Programma

GIOVEDI' 27 OTTOBRE

h. 10.00 ***Registrazione dei partecipanti***

h. 11.00 ***Apertura dei Lavori***

PROF. DAMIANO GUSTAVO MITA
Presidente INBB
PROF. ANTONIO MOCCALDI
Presidente ISPESL

h. 11.45 ***Saluto delle Autorità***

PROF. FABIO PISTELLA
Presidente CNR

h. 12.00 ***Lettura Magistrale***
PROF. ALBERTO MANTOVANI – ISS Roma
"*Attualità e prospettive per lo studio dei possibili rischi per la salute"*

h. 13.00 ***Pausa Pranzo***

EFFETTI SULLA SALUTE

Coordina DOTT. GIUSEPPE SPAGNOLI
Direttore DML ISPESL

h. 15.00 DOTT. BRUNO PAPALEO – ISPESL Roma
"*L'esposizione professionale ad interferenti endocrini*"
h. 15.30 PROF. LUIGI MANZO – Università degli Studi e IRCCS Fondazione Maugeri di Pavia
"*Interferenti endocrini come fattori modificanti la suscettibilità a xenobiotici*"
h. 16.00 DOTT. MARCELLO SPANÒ – ENEA-
"*Rischio ambientale da interferenti endocrini e salute riproduttiva maschile"*
h. 16.30 PROF. GIAN MARIO TIBONI – Università di Chieti-Pescara
"*Interferenti endocrini e salute riproduttiva femminile"*

h 17.00 ***Coffee Break***

Coordina DOTT. FERRUCCIO SANTINI
Centro AmbiSEN- Univ. Pisa

h. 17.30 DOTT.SSA GEMMA CALAMANDREI – ISS Roma
"*Interferenti endocrini e sviluppo neurocomportamentale"*
h. 18.00 PROF.SSA PAOLA PALANZA – Università di Parma
"*Impatto degli estrogeni ambientali sulla differenziazione sessuale del comportamento"*
h. 18.30 DOTT.SSA ANTONELLA OLIVIERI – ISS Roma
"*Interferenti endocrini ed effetti sulla funzione tiroidea"*

VENERDI' 28 OTTOBRE

BIOSENSORI E BIORISANAMENTO

Coordina PROF.SSA DANILA MOSCONE
Univ. "Tor Vergata" Roma

h. 9.00 PROF. ALDO RODA – Università di Bologna
"*Nuovi biosensori cellulari bioluminescenti geneticamente ingegnerizzati per il monitoraggio di composti con attivita estrogenica ed androgenica*"

h. 9.30 PROF. MARCO MASCINI – UdR INBB Università di Firenze
"*Biosensori a DNA per tossicità ambientale"*

h. 10.00 PROF. DAMIANO G. MITA – UdR INBB II Università di Napoli
"*Biorisanamento di acque inquinate da interferenti endocrini"*

h. 10.30 PROF.SSA PAOLA GRAMATICA – Università dell'Insubria
"*L'approccio modellistico QSAR (Quantitative Structure Activity Relationships) agli interferenti endocrini"*

h 11.00 ***Coffee Break***

MODELLI DI MECCANISMI MOLECOLARI

Coordina PROF.SSA SILVIA FASANO
II Univ. Napoli

h. 11.30 PROF.SSA MARIA LUISA BRANDI – Università di Firenze
"*Genetica e Farmacogenetica"*

h. 12.00 PROF.SSA ADRIANA MAGGI – Università di Milano
"*Nuovi modelli per lo studio dei meccanismi d'azione degli interferenti endocrini"*

h. 12.30 PROF.SSA ALBERTA POLZONETTI MAGNI – Università di Camerino
"*Approcci biomolecolari per la caratterizzazione degli effetti di estrogeni ambientali in modelli sperimentali"*

h. 13.00 PROF. VITTORIO TOMASI – UdR INBB Università di Bologna
"*I distruttori endocrini come agonisti o antagonisti al recettore degli estrogeni α (ERα) a livello caveolare e loro ruolo nella risposta angiogenica"*

h. 13.30 ***Pausa Pranzo***

SVILUPPO ED UTILIZZO DI BIOMARCATORI

Coordina PROF. STEFANO PARMIGIANI
Univ. Parma

h. 15.00 DOTT. ANTONIO MENDITTO – ISS Roma
"*Strategie per lo sviluppo e caratterizzazione di biomarkers per interferenti endocrini*"

h.15.30 PROF. CLAUDIO MINOIA – Fondazione Maugeri Pavia
"*Biomarcatori di esposizione a interferenti endocrini"*

h. 16.00 PROF.SSA OLIANA CARNEVALI – Università Politecnica delle Marche
"Distruttori endocrini:nuovi bioindicatori per valutare il rischio ambientale"

h 16.30 **TAVOLA ROTONDA**
"Prospettive di attività di ricerca integrate"

Introduce e coordina:
PROF. DAMIANO GUSTAVO MITA - Presidente I.N.B.B.

Interventi programmati:
PROF.SSA LAURA CANESI - Università degli Studi di Genova

PROF. ALBERTO MANTOVANI - ISS Roma

PROF.SSA MARIA MARINO - Università di Roma Tre

DOTT.SSA ANTONELLA OLIVIERI - ISS Roma

PROF. MARIO PALERMO - UdR INBB di Sassari

DOTT. BRUNO PAPALEO - ISPESL Roma

PROF. ANTONIO TONINELLO - Università degli Studi di Padova

h. 18.30 ***Chiusura dei lavori***

Si ringrazia per la collaborazione la FISBi (Federazione Italiana Società Biologiche) e la Società Italiana di Tossicologia della Riproduzione (SITOR)

INDICE

	PAG.
INTRODUZIONE AL CONVEGNO	**7**
LETTURA MAGISTRALE	**9**
EFFETTI SULLA SALUTE	**11**
BIOSENSORI E BIORISANAMENTO	**27**
MODELLI DI MECCANISMI MOLECOLARI	**33**
SVILUPPO ED UTILIZZO DI BIOMARCATORI	**43**
CONTRIBUTI DELLA TAVOLA ROTONDA	**49**

INTRODUZIONE AL CONVEGNO

Quest'anno il workshop tematico che l'I.N.B.B. promuove tradizionalmente ogni due anni si è trasformato in un Convegno Nazionale. Ciò è stato possibile grazie all'ISPESL che ha accettato di organizzare l'iniziativa insieme a noi (anche per la collaborazione sviluppatasi con loro ricercatori in un progetto di ricerca su questo tema) e all'ISS, che ha concesso il patrocinio al convegno e i cui ricercatori hanno mostrato, fin dall'inizio, vivo interesse a collaborarvi.

Per quanto riguarda l'INBB, il tema degli Interferenti Endocrini è stato scelto in base all'attualità della tematica scientifica ed all'interesse che essa poteva suscitare in molti aderenti, anche per la evidente interdisciplinarietà.

Benché i danni prodotti dagli interferenti endocrini siano abbastanza rilevanti, la maggior parte della nostra comunità scientifica e coloro che hanno responsabilità politico-istituzionali non sono ancora adeguatamente sensibilizzati in merito alla pericolosità di questi "killer invisibili".

Qualcosa ha cominciato a muoversi in Italia, anche grazie all'ISPESL ed all'ISS e a ricercatori di vari atenei; molto di più si è fatto da alcuni anni a livello europeo, ma la nostra comunità scientifica è risultata abbastanza impreparata ed è rimasta sostanzialmente estranea dai finanziamenti previsti, non avendo ancora raggiunto una maturità in questo settore di ricerca.

Scopo del Convegno è quello di stimolare un interesse più largo su queste tematiche, partendo dalla diffusione delle attività scientifiche svolte ed in corso, e di favorire la costituzione e la collaborazione di gruppi di ricerca, multidisciplinari ed interdisciplinari, anche in grado di competere a livello internazionale.

Se con questa iniziativa riusciremo in qualche modo a trasmettere l'importanza di questa linea di ricerca all'entourage scientifico di cui siamo parte e, parallelamente, ai responsabili delle politiche della ricerca pubblica e ai decisori delle priorità programmatiche, il Convegno che ci accingiamo a celebrare avrà raggiunto il suo principale obiettivo.

L'attenzione che siamo riusciti ad avere a livello regionale con il patrocinio da parte del Presidente del Consiglio Regionale del Lazio, On. Pineschi, è già un buon auspicio in questa direzione, nel tentativo di aumentare la sensibilità verso una reale problematica di carattere biosanitario ed ambientale.

Ancora un grazie a quanti, ricercatori ed Istituzioni, hanno contribuito all'organizzazione di questo convegno.

Prof. Damiano Gustavo Mita

Presidente I.N.B.B.

LETTURA MAGISTRALE

ATTUALITÀ E PROSPETTIVE PER LO STUDIO DEI POSSIBILI RISCHI PER LA SALUTE

Alberto Mantovani
Dipartimento di Sanità Alimentare ed animale – Istituto Superiore di Sanità, Roma
alberto@iss.it, sito web "Interferenti Endocrini": http://progetti.iss.it/inte/

Gli Interferenti Endocrini (IE) sono un eterogeneo gruppo di sostanze (contaminanti persistenti, composti utilizzati nella filiera agrozootecnica, composti industriali, ed anche sostanze naturali, i c.d. "fitoestrogeni") caratterizzate dal potenziale di interferire con il funzionamento del sistema endocrino attraverso svariati meccanismi (recettoriali, metabolici, ecc.). L'omeostasi degli steroidi sessuali e della tiroide sono i principali bersagli degli effetti degli IE; è inoltre riconosciuto che il bersaglio biologico più sensibile è la salute riproduttiva, considerata come un continuum che dalla produzione di gameti sani e la fertilizzazione attraversa lo sviluppo intrauterino e postnatale della generazione successiva.
Gli IE sono considerati da un decennio fra gli argomenti prioritari in Europa sia nell'ambito della ricerca (con iniziative quali il cluster di progetti CREDO http://www.credocluster.info/, ed il network di eccellenza CASCADE http://www.cascadenet.org/) sia nell'ambito della valutazione e gestione del rischio, in particolare nella nuova Strategia Europea per l'Ambiente e la Salute (Calamandrei & Mantovani, *Notiziario I.S.S.*, 2004, 17[11]:3-7).
I motivi sono diversi:
- la insufficienza degli approcci tossicologici disponibili per una caratterizzazione adeguata dei rischi. In particolare per gli effetti a lungo termine di esposizioni precoci riguardo ai sistemi, riproduttivo, nervoso, immunitario e alla suscettibilità ad alcuni di tipi cancro (es., seminoma)
- la possibile esposizione combinata a diverse classi di IE attraverso l'ambiente e gli alimenti, data l'eterogeneità di utilizzi e di destini ambientali, che non consente di escludere il rischio di effetti additivi o sinergici;
- la potenziale correlazione, suggerita da studi epidemiologici, fra esposizione ambientale e/o lavorativa a IE e patologie umane, riguardanti in primo luogo la sfera riproduttiva (infertilità, ipospadia/criptorchidismo, endometriosi) e l'età evolutiva (disturbi dello sviluppo neurocomportamentale e della pubertà)
- la correlazione fra la vulnerabilità a specifici di IE e lo status endocrino dell'organismo esposto, quindi, in primo luogo, con il sesso e la fase del ciclo vitale, ma anche con fattori legati alla dieta ed agli stili di vita.

La complessità ed il rilievo dei problemi legati all'analisi del rischio degli IE offrono, pertanto, importanti indicazioni allo sviluppo di programmi di ricerca, quali:

- lo sviluppo di strategie integrate di saggi tossicologici *in vitro/in vivo* per un'adeguata identificazione degli xenobiotici con potenziali effetti endocrini
- la caratterizzazione dei meccanismi di azione e dei potenziali effetti di IE sui diversi sistemi dell'organismo che interagiscono con il sistema endocrino, con particolare attenzione nei confronti: a) di modelli per lo studio di tali effetti in fasi "critiche" del ciclo vitale (lo sviluppo intrauterino e l'infanzia, ma anche l'adolescenza e la menopausa); b) degli eventuali meccanismi di interazione fra IE, considerando le situazioni realisticamente attese per la popolazione generale di esposizione multipla a basse dosi nella dieta e/o nell'ambiente

- l'elaborazione di strategie per la valutazione integrata dell'esposizione a IE attraverso l'alimentazione, l'ambiente di lavoro e l'ambiente di vita, anche attraverso la ottimizzazione dei molteplici indicatori disponibili, dalle popolazioni animali sentinella all'uso di biosensori
- la programmazione di studi di popolazione per lo studio dei livelli di esposizione e di possibili effetti sulla salute ad essi associati, sviluppando ed utilizzando adeguati biomarcatori di esposizione, effetto e suscettibilità
- *last but not least*, la valutazione del ruolo dell'esposizione a IE nel contesto degli altri fattori, quali componenti presenti nell'alimentazione (oligoelementi, vitamine, antiossidanti, sostanze bioattive..) e stili di vita, in grado di interagire con la funzionalità del sistema endocrino, anche con potenziali effetti protettivi nei confronti di sostanze esogene.

