/L
  - ▶ **CV= 7.7% a 34 µg/L**
  - ▶ **103 ± 7%**
  - ▶ **7.8% (4-40 µg/L)**
  - ▶ 5.5% (>40-150 µg/L)



**Consensus agreement, Stoccolma, 1999**  
**Gerarchia delle metodologie per la definizione dei**  
**traguardi analitici in medicina di laboratorio**

1. Effetto delle prestazioni analitiche sull'efficacia clinica dei test in situazioni cliniche specificate
2. Effetto delle prestazioni analitiche sulle decisioni cliniche definito in base a
  - a. componenti della variabilità biologica
  - b. pareri dei clinici
3. Raccomandazioni specialistiche pubblicate
  - a. da organizzazioni internazionali ed nazionali
  - b. da esperti (individui o gruppi) a livello locale
4. Traguardi analitici stabiliti da
  - a. normative o indicazioni di organizzazioni di controllo
  - b. organizzatori di schemi di VEQ
5. Stato dell'arte, valutato in base a
  - a. i risultati di schemi di VEQ
  - b. letteratura scientifica sulla metodologia analitica

# Traguardi analitici per la determinazione del Pb nel sangue

A concentrazioni di 100 µg/L

In base a:

variabilità biologica: <8.5%

Limiti imposti da  
leggi (US CLIA88): <40 µg/L

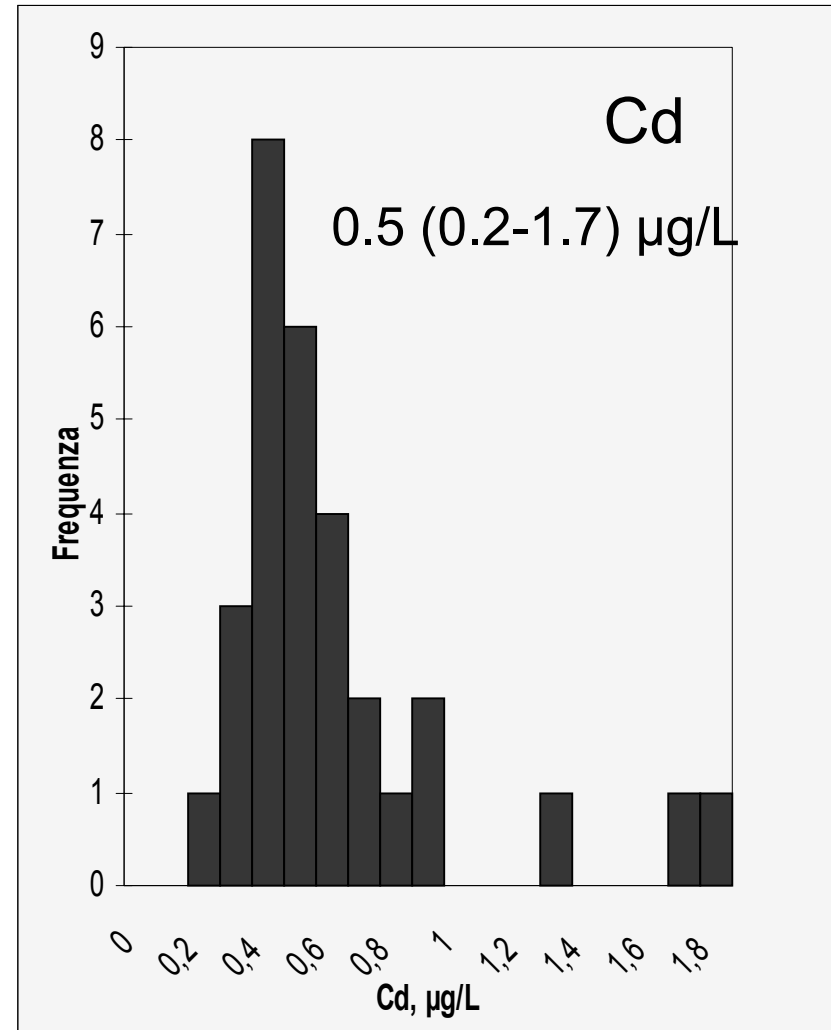
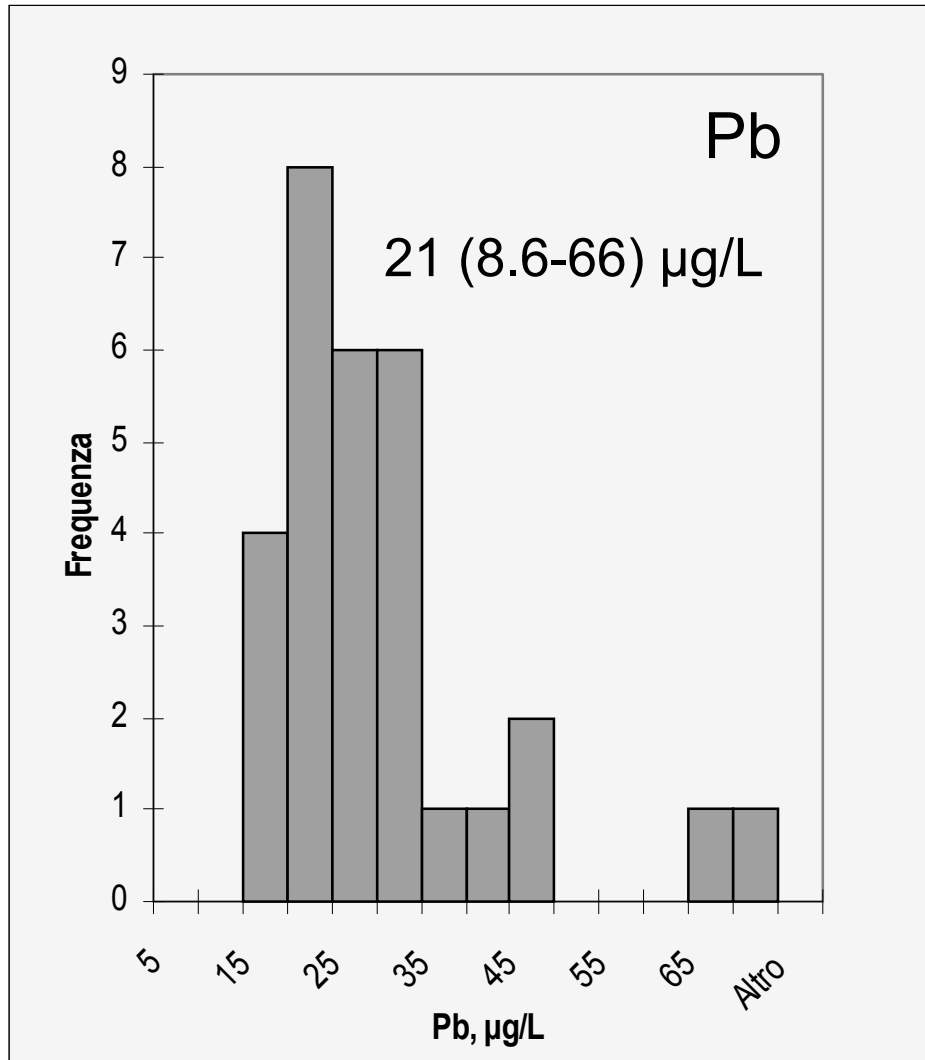
organismi di controllo (OSHA): <60 µg/L

Stato dell'arte (Schemi di VEQ): 7-21%

Network Europeo EQAS in OELM <30 µg/L

Taylor et al., Clin. Chem. 2002, 48, 2000-7

# Risultati preliminari: livelli di Pb e Cd nel sangue



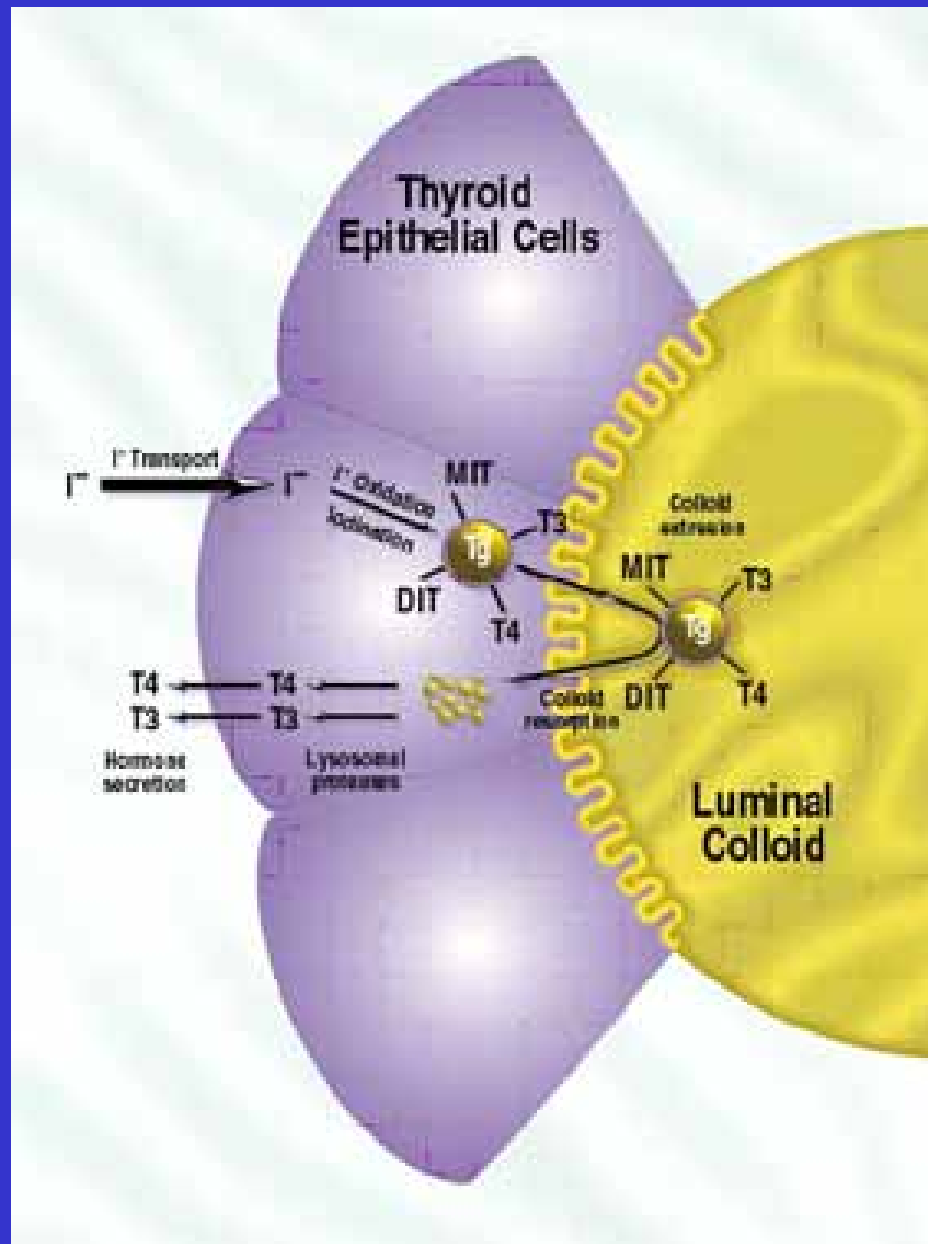
(mediana, min-max)