“EFFETTI SULLA SALUTE”

L'ESPOSIZIONE PROFESSIONALE AD INTERFERENTI ENDOCRINI

B. Papaleo, L. Caporossi, M. De Rosa, S. Signorini, G. Bencivenga, C. Colagiacomo, A. Pera.
ISPESL- Dipartimento di Medicina del Lavoro
Via Fontana Candida 1- Monteporzio Catone (RM)

L'interesse del mondo scientifico per gli inquinanti ambientali in grado di interferire con il sistema endocrino, è cresciuto a partire dagli anni '90 fino a diventare oggi una delle principali aree di ricerca a livello internazionale, nonché una priorità per gli organismi predisposti al controllo della salute e della sicurezza pubblica. Con il termine interferenti Endocrini (Endocrine disruptors chemicals nella terminologia anglosassone) viene indicato un gruppo di sostanze chimiche, naturali e di sintesi che, nonostante la notevole differenza strutturale a livello molecolare, interferiscono attraverso meccanismi altrettanto diversi, con il sistema endocrino producendo effetti comuni.
Gli studi epidemiologici in lavoratori esposti a interferenti endocrini attualmente sono scarsi. Ciò è dovuto, principalmente, alla difficoltà nella predisposizione di un accurato disegno epidemiologico, condizionato dalla contemporanea presenza ambientale di questi composti e dalla loro larga diffusione negli ambienti di vita.
Storicamente le prime ricerche hanno coinvolto i lavoratori delle industrie farmaceutiche produttrici di pillole anticoncezionali (in cui l'evidenza degli effetti estrogenici facilitava l'identificazione della fonte di rischio) e gli esposti a DDT, che già dal 1949 mostravano oligospermia [1].
Nei lavori più recenti, presenti in letteratura, particolare attenzione è stata posta allo studio della fertilità maschile: la valutazione degli effetti negativi per i lavoratori in serra in contatto con pesticidi, ha mostrato un ritardo significativo nel concepimento per le mogli degli operatori [2]; in particolare, dai dati raccolti da circa 2000 coppie di agricoltori che utilizzavano abitualmente fenossi erbicidi, si è rilevato un rischio di aborti spontanei significativamente superiore rispetto alla popolazione generale [3].
Un monitoraggio di lavoratori esposti a solventi e metalli, agricoltori in serra e lavoratori agricoli addetti all'uso degli antiparassitari, ha mostrato un ritardo significativo nel tempo atteso per il concepimento per i primi, molto meno accentuato per i lavoratori agricoli non in serra e una alterazione morfologica del liquido seminale [4]. A seguito dell'esposizione a solventi e fumi di metalli in una popolazione maschile non si sono riscontrati nelle partner evidenti incrementi di aborti spontanei [5].
L'Asclepios project (progetto multicentrico) ha sviluppato un protocollo di ricerca epidemiologica, per l'individuazione dei fattori di rischio lavorativi con effetti negativi sul sistema riproduttivo maschile, prendendo in considerazione fungicidi, stirene e piombo inorganico come fonti di rischio e ha investigato la possibile correlazione tra i dati raccolti dai questionari e la qualità del liquido seminale. I primi risultati di questo progetto hanno indicato come una esposizione a stirene porti ad una riduzione statisticamente significativa nel numero degli spermatozoi rispetto ai controlli, sottolineando la vulnerabilità della spermatogenesi a questo genere di esposizione, anche se i tentativi di correlazione dei dati ottenuti con i dosaggi di stirene non hanno portato ad alcun esito [6]; l'identificazione di una ridotta fertilità dei soggetti esposti a stirene nell'industria della plastica, definita valutando il tempo di attesa per il concepimento, non ha fornito dati statisticamente significativi [7]; non si sono ottenuti risultati significativi per esposizione a pesticidi e fungicidi. Si è osservato che questo genere di esposizione non comporta l'aneuploidia degli spermatozoi, al contrario dell'abitudine al fumo che risulta un forte fattore di confondimento [8]; non ci sono differenze sostanziali nelle misurazioni della qualità del liquido seminale [9], né sono state rilevate correlazioni tra l'esposizione e riduzione della fertilità (tempo di attesa per il concepimento) [10]. Ugualmente per esposizione a piombo non si sono trovate associazioni significative tra esposti e potenziale ridotta fertilità [11].
In spruzzatori di resine epossidiche (composte in larga parte da BPA e dal suo diglicidil-etere, che viene metabolizzato in bis-fenolo A) il dosaggio di bisfenolo A nelle urine ha mostrato una

correlazione con i livelli di FSH, indicando una interferenza distruttiva nella secrezione degli ormoni gonadotropici nell'uomo [12].
L'effetto dello stirene sulla tiroide viene confermato da un monitoraggio biologico di esposti che correla significativamente il dosaggio dei metaboliti dello stirene con l'alterazione dei livelli degli ormoni tiroidei [13].
L'approccio metodologico dei disegni epidemiologici su esposizioni a interferenti endocrini, è un argomento molto discusso. Alcuni autori hanno cercato di dare delle indicazioni di massima, con la definizione di un protocollo di valutazione del rischio per l'esposizione professionale [14], partendo dall'identificazione del rischio fino alla definizione della corrispondenza dose/risposta.
La stessa validità dell'utilizzo di questionari per la raccolta della storia lavorativa di operatori in contatto con PCB, viene posta in discussione. Si è infatti stimata la presenza di un range dal 13% al 29% di dati non correttamente descrittivi ed in particolare è stata riscontrata una tendenza, per la popolazione femminile, a sovrastimare l'esposizione (per gli uomini si è avuta una distribuzione random) [15]. Questione centrale è la "misura", o l'accurata descrizione, dell'esposizione che risulta una variabile molto più problematica piuttosto che l'accertamento dei problemi riproduttivi. Questa situazione è presente sia per gli studi caso/controllo nei lavoratori, che per la popolazione generale. Per ridurre al minimo errori grossolani viene consigliato di combinare i dati dei monitoraggi biologici con quelli dei questionari raccolti, facendo ben attenzione ad utilizzare metodi analitici accurati ed affidabili e soprattutto motivati da considerazioni strettamente metaboliche [16]. L'interpretazione dei dati ottenuti e un loro utilizzo ai fini della prevenzione dei danni per la salute, è un punto focale ma non di semplice trasposizione, come anche la definizione di "limiti" ambientali e biologici che possano sufficientemente tutelare la salute endocrina [17].
L'esposizione professionale è certamente una condizione ancora da studiare attentamente attraverso: l'identificazione degli interferenti endocrini presenti, la descrizione e valutazione dell'esposizione; la definizione del paradigma dose/risposta che risulta alquanto complicato ottenere a causa della notevole diffusione ambientale dei contaminanti; l'identificazione di livelli di concentrazione ambientale e biologica al di sopra dei quali si ritiene reale il rischio di danni per la salute; impostazione di metodiche analitiche opportune e validate; la ricerca di intervalli di riferimento per i dosaggi biologici; una definizione condivisibile di "basse dosi" e univocamente riconosciuta; la definizione di protocolli operativi per lo sviluppo di disegni epidemiologici mirati agli ambienti lavorativi; la valutazione delle suscettibilità personali e soprattutto nelle opportune considerazioni delle differenze di genere.
All'interno della ricerca finalizzata 2003 del Ministero della salute è in corso un progetto riguardante la relazione tra la patologia endocrina e l'esposizione ambientale a contaminanti con lo scopo di realizzare un registro di malattie e un centro nazionale Italiano sui distruttori endocrini. Il progetto coinvolge l'ISPESL, la FSM, l'ISS e i sui scopi sono:

- realizzare e gestire banche dati nazionali ed internazionali sui distruttori endocrini, aperto alla comunità scientifica come alle strutture del Servizio sanitario nazionale;
- sviluppare ricerche su:
  1. lavoratori esposti a pesticidi e solventi (studi retrospettivi e prospettici),
  2. campioni selezionati di lavoratori rispetto all'inquinamento ambientale, con dati misurabili (studi retrsettivi e prospettici), definizione ed utilizzo di test biologici standardizzati per identificare le conseguenze, la relazione dose/risposta.
- Il disegno e o studio di fattibilità del registro di malattia riguardo i distruttori endocrini.

Bibliografia

1.Degen GH et al. 2000. Endocrine disruptors: update on xenoestrogens. Int. Arch. Occup. Environ. Health,73: 433-441.
2.Petrelli G et al. 2000. Esposizione a Pesticidi in serra e fertilità maschile. G. Ital. Med. Lav. Erg. 22(4): 291-295.

3.Arbuckle TE et al. 1999. Exposure to Phenoxy herbicides and the risk of spontaneous abortion. Epidemiology 10(6): 752-760.
4.Figà-Talamanca I et al. 2001. Occupational exposures to metals, solvents and pesticides: recent evidence on male reproductive effects and biological markers. Occup. Med.51(3): 174-188.
5.Figà-Talamanca I et al. 2000. Fertility of male workers of the Italian mint. Reprod. Toxicol. 14: 325-330.
6.Kolstad HA et al. 1999. Change in semen quality and sperm chromatin structure following occupational styrene exposure. ASCLEPIOS. Int. Arch. Occup. Environ. Health. 72(3): 135-41.
7.Kolstad HA et al. 2000. Time to pregnancy among male workers of the reinforced plastics industry in Denmark, Italy and Netherlands. ASCLEPIOS. Scand. J. Work. Environ. Health. 26(4): 353-8.
8.Harkonen K et al. 1999. Aneuploidy in sperm and exposure to fungicides and lifestyle factors. ASCLEPIOS. A European concerted action on occupational hazards to male reproductive capability. Environ. Mol. Mutagen. 34(1): 39-46.
9.Larsen SB et al. 1999. Semen quality and sex hormones among organic and traditional Danish farmers. ASCLEPIOS Study group. Occup. Environ. Med. 56(2): 139-44.
10. Thonneau P et al. Effects of pesticide exposure on time to pregnancy: results of a multicenter study in France and Denmark. ASCLEPIOS study group. Am. J. Epidemiol. 15-150(2): 157-63.
11. Joffe M et al. 2003. Time to pregnancy and occupational lead exposure. Occup. Environ. Med.60(10): 752-8.
12. Hanaoka T et al. 2002. Urinary bisphenol A and plasma hormone concentrations in male workers exposed to bisphenol A diglycidyl ether and mixed organic solvents. Occup. Environ. Med. 59: 625-628.
13. Mutti A et al. 1984. Neuroendocrine effects of styrene on occupationally exposed workers. Scand. J. Work. Environ. Health. 10(4): 225-8.
14. Taskinen H, Ahlborg G jr, “Assessment of reproductive risk at work”, Int J Occup Environ Health 1996, 2: 59-63.
15. Rosenberg CR, Mulvihill MN, Fischbein A, Blum S, “An analysis of validity of self reported occupational histories using a cohort of workers exposed to PCBs”, Brit J Ind Med 1987, 44: 702-710.
16. Joffe M, “Epidemiology of occupational reproductive hazards: methodological aspects”, Rev Epidém Santé Publ 1992, 40: S17-S25.
17. Figà-Talamanca I, Giordano F, “Applicazioni dell’epidemiologia per la tutela della salute riproduttiva”, G Ita Med Lav Erg 2003, 25(3): 416-417.

INTERFERENTI ENDOCRINI COME FATTORI MODIFICANTI LA SUSCETTIBILITA' A XENOBIOTICI

L. Manzo, A.F. Castoldi, T. Coccini - Centro Ricerche, Università degli Studi di Pavia e IRCCS Fondazione Salvatore Maugeri, Pavia

Una comune caratteristica degli Interferenti Endocrini (IE) è quella di indurre effetti di "disregolazione", cioè fini cambiamenti molecolari che impediscono alla cellula di rispondere in modo corretto ai normali stimoli esercitati da ormoni, agonisti recettoriali, fattori di crescita ed altri agenti. Queste sostanze producono raramente una tossicità franca se non a dosi molto elevate. La loro azione interessa tipicamente sistemi fisiologici integrati, coinvolgimento il più delle volte le funzioni nervose e il sistema immunitario, unitamente all'endocrino. Si spiega così la complessità e la molteplicità delle forme con cui si esprime l'azione tossica degli IE di interesse ambientale. Dall'interferenza iniziale con specifici bersagli endocrini (gonadi, tiroide, ecc), scaturiscono effetti amplificati che, a seconda delle dosi e delle caratteristiche del soggetto esposto, assumono forme diverse: alterazioni del comportamento, deficit dello sviluppo pre- e postnatale, patologie neoplastiche o immunitarie, ecc. Da ciò deriva la difficoltà di caratterizzare il profilo tossicologico degli IE, considerato che, a tal fine, i classici metodi di studio in uso per la valutazione tossicologica delle sostanze chimiche sono scarsamente predittivi e talora inapplicabili.
L'attività degli IE mostra ampie differenze, legate alla natura del composto, al parametro neuro-immuno-endocrino esaminato, alla specie animale e alle modalità di esposizione (acuta, cronica, esposizione a miscele, ecc.).
Proprietà comuni a molti IE presenti nell'ambiente ambientale sono l'elevata persistenza e la lenta eliminazione dalla dose assorbita nell'organismo. Tali sostanze tendono perciò a concentrarsi e ad accumularsi nei tessuti, potendo raggiungere e mantenere per lungo tempo concentrazioni cellulari "critiche" anche quando vengono assunte a piccole dosi.
La prolungata permanenza fa sì che, nei tessuti del soggetto esposto, gli IE vengano spesso a trovarsi in combinazione con varie altre sostanze di interesse tossicologico. Negli ultimi anni, sono state avviate molte ricerche sugli effetti delle esposizioni miste, specie per quanto riguarda l'azione delle miscele di diossine e bifenili policlorurati (PCB) assorbite attraverso alimenti contaminati.
Incerti e controversi sono anche i dati sulla tossicità degli IE assunti in combinazione con sostanze d'interesse ambientale appartenenti ad altre classi (1,3,4).
E' stato recentemente osservato che certe miscele di PCB (Aroclor), assunte con il metilmercurio (MeHg), esercitano effetti neurotossici additivi (4) o sinergici (1) in alcuni modelli sperimentali. Gli effetti dell'interazione non sono però univoci. Nostri recenti studi indicano che l'esposizione simultanea a MeHg e al singolo congenere 2,2',4,4',5,5'-esaclorobifenile (PCB153), uno dei PCB più diffusi nell'ambiente, non amplifica, e in alcuni casi addirittura riduce, l'entità degli effetti esercitati dai singoli contaminanti su end-point biochimici del SNC nel ratto in via di sviluppo (2, 3). Nella corteccia cerebrale di ratti di 36 giorni, esposti durante la gestazione e l'allattamento a PCB153 (5 mg/kg/die, GD7-PND21), la densità dei recettori dopaminergici D2-like aumenta del 40%. Tale alterazione si mantiene anche nel gruppo co-esposto a MeHg (0.5 mg/kg/die, GD7-PND21), che di per sè è privo di effetto su questo parametro.
Nella stessa area cerebrale, esaminata in animali giunti al 21° giorno di vita, si osserva anche significativo aumento (30%) dei recettori colinergici muscarinici a seguito del trattamento con PCB153 (20 mg/kg/die) e MeHg (1 mg/kg/die) durante la gravidanza e nel primo periodo di vita post-natale. La miscela dei due composti non determina alcuna additività o sinergismo, anzi il PCB153 sembra mascherare l'effetto del MeHg (3). Nel cervello dell'animale immaturo, i due contaminanti riducono anche l'attività della monoaminoossidasi B (MAO-B), con effetti variabili in rapporto al sesso e all'area cerebrale testata. Indagini tossicocinetiche dimostrano che il PCB153 non modifica l'assorbimento e la distribuzione cerebrale del MeHg (3).
Gli esempi descritti dimostrano che gli IE possono modulare in maniera diversa la risposta a stimoli chimici tossici. Per la valutazione del rischio, esiste la necessità di mettere a punto e standardizzare

nuovi test, con particolare attenzione allo studio dei meccanismi cellulari e molecolari che sono alla base dell'effetto combinato di questi inquinanti.

Studi condotti con il contributo della Commissione Europea (Progetti ANEMONE, QLK4-CT-2001-00186 e DEVNERTOX, FOOD-CT-2003-506543), del Ministero della Salute e del Ministero dell'Istruzione, dell'Università e della Ricerca.