# IMPATTO SULLA FUNZIONE TIROIDEA DELL'ESPOSIZIONE A PESTICIDI

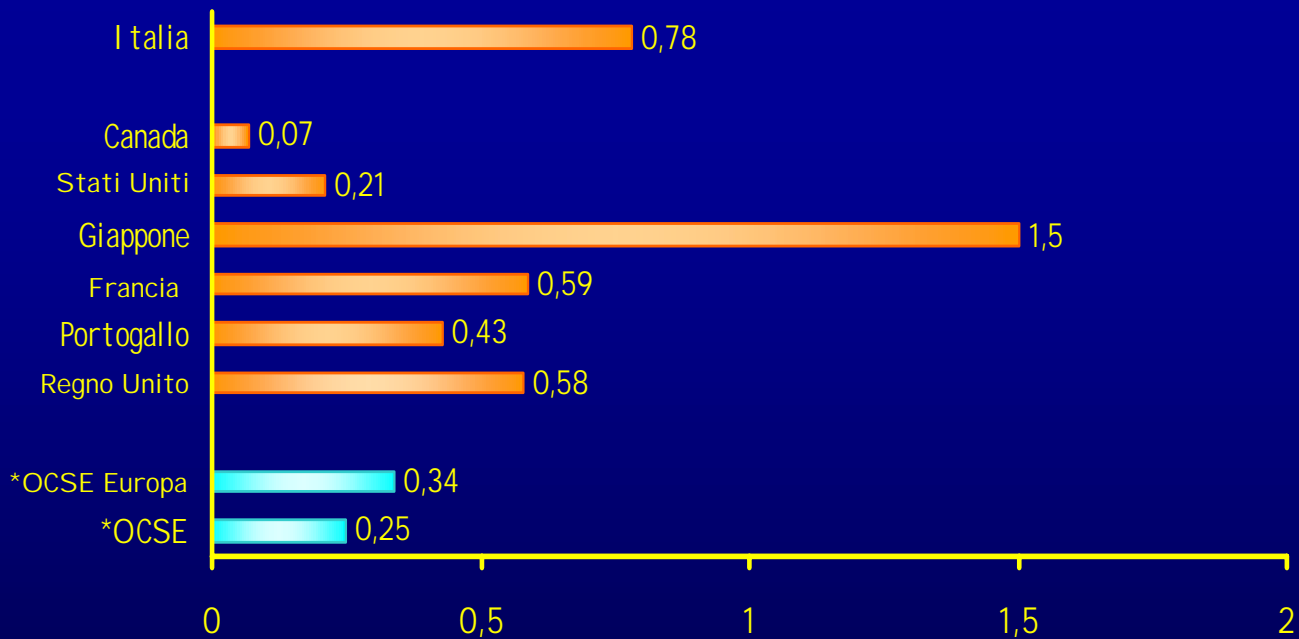
A. Olivieri



Istituto Superiore di Sanità



## Uso di pesticidi – fine anni '90



\*Fonte FAO; OCSE

Tonnellate/Km<sup>2</sup> di suoli coltivabili  
e coltivazioni permanenti

# ASSORBIMENTO MANCOZEB

SOGGETTI PROFESSIONALMENTE ESPOSTI  
ATTRAVERSO LE VIE

- INALATORIA

- CUTANEA

- ORALE

SOGGETTI APPARTENENTI ALLA POPOLAZIONE  
GENERALE



*ATTRAVERSO LA DIETA*



# METABOLISMO MANCOZEB

---

VEGETALI  
UOMO



**ETU**  
(etilentiourea)

ETU è un metabolita comune a tutti gli etilenbisditiocarbamati

ETU escreto con le urine può essere dosato



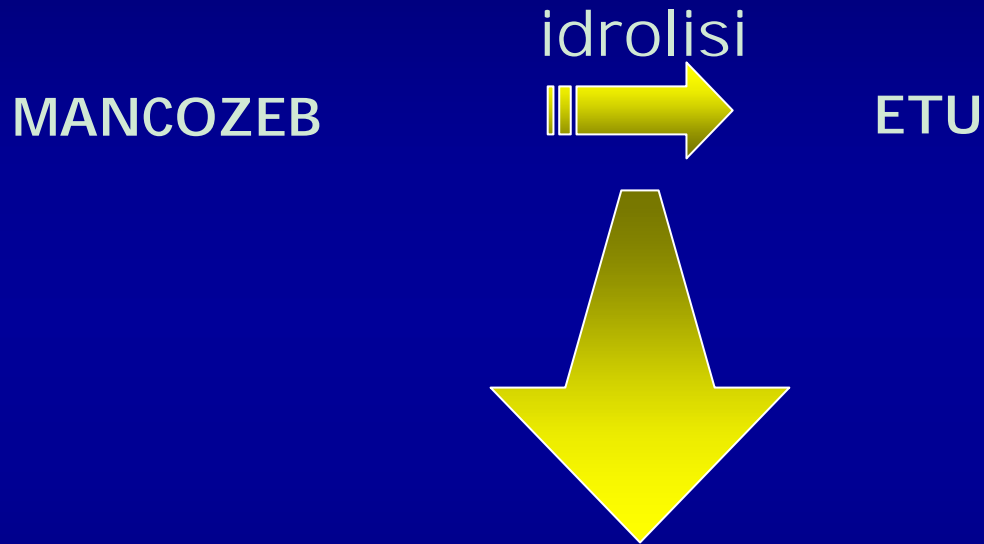
**MARCATORE DI DOSE**





# ESPOSIZIONE A MANCOZEB

---



ETU presente in tracce nelle formulazioni commerciali di EBDC  
ETU prodotto durante la conservazione o la cottura di cibo contaminato

# ETU - EFFETTI SULLA TIROIIDE

## STUDI SU MODELLI SPERIMENTALI

1. **Azione cancerogena** sulla tiroide ed altri organi (*Ann. N.Y. Acad. Sci. 982:123, 2002*)
2. **Azione teratogena** (*Teratology 41: 721, 1990;*)
3. **Azione gozzigena** dovuta alla capacità di inibire la perossidasi tiroidea

## STUDI SULL'UOMO

Pochissime informazioni su soggetti professionalmente esposti (applicatori): vengono riportate lievi modificazioni ormonali rispetto ai controlli a supporto di **un'azione tireostatica** anche sull'uomo (*Environ. Health Perspect. 107: 1126, 1997*)

## ETU excretion in MANCOZEB exposed workers

	Baseline ETU excretion $\mu\text{g}/\text{g}_{\text{creat}}$	End-shift ETU excretion $\mu\text{g}/\text{g}_{\text{creat}}$
MANCOZEB applicators (n=13)	$0.6 \pm 0.9$ median: <0.5	$12.5 \pm 25.9$ median: 2.5
CONTROLS (n=13)	<0.5*	/

\*detection limit for urinary ETU

C. Colosio *Toxicol. Letters*, 2002 - 134:133-40

Baseline vs end-shift ETU excretion,  $P < 0.01$

# ETU excretion in general population

	N	Mean±SD ( $\mu\text{g/g}_{\text{creat}}$ )	Median ( $\mu\text{g/g}_{\text{creat}}$ )	% of subjects ETU >1 $\mu\text{g/l}$
Urban population (Verona, Pavia, Torino, Trento)	167	2.7 ± 2	1.8	24
Rural population (Rovescala - Pavia) Area sprayed by helicopter	97	9.1 ± 13.4	4.7	37

C. Aprea et al. *Sci Total Environ* 1996, 192:83-93

ISS

ASL FIRENZE

UNIV. DI PISA

UNIV. PAVIA

## Studio degli effetti sulla funzione tiroidea dell'esposizione a etilenbisditiocarbamati (EBDC)



Realizzazione di uno STUDIO PILOTA

# STUDIO PILOTA

## Soggetti studiati

N = 17 viticoltori dell'area del Chianti impegnati nell'attività agricola mediamente da  $7.0 \pm 4.4$  anni (range 1 - 15 anni)

## Obiettivo dello studio

Valutare i possibili effetti dell'esposizione professionale a EBDC sulla funzionalità tiroidea attraverso la determinazione dei parametri ormonali, l'ecografia tiroidea e la determinazione di ETU urinario.