(1) Bemis JC, Seegal RF. Polychlorinated biphenyls and methylmercury act synergistically to reduce rat brain dopamine content in vitro. *Environ Health Perspect 107: 879-885, 1999.*
(2) Castoldi AF, Coccini T, Ceccatelli S, Manzo L. Neurotoxicity and molecular effects of methylmercury. *Brain Res Bull. 55: 197-203, 2001.*
(3) Coccini T, Castoldi AF, Randine G, Grandjean P, Manzo L. Exposure to methylmercury and PCB153 during pregnancy and lactation. Effects on brain and lymphocyte cholinergic muscarinic receptors in rat dams and pups. *Toxicol Sci S-1, 84: 215-216, 2005.*
(4) Roegge CS, Wang VC, Powers BE, Klintsova AY, Villareal S, Greenough WT, Schantz S. Motor impairment in rats exposed to PCBs and methylmercury during early development. *Toxicol Sci 77: 315-324, 2004.*

RISCHIO AMBIENTALE DA INTERFERENTI ENDOCRINI E SALUTE RIPRODUTTIVA MASCHILE

Marcello Spanò, Sezione di Tossicologia e Scienze Biomediche, ENEA CR Casaccia, Roma

Nel corso degli ultimi decenni si è assistito, in molti paesi industrializzati, ad una riduzione del tasso di natalità. Questo trend viene spiegato con argomentazioni di tipo sociale, economico, culturale, sociologico, mentre viene trascurata la possibile concausa di fattori biologici. In tempi recenti si è però notato tra la popolazione maschile, soprattutto in alcune regioni del pianeta (ad es., Scandinavia), una diminuzione della qualità del seme, un aumento di incidenza di malformazioni alla nascita del tratto urogenitale maschile (criptochidismo, ipospadia), e di neoplasie al testicolo durante l'adolescenza. Si assiste, inoltre, ad un crescente ricorso verso le tecniche di fecondazione assistita. Questo scenario potrebbe rappresentare un sintomo di una diminuzione del potenziale di fertilità della specie umana, in particolare di quella maschile. Il trend temporale di questi processi ha fatto ipotizzare una pressione ambientale negativa sul processo riproduttivo. Contemporaneamente, ripetute osservazioni sulla fauna selvatica in ambienti particolarmente inquinati da specifici composti chimici, riportavano anomalie nello sviluppo degli organi riproduttivi di molluschi, pesci, anfibi, rettili, uccelli e mammiferi. E' iniziata quindi la ricerca di composti ambientali che possono interferire negativamente con l'omeostasi del sistema endocrino, alla base di importanti funzioni necessarie alla sopravvivenza dell'individuo (metabolismo, immunità, comportamento, sviluppo e crescita) e della specie (riproduzione). Tutti quei composti, per ora identificati, che sono in grado di interferire con la normale regolazione ormonale dei diversi organismi, sono denominati colletivamente come Endocrine Disrupting Chemicals (EDC). Restringendo il discorso ai soli ormoni sessuali steroidei, gli EDC possono agire, in prima istanza, come agonisti o antagonisti di androgeni ed estrogeni nei confronti dei corrispettivi recettori, inibendo il legame di questi sul rispettivo recettore e/o alterando il metabolismo dell'ormone o del suo recettore e/o alterando le comunicazioni cellulari, mimando quindi gli ormoni naturali, inibendone la loro azione, alterando le loro normali funzioni regolatrici. I principali EDC sono costituiti da contaminanti (cloro)organici persistenti (POPs), da diversi pesticidi e biocidi, da sostanze d'uso industriale e domestico, da fitoestrogeni. Il maschio sembra essere più sensibile della femmina in quanto il suo sviluppo è totalmente dipendente dagli ormoni fin dai primissimi stadi embrionali e, in particolare, il sistema riproduttivo in via di sviluppo è particolarmente vulnerabile a possibili alterazioni funzionali che possono manifestarsi a distanza di decenni dall'esposizione, in epoca postpuberale. Particolare attenzione va quindi riservata alla valutazione dei rischi per l'infanzia e durante la gravidanza. Effetti riproduttivi attribuibili all'esposizione a EDC sono stati chiaramente dimostrati in numerose specie animali ed in numerosi studi di laboratorio. Si è dimostrato che molti composti, per esempio ftalati, sono capaci di indurre molte delle patologie tipiche dell'uomo descritte sotto la cornice teorica nota come "sindrome disgenetica testicolare", quali criptorchidismo, ipospadia, peggioramento della qualità del seme nei maschi nati dopo esposizioni in utero o perinatali. L'associazione casuale tra EDC e impatto sulla salute riproduttiva umana rimane però elusiva, anche per la complessità del problema tossicologico. Infatti, durante tutta la vita, dallo stadio uterino in poi, l'uomo è continuamente esposto a miscele di EDC presenti nell'ambiente lavorativo, domestico e negli alimenti, miscele la cui composizione è spesso ignota, come ignote sono le suscettibilità individuali, sia come individuo dotato di un esclusivo patrimonio genetico, sia nelle diverse fasi del suo sviluppo vitale. Per quanto riguarda le iniziative a livello programmatico, nel 2001 è stata firmata la convenzione di Stoccolma sotto egida UNEP per il bando totale di 12 POPs dal pianeta (Aldrin, Chlordane, Dieldrin, Dioxins, DDT, Endrin, Furans, Heptachlor, Hexachlorobenzene, Mirex, PCBs, Toxaphene). In Europa, USA e Giappone, dal 1996, le autorità competenti stanno attivando comitati, gruppi di studio e notevoli risorse economiche per comprendere meglio il fenomeno e le sue dimensioni, sia per l'uomo che per l'ambiente. L'UE sta implementando una strategia comunitaria per gli EDC e, solo nel V Programma Quadro, ha attivato

22 progetti che studiano l'impatto ambientale e sanitario degli interferenti endocrini, lo sviluppo di nuove metodologie per lo screening e lo studio degli effetti a livello genomico. WHO e UNEP hanno pubblicato un inventario degli EDC e dei loro effetti. Lo sforzo internazionale vede la partecipazione attiva dell'industria chimica (ad es., CEFIC) e di numerose organizzazioni ambientaliste. L'OECD ha attivato Endocrine Disrupters Testing and Assessment Task Force per l'elaborazione e l'armonizzazione di test tossicologici specifici per EDC. L'US EPA ha attivato la EDRI (Endocrine Disrupters Research Initiative). In Italia, nel corso del 2000, il Ministero della Salute ha lanciato un primo progetto pilota coordinato dall'ISS. Uno dei progetti della UE, a cui partecipa anche il nostro laboratorio, mira a stabilire il rischio riproduttivo per l'uomo da esposizione alimentare a POP (http//www.inuendo.dk) ed include anche una coorte di Inuit groenlandesi, una popolazione che risulta avere, suo malgrado, le concentrazioni ematiche più elevate di PCB e DDT. In conclusione, il problema degli EDC è di dimensioni planetarie e, per la sua intrinseca complessità tossicologica, deve essere affrontato attraverso una collaborazione transnazionale ed interdisciplinare (epidemiologi, tossicologi, chimici, biologi, endocrinologi, genetisti, clinici, veterinari, ecc.), in modo da comprendere, in tempi ragionevoli, il reale impatto degli EDC sul potenziale riproduttivo della nostra e di altre specie, e fornire alle autorità predisposte gli strumenti per operare una corretta gestione della salute umana e dell'ambiente.

Siti WEB utili per approfondimento:

http://europa.eu.int/comm/research/endocrine/index_en.html
http://www.iss.it/sitp/dist/
http://europa.eu.int/comm/environment/endocrine/
http://www.epa.gov/endocrine
http://e.hormone.tulane.edu/

INTERFERENTI ENDOCRINI E SALUTE RIPRODUTTIVA FEMMINILE

Gian Mario Tiboni- Ostetricia e Ginecologia, Dipartimento di Medicina e Scienze dell'Invecchiamento, Università "G. d'Annunzio" di Chieti-Pescara

Lo sviluppo e le funzioni dell'apparato riproduttivo femminile sono governati da delicati equilibri ormonali. Studi di tipo sperimentale hanno documentato la tossicità riproduttiva di sostanze ambientali con effetti di interferenza endocrina. Un crescente numero di studi suggerisce che i bassi livelli di interferenti endocrini presenti nell'ambiente potrebbero essere sufficienti ad innescare disordini riproduttivi nella specie umana. Mancano tuttavia evidenze inequivocabili a suffragio di questa ipotesi. I disordini riproduttivi femminili originerebbero da interferenze dei contaminanti ambientali con le funzioni endocrine mediate dagli estrogeni dagli androgeni tecali e dagli ormoni tiroidei. Infertilità, aborto, parto pretermine ed endometriosi rappresentano i principali problemi riproduttivi femminili per i quali il nesso di causalità con l'esposizione ad interferenti endocrini appare meglio documentata.

Infertilità. Nei paesi industrializzati il problema dell'infertilità ha mostrato un costante aumento negli ultimi due decenni. Dati ISTAT del 2003 indicano che il 10% delle donne di età compresa tra i 20 ed i 44 anni (più di 600.000) è infertile. Nel 10-20% dei casi all'incirca non è possibile identificare il fattore che ne è alla base. Un aumento del time to pregnancy è stato osservato in coppie in cui il partner femminile era stato esposto a composti organoclorurati (1). In analogia, è stata evidenziata un prolungamento del time to pregnancy nelle figlie di donne esposte a DDT durante la gravidanza (1). Plausibilità ad un possibile ruolo degli interferenti endocrini nell'infertilità viene conferita dall'evidenza che questi agenti sono presenti nei fluidi riproduttivi delle donne infertili (2). Per esempio, composti organoclorurati persistenti con documentata attività di interferenza endocrina sono stati identificati nel fluido follicolare di donne sottoposte a tecniche di fecondazione in vitro. Inoltre, il recupero di ovociti e lo sviluppo embrionale sono risultati inversamente correlati alle concentrazioni di idrocarburi clorurati (2).

Aborto. Si stima che circa il 15% di tutte le gravidanze identificabili clinicamente esiti in aborto spontaneo. Quando vengono prese in considerazioni anche le gravidanze che esitano in aborto in fasi precliniche, il tasso di abortività sale al 50%. Studi sperimentali hanno dimostrato che gli interferenti endocrini possono raggiungere attraverso la placenta il compartimento embrionale ed indurre aborto ed altri esiti gestazionali avversi. L'aborto potrebbe anche conseguire ad alterazioni della contrattilità uterina. E' stato osservato che più del 20 % delle donne con abortività ripetuta presentano livelli di organoclorurati più elevati rispetto alla popolazione di riferimento (3). Una forte correlazione è stata osservata tra i livelli sierici di esaclorobenzene ed rischio di aborto in donne turche accidentalmente esposte a questo pesticida (4). Questo tipo di associazione non è stata osservate in uno studio condotto in Italia (5). Il bisfenolo A è un interferente endocrino con effetti estrogenici. Uno studio giapponese pubblicato di recente ha documentato gli effetti abortigeni del bisfenolo A (6).

Parto pretermine. I policlorobifenili sono stati messi in relazione con un aumento del rischio di parto pretermine (1). L'effetto potrebbe essere mediato da un aumento dell'attività contrattile uterina. Uno studio Italiano ha stabilito una correlazione tra esposizione a ftalati e riduzione della durata della gravidanza di circa una settimana (7).

Endometriosi. L'endometriosi è caratterizzata dalla crescita extrauterina di tessuto endometriale che causa sanguinamento interno, infiammazione e genesi di fenomeni cicatriziali. La sua prevalenza e severità sono in aumento nei paesi industrializzati. Gli estrogeni giocano un ruolo cruciale nella patogenesi della malattia. Alcuni studi hanno proposto che alcuni interferenti endocrini, come le diossine ed i policlorobifenili, potrebbero favorire lo sviluppo di endometriosi . Un recente studio epidemiologico condotto in Belgio ha stabilito il primo nesso causale tra esposizione ad alcuni contaminanti clorurati persistenti ed rischio di sviluppare endometriosi (8).

Bibliografia

1. Toft G, Hagmar L, Giwercman A, Bonde JP. Epidemiological evidence on eproductive effects of persistent organochlorines in humans. Reprod Toxicol. 2004;19:5-26.
2. Younglai EV, Holloway AC, Foster WG. Environmental and occupational factors affecting fertility and IVF success. Hum Reprod Update. 2005;11:43-57.
3. Gerhard I, Daniel V, Link S, Monga B, Runnebaum B. Chlorinated hydrocarbons in women with repeated miscarriages. Environ Health Perspect. 1998;106:675-81.
4. Jarrell J, Gocmen A, Foster W, Brant R, Chan S, Sevcik M. Evaluation of reproductive outcomes in women inadvertently exposed to hexachlorobenzene in southeastern Turkey in the 1950s. Reprod Toxicol. 1998;12:469-76.
5. Leoni V, Fabiani L, Marinelli G, Morini A, Aleandri V, Pozzi V, Cappa F, Barbati D, Puccetti G, Tarsitani GF, et al. Spontaneous abortion in relation to the presence of hexachlorobenzene in the Italian environment. IARC Sci Publ. 1986;77:143-6.
6. Sugiura-Ogasawara M, Ozaki Y, Sonta S, Makino T, Suzumori K. Exposure to bisphenol A is associated with recurrent miscarriage. Hum Reprod. 2005;20:2325-9.
7. Latini G, De Felice C, Presta G, Del Vecchio A, Paris I, Ruggieri F, Mazzeo P.In utero exposure to di-(2-ethylhexyl)phthalate and duration of human pregnancy. Environ Health Perspect. 2003;111:1783-5.
8. Heilier JF, Nackers F, Verougstraete V, Tonglet R, Lison D, Donnez J. Increased dioxin-like compounds in the serum of women with peritoneal endometriosis and deep endometriotic (adenomyotic) nodules. Fertil Steril. 2005;84:305-12.