*ISS*

S. De Angelis

C. Fazzini

A. Mantovani

M. Sorcini

*ASL FIRENZE*

C. Fiumalbi

M.T. Mechi

A. Perico

*UNIVERSITA' DI PISA*

F. Santini

T. Rago

P. Vitti

A. Pinchera

*UNIVERSITA' DI PAVIA*

*Istituto Maugeri*

L. Chiovato

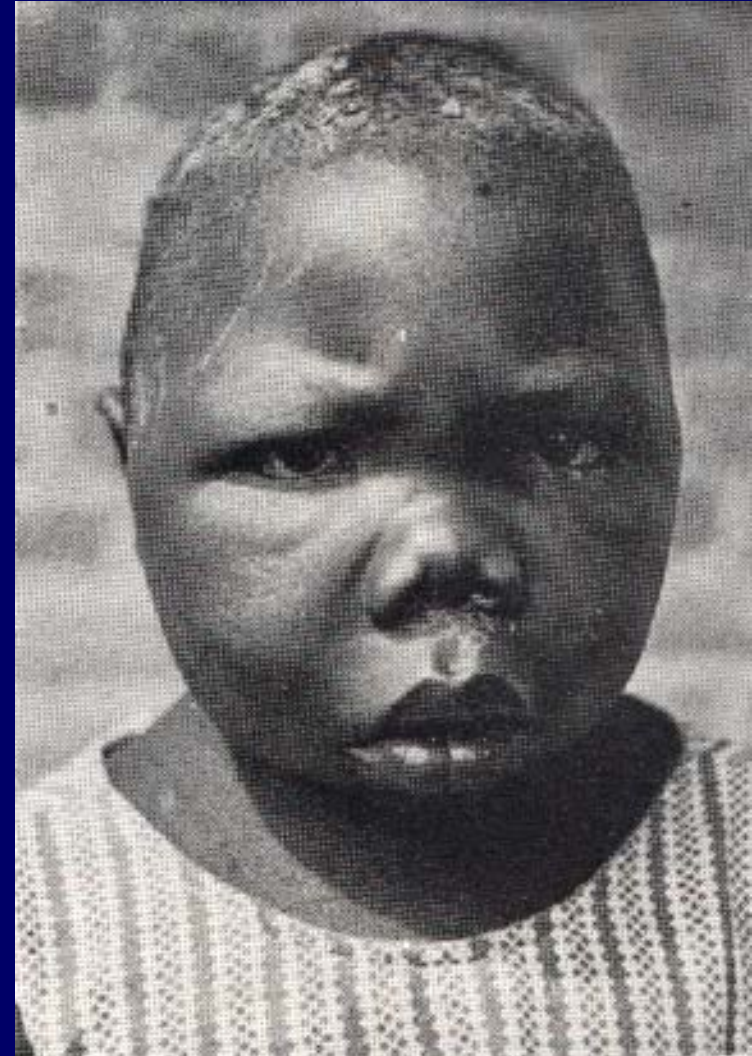
**AMBIENTE  
E  
FUNZIONE TIROIDEA:  
VECCHI PROBLEMI,  
NUOVE PREOCCUPAZIONI**

**Prof Aldo Pinchera**

**Roma 4 luglio, 2003**



**Mixedematous hypothyroidism in a subject age 17 years (F. Delange et al. Endemic cretinism in Idjwi Island, Kivu Lake, Republic of the Congo, 1972)**



# ENDOCRINE DISRUPTORS E FUNZIONE TIROIDEA

**1970:** elevata incidenza di gozzo nei salmoni dei Grandi laghi d'America (44% nel 1972, 79 % nel 1977, 100% nel 1994)

**1979:** ratti alimentati con salmoni provenienti dai grandi Laghi sviluppavano il gozzo

**1984:** i figli di madri che avevano mangiato pesce proveniente dal lago Michigan durante la gravidanza, presentavano difetti di crescita fetale e neonatale.

**1996:** gli stessi bambini di cui sopra presentavano difetti intellettivi in età scolare

# **CLASSIFICAZIONE DEI “THYROID DISRUPTORS”**

**Sostanze naturalmente presenti nell’ambiente**

**Sostanze accidentalmente introdotte  
nell’ambiente**

**Sostanze volontariamente introdotte  
nell’ambiente**

# Sostanze naturalmente presenti nell'ambiente

- **Composti organici solforati:** tiocianati, isotiocianati, goitrina, disolfidi (cassava, miglio americano, fagioli di Lima, germogli di bamboo, brassicacee, acque provenienti da particolari sottosuoli)
- **Flavonoidi e loro metaboliti:** cianidina, vitexina, floretina (Melissa officinalis, Lycopus, Lithospermum officinalis, miglio, sorgo)
- **Derivati fenolici e idrossifenolici:** resorcinolo (sostanze umiche, derivati del carbone, argille)
- **Piridine:** derivati del carbone, alcuni legumi tropicali
- **Ftalati:** argille, petrolio, alcuni funghi
- **Idrocarburi policiclici aromatici:** metilcolantrene, metilantracene, (derivati del carbone)

# Sostanze accidentalmente introdotte nell'ambiente

- **Policlorobifenili (PCB):** fluido refrigerante di trasformatori e condensatori
- **Diossine:** sottoprodotti industriali, contaminanti di pesticidi e diserbanti, derivati di combustione negli inceneritori
- **Derivati fenolici e idrossifenolici:** sottoprodotti della lavorazione del carbone
- **Ftalati:** industria della plastica
- **Idrocarburi policiclici aromatici:** scarichi industriali, rifiuti urbani
- **Metalli pesanti:** piombo, cadmio, mercurio
- **Sostanze radioattive:** (incidenti nucleari)

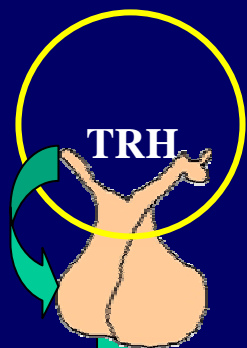
# Sostanze volontariamente introdotte nell'ambiente

- **Insetticidi:** carbamati (carbaryl, carbofuran), organocloruri (alachlor, DDT, endosulfan), organofosfati (dimetoato, malathion, metilparathion), piretroidi
- **Fungicidi:** tiocarbamati (mancozeb, maneb, zineb), tiourea (etilenetiourea), esaclorobenzene
- **Diserbanti:** amidi (ossiacetamide), triazine (atrazina), triazoli (aminotriazolo), acetochlor, pronamide
- **Fertilizzanti:** perclorato

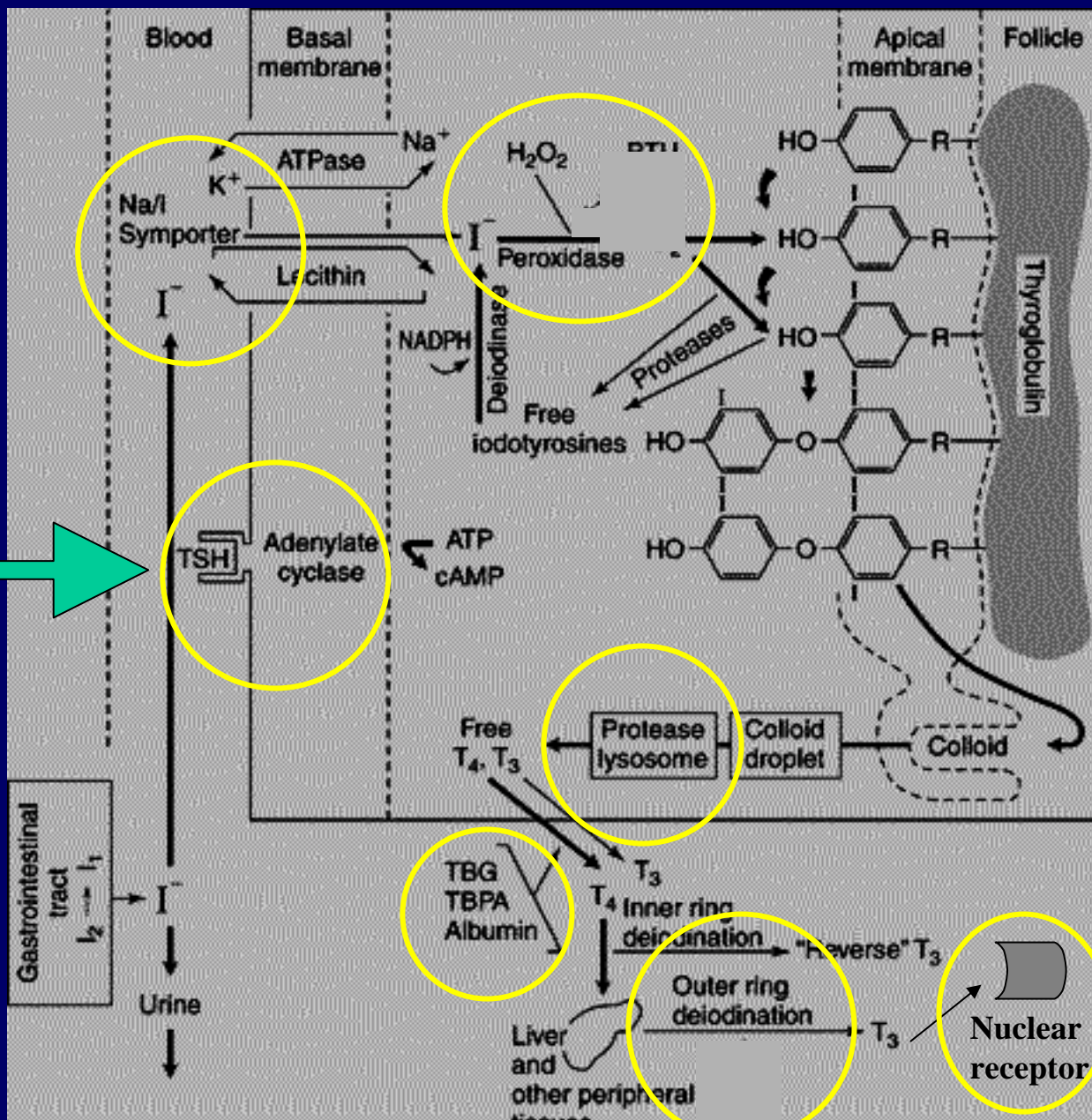
# **POSSIBILI EFFETTI DEI “THYROID DISRUPTORS” NELL’ADULTO**

- GOZZO**
- TIREOPATIE AUTOIMMUNI**
- TUMORI**

# POSSIBILI MECCANISMI D'AZIONE DEI "THYROID DISRUPTORS"



TSH





# SVILUPPO DEL SISTEMA NERVOSO, RELATIVAMENTE ALLA FUNZIONE TIROIDEA NELL'UOMO

FASE I

FASE II

FASE III



Neurogenesi cerebrale e migrazione neuronale (5-24 sett)



Differenziazione neuronale, crescita assonale, ontogenesi dendritica e sinaptogenesi, neurogenesi cerebellare, gliogenesi



Mielinogenesi (2° trimestre - 2° anno)

Porterfield e Hendrich, 1993

# STRATEGIA DI PROTEZIONE NEI CONFRONTI DEI THYROID DISRUPTORS

**STUDI EPIDEMIOLOGICI**

**OSSERVAZIONE  
OCCASIONALE**

**TEST IN VIVO IN ANIMALI**

**TEST IN VITRO PER  
L'IDENTIFICAZIONE DEL  
MECCANISMO D'AZIONE**

**ADOZIONE DI MISURE PREVENTIVE**



**EFFETTI DELL'ESPOSIZIONE  
CRONICA ALLO STIRENE  
SULLA ghiandola TIROIDEA  
E SULL'EQUILIBRIO  
ORMONALE TIROIDEO**

**Dipartimento di  
Endocrinologia e  
Metabolismo, Ortopedia e  
Traumatologia, Medicina  
del Lavoro**

**Istituto Superiore di Sanità**

**Università di Pisa**

# La resina poliesteri contiene *stirene*

- RESINE POLIESTERI INSATURE:

Nome in cui si indica la miscela di polimero lineare insaturo (un poliesteri maleico o ftalico)

con

un monomero vinilico: generalmente **stirene**,  
presente in misura variabile dal 28 al 50% circa

# Settori d'impiego più importanti per la VETRORESINA

- NAUTICA
- EDILIZIA e ARREDAMENTO
- INDUSTRIA CHIMICA,  
ALIMENTARE, AGRICOLTURA
- TRASPORTI TERRESTRI
- VACANZE E TURISMO
- AEREONAUTICA E MISSILISTICA

# Ciclo produttivo di uno scafo in vetroresina



- Creazione di uno stampo
- Impregnazione dello stampo con alcool polivinilico
- Impregnazione con **resina poliestere** della fibra di vetro
- Apposizione allo stampo di teli di fibra di vetro
- Laminazione di vari strati
- Rimozione dello scafo dallo stampo

Scafo grezzo in vetroresina

# Stirene: caratteristiche generali

- Lo **stirene**, o vinilbenzene o feniletilene, è un liquido **oleoso, volatile, incolore**
- La **via aerea** e' la principale via d'assorbimento dei vapori di monomero
- La proporzione di stirene ritenuto per via respiratoria è del **59-88%**
- Altre vie di assorbimento: cutanea (< 2%)
- Le concentrazioni piu' alte di stirene sono raggiunte nel **fegato**, nel **tessuto cerebrale**, nel **tessuto adiposo**

# Biotrasformazione

- Lo stirene viene epossidato a **7-8 STIRENE OSSIDO**, nel fegato e nei globuli rossi
- **7-8 STIRENE OSSIDO** è fortemente reattivo e forma legami stabili con varie componenti cellulari (proteine, DNA ecc.)
- I prodotti ultimi della biotrasformazione dello stirene sono **l'acido mandelico (MA) e l'acido fenilgliossilico (PGA)**, che si possono dosare nelle urine. MA+PGA:
  - < 400 mg/g creatinina inizio turno
  - <1040 mg/g/ creatinina fine turno



# Effetti dannosi dello stirene

**Tossicità acuta** SONNOLENZA, PERDITA DI EQUILIBRIO, NAUSEA, CEFALEA, MODICA EUFORIA, AUMENTO DEI TEMPI DI REAZIONE, RINOCONGIUNTIVITE, FARINGITE, SINDROME DA STIRENE: NAUSEA, VOMITO, ANORESSIA, ASTENIA

## Tossicità cronica

- effetti neuroendocrini
- effetti sul SNC e neuro-comportamentali
- effetti genotossici e cancerogeni (?)
- effetti sull'apparato respiratorio
- altri e più limitati effetti presunti a carico del fegato, rene, sistema emopoietico
- asma

# Effetti neuroendocrini in lavoratori esposti allo stirene

- PRL aumentata rispetto ai valori di riferimento e vs i controlli; valori correlati ai livelli urinari di MA e PGA <sup>1,2,3</sup>
- GH, e TSH lievemente aumentati rispetto ai controlli  
valori correlati ai livelli urinari di MA e PGA <sup>1</sup>

Deplezione di dopamina a livello tuberoinfundibulare ?

# Effetti neuroendocrini in ratti esposti allo stirene

- PRL <sup>1,2</sup> e Dopamina <sup>1</sup> normali
- Concentrazioni di catecolamine e loro metaboliti nel nucleo striato e mediobasale dell' ipotalamo normali <sup>1</sup>
- Nessun effetto sulle dimensioni e caratteristiche di utero, prostata, vescicole seminali, muscolo bulbocavernoso <sup>2</sup>
- Nessuna interferenza sul legame ormone-recettore per estrogeni, androgeni, ormoni tiroidei <sup>2</sup>

**1) Metten et al, Arc Toxicol, 2002**

**2) Ohno et al, Food Chem Toxicol, 2002**

# Effetti mutageni e cancerogeni

- AUMENTO ABERRAZIONI CROMOSOMICHE
- AUMENTO FREQUENZA SCAMBI CROMATIDI
- AUMENTO DEI MICRONUCLEI
- l'Agencia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (I.A.R.C.) dell'O.M.S. ha classificato
  - lo stirene come sostanza con limitata evidenza di cancerogenicità (2B)
  - lo stirene ossido nel gruppo 2A (Sostanze probabilmente cancerogene per l'uomo, in attesa di ulteriori studi)

# Stirene e tiroide – MATERIALI e METODI

## ➤ SOGGETTI :

- 46 esposti (Intermarine, Sarzana)
- 157 non esposti (Intermarine, Sarzana)  
(Termomeccanica, La Spezia)