INTERFERENTI ENDOCRINI E SVILUPPO NEUROCOMPORTAMENTALE

Gemma Calamandrei, Daniela Santucci, Enrico Alleva
Reparto di Neuroscienze comportamentali, Dipartimento di Biologia cellulare e Neuroscienze, Istituto Superiore di Sanità, Viale Regina Elena 299, I-00161 Roma

Dati epidemiologici recenti riferiti ai paesi industrializzati suggeriscono che la prevalenza dei disordini neurocomportamentali in età evolutiva, che includono dislessia, deficit dell'attenzione e iperattività (ADHD), ritardo mentale lieve o moderato, autismo e quadri sindromici correlati sia significativamente aumentata dal 1970 ad oggi. Solo il 30% dei disordini neurocomportamentali dell'infanzia e dell'adolescenza sono associati a cause genetiche, traumi alla nascita ed esposizione fetale a droghe d'abuso, mentre l'eziopatogenesi della grande maggioranza di tali disturbi è ancora di difficile caratterizzazione. L'eziologia multifattoriale di tali disordini è sostenuta da numerose evidenze cliniche ed epidemiologiche, quindi suscettibilità genetica, e fattori epigenetici e ambientali concorrerebbero nell'indurre alterazioni "sottili" dello sviluppo cerebrale, soprattutto a carico di circuiti corticali. In questo contesto, i contaminanti ambientali potrebbero rivestire un ruolo più rilevante di quanto precedentemente supposto. Dati sperimentali ed epidemiologici indicano, infatti, che le anomalie anatomiche o morfologiche prodotte nei nascituri dai teratogeni classici sono solo la manifestazione più evidente di un'interferenza con l'organogenesi, e che contaminanti ambientali, quali gli organoclorurati, gli organofosfati, gli erbicidi, e i metalli pesanti possono provocare alterazioni cliniche o subcliniche dello sviluppo neurocomportamentale anche in assenza di specifici quadri lesivi. Questi effetti sono spesso difficili da diagnosticare, e si manifestano solo più tardivamente, per esempio in età scolare, esitando in disturbi dell'apprendimento, dell'attenzione e dell'emozionalità.

La protratta organogenesi è alla base dell'estrema vulnerabilità del sistema nervoso centrale (SNC) agli agenti tossici durante lo sviluppo. Lo sviluppo del SNC consiste di una sequenza di eventi tra loro intimamente connessi, perciò un'alterazione del processo di migrazione cellulare nelle fasi precoci dello sviluppo embrionale potrà influenzare lo stabilirsi dei contatti sinaptici tra neuroni corticali nel corso del primo anno di vita postnatale. Un agente tossico può influenzare lo sviluppo cerebrale interferendo direttamente con i processi di proliferazione, migrazione, sinaptogenesi o mielinizzazione. Se l'esposizione avviene nel corso di tutta la gravidanza e continua poi nella fase postnatale con l'allattamento e la dieta, sono ipotizzabili effetti cumulativi, anche nel caso di dosi estremamente basse. Effetti specifici su neurotrasmettitori, e sistemi recettoriali di membrana o citoplasmatici sono stati caratterizzati per molti contaminanti ambientali. Agli effetti diretti si possono sommare quelli indiretti, quali l'interferenza con l'azione di molecole modulatrici della plasticità cerebrale, come i fattori neurotrofici, con l'attività degli ormoni steroidi, che hanno un ruolo fisiologico determinante nella differenziazione sessuale di particolari aree cerebrali, e degli ormoni tiroidei. I policlorobifenili (PCB), contaminanti organici persistenti che si ritrovano tuttora in quantità significative nei liquidi biologici e nel tessuto adiposo degli animali e dell'uomo, rappresentano un caso paradigmatico in questo contesto. Gli effetti tossici di questi composti sono quelli sospettati per i cosiddetti "interferenti endocrini" (sviluppo sessuale anomalo, aumentato rischio di tumore alla mammella e alla prostata, riduzione della fertilità, alterazioni delle funzioni tiroidee e immunitarie), e sembrano conseguenti al legame con il recettore citosolico per gli idrocarburi arilici, con un meccanismo di azione analogo a quanto riportato per il 2,3,7,8-tetraclorobenzo-p-diossina (TCDD). Esistono tuttavia notevoli differenze fra i diversi PCB in conseguenza della loro struttura chimica: alcuni congeneri (p.es. 153) sono particolarmente persistenti, alcuni congeneri coplanari (p.es. 126) hanno una chiara attività diossino-simile attraverso il recettore arilico, mentre i congeneri non coplanari e orto-sostituiti sembrano avere effetti diretti sul sistema nervoso interferendo con il metabolismo intracellulare del calcio. Recentemente è stata dimostrata per alcuni congeneri la capacità di interferire sia con il rilascio di ormoni tiroidei che con i meccanismi di conversione e trasporto di questi stessi ormoni.

Vi sono sostanziali indicazioni di un'elevata neurotossicità dei PCB nell'organismo in sviluppo. Studi sperimentali condotti su roditori di laboratorio hanno infatti evidenziato in animali esposti in fase prenatale ai PCB un aumento non fisiologico dei livelli di calcio intracellulare, con un conseguente effetto a cascata sui meccanismi di funzionalità sinaptica. E' inoltre suggerito che i PCB, interferendo con il metabolismo degli steroidi e con altre regolazioni neuroendocrine, inducano anche indirettamente effetti neurocomportamentali. Studi epidemiologici prospettici, mirati a correlare marcatori di esposizione pre e/o postnatale ai PCB con il successivo sviluppo neuropsicologico dei soggetti esposti, sono stati condotti sia negli Stati Uniti sia in Europa. Gli studi statunitensi hanno incluso coorti di bambini nati nelle aree del Lago Michigan e del Lago Ontario, dove il grande consumo di pesce contaminato da parte di donne in età fertile o in gravidanza e allattamento espone il feto e il neonato ad elevate concentrazioni di PCB. Gli studi europei hanno incluso coorti madri/bambini di differenti aree geografiche dell'Olanda e della Germania. In generale, i risultati dei diversi studi hanno concordato nell'evidenziare un impatto negativo di elevate esposizioni pre e/o postnatali ai PCB e/o diossine su parametri di sviluppo neurologico e cognitivo, misurati in diverse fasi di sviluppo dei bambini, e tali effetti sono in generale significativamente associati all'esposizione transplacentare. Alterazioni dello sviluppo neuropsicologico vengono anche riportati per bambini esposti a concentrazioni subtossiche di pesticidi organoclorurati e/o organofosfati. Oltre agli effetti direttamente neurotossici, è ipotizzata anche per queste classi di composti un'interferenza con l'azione degli ormoni tiroidei, e con il ruolo della tiroide nel regolare/modulare lo sviluppo cerebrale durante la vita fetale e neonatale.
Gli studi di teratologia comportamentale condotti in modelli animali hanno significativamente aumentato la conoscenza dei meccanismi attraverso i quali diversi xenobiotici influenzano lo sviluppo del SNC e del comportamento. Gli studi su modelli animali consentono l'analisi di importanti parametri di difficile valutazione nelle popolazioni a rischio, come il ruolo di variabili multiple e l'identificazione di periodi di suscettibilità e la valutazione degli effetti a lungo termine. In conclusione, la valutazione del rischio di questi agenti per la salute richiede modelli sperimentali appropriati, che tengano conto della peculiare fisiologia dell'organismo in sviluppo, della sua estrema suscettibilità all'insulto neurotossico e della possibilità di effetti ritardati e mediati dalla interferenza con equilibri neuroendocrini.

IMPATTO DEGLI ESTROGENI AMBIENTALI SULLA DIFFERENZIAZIONE SESSUALE DEL COMPORTAMENTO NEL TOPO

Paola Palanza e Stefano Parmigiani - Dipartimento di Biologia Evolutiva e Funzionale, Università degli Studi di Parma

Numerose sostanze naturali o artificiali presenti nell'ambiente e negli alimenti, chiamate collettivamente "distruttori endocrini", "inquinanti ormonalmente attivi" o "interferenti endocrini", sono in grado di interferire con i sistemi ormonali dei vertebrati, mimando o inibendo l'azione degli ormoni naturali. Negli ultimi anni i dati sperimentali hanno messo in evidenza che una caratteristica distintiva degli interferenti endocrini è che, mentre l'esposizione acuta a tali composti può non avere effetti nell'animale adulto, essi possono essere trasmessi dalla madre all'embrione, dove, anche a dosi estremamente basse, possono interferire con il normale sviluppo neuroendocrino ed alterare in modo permanente la funzionalità delle strutture. Attualmente gli interferenti endocrini meglio caratterizzati sono i composti in grado di legarsi ai recettori intracellulari degli ormoni sessuali, in particolare ai recettori degli estrogeni (estrogeni ambientali - EA), come i fitoestrogeni naturali (es: nella soia), i pesticidi come il DDT e il suo derivato metossicloro, o composti rilasciati dai policarbonati utilizzati come contenitori alimentari, come il bisfenolo A, o farmaci (etinilestradiolo, dietistilbestrolo), alcuni policlorobifenili (PCB).

E' noto da tempo che livelli appropriati di ormoni sessuali sono indispensabili per il normale sviluppo e la differenziazione sessuale degli organi riproduttivi e del sistema nervoso centrale, e, conseguentemente, del comportamento (Schumaker et al. 1987; Fitch & Denenberg 1998). Perturbazioni del milieu ormonale, durante le fasi critiche dello sviluppo pre- e/o post-natale, sono potenzialmente in grado di modificare, in modo irreversibile, i processi di sensibilizzazione e/o organizzazione del SNC, e, di conseguenza, di alterare il comportamento in molte specie diverse. In particolare lo studio di comportamenti sessualmente dimorfici si propone come un modo particolarmente sensibile di evidenziare l'azione distruttrice o semplicemente modulatrice degli estrogeni ambientali (EA) (Palanza et al.1999). Nell'ambito della teoria dell'evoluzione, le differenze sessuali nel comportamento riflettono differenze adattative nelle strategie con cui gli individui affrontano l'ambiente socio-ecologico e sono il risultato dell'azione della sella selezione sessuale (Darwin 1871). Come e in quale misura l'esposizione agli inquinanti endocrini possa influenzare il comportamento appare quindi una questione di una certa rilevanza, poichè è lecito ipotizzare che la distruzione dei normali processi di mascolinizzazione dei maschi e di femminizzazione delle femmine possano inerferire con sopravvivenza e successo riproduttivo (fitness) degli individui esposti (Parmigiani et al. 1998; Crews et al. 2000; Clotfelter et al. 2004).

La nostra ricerca si propone di caratterizzare i sistemi comportamentali sessualmente dimorfici sensibili all'azione di basse concentrazioni (compatibili con quelle presenti nell'ambiente) di EA durante periodi critici, individuandone le possibili alterazioni dei substrati endocrini e neurali. Topi femmine CD1 sono state addestrate a bere spontaneamente da una siringa modificata soluzioni di olio di mais, con o senza il pesticida metossicloro (MXC 20microg/Kg), o il bisfenolo A (BPA 10, 20 o 40 microg/Kg), un estrogeno ambientale che si trova nei policarbonati di origine industriale, durante l'ultima settimana di gestazione e la prima settimana post-parto. La loro prole (animali esposti perinatalmenente ai due composti) è stata sottoposta a diversi test di esplorazione (Novelty pre-pubertà, free-exploratory open field -OPF e Elevated plus maze-EPM da adulto), di comportamento cognitivo (labirinto a T, object recognition test, e Three door runway) e di comportamento sociale e riproduttivo. I risultati dell'analisi del comportamento indicano che nei diversi paradigmi sperimentali i controlli mostrano chiare differenze sessuali nel comportamento in risposta ad un ambiente nuovo e nell'apprendimento di un percorso, mentre la prole esposta a BPA e/o MXC presenta una riduzione o un annullamento delle differenze sessuali. Maschi e femmine di topo sembrano mostrare una diversa sensibilità all'azione degli EA: mentre nelle femmine gli effetti comportamentali e neurali degli EA perinatali si sono riscontrati soprattutto per quanto riguarda il comportamento esplorativo-emozionale ed il comportamento materno, i maschi risentono

maggiormente dell'esposizione perinatale agli EA per quanto riguarda lo sviluppo del comportamento cognitivo, aggressivo e le interazioni sociali. Abbiamo inoltre valutato gli effetti dell'esposizione prenatale a bisfenolo A o metossicloro sull'attività del sistema noradrenergico in due aree cerebrali sessualmente dimorfiche: il locus coeruleus e l'area preottica, analizzando espressione e funzione dei recettori alfa2 adrenergici tramite autoradiografia. I dati hanno indicato che nei maschi esposti a bisfenolo A si riscontra un aumento del numero di recettori alfa2 nell'area preottica, un effetto che riduce le differenze sessuali presenti nei controlli. Inoltre, sia nel locus coeruleus che nell'area preottica degli animali esposti prenatalmente agli EA l'affinità di legame dei recettori alfa2 adrenergici verso il radioligando utilizzato per lo studio risulta ridotta. I nostri risultati suggeriscono come gli inquinanti endocrini da noi analizzati possano interferire con lo sviluppo delle differenze sessuali del sistema monoaminergico e, di conseguenza, con l'espressione dei comportamenti ad esso associati.

INTERFERENTI ENDOCRINI ED EFFETTI SULLA FUNZIONE TIROIDEA

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

Gli interferenti endocrini sono agenti chimici di sintesi, rilasciati nell'ambiente soprattutto attraverso l'impiego di pesticidi o come risultato dell'attività industriale, in grado di causare un effetto avverso sulla salute di un organismo o sulla sua progenie. L'interesse della comunità scientifica per gli effetti sulla salute umana derivanti dall'esposizione a tali sostanze rappresenta oggi un punto focale della ricerca nazionale ed internazionale, data la vastissima diffusione che queste sostanze hanno negli ambienti di vita e di lavoro e per le numerose conseguenze che una tale esposizione può determinare per la salute umana. Queste riguardano prevalentemente certe tipologie di cancro (mammella, testicoli), alterazioni del sistema riproduttivo maschile e femminile, del sistema immunitario e neurologico. Più recentemente è stato messo in evidenza che anche la tiroide rappresenta un bersaglio per tali sostanze. Ad oggi infatti, sono state individuate oltre 100 agenti chimici di sintesi in grado di interferire con la normale funzione tiroidea attraverso meccanismi d'azione che possono alterare la sintesi, il metabolismo ed il trasporto degli ormoni tiroidei, possono sostituirsi a questi a livello recettoriale o possono indurre una risposta autoimmune tiroide-specifica [*Thyroid 8:827, 1998*].

Il crescente interesse per i possibili effetti sulla funzione tiroidea derivanti dall'esposizione a tali sostanze si origina dal fatto che gli ormoni tiroidei svolgono un'azione determinante sia nell'organismo in via di sviluppo, promuovendo il differenziamento e la proliferazione cellulare, sia nell'organismo adulto contribuendo al mantenimento dell'omeostatsi metabolica. Sebbene la tiroide possa essere considerata un organo piuttosto robusto nell'adulto, in grado cioè di compensare una moderata o lieve azione interferente attraverso adattamenti morfologici e/o funzionali (ad es. l'iperplasia ed il gozzo), nell'organismo in evoluzione la tiroide non è ugualmente in grado di adattarsi e quindi compensare l'effetto di insulti esterni. Il fatto che numerosi di questi agenti chimici siano in grado di oltrepassare la placenta ed il ruolo centrale degli ormoni tiroidei nello sviluppo del sistema nervoso durante le prime fasi della vita, suggeriscono la potenziale pericolosità di esposizioni a tali sostanze "in utero" o durante la prima infanzia *[Environ. Health Perspect. 110:337, 2002]*. A tale proposito è stato suggerito che l'azione neurotossica dimostrata per alcune di queste sostanze (ad es. PCB) possa, almeno in parte, essere mediata dall'effetto sulla tiroide.

Per molte di queste sostanze tuttavia, la conoscenza degli effetti sul sistema endocrino, e in particolare sulla funzione tiroidea, deriva prevalentemente da studi condotti su modelli sperimentali *in vivo* e *in vitro*, mentre molto pochi sono gli studi condotti sull'uomo per la valutazione di effetti relativi sia ad esposizioni professionali che ad esposizioni riguardanti la popolazione generale. Risulta pertanto forte l'esigenza di realizzare indagini epidemiologiche finalizzate alla valutazione dell'impatto sulla salute umana dell'esposizione ambientale ed alimentare a tali sostanze. Ed è proprio in quest'ottica che l'Istituto Superiore di Sanità si è impegnato realizzando studi sul territorio mirati alla identificazione degli effetti sulla funzione tiroidea dell'esposizione professionale e ambientale a particolari pesticidi largamente usati nel nostro Paese, quali etilenbisditiocarbamati e organofosforici. Tali indagini sono attualmente in corso e i risultati che si otterranno contribuiranno a costruire la base conoscitiva necessaria per valutare il reale impatto sulla salute umana dell'esposizione ad interferenti tiroidei e per individuare eventuali segmenti di popolazione a maggior rischio sui quali orientare e concentrare attuabili azioni di prevenzione.

“BIOSENSORI E BIORISANAMENTO”

NUOVI BIOSENSORI CELLULARI BIOLUMINESCENTI GENETICAMENTE INGEGNERIZZATI PER IL MONITORAGGIO DI COMPOSTI CON ATTIVITÀ ESTROGENICA ED ANDROGENICA

A. Roda, E. Michelini, M. Mirasoli, M. Guardigli, P. Simoni, M. Magliulo, Department of Pharmaceutical Sciences, University of Bologna, via Belmeloro 6, 40126, Bologna, Italy

Negli ultimi decenni sono stati eseguiti numerosi studi relativi agli effetti pseudo-ormonali di composti chimici naturali e di sintesi rilasciati nell'ambiente. Tali sostanze, definite "interferenti endocrini", agiscono sul sistema endocrino, sia degli animali che dell'uomo, causando alterazioni a lungo termine dell'apparato riproduttivo, squilibri metabolici, aumenti nell'incidenza di alcuni tipi di tumore ed effetti avversi anche sulla progenie.

Una delle priorità della Commissione Europea riguarda pertanto lo sviluppo di nuove metodologie analitiche di screening, sia *in vitro* che *in vivo*, idonee per un efficiente monitoraggio ambientale ed una più approfondita conoscenza dei meccanismi d'azione e della tossicità degli interferenti endocrini.

Tale classe di composti è estremamente eterogenea dal punto di vista strutturale e ciò complica la messa a punto di metodi analitici convenzionali di screening rapidi e nello stesso tempo sensibili in grado di determinarne la concentrazione in matrici reali.

Sono stati pertanto sviluppati biosensori cellulari bio-chemiluminescenti che prevedono l'impiego di cellule di lievito *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificate in modo da esprimere il recettore umano per gli estrogeni o per gli androgeni, nelle quali è stato inoltre inserito un plasmide reporter in cui la sequenza estrogen o androgen responsive element (ERE, ARE) controlla l'espressione del gene reporter. L'interazione del recettore con la molecola o con classi di composti con attività simil-ormonale causa la dimerizzazione del recettore con attivazione della sequenza specifica ERE o ARE e come conseguenza l'attivazione trascrizionale del gene reporter con produzione della proteina reporter luminescente. L'espressione della proteina reporter viene poi misurata tramite rivelazione luminescente mediante un fotomoltiplicatore o CCD.

Tali biosensori cellulari consentono, a differenza delle tecniche analitiche convenzionali, di valutare la biodisponibilità e gli effetti tossici degli interferenti endocrini, fornendo importanti informazioni riguardo all'attività biologica di un campione o di un composto in esame.[1]

Per la determinazione dell'attività estrogenica è stato sviluppato un biosensore che utilizza la β-galattosidasi come gene reporter.

L'analisi viene eseguita in piastre microtiter di polistirene a 96 pozzetti in cui 10 µL del campione acquoso viene fatto incubare con un numero fisso di cellule (circa $1x10^5$) in un volume finale di 100 µL per pozzetto. Durante un'incubazione di 24 h a 30°C l'analita penetra all'interno delle cellule, si lega al recettore per gli estrogeni e il complesso ligando-recettore interagisce con fattori di trascrizione specifici (ERE) che attivano l'espressione del gene reporter β-galattosidasi, con conseguente sintesi dell'enzima che viene secreto nel mezzo di reazione; l'attività enzimatica viene valutata mediante substrati chemiluminescenti quali derivati del diossietano.

Il biosensore è stato calibrato utilizzando il 17ß-estradiolo. La risposta del biosensore è risultata riproducibile nell'ambito di concentrazioni 5 – 1000 ng/L (C.V. < 5%), con un limite di rivelazione pari a 5 ng/L di 17ß-estradiolo.
E' stata inoltre sviluppata una seconda generazione di biosensori cellulari per la valutazione dell'attività androgenica o anti-androgenica utilizzando il recettore umano per gli androgeni. Come gene reporter è stata utilizzata una luciferasi di *Photinus pyralis* senza la sequenza di traslocazione nei perossisomi (*skl*) che consente di misurare l'attività della luciferasi senza necessità di lisare le cellule, semplicemente aggiungendo il substrato D-luciferina.[2]

La semplicità e rapidità di utilizzo della luciferasi modificata rende tale proteina una valida alternativa ai geni reporter normalmente utilizzati nei lieviti, quali la beta galattosidasi. Molte procedure richieste con gli altri geni reporter sono eliminate od accorciate, riducendo i tempi di analisi e migliorando le prestazioni analitiche del metodo, che prevede un'incubazione di 2 h di 10 μL di analita in soluzione con le cellule ricombinanti e la successiva misura di luminescenza che è stata automatizzata con un dispensatore automatico per l'aggiunta del substrato.[3]

Per aumentare la robustezza e l'accuratezza del biosensore ed eliminare la necessità di pre-trattare il campione, sono stati utilizzati dei controlli interni, inserendo nelle cellule un secondo gene reporter (che emette a lunghezze d'onda diverse o che richiede un diverso substrato luminescente) che esprime un livello costante di proteina reporter, consentendo quindi di monitorare eventuali variazioni (aumento o diminuzione) del segnale bioluminescente dovute alla presenza di interferenti dotati di effetti citotossici o in grado di alterare la funzionalità e/o la vitalità cellulare. La presenza di analiti tossici porterebbe infatti ad una sottostima dell'attività androgenica se queste variazioni nel numero di cellule o nella loro vitalità non fossero correttamente interpretate.

L'utilizzo in parallelo di un controllo esterno costituito dallo stesso ceppo di lieviti opportunamente ingegnerizzato per esprimere in modo costitutivo e costante il gene della luciferasi (luc-skl) ha permesso infatti di monitorare e correggere l'effetto della matrice mediante normalizzazione dei dati, ottenendo una buona riproducibilità e un limite di rivelazione pari a 10 ng/L di testosterone, confrontabile se non migliore a quello di analoghi saggi trascrizionali per il recettore per gli androgeni precedentemente sviluppati usando linee cellulari di mammifero.
Entrambi i biosensori sono stati utilizzati per valutare l'attività simil-estrogenica, androgenica ed antiandrogenica in campioni ambientali e alimentari. Sono state eseguite alcune analisi su effluenti prima e dopo trattamento da impianti municipali di depurazione delle città di Roma, Firenze, Parma e Bologna che hanno rilevato solo in alcuni depuratori diminuzioni significative dei livelli di attività ormonale.
I due biosensori si sono rivelati di semplice esecuzione, sensibili, robusti, di facile automazione e ad alta produttività analitica. Tali caratteristiche rendono i biosensori cellulari ideali per lo sviluppo di sistemi di monitoraggio di primo livello, che permettono di valutare l'interazione di interferenti endocrini presenti in campioni ambientali, biologici, o alimentari con recettori per specifici ormoni. Soltanto i campioni risultati positivi al test biologico di primo livello verranno poi analizzati mediante tecniche cromatografiche combinate con la spettrometria di massa più accurate e costose per identificare i singoli composti con attività simil-ormonale.
Una terza generazione di biosensori cellulari è attualmente in fase di studio con la prospettiva di immobilizzazione delle cellule che, associata all'impiego di diversi geni reporter, ottenuti da mutazioni di geni esistenti con emissione a diversa λ e clonaggio di nuovi geni che utilizzano diverse luciferine, consentirà di sviluppare metodi rapidi e multianalita per analisi in situ.[4]
Occorrono pertanto ulteriori sforzi per la piena ottimizzazione e validazione dei sistemi proposti, dando risposte soddisfacenti a questioni quali l'applicabilità a diverse matrici, la possibile interferenza con componenti naturali delle matrici stesse e la possibilità di valutare eventuali effetti additivi e sinergici.

1. Mirasoli M., Feliciano-Cardona J. S., Michelini E., Daunert S., Roda A. *Anal. Chem*. 74: 5948-53, 2002
2. Michelini E., Leskinen P., Virta M., Karp M., Roda A. *Biosens. Bioelectron.* 20: 2261-7, 2005
3. Michelini E., Magliulo M., Leskinen P., Virta M., Karp M., Roda. *Clin. Chem*. 51: 1995-98, 2005
4. Branchini BR, Southworth TL, Khattak NF, Michelini E, Roda A. *Anal. Biochem*. 345:140-8, 2005

BIOSENSORI ELETTROCHIMICI A BASE DI DNA PER LA VALUTAZIONE DI MODULATORI ENDOCRINI NELLE ACQUE E IN MATRICI COMPLESSE

Marco Mascini, Dipartimento di Chimica, Università di Firenze, Via della Lastruccia 3 - Sesto Fiorentino 50019
marco.mascini@unifi.it

L'interazione specifica tra uno strato biologico immobilizzato e specifiche sostanze inquinanti fornisce la base per la costruzione di dispositivi analitici adatti all'uso in laboratorio o direttamente sul posto di prelievo. Le applicazioni ambientali di sensori biocatalitici (enzimi) ed immunosensori sono aumentate durante gli anni 90, mentre poca attenzione è stata data allo sviluppo di sensori basati su acidi nucleici per applicazioni ambientali. Gli sviluppi in Biologia molecolare e nelle Biotecnologie hanno aperto interessanti possibilità per la realizzazione di biosensori basati sul DNA per applicazioni ambientali. A differenza degli enzimi o anticorpi, gli acidi nucleici immobilizzati sono molto stabili e possono essere facilmente sintetizzati e rigenerati. Gli acidi nucleici immobilizzati in film sulla superficie elettrodica rappresenteranno l'elemento di riconoscimento molecolare altamente selettivo e potranno avere in futuro un ruolo maggiore per analisi ambientali. La nostra tecnica è basata nell'immobilizzazione su di una superficie elettrodica di carbone ottenuta per tecnologia serigrafica, del DNA a doppia elica (ottenuto, per esempio, dal timo di vitello)e nel mettere tale biosensore a contatto per un certo periodo di tempo con campioni d'acqua; sostanze intercalanti o formanti un complesso con il DNA possono essere misurate attraverso l'uso di tecniche elettrochimiche sofisticate.

In questo caso possiamo utilizzare il segnale di ossidazione della guanina che decrescerà in seguito all'interazione con la sostanza inquinante o in caso di inquinanti elettroattivi l'interrogazione elettrochimica permettera' di ottenere specifici segnali.

Il dsDNA si comporta come un dispositivo biologico di preconcentrazione dove il composto intercalante o interagente si accumula alla superficie dell'elettrodo. L'interrogazione elettrochimica della superficie può essere fatta in un tampone opportuno controllato. Inoltre questa tecnica elettrochimica è accoppiata allo sviluppo di elettrodi stampati economici e riproducibili molto adatti per l'uso in campo e per un rapido controllo di sostanze inquinanti.

BIORISANAMENTO DI ACQUE INQUINATE DA INTERFERENTI ENDOCRINI

Prof. Damiano Gustavo Mita

- *Dipartimento Medicina Sperimentale, II Università di Napoli, mita@unina2.it*
- *Istituto di Genetica e Biofisica del CNR Napoli, mita@gb.cnr.it*

Vengono presentati risultati relativi all'impiego di bioreattori a membrana nel disinquinamento delle acque inquinate da interferenti endocrini appartenenti alla classe dei composti fenolici. Nel caso specifico laccasi da *Trametes versicolor* è stata covalentemente immobilizzata su una membrana planare idrofobica di Nylon, posta a separare due soluzioni acquose di bisfenolo A, utilizzato come substrato modello. Il bisfenolo A è impiegato principalmente come plastificante e , di conseguenza, risulta ubiquitario. Il comportamento della membrana catalitica in funzione della concentrazione di bisfenolo A è stato studiato in condizioni isoterme e non-isoterme. I risultati sperimentali hanno dimostrato che:

a) la cinetica della reazione enzimatica in entrambe le condizioni sperimentali è del tipo Michaelis-Menten;
b) a ciascuna concentrazione di bisfenolo A la velocità di reazione in condizioni non-isoterme è maggiore di quella ottenuta in comparabili condizioni isoterme;
c) la velocità della reazione catalitica aumenta linearmente all'aumentare della differenza di temperatura applicata attraverso la membrana

Quest'ultimo risultato ha permesso di identificare un parametro significativo per le applicazioni industriali della tecnologia dei bioreattori non isotermi. Tale parametro, definito come incremento percentuale della velocità di reazione (P.A.I.) in condizioni non isoterme è definito dall'equazione:

$$(P.A.I.) = \frac{R_{(non\text{-}isot.)} - R_{(isot.)}}{R_{(isot.)}} = \alpha \Delta T$$

dove $R_{(non\text{-}isot.)}$ ed $R_{(isot.)}$ rappresentano rispettivamente la velocità della reazione non isoterma ed isoterma. Sotto queste condizioni α rappresenta l'incremento percentuale della velocità di reazione quando le termocoppie, applicate ad 1,5 mm da ciascuna delle due superfici della membrana catalitica, registrano una differenza di temperatura di un grado centigrado. Applicando questa analisi sono stati calcolati incrementi percentuali significativi a livello di applicazioni industriali.