## ➤ METODI:

- **Ecografia tiroidea** (sonda da 7,5 megaHz)
- **Indagini ormonali su siero** (FT4, FT3, TSH basali e dopo stimolo con TRH e.v).
- **Ricerca di AutoAb anti-tiroide** (AbTg e AbTPO)
- **Ricerca di marcatori tumorali specifici** (calcitonina)
- **Misurazione dei metaboliti urinari dello stirene nei soggetti esposti** (acido mandelico e acido fenilgliosilico)

**I RISULTATI DELLO STUDIO SONO  
IN CORSO DI ELABORAZIONE**

# INQUINAMENTO E SPERMATOGENESI

*Michele De Rosa, Umberto Carbone\**,

*Annamaria Colao.*

Dipartimento di Endocrinologia ed Oncologia Molecolare e Clinica

\* Dipartimento di Scienze Mediche Preventive

Università degli Studi di Napoli "FEDERICO II". E-mail: miderosa@unina.it

## **Introduzione**

La letteratura medica degli ultimi trent'anni mostra un crescente interesse per due problematiche attualmente all'attenzione dell'opinione pubblica: il costante incremento dell'inquinamento ambientale e la riduzione della fertilità maschile. Dagli studi condotti si evince indiscutibilmente che numerose sono le sostanze chimiche presenti nell'ambiente in grado di alterare la spermatogenesi, per questo la correlazione tra inquinamento ed infertilità sembrerebbe probabile. Ad avvalorare tale ipotesi concorrono le sempre più numerose evidenze sperimentali sull'uomo e le osservazioni in diverse specie animali selvatiche di alterazioni del sistema riproduttivo maschile [1]. Sono stati riscontrati, infatti, malformazioni del tratto urogenitale quali ipospadia e criptorchidismo, alterazioni ormonali e modificazione dei comportamenti sessuali, addirittura processi di femminilizzazione e/o demascolinizzazione e diminuzione della fertilità in animali nati e vissuti in ambienti molto inquinati da determinate sostanze xenobiotiche (quali pesticidi, alchilfenoli, ftalati) che mimano gli effetti degli steroidi [2].

Alcune alterazioni organiche e/o funzionali dell'apparato riproduttivo maschile, osservabili fin dalla nascita nel primo caso o in età adulta nel secondo in animali allo stato selvaggio, potrebbero essere dovute all'esposizione a determinati prodotti chimici avvenuta durante il periodo prenatale o neonatale. I tessuti embrionali e fetali, infatti, sembrerebbero essere particolarmente sensibili agli effetti degli inquinanti ambientali, anche senza riconoscere una vera e propria azione teratogena [1]. Queste alterazioni sembrerebbero essere il risultato dell'azione xenoestrogenica di sostanze presenti nell'ambiente, in grado, quindi, di modificare ed alterare l'equilibrio ormonale in soggetti di entrambi i sessi, ma, come facilmente intuibile, soprattutto nei maschi [3].

### **Azione dei metalli pesanti sulla fertilità**

I metalli pesanti sono stati ampiamente studiati per quel che riguarda il loro rapporto con la spermatogenesi, anche se non sempre è stato possibile dimostrare in modo inequivocabile una relazione diretta tra l'esposizione e la riduzione della fertilità nei soggetti ad essi esposti, quali il bromo che probabilmente induce una moderata riduzione di numero, vitalità e motilità degli spermatozoi [4], il cadmio che induce una diminuzione delle gravidanze [5, 6], il cromo [7] e il manganese che causano calo delle nascite nei soggetti esposti [6, 8] e il mercurio che determina un decremento dei livelli di SHBG [8, 9].

Per quanto riguarda il rapporto tra inquinazioni ambientali e spermatogenesi, un inquinante di cui si sono studiati molto gli effetti sia sugli animali che sugli uomini è il piombo. La sua azione sembra abbastanza, anche se non ancora del tutto, conosciuta. In uno studio, condotto presso il nostro Dipartimento, abbiamo dimostrato l'esistenza di una correlazione lineare inversa tra la concentrazione plasmatica di questo elemento e la maggior parte dei parametri seminologici funzionali [10]. Gli effetti patologici del piombo sulla spermatogenesi possono essere assunti come paradigma dell'azione tossica dell'inquinamento ambientale sulla fertilità maschile. Poiché numerosi lavoratori vi sono esposti professionalmente, è fondamentale conoscere le conseguenze della sua azione, non solo sulla fertilità. Soprattutto se consideriamo la sua origine dal traffico veicolare, ne deriva che l'intera popolazione dei grandi centri urbani vi entra in contatto, seppur non professionalmente, in maniera massiccia e continuata. È stata ipotizzata un'azione del piombo a livello ipotalamo ipofisario. In particolare, ratti adulti esposti a piombo mostrano un alterato rilascio di LH, mentre lavoratori moderatamente esposti mostrano una diminuzione dell'FSH ed un aumento della secrezione di prolattina [11]. Inoltre, è stato riportato che nel testicolo del macaco il trattamento cronico con piombo nell'animale adulto comporta un'alterazione della cromatina spermatica [12]. Lo stesso trattamento nello stesso animale dalla nascita fino all'età di 10 anni causa danni ultrastrutturali alle cellule di Sertoli e a quelle spermatogenetiche [13]. Aumentati livelli ematici di piombo sono associati con diminuzione del numero di spermatozoi, del volume dell'eiaculato, della percentuale di forme mobili, di nemaspermi dotati di moto rettilineo veloce e con incremento della percentuale di spermatozoi con morfologia alterata od anomala [14]. È stato, inoltre, dimostrato che la conta totale spermatica e la motilità diminuiscono con l'aumentare della concentrazione della piombemia [15] e che i livelli di piombemia sono inversamente



correlati con la percentuale di nemaspermi vivi [16]. È, infatti, noto che una piombemia superiore a 40 $\mu$ g/dL induce un aumento nel rischio di riscontrare una concentrazione nemaspermica ridotta in uomini che lavorano in fonderie di piombo paragonati ad altri con concentrazioni di piombo ematico inferiori a 15 $\mu$ g/dL [17]. Tuttavia, anche moderate esposizioni al piombo possono ridurre in maniera significativa la qualità del seme senza evidenze cliniche conclusive di riduzione della funzione riproduttiva ed endocrina maschile [18]. Dal punto di vista strettamente fisiopatologico, è stato dimostrato che i canali del potassio sono sensibili all'avvelenamento da piombo, offrendo una via di passaggio ai metalli tossici nello spermatozoo maturo [19]. Inoltre, il piombo può competere o rimpiazzare lo zinco nella protamina P2 (HP2) in due diversi siti determinando un cambiamento conformazionale della proteina. Questa interazione determina chiaramente un'alterazione della condensazione della cromatina spermatica [20]. A conferma di tale meccanismo, è stato dimostrato nei ratti che la somministrazione di zinco migliora il danno testicolare indotto dal piombo sia a livello cellulare che subcellulare [21].

### **Il liquido seminale come bersaglio dell'azione degli inquinanti.**

Numerosi studi hanno dimostrato come sistemi biochimici e biofunzionali presentano alterazioni a seguito d'esposizioni di breve durata ed a concentrazioni inefficaci a determinare patologie clinicamente evidenti. L'impiego dell'esame del liquido seminale come indicatore di esposizione e, soprattutto, di effetto è giustificato proprio dal fatto che le gonadi, ed in particolar modo la funzione spermatogenetica, per le caratteristiche anatomiche e fisiologiche (continua replicazione, differenziazione e maturazione delle cellule gametiche), costituiscono una sede elettiva e precoce per l'insorgenza di alterazioni strutturali e funzionali alla presenza di tossici di svariata natura, anche quando l'esposizione ad essi corrisponda a dosi molto contenute (le cosiddette microdosi).