I risultati vengono discussi sulla base del processo di termodialisi.

L'intervento della Proff.ssa Gramatica è a pag. 40

“MODELLI DI MECCANISMI MOLECOLARI”

GENETICA E FARMACOGENETICA

Maria Luisa Brandi - Dipartimento di Medicina Interna, Università degli Studi di Firenze, Firenze

La possibilità che si verifichi un forte impatto con caratteristiche negative sulla salute umana e animale da parte di molecole presenti nell'ambiente in grado di interagire con la normale funzione endocrina è stata al centro dell'attenzione della comunità scientifica internazionale e dei media nell'ultima decade. Il sistema endocrino consiste di un complesso di feedbacks che coinvolgono il sistema nervoso centrale, gli organi endocrini e l'apparato riproduttivo maschile e femminile (ghiandole mammarie, utero, endometrio, cervice uterina, ovaio, vagina, vulva, testicoli, prostata e pene). Per svolgere il loro ruolo le ghiandole endocrine secernono ormoni, che attivano la risposta dell'organismo attraverso meccanismi mediati da recettori. L'ipotesi di "Molecole Disruptive del Sistema Endocrino" ("Endocrine Disruptors") è basata sul fatto che sostanze presenti nell'ambiente possono mimare gli ormoni endogeni, funzionando come agonisti od antagonisti a livello recettoriale, anche se alcune molecole possono agire come sostanze tossiche indipendentemente da interazioni con i recettori ormonali. Un'ampia varietà di sostanze chimiche sintetiche di uso comune, in particolare quelle che possono accumularsi nell'ambiente e nei tessuti, sono in grado di interferire con il normale funzionamento del sistema endocrino provocando aumento di alcuni tipi di tumore, anomalie nel sistema riproduttivo, problemi comportamentali, deficit nell'apprendimento ed alterazioni del sistema immunitario. Il problema è globale, visti il numero delle sostanze chimiche implicate e la diffusione delle stesse (vernici, detergenti, lubrificanti, cosmetici, tessili, pesticidi, plastiche, prodotti di smaltimento delle scorie). Peraltro molti farmaci, inclusi i contraccettivi, hanno attività ormonale. Esistono inoltre molecole di origine vegetale (fitoestrogeni), comunemente presenti nella dieta umana ed animale, in grado di interagire con la risposta estrogenica. Infine, gli ormoni naturali prodotti dall'uomo e dagli animali hanno potenti effetti ed essi stessi od i loro metaboliti sono rilasciati nell'ambiente. La valutazione dei rischi potenziali deve tenere conto delle influenze additive e/o degli effetti antagonisti, che tutte queste sostanze possono esprimere reciprocamente, visto che è proprio in forma di miscele che esse si troveranno ad agire nell'ambiente. Il risultato di queste conoscenze è riconoscibile nello sforzo fatto per sviluppare modelli "in vivo" ed "in vitro", utili a qualificare e quantificare l'attività di "Molecole Disruptive del Sistema Endocrino". Essendo l'esposizione ubiquitaria e potenzialmente con specificità geografiche diverse è di vitale importanza di studi mirati, condotti da ricercatori provenienti da varie discipline scientifiche, quali l'endocrinologia, l'oncologia e la tossicologia per creare una interazione complementare come rilevabile dal contenuto dei rispettivi progetti di ricerca. Sarà così possibile: a) costruire un inventario dei modelli "in vivo" ed "in vitro" utili alla valutazione delle "Molecole Disruptive del Sistema Endocrino"; b) identificare le aree che necessitano di sviluppo di nuovi modelli e di ottimizzazione dei preesistenti; c) facilitare la coordinazione e la cooperazione attraverso una rete nazionale con lo scopo di economizzare le risorse esistenti in Italia; e d) integrare le attività del gruppo di ricerca al fine di coinvolgere l'interesse pubblico, i settori privati ed i gruppi internazionali interessati a questi problemi con proposte e risultati che riflettano la specificità del nostro Paese.

THE ERE-LUC MOUSE: A PARADIGM OF REPORTER MOUSE FOR PHARMACOLOGICAL AND TOXICOLOGICAL STUDIES.

Adriana Maggi and Paolo Ciana. Center of Excellence on Neurodegenerative Diseases and Dept of Pharmacological Sciences University of Milan,I-20129 Milan, Italy

During the past decade the remarkable progress made by molecular genetics, and the possibility to manipulate cells for the expression of genes reporter of drug activity determined majors changes in the strategies for drug development. We have recently generated transgenic mouse reporting on estrogen receptor activity. The mouse was engineered with a construct carrying the luciferase reporter gene under the control of an estrogen responsive element. In addition Matrix Attachment Regions were used to flank the transgene construct in order to ensure the generalized expression of the reporter. This model system was extensively validated to demonstrate that luciferase expression is strictly associated to the state of estrogen receptor transcriptionally activation. We show that by biochemical, immuno-histochemical, and pharmacological criteria, luciferase content reflects ER transcriptional activity and thus represents a novel system for the study of ER dynamics during physiological fluctuations of estrogen and for the identification of SERMs or endocrine disruptors.
The description of such a reporter mouse allowing *in vivo* analysis of hormone receptor activity opens new orisons for drug discovery and toxicological studies: these novel animal models in association with *in vivo* imaging technologies allow for a global view of the tissues target of the drug action after acute and repeated treatment thus enabling to predict potential side effects at a very early phase of the preclinical studies; in toxicological studies these animals allow for monitoring the state of estrogen receptor activation in vivo during prolonged exposure of environmental pollutants or toxic agents. It is anticipated that further improvements of transgene architecture will lead to models which will allow for a global view of endocrine disrupter activity.

Our work is supported by UE (EDERA, QLRT 2001-02221, EMIL and CASCADE Projects), MIUR 2002-58785, AIRC and Telethon

1. Ciana P., Di Luccio G., Belcredito S., Pollio G., Vegeto E., Tatangelo L., Tiveron C and Maggi A. Engineering of a mouse for the in vivo profiling of estrogen receptor activity, Mol Endocrinol, (2001) 15(7). 1104-1113
2. Ciana P., Raviscioni M., Vegeto E., Mussi P., Que I., Parker M.G., Lowik C., and Maggi A. In vivo imaging of transcriptionally active oestrogen receptor, Nature Medicine, (2003) 9: 82 – 86
3. DiLorenzo D., Villa R., Biasiotto G., Belloli S., Ruggeri G., Alberini A., Apostoli P., Raviscion M., Ciana P., and Maggi A. Isomer-specific activity of DDT with estrogen receptor in adult and suckling mice, Endocrinology**,(**2002) 143: 4544 - 4551.
4. MAGGI A. CIANA P. Tailoring animals to image drugs in action. Nature Reviews Drug Discovery, (2005) 4:249-55
5. PATENT REQUEST: A transgenic mouse for the screening, pharmakokinetics and pharmacodynamic profiling of ligands active on intracellular receptors and estrogen receptors, methods for its preparation. Patent request n. MI2000A 001503 04/07/2000, European and USA extension PCT/EP 01/07622

APPROCCI BIOMOLECOLARI PER LA CARATTERIZZAZIONE DEGLI EFFETTI DEGLI ESTROGENI AMBIENTALI IN MODELLI SPERIMENTALI

Alberta Maria Polzonetti-Magni - Dipartimento di Scienze Morfologiche e Biochimiche Comparate, Università di Camerino, Camerino (MC), Italy- email: alberta.polzonetti@unicam.it

Numerosi studi hanno messo in evidenza l'esistenza di un ampio gruppo di sostanze che possono interferire con le funzioni endocrine, mimando l'effetto degli ormoni; tra questi gli estrogeni ambientali, o xenoestrogeni, composti molto diffusi in diversi ambienti per effetto delle attività antropiche.

Modificazioni del sistema endocrino correlate con la riproduzione e con il differenziamento sessuale producono gravi alterazioni negli equilibri naturali; infatti i distruttori endocrini sono considerati dei buoni candidati per spiegare il declino di popolazioni naturali di pesci ed anfibi e queste classi di vertebrati acquatici rappresentano perciò un ottimo modello sperimentale.

Le modalità attraverso le quali tali composti possono interferire con la biologia riproduttiva sono studiate valutando gli effetti a livello dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi (HPG). Nell'asse HPG gli estrogeni ambientali possono legare sia le proteine che trasportano gli steroidi (SBP) che il recettore per gli estrogeni (mimando o bloccando la trascrizione), possono determinare un'alterazione dell'espressione di specifici biomarcatori estrogenici, ed influenzare l'ipotalamo e l'ipofisi attraverso meccanismi di feed-back. Inoltre, gli estrogeni ambientali possono incidere sulla sintesi dell'estradiolo-17β agendo indirettamente mediante inibizione dell'aromatasi.

Il pre-requisito fondamentale affinché un composto eserciti un effetto estrogenico risiede nella capacità di legare il recettore per gli estrogeni (ER) presente sulle cellule target. Attraverso tale legame il complesso xenoestrogeno-recettore regola l'espressione dei geni coinvolti nella risposta biologica. Lo studio dell'interazione ERs-xenoestrogeni costituisce, dunque, un passaggio fondamentale per poter valutare l'effetto biologico provocato da tali composti.

Nei vertebrati ovipari l'organo target principale per l'azione degli estrogeni è rappresentato dal fegato dove la sintesi di vitellogenina (VTG), proteina precursore delle componenti del tuorlo, è specificatamente indotta dallo steroide sessuale femminile: l'estradiolo-17β. Il dosaggio della vitellogenina rappresenta, dunque, una valutazione molto attendibile per la rilevazione dell'attività estrogenica .

Si è cercato perciò di indagare sulla possibilità che alcuni aspetti della femminilizzazione osservata in animali selvatici possano dipendere dalla presenza nell'ambiente acquatico di composti con attività estrogenica. Sono stati effettuati esperimenti "in vivo" per stabilire la potenza estrogenica di diverse dosi del composto 4-nonilfenolo (NP), nell'indurre la sintesi del biomarcatore estrogenico epatico, la vitellogenina (VTG), in maschi adulti di rana e tritone; negli stessi animali sono stati anche misurati i livelli degli steroidi plasmatici, estradiolo-17β e androgeni, della prolattina e delle gonadotropine. Parallelamente sono stati anche studiati gli effetti prodotti "in vitro" dal 4-NP sull'induzione della sintesi di VTG in colture di fegato prelevato da maschi di *Rana esculenta,* sulla steroidogenesi gonadica e sulla sintesi e rilascio di ormoni ipofisari (gonadotropine e prolattina) in colture primarie di pars distalis. I risultati ottenuti suggeriscono che nel modello sperimentale utilizzato, il 4-NP provoca modificazioni neuroendocrine significative tali da determinare chiari effetti di femminilizzazione; questi effetti alterano in maniera significativa l'equilibrio dinamico delle popolazioni naturali.

E' stata quindi intrapresa la ricerca sul *Carassius auratus* allo scopo di chiarire se ERβ1, il tipo di ER maggiormente coinvolto nella regolazione della funzione ovarica, sia anche coinvolto nella regolazione della vitellogenesi e nell'interazione ERs-xenoestrogeni.

Esemplari di *Carassius auratus* sono stati trattati con estradiolo-17β e con 4-nonilfenolo (4-NP); quindi è stato determinata la VTG plasmatica mediante ELISA, l'espressione di ERβ1 nel fegato mediante Northern Blot e RT-PCR semiquantitativa ed il bioaccumulo nei tessuti.

Anche *Carassius auratus* si è dimostrato un buon modello sperimentale; in particolare le variazioni dell'espressione del recettore ERβ1 consentono non solo di chiarire il meccanismo d'azione del 4-NP, ma anche di poter utilizzare il recettore ERβ1 come marker biomolecolare di effetti xenoestrogenici. Le analisi poi condotte mediante GC-MS sostengono in maniera chiara le problematiche inerenti il bioaccumulo e la biodisponibilità su cui sarà importante indagare mediante l'applicazione di altre metodiche biomolecolari.

La tecnologia dei microarrays è mirata essenzialmente allo studio dell'analisi funzionale del genoma. In particolare questa metodica permette di esaminare rapidamente l'espressione differenziale di più geni di un organismo, di un tessuto o di un tipo cellulare, sottoponendo a screening centinaia o migliaia di geni contemporaneamente.

Il DNA microarray, nel contesto preso in esame, viene utilizzato per identificare e caratterizzare la risposta di una determinata specie acquatica ad una perturbazione, come l'esposizione a sostanze xenoestrogene presenti nell'ambiente, e lo studio di genomica funzionale applicato agli ED è in corso sul modello sperimentale zebrafish (*Danio rerio*).

I DISTRUTTORI ENDOCRINI COME AGONISTI O ANTAGONISTI AL RECETTORE DEGLI ESTROGENI α (ERα) A LIVELLO CAVEOLARE E LORO RUOLO NELLA RISPOSTA ANGIOGENICA

V. Tomasi, T. Guarnieri, S. Tavolati - Dipartimento di Biologia Sperimentale, Università di Bologna

La partecipazione dell'estradiolo (E_2) alla regolazione della trasduzione del segnale è stata dimostrata in modo convincente dalla identificazione di un recettore di membrana (ERα) che in diverse cellule è legato alla caveolina-1. E' noto anche che i distruttori endocrini si possono comportare come agonisti o antagonisti di steroidi sessuali, spesso capaci di modificare rapidamente eventi tipici della tasduzione del segnale. Mediante impiego della fluorescenza polarizzata, nel nostro laboratorio abbiamo valutato la capacita' di una serie d policlorobifenili (PCB), noti per essere distruttori endocrini, di interagire con ERα calcolandone la costante di associazione Ka. Mediante western blotting è stato inoltre stabilito che l'occupazione del recettore è seguita alla fosforilazione della ERK 1/2 e che il grado di fosforilazione è in rapporto all'attività agonista o antagonista dei singoli PCB.
Sono in corso ricerche per connettere il comportamento a livello recettoriale dei PCB con la ben nota capacità dei componenti caveolari di influenzare l'angiogenesi in cellule endoteliali. A tale scopo è stato messo a punto un nuovo saggio angiogenico basato sull'impiego di cellule endoteliali e muscolari lisce che permette di valutare l'effetto di composti anche a distanza di settimane. In questo saggio si puo' confrontare l'attività angiogenica di un potente stimolatore come il vascular endothelial growth factor (VEGF) con l'attività dei singoli PCB. Questi risultati sono stati estesi di recente secondo le seguenti linee di ricerca:

1) Effetto dei PCB sulla traslocazione di ERα dal citosol al nucleo e alle caveole in rapporto alla palmitoilazione di residui specifici di cisteina.
2) Ruolo dei recettori ERα e ERβ nella regolazione dell'angiogenesi.
3) Estensione dei dati ottenuti ad altri distruttori endocrini (xenobiotici o composti naturali) capaci di mimare o antagonizzare gli ormoni sessuali.

L'APPROCCIO MODELLISTICO QSAR (*QUANTITATIVE STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIPS*) AGLI INTERFERENTI ENDOCRINI

Paola Gramatica– Unità di Ricerca di QSAR in Chimica Ambientale – DBSF – Università degli Studi dell'Insubria – Via J.H. Dunant 3, 21100 Varese paola.gramatica@uninsubria.it; http://www.qsar.it

Il numero e la quantità di composti chimici presenti nell'ambiente è aumentato in modo considerevole con la crescente industrializzazione, mentre non è cresciuta di pari passo la conoscenza di tutte quelle proprietà chimico-fisiche, reattività ambientali e diverse attività biologiche (tossicità acute e croniche), che consentirebbero una corretta gestione di tali sostanze.
E' infatti cresciuto in modo esponenziale il rischio per la salute dell'uomo, e dell'ambiente in senso lato, determinato da composti chimici in grado di alterare diversi processi biologici, come ad esempio il sistema ormonale dell'uomo e degli animali, determinando conseguenze indesiderate e spesso, purtroppo, impreviste.
L'attenzione del mondo scientifico sul problema dell'impatto delle sostanze chimiche, presenti nell'ambiente, sulla fertilità e sul sistema endocrino in generale è stata sollecitata a partire dai primi anni '90 [1,2] . Da allora si sono approfonditi gli studi e sviluppate le iniziative a vari livelli, di base e decisionali per avere maggiori conoscenze, da un lato, e maggiori possibilità di intervento, dall'altro, riguardo al problema degli interferenti endocrini (più noti con il termine inglese di *Endocrine Disrupting Chemicals, EDCs*), cioè, secondo la definizione WHO/OECD, di quelle "sostanze esogene con proprietà tali da causare conseguenze sulla salute di un organismo o della sua progenie, a seguito di cambiamenti nelle funzioni endocrine". E' indubbio che esistano tra i 70.000 composti chimici inclusi nell'americano TSCA (*Toxic Substances Control Act*) o tra le 100.000 dell'EINECS (*European Inventory of Existing Commercial Substances*) molte molecole in grado di interferire con gli ormoni, portando a sviluppo anormale, disfunzioni riproduttive e in alcuni casi al cancro, ma è proprio il numero troppo elevato delle sostanze, che dovrebbero essere testate, per ottenere evidenze sperimentali riguardo a diverse risposte biologiche indicative di questo fenomeno (ad es. la interazione con il recettore degli estrogeni), a imporre delle scelte orientative. In America *l'Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Commmittee* (EDSTAC) [3] dell'EPA (*Environmental Protection Agency*) svolge proprio questo compito dal 1996. L'attività di interferenti endocrini può essere determinata con parecchi *tests* sia *in vitro* sia *in vivo*, ma gli esperimenti necessari sono molte dispendiosi in termini di costi, tempi e risorse umane e strumentali (*range* di costo stimato per una singola sostanza: 200-300.000$), è quindi essenziale una fase preliminare di messa a punto di metodi predittivi per lo screening e la prioritizzazione dei composti di maggior pericolo, sui quali concentrare gli esperimenti.
Le metodologie QSAR (*Quantitative Structure-Activity Relationships*) si basano sull'assunto che la struttura molecolare di un composto chimico ne determini il comportamento chimico-fisico e biologico [4], che sia possibile, a partire da un numero relativamente limitato di dati sperimentali noti per molecole con struttura chimica ben definita, trovare una relazione matematica tra la risposta sperimentale studiata e la struttura molecolare e sviluppare quindi un modello matematico, in grado di predire la stessa risposta modellata anche per molecole non testate o addirittura non ancora sintetizzate. Le metodologie QSAR sono state infatti sviluppate ed hanno trovato le principali applicazioni in ambito farmaceutico nel *Drug Design* per la progettazione e la sintesi di farmaci sempre più attivi e con minor effetti collaterali. In tempi più recenti le stesse metodologie hanno trovato ampie e differenziate applicazioni anche in campo ambientale, per la valutazione degli effetti indesiderati dei composti chimici [5]. La filosofia alla base del QSAR è che la prevenzione è sempre meglio del rimedio e che sia quindi importante "imparare" da ciò che già si conosce (i dati sperimentali noti, già acquisiti) per predire quello che ancora non si conosce, indirizzando quindi l'attenzione sulle molecole stimate, dai modelli QSAR, come più pericolose.
Le metodologie QSAR richiedono di avere a disposizione tre elementi fondamentali: a) una base di dati sperimentali di buona qualità, il più possibile omogenei e rappresentativi di una sufficiente varietà strutturale, b) descrittori molecolari in grado di tradurre in numeri i diversi aspetti della

struttura chimica, c) metodi matematico/statistici di regressione o classificazione (metodi chemiometrici) per trovare la relazione Struttura-Attività, sviluppare il modello matematico e validarlo per verificarne le capacità predittive [6]. In anni recenti sono stati sviluppati modelli QSAR per predire le capacità di interazione di diverse composti chimici con varie strutture biomolecolari, nel caso in esame soprattutto con il recettore per gli estrogeni, ma anche per gli androgeni. I modelli più comunemente sviluppati sono dei modelli 3D-QSAR che utilizzano come descrittori molecolari le informazioni strutturali tridimensionali nell'analisi CoMFA (*Comparative Molecular Field Analysis*) [7], ma anche altri approcci di modellizzazione relativamente più semplici hanno dato buoni risultati [8]. E' importante segnalare che un importante metodo di *screening* basato sulla struttura molecolare e sull'approccio QSAR, messo a punto da ricercatori della *Food and Drug Administration* (FDA) [9], ha permesso di ridurre il numero dei potenziali EDCs da 58.000 a 3600, quindi con una riduzione al 6% dei composti che più necessiterebbero di verifiche sperimentali. E'evidente che questo è ancora un numero troppo elevato e che quindi ulteriori sforzi del QSAR nella prioritizzazione devono ancora essere programmati e portati a termine. L'approccio QSAR viene ora accettato anche dal nuovo sistema europeo per la registrazione dei composti chimici (REACH) [10], nel quale gli intereferenti endocrini richiedono il massimo livello di attenzione. Tra i potenziali interferenti endocrini, oltre ai più noti composti steroidei (es. estradiolo, progesterone) e non steroidei (fitoestrogeni, dietilsilbestrolo-DES), si possono considerare composti con una vasta varietà strutturale: fenoli (i più famosi: nonilfenolo e bisfenolo A), PCB, flavonoidi, pesticidi (insetticidi come il DDT, antialgali come il TBT, ecc.), plastificanti come gli ftalati ed anche alcuni farmaci, più di recente evidenziati come un problema di inquinamento ambientale.
Il problema degli interferenti endocrini, ad oltre un decennio dalla presa di coscienza del problema, è ancora apertissimo [11], necessita di un approccio integrato che combini diverse metodologie, tra cui un posto di rilievo hanno senza dubbio le metodologie predittive QSAR per "scoprire" nuove sostanze con queste caratteristiche indesiderate e soprattutto evitare di ripetere errori del passato nella sintesi di nuove sostanze.

Bibliografia

[1] RM. Sharpe**.** Are Environmental Chemicals a Threat to Male-Fertility? *Chem. & Ind.* (*3*) 88 3, 1992.
[2] T.Colborn, FSV. Saal, AM. Soto. Developmental Effects of Endocrine-Disrupting Chemicals in Wildlife and Humans. *Environ. Health Persp. 101*, 378-384, 1993. Times Cited: 1019
[3] http://www.epa.gov/scipoly/oscpendo/edspoverview/edstac.htm
[4] C.Hansch, A.Leo, "*Exploring QSAR*"; ACS Press, 1995, p. 557.
[5] P.Gramatica. QSAR approach to the evaluation of chemicals. *Chem. Today*, 18-24, 2001.
[6] A.Tropsha, P. Gramatica, V.K. Gombar. The Importance of Being Earnest: Validation is the Absolute Essential for Successful Application and Interpretation of QSPR Models. *QSAR &Comb. Sci.., 22*, 69-77, 2003.
[7] H.Hong, H.Fang, Q.Xie, R.Perkins, D.M.Sheehan, W.Tong, CoMFA Model Using a large Diverse Set of Natural, Synthetic and Environmental Chemicals for Binding to the Androgen Receptor. *SAR & QSAR Environ.Res*., 14, 373-388, 2003.
[8] AH.Asikainen, J.Ruuskanen, KA.Tuppurainen, Consensus kNN QSAR: A Versatile Method for Predicting the Estrogenic Activity of Organic Compounds In Silico. *Environ. Sci. Technol., 38*, 6724-6729, 2004.
[9] L.Shi, W.Tong, H.Fang, Q.Xie, H.Hong, R.Perkins, et al., An Integrated "4-phase" Approach for Setting Endocrine Disription Screening Priorities- Predictions of Estrogen Receptor Binding Affinity. *SAR & QSAR Environ. Res*., 13, 69-88, 2002.
[10] http://europa.eu.int/comm/environment/chemicals/reach.htm
[11] IUPAC Special Topic Issue on the Implications of Endocrine Active Substances for Humans and Wildlife, *Pure and Appl. Chem*., 75, 1617-2615.

“SVILUPPO ED UTILIZZO DI BIOMARCATORI”

STRATEGIE PER LO SVILUPPO E LA CARATTERIZZAZIONE DI BIOMARKERS PER INTERFERENTI ENDOCRINI

Antonio Menditto, Dipartimento di Sanità alimentare ed animale, Istituto Superiore di Sanità

La valutazione del rischio per la salute umana derivante dall'esposizione ai composti chimici, inclusi quelli classificati come in grado di interferire con il sistema endocrino, prevede quattro distinte fasi: l'identificazione dei pericoli, la valutazione della relazione dose-risposta, la valutazione e la stima dell'esposizione connessa con l'uso della sostanza e infine la caratterizzazione del rischio. A sua volta, la valutazione dell'esposizione si avvale dell'informazione ottenuta dalla misurazione dei livelli di esposizione sia esterna, in varie matrici ambientali quali alimenti, aria, acqua e suolo (monitoraggio ambientale), che interna (monitoraggio biologico, MB).
Il MB consiste nella misurazione, continua o ripetuta, di sostanze potenzialmente tossiche, o dei loro metaboliti, o degli effetti biochimici —nei tessuti, nelle secrezioni, nelle escrezioni o nell'aria espirata, o loro combinazioni— al fine di valutare l'esposizione e i rischi per la salute attraverso un confronto con appropriati valori di riferimento sulla base della conoscenza della probabile relazione causale tra l'esposizione e i risultanti effetti dannosi sulla salute.
I parametri oggetto delle misurazioni nell'ambito del MB sono indicati con il nome di biomarker (BM) o indicatori biologici ed includono parametri di natura chimica, biochimica, fisiologica o comportamentale, misurabili nella specie umana. La loro funzione è quella di rilevare un evento che può influenzare o predire l'insorgenza e/o l'evoluzione di una malattia, e sono fondamentali al fine di stabilire un nesso causale tra l'esposizione umana a sostanze tossiche e il manifestarsi di alterazioni funzionali o morfologiche. I BM sono classificati in BM di esposizione (indicatori di dose interna e indicatori di dose biologicamente efficace), BM di effetto e BM di suscettibilità. Per quanto riguarda i BM di pertinenza laboratoristica, la loro misurazione viene effettuata in una ampia gamma di matrici biologiche di provenienza umana (per es., urine, sangue intero, siero, capelli, unghie, denti decidui, latte materno, saliva, meconio, aria espirata, sangue dal cordone ombelicale, ecc.). Per ogni BM e per ogni matrice, i risultati della misura ottenuti dovrebbero essere confrontati con degli appropriati valori di riferimento, derivati in genere da studi eseguiti su campioni tratti da popolazioni di soggetti non esposti.
I BM di esposizione sono in genere rappresentati dai composti chimici come tali o dai loro metaboliti (indicatori di dose); fra i BM di esposizione devono essere compresi anche gli indicatori che riflettono, a livello molecolare, gli effetti indotti dagli stessi composti chimici o dai loro metaboliti (indicatori di dose biologicamente efficace). Questi ultimi indicatori sono particolarmente importanti in quanto riflettono la frazione biologicamente attiva degli xenobiotici, ossia la frazione in grado di interagire con le macromolecole a livello dell'organo bersaglio. Sono rappresentati soprattutto dagli addotti che si vengono a formare tra un agente chimico e gli acidi nucleici o le proteine.
I BM di effetto si riferiscono ad alterazioni biochimiche o funzionali misurabili e reversibili a carico degli organi bersaglio. Sono in genere degli indicatori preclinici di condizioni patologiche. Possono essere specifici o aspecifici. Gli indicatori non specifici integrano l'effetto dovuto all'esposizione a più composti chimici. Tra i BM di effetto i più utilizzati sono quelli relativi alla funzione dei vari organi (per esempio beta2-microglobulina e cistatina C per la funzionalità renale) e delle ghiandole endocrine (ad es. dosaggio degli ormoni tiroidei e degli ormoni steroidei) quelli collegati al danno citogenetico (per es. 8-ossi-deossi-guanosina nelle urine; il test COMET, le rotture e le aberrazioni cromosomiche). Sono considerati BM di effetto anche le alterazioni del normale sviluppo fisiologico (per es. le alterazioni dello sviluppo sessuale quali il ridotto volume dei testicoli, la ritardata o anticipata comparsa dei caratteri sessuali secondari, ecc.).
I BM di suscettibilità sono un indice della predisposizione, ereditaria o acquisita, di un singolo individuo a subire gli effetti di uno xenobiotico o di un gruppo di composti chimici. A differenza dei geni associati a malattie ereditarie, i geni di suscettibilità sono in grado di modificare il rischio