L'uso dei parametri seminologici quali indici dell'effetto tossico degli inquinanti ambientali, considerando la riduzione della fertilità maschile come tale, presenta diversi limiti ma anche alcuni vantaggi. Un primo limite è costituito dalla difficoltà d'interpretazione dell'eiaculato, infatti, ogni carattere non è singolarmente valutabile in modo appropriato, ma tutti devono essere considerati come un *unicum* di informazioni integrate, meglio comprensibili, inoltre, alla luce dei dati clinici ed ormonali. La notevole variabilità inter- ed intraindividuale della conta spermatica tra soggetti diversi in condizioni ordinarie ed anche nello stesso soggetto,

in relazione a svariati fattori quali le abitudini sessuali, le variazioni stagionali e le abitudini di vita, rappresenta un'ulteriore difficoltà. Inoltre, come già accennato, sebbene esistano numerose segnalazioni sul progressivo peggioramento dei parametri seminali tenendo conto delle osservazioni effettuate nei precedenti decenni, i dati risultano spesso mal confrontabili per due motivi: gli individui studiati, generalmente, giunti all'osservazione per problemi di natura andrologica o endocrinologica, e le variazioni legate alle metodiche d'analisi. Altri limiti interpretativi derivano dal fatto che varie condizioni di vita estrinseche ed indipendenti dal singolo individuo sono potenzialmente in grado di determinare alterazioni quantitative e qualitative del liquido seminale [22]. Di sicuro impatto, inoltre, è il fattore biologico in termini d'infezioni, sovente subcliniche e misconosciute, soprattutto quando ad essere interessate sono le vie spermatiche, ed altrettanto importanti i fattori ambientali fisici, quali radiazioni ionizzanti e calore [23, 24]. Per i motivi esposti, hanno maggiore rilevanza scientifica quei progetti di ricerca che studiano popolazioni omogenee, rispetto all'esposizione a fattori di rischio ambientale, in modo da cercar di annullare (eguagliandole) tutte le possibili fonti di danno spermatogenico concomitanti ma estranee al soggetto dello studio. Chiaramente, è fondamentale, per far ciò, seguire anche, negli stessi individui, l'andamento nel tempo delle alterazioni eventualmente riscontrate. I principali vantaggi dell'uso dell'esame del liquido seminale consistono nel fatto che, come indicatore di esposizione, l'epitelio seminifero costituisce un bersaglio interessato precocemente da basse o bassissime concentrazioni di inquinanti, per cui esso presenta delle alterazioni silenti e macroscopicamente rilevabili solo da Centri ad Alta Specializzazione. Queste alterazioni, come indicatore d'effetto, sono precoci rispetto al resto dell'organismo e già di per se stesse molto significative per le conseguenze in termini di fertilità non solo per il singolo individuo ma per l'intera comunità.

I meccanismi fisiopatologici attraverso i quali è interessato l'apparato riproduttivo maschile ed in particolar modo il compartimento spermatogenetico sono poco conosciuti. È logico immaginare che ogni particolare sostanza inquinante possa produrre danno seguendo un meccanismo diverso dalle altre, ne consegue la possibilità che esistano numerosi meccanismi d'azione tossica. È probabile che una sostanza possa produrre un unico tipo di alterazione a carico delle gonadi oppure più danni diversi tra loro a carico anche di altri organi dando origine conseguentemente ad uno o più quadri patologici ai quali, però, corrisponderebbe un unico meccanismo fisiopatologico, così come molteplici sostanze potrebbero indurre un tipo di alterazione patologica simile attraverso meccanismi d'azione

distinti o alterazioni dissimili attraverso lo stesso meccanismo d'azione che si estrinseca però in sedi anatomiche diverse; è altresì chiaro che il quadro clinico del soggetto in esame nulla o poco rivela di ciò che lo ha prodotto e del modo in cui si sia prodotto. È facile intuire come un campo di grande interesse quale l'inquinamento ambientale sia estremamente vasto e difficile da affrontare in termini di effetti sulla salute pubblica ed in particolare sulla fertilità.

### **Esperienza clinica personale (10)**

Abbiamo studiato 85 soggetti esattori ai caselli di un'autostrada confrontandoli con 85 soggetti non esposti impiegati in attività altrettanto sedentaria. Il protocollo di studio è riportato in figura (v. tab 1).

Considerando il nostro studio, si può evidenziare che all'aumento della piombemia corrisponde una riduzione del numero e della vitalità degli spermatozoi, alterazione grave e difficilmente reversibile (figg. 1 e 2). All'aumento della metaemoglobinemia corrisponde, invece, la riduzione di quasi tutti i parametri qualitativi del seme, quali soprattutto la motilità, nelle sue diverse sfaccettature, e la vitalità degli spermatozoi. Le relazioni dei parametri seminologici con i rimanenti indicatori plasmatici e con le concentrazioni ambientali di inquinanti hanno evidenziato, pur senza raggiungere la significatività statistica, un medesimo andamento generale, in particolare all'aumentare degli ossidi di azoto corrisponde la riduzione di tutti i parametri di funzionalità spermatica.

Si può concludere che nei soggetti esposti ad ossidi di azoto si evidenzia un andamento in diminuzione dei parametri seminali; l'entità della riduzione aumenta in rapporto con la durata dell'esposizione e con l'incremento della concentrazione, cui i lavoratori sono esposti. Inoltre, utilizzando valutazioni comparative tra i parametri del liquido seminale, indicatori di assorbimento e di effetto e concentrazioni ambientali è possibile individuare, in un gruppo di sostanze potenzialmente tossiche, quali abbiano più probabilmente un'azione inibitrice sulla funzione spermigenetica. Infine, combinando opportunamente indagini ambientali e tossicologiche, il riscontro di una diminuzione della funzione spermigenetica può costituire un indicatore precoce d'effetto tossico.

I lavoratori andrebbero seguiti nel tempo per valutare sia l'entità dell'accumulo nell'organismo delle sostanze tossiche sia la capacità fecondante. Solo attraverso un

controllo nel tempo sarà possibile valutare con precisione quale sia l'effetto di ogni singolo elemento sul sistema endocrino e/o sul sistema riproduttivo, a quali dosi e dopo quanti anni di esposizione tale sostanza cominci ad indurre tale effetto, quali alterazioni biochimiche e fisiopatologiche determinino un'evidenza clinicamente manifesta e se questa, un volta instauratosi, sia reversibile cessando l'esposizione.

Un'analisi critica della letteratura medico-scientifica suggerisce che analoghi studi clinici ed epidemiologici sulla fertilità maschile dovrebbero essere estesi ad altre categorie lavorative [25]. Da parte delle autorità e degli enti preposti alla tutela della salute pubblica, inoltre, maggiore attenzione dovrebbe essere rivolta al significato biologico di tali studi, talora utilizzando la sensibilità dei parametri di funzionalità riproduttiva per individuare possibili sostanze cronicamente tossiche per l'uomo, individuare nuove categorie "professionalmente a rischio", meglio definire le dosi massime tollerabili ed, infine, programmare, di conseguenza, un'adeguata politica economica ed ambientale di prevenzione.

## **Bibliografia**

1. Colborn T., Vom Saal F.S., Soto A.M. (1993) **Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans.** *Environmental Health Perspectives*, 101: 378-384.
2. Tyler C.R., Jobling S., Sumpter J.P. (1998) **Endocrine disruption in wildlife: a critical review of the evidence.** *Critical Review of Toxicology*, 28: 319-361.
3. Daston G.P., Gooch J.W., Breslin W.J., Shuey D.L., Nikiforov A.I., Fico T.A., Gorsuch J.W. (1997) **Environmental estrogens and reproductive health: a discussion of the human and environmental data.** *Reproductive Toxicology*, 11: 465-481
4. Potashnik G., Carel R., Belmaker I., Levine M. (1992) **Spermatogenesis and reproductive performance following human accidental exposure to bromine vapor.** *Reproductive Toxicology*, 6: 171-174.
5. Mason H.J. (1990) **Occupational cadmium exposure and testicular endocrine function.** *Human and Experimental Toxicology*, 9: 91-94.
6. Gennart J.P., Buchet J.P., Roels H., Ghyselen P., Ceulemans E., Lauwerys R. (1992) **Fertility of male workers exposed to cadmium, lead or manganese.** *American Journal of Epidemiology*, 135: 1208-1219.
7. Bonde J.P., Ernst E. (1992) **Sex hormones and semen quality in welders exposed to hexavalent chromium.** *Human and Experimental Toxicology*, 11: 259-263.
8. Lauwerys R., Roels H., Genet P., Toussaint G., Bouckaert A., De Cooman S. (1985) **Fertility of male workers exposed to mercury vapor or to manganese dust: a questionnaire study.** *American Journal of Industrial Medicine*, 7: 171-176.
9. McGregor A.J., Mason H.J. (1991) **Occupational mercury vapour exposure and testicular, pituitary and thyroid endocrine function.** *Human and Experimental Toxicology*, 10: 199-203.

10. De Rosa M., Zarrilli S., Paesano L., Carbone U., Boggia B., Petretta M., Maisto A., Cimmino F., Puca G., Colao A., Lombardi G. (2003) **Traffic pollutants affect fertility in men.** *Human Reproduction* 18: 5, 1055-1061.
11. Baccarelli A., Pesatori A.C., Bertazzi P.A. (2000) **Occupational and environmental agents as endocrine disruptors: Experimental and human evidence.** Review Article. *Journal of Endocrinological Investigation*, 23: 771-781.
12. Foster W.G., Mc Mahon A., Rice D.C. (1996). **Sperm chromatin structure is altered in cynomolgus monkey with environmentally relevant blood lead levels.** *Toxicological Industrial Health*, 12: 723-735.
13. Foster W.G., Singh A., Mc Mahon A., Rice D.C. (1998) **Chronic lead exposure effects in the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) testis.** *Ultrastructural Pathology*, 22: 63-71.
14. Moorman W.J., Skaggs S.R., Clark J.C., Turner T.W., Sharpnack D.D., Murrell J.A., Simon S.D., Chapin R.E., Schrader S.M. (1998) **Male Reproductive effects of lead, including species extrapolation for the rabbit model.** *Reproductive Toxicology*, 12: 333-346.
15. Alexander B.H., Checkoway H., Faustman E.M., van Netten C., Muller C.H., Ewers T.G. (1998) **Contrasting associations of blood and semen lead concentrations with semen quality among lead smelters workers.** *American Journal of Industrial Medicine*, 34: 464-469.
16. Dawson E.B., Ritter S., Harris W.A., Evans D.R., Powell L.C. (1998) **Comparison of sperm viability with seminal plasma metal levels.** *Biol Trace Elem Res*, 64: 215-219.
17. Alexander B.H., Checkoway H., van Netten C., Muller C. H., Ewers T.G., Kaufman J.D., Faustman E.M. (1996) **Semen quality of men employed at a lead smelter.** *Occupational and Environmental Medicine*, 53: 411-416.
18. Telisman S., Cvitkovic P., Jurasovic J., Pizent A., Gavella M., Rocic B. (2000) **Semen quality and reproductive endocrine function in relation to biomarkers of lead, cadmium, zinc and copper in men.** *Environmental Health Perspectives*, 108: 45-53.
19. Benoff S., Jacob A., Hurley I.R. (2000) **Male infertility and environmental exposure to lead and cadmium.** *Human Reproduction Update*, 6: 107-121.
20. Quintanilla-Vega B., Hoover D.J., Bal W., Silbergeld E.K., Waalkes M.P., Anderson L.D. (2000) **Lead interaction with human protamine (HP2) as mechanism of male reproductive toxicity.** *Chemical Research Toxicology*, 13: 594-600.
21. Batra N., Nehru B., Bansal M.P. (1998) **The effect of zinc supplementation on the effects of lead on the rat testis.** *Reproductive Toxicology*, 12: 535-540.
22. Skakkebaek N.E. Giwercman A., De Kretser D. (1994) **Pathogenesis and management of male infertility.** *Lancet*, 343: 147-149.
23. Steeno O.P., Pangkahila A. (1984) **Occupational influences on male fertility and sexuality. Part I: Physical factors and chemical agents.** *Andrologia*, 16: 5-22.
24. Figà Talamanca I., Cini C., Varricchio G.C., Dondero F., Gandini L., Lenzi A., Lombardo F., Angelucci I., Di Grazia R., Petaccioli F.R. (1996) **Effects of prolonged automobile driving on male reproductive function: a study among taxi drivers.** *American Journal of Industrial Medicine*, 30: 750-758.
25. Figà Talamanca I. (1998) **Limiti di esposizione per la prevenzione di danni alla riproduzione: una proposta operativa.** *Giornale Italiano di Medicina del Lavoro ed Ergonomia*, 20: 15-19.

**Tabella 1: Effetto degli inquinanti ambientali su parametri clinici ed endocrini.**

	<b>controlli</b>	<b>Gruppo di studio</b>	<b>p</b>
<b>N.</b>	<b>85</b>	<b>85</b>	<b>/</b>
<b>Età</b>	<b>39.6±0.7</b>	<b>38.6±0.8</b>	<b>NS</b>
<b>sposati %</b>	<b>74.1</b>	<b>83.5</b>	<b>NS</b>
<b>figli n°</b>	<b>2.0±0.1</b>	<b>1.8±0.1</b>	<b>NS</b>
<b>TTP (mesi)</b>	<b>8.1±0.4</b>	<b>15±1.6</b>	<b>&lt; 0.0001</b>
<b>FSH (U I/L)</b>	<b>3.2±0.2</b>	<b>4.1±0.3</b>	<b>&lt; 0.05</b>
<b>LH (UI/L)</b>	<b>2.8±0.1</b>	<b>2.8±0.2</b>	<b>NS</b>
<b>T (µg/L)</b>	<b>4.7±0.2</b>	<b>4.8±0.2</b>	<b>NS</b>

**SPERM COUNT (n x 10<sup>6</sup> /mL)**

100  
75  
50  
25  
0

5

20

35

**BPb (μg/100 mL)**

***r = - 0.271***

***p = 0.016***