per un effetto avverso allorché vi sia esposizione ad agenti chimici pericolosi; ma di per sé non sono né necessari né sufficienti nel determinare la patologia.
In generale, gli studi epidemiologici che utilizzano i BM rientrano nell'ambito degli studi appartenenti all'epidemiologia molecolare, la cui finalità è quella di stabilire un nesso tra il manifestarsi di patologie e l'esposizione a sostanze tossiche. Gli studi di epidemiologia molecolare che utilizzano i BM sono simili agli studi epidemiologici tradizionali per quanto riguarda il disegno, l'analisi e l'interpretazione. Necessitano tuttavia, in una fase preliminare, di studi volti allo sviluppo e alla validazione dei BM stessi (studi transizionali), il cui scopo è quello di caratterizzare il BM piuttosto che il fenomeno biologico di cui il BM stesso è espressione. Gli studi transizionali a loro volta si dividono in studi di sviluppo, studi di caratterizzazione e studi applicati.
Gli studi di sviluppo consistono in studi che prevedono la valutazione delle caratteristiche di affidabilità del metodo —specificità, limiti di rivelabilità e quantificazione, esattezza, precisione, sensibilità, intervallo di linearità, robustezza, incertezza di misura — quando applicato a campioni di origine umana (validazione analitica sul campo), e in studi di valutazione delle procedure per la raccolta, il trattamento, l'analisi e la conservazione dei campioni.
Gli studi di caratterizzazione prevedono il dosaggio del BM in campioni di popolazioni umane per lo studio della variabilità biologica (inter- e intra- individuale) e la definizione dei valori di riferimento, dei fattori di confondimento (endogeni ed esogeni) e dei modificatori di effetto.
La validazione sul campo (*field validation*) avviene attraverso l'esecuzione di studi transizionali applicati di tipo epidemiologico che possono permettere la valutazione delle relazioni tra livelli di esposizione (attraverso BM di dose), dose biologica efficace, effetto biologico precoce, alterazioni strutturali o funzionali (attraverso BM di effetto) e infine l'occorrenza di esiti e patologie conclamate. Per quanto riguarda i BM di effetto, il disegno di uno studio transizionale sul campo, volto a validare un BM come predittivo di esiti, è più complicato rispetto a quelli volti a validare i BM di esposizione. Nel caso dei BM di effetto una risposta precede la comparsa di un esito che può essere raro nella popolazione oggetto dello studio. Il più efficace disegno sperimentale è uno studio longitudinale di coorte, ma spesso l'esito —che costituisce la variabile indipendente— oltre a essere raro ha luogo molto tempo dopo la risposta del BM. Per questo motivo, gli studi di questo tipo devono essere ampi e devono durare per un lungo periodo di tempo, cosa che molto spesso può risultare impossibile. Un valido compromesso per la validazione dei marcatori di effetto è l'esecuzione di studi caso-controllo nidificati. In questo caso i campioni biologici vengono raccolti in momenti appropriati dopo l'esposizione e conservati fino al manifestarsi, nei soggetti dello studio, degli esiti di interesse. Nell'ambito degli studi transizionali applicati trovano un loro specifico utilizzo i BM di suscettibilità. Conclusa la fase di validazione, i BM trovano applicazione nelle diverse tipologie di studi epidemiologici a carattere osservazionale, siano essi di coorte o longitudinali, trasversali o di prevalenza, oppure studi di tipo caso-controllo.
Attualmente le nuove discipline '-omiche' (genomica e proteomica, tossicogenomica), quando applicate a studi di epidemiologia molecolare, permettono di stimare direttamente (utilizzando il DNA) o indirettamente (utilizzando l'RNA) e in singoli esperimenti i cambiamenti nell'espressione in un gran numero di geni/proteine indotti da xenobiotici. Per esempio, tali discipline permettono di studiare la variabilità interindividuale nei geni (polimorfismo) codificanti gli enzimi coinvolti nel metabolismo (di prima e seconda fase) sulla dose biologicamente attiva degli xenobiotici. La presenza di geni che codificano enzimi con funzionalità ridotta o aumentata possono, a parità di dose assorbita, modificare il rischio di comparsa di effetti avversi per la salute associati alla presenza, nel singolo soggetto, di polimorfismi che comportano una aumentata suscettibilità individuale. La metodica dei DNA microarray è una nuova tecnica di biologia molecolare che sta rapidamente trovando applicazione negli studi di tossicogenomica. Si tratta di una tecnologia ad alta capacità che permette l'analisi d'espressione di molti geni in maniera simultanea e in uno stesso esperimento; il confronto contemporaneo dell'espressione genica tra campioni di controllo (*in vitro*) o sani (*in vivo*) e campioni trattati o esposti a xenobiotici, potrebbe permettere l'identificazione e la definizione di prodotti d'espressione candidati come nuovi BM.

BIOMARCATORI DI ESPOSIZIONE A INTERFERENTI ENDOCRINI

Claudio Minoia - Laboratorio di Misure Ambientali e Tossicologiche, Fondazione S. Maugeri, Clinica del Lavoro e della Riabilitazione, Istituto Scientifico di Pavia

In una recente pubblicazione della *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) la problematica sempre più emergente degli interferenti endocrini è stata riesaminata criticamente, anche introducendo nuove definizioni di *Endocrine Disruptor* e di *Potential Endocrine Disruptor* rispetto a quanto proposto dallo *European Workshop on the Impact of the Endocrine Disruptors on Human Health and Wildlife* tenutosi nel 1996 e del rapporto finale EPA su *Endocrine Disruptor Screening Testing Advisory Committee* (EDSTAC) pubblicato nel 1998.
Nello studio dei possibili effetti di sostanze interferenti endocrini (EDCs) una priorità è senza dubbio l'identificazione di biomarcatori di esposizione in grado di evidenziare situazioni anomale. Questa considerazione pone due ulteriori necessità: la prima relativa alla esigenza di disporre per i biomarcatori di specifico interesse di "valori di riferimento" per gruppi di popolazione generale. La seconda, di tipo prettamente analitico, riguarda l'affidabilità dei metodi e in particolare la loro validazione ai livelli caratteristici dell'intervallo di riferimento. Un possibile percorso che recentemente accompagna la validazione delle procedure di analisi è quindi il calcolo dell'incertezza estesa che fornisce l'intervallo entro il quale cade il valore vero della misura, nell'ambito dei limiti di confidenza prestabiliti. Se si considera il parametro 3,5-dicloroanilina in urina (3,5-DCA), che può essere utilizzato come indicatore di esposizione a *Vinclozolin* studi recenti hanno dimostrato che il relativo valore di riferimento (per un gruppo di popolazione italiana) era pari a 0,316 □g/l (mediana), con una positività del 99%. L'intervallo dei valori osservati era compreso tra 0,019 e 4,532 □g/l, con un limite di rivelabilità di 0,01 □g/L. I requisiti del metodo in questo caso potrebbero prevedere, alla concentrazione mediana rilevata di 0,316 □g/L, un'incertezza estesa non superiore al 20%. E' evidente che l'applicazione di questi criteri ai metodi di analisi eleverebbe significativamente la qualità dei dati ottenuti, migliorando quindi l'affidabilità dei biomarcatori utilizzati. In questo contesto verranno quindi proposti i valori di riferimento in matrici biologiche per diversi xenobiotici con caratteristiche di EDCs al fine di creare una base di confronto metodologica e interpretativa dei dati ottenuti, anche per quanto riguarda soggetti professionalmente esposti. Tra le sostanze prese in considerazione risultano i policlorobifenili, gli ftalati, gli alchilfenoli etossilati, gli idrocarburi policiclici aromatici, il bisfenolo, fitoestrogeni, etc.
Attraverso quadri sinottici sarà possibile verificare limiti e vantaggi dei vari metodi, anche in rapporto al tipo di informazione tossicologica che è possibile ottenere. Parimenti si cercherà di evidenziare per quali indicatori sono ottenibili misure affidabili dei valori di riferimento, utilizzando quando disponibili valori di confronto (valori di riferimento) riferibili a gruppi di popolazione residenti in diversi paesi europei. Uno degli aspetti importanti dei valori di riferimento degli ECDs riguarderà lo studio delle variabili fisiologiche, alimentari e voluttuarie e in questo contesto l'introduzione alimentare di sostanze con caratteristiche di *Endocrine Disruptors* assume certamente un ruolo prevalente rispetto ad altre vie di assorbimento (ad es. per via inalatoria), in particolare per i microinquinanti organici persistenti. Ne deriva quindi la necessità di approfondire il significato di specifici bioindicatori rispetto al contenuto alimentare di *Endocrine Disruptors:* al riguardo un possibile *target* potrebbe essere l'identificazione di biomarcatori in grado di riflettere variazioni significative del contributo alimentare di EDCs, permettendo quindi l'individuazione di soggetti o gruppi a più elevato rischio espositivo. In questo ambito un importante contributo può derivare dagli studi di *Total Diet*, oggi sempre più frequenti, per cui è logico attendersi che l'utilizzo dei biomarcatori di esposizione a *Endocrine Disruptors* potrà subire un notevole impulso proprio in rapporto a più approfondite conoscenze della "reale" introduzione alimentare di xenobiotici e più in particolare di sostanze con caratteristiche di interferenti endocrini.

DISTRUTTORI ENDOCRINI:NUOVI BIOINDICATORI PER VALUTARE IL RISCHIO AMBIENTALE

Oliana Carnevali - Dipartimento di Scienze del mare, Università Politecnica delle Marche, Via Brecce Bianche, 60131 Ancona, o.carnevali@univpm.it

Ogni anno vengono immesse nell'ambiente più di 25.000 tonnellate di contaminanti industriali e agricoli; questi, attraverso le acque reflue, raggiungono i fiumi, quindi i laghi e i mari. Per questa ragione, l'ambiente acquatico è molto interessante perché qui compaiono le prime avvisaglie della presenza e dell'impatto dei vari inquinanti. Dal punto di vista biologico, lo studio di organismi acquatici in natura, quindi soggetti ad esposizione cronica ad una serie di xenobiotici, offre l'enorme vantaggio di fornire, in tempi e costi ragionevoli, indicazioni precise sulla presenza di una vasta gamma di inquinanti, anzi, per meglio dire, sulla loro biodisponibilità. Una volta accertata la presenza di xenobiotici in grado di provocare effetti biologici sugli organismi, fondamentali sono gli studi sulla capacità che tali organismi hanno di biomagnificare l'inquinante. La biomagnificazione consente agli inquinanti di entrare nella catena alimentare arrivando fino all'uomo, minacciando così la salute umana.

Molte delle sostanze inquinanti appartengono alla grande famiglia dei "distruttori endocrini" (ED), una categoria di contaminanti di origine sintetica che esplica il suo effetto tossico in seguito a bioaccumulo negli organismi. Queste sostanze interferiscono sulla fisiologia del sistema endocrino attraverso effetti sinergici o antagonisti con gli ormoni naturali (estrogeni, androgeni, ecc…) che regolano i processi riproduttivi e lo sviluppo embrionale. La presenza ambientale di EDs può quindi causare effetti negativi sulle performance riproduttive nonché l'insorgenza di tumori in quei tessuti che presentano i recettori per tali ormoni.

L'individuazione di bioindicatori per la valutazione del rischio ambientale è oggetto di studio in moltissimi laboratori. In questo studio di ecotossicologia riproduttiva saranno presentati e discussi i risultati sperimentali ottenuti nel teleosteo marino *Gobius niger*. Questo lavoro, svolto mediante tecniche molecolari, ha consentito di individuare risposte a breve e medio termine di sostanze xenobiotiche comunemente presenti nell'ambiente come l'alchilfenolo polietossilato nonilfenolo , sostanza estrogeno simile; il β-naftoflavone, composto diossina simile e il tamoxifen, composto antiestrogenico L'effetto di queste sostanze è stato studiato sia singolarmente che in cocktail in modo di valutare eventuali sinergismi/ antagonismi associabili agli inquinanti studiati. L'effetto è stato analizzato attraverso l'uso di bioindicatori classici: per i composti estrogeno simile sono state utilizzate la vitellogenina e le proteine della zona radiata, componenti sesso specifiche coinvolte nell'oogenesi. Per le sostanze diossina simile, è stato analizzato il citocromo P4501A1, coinvolto nel pathway di detossificazione. In questo studio sono stati anche individuati nuovi bioindicatori, la heat shock protein 70 (HSP70) e la catepsina D (CATD) la cui espressione è modulata sia da inquinanti estrogeno simile che da quelli diossina-simile. Di rilevante importanza è l'individuazione dell'esistenza di un crosstalk tra il pathway indotto dalle molecole estradiolo-like (riproduzione) e quello delle diossine-like (detossificazione). La molecola coinvolta nel crosstalk è il repressore del recettore degli idrocarburi arilici (AhRR) la cui espressione è aumentata da sostanze estradiolo-simile e ridotta da composti diossina-simile. Vista la capacità delle due più rappresentate classi di inquinanti ambientali di modulare in modo opposto l'espressione dell'AhRR, sono in corso studi ulteriori per validare l'uso di questa molecola come biomarker precoce per la valutazione di rischio ambientale attraverso un approccio di ecotossicologia molecolare.

CONTRIBUTI DELLA TAVOLA ROTONDA

MECCANISMI ANTIESTROGENICI DEL FLAVONOIDE NUTRIZIONALE NARINGENINA

Maria Marino
Dipartimento di Biologia, Università Roma Tre, Viale G. Marconi 446, 00146 Roma

E' stato ampiamente riportato che il flavanone naringenina (Nar), abbondante nella dieta Mediterranea, possiede effetti antiproliferativi in diversi tumori dipendenti dagli estrogeni (E2). Alla base di questi effetti sono stati proposti meccanismi molecolari di azione tra cui effetti antiossidanti, inibizione dell'attività chinasica e dell'assunzione di glucosio. In aggiunta è stata proposta, per questo composto nutrizionale, un'attività antiestrogenica i cui meccanismi molecolari non sono ancora stati chiariti. L'ipotesi avanzata nel presente lavoro è che gli effetti del flavonoide siano mediati da meccanismi molecolari coinvolgenti il recettore degli estrogeni (ER). Per valutare questa ipotesi sono state usate linee cellulari tumorali umane contenenti ERα endogeno (epatoma umano, HepG2) o transfettato (carcinoma epitelioide della cervice umana, HeLa). I risultati presentati mostrano che la naringenina sia un E2-mimetico sull'attività trascrizionale pur bloccando l'attivazione delle vie di segnale rapide. Questo disaccoppiamento delle attività di ERα indotto dalla naringenina può essere proposto come un nuovo meccanismo protettivo dei flavonoidi contro le forme di cancro dipendenti dagli estrogeni e apre la possibilità che questi composti nutrizionali possano agire nelle fasi di sviluppo dipendenti dagli ormoni come interferenti endocrini.

INTERFERENZE DELL'ACIDO GLICIRRIZINICO (LIQUIRIZIA) SULL'ATTIVITÀ MITOCONDRIALE EPATICA E CARDIACA E SUL PROFILO ORMONALE NELL'UOMO

M Palermo, M Salvi, V Battaglia, C Fiore, D Armanini, A Toninello

Studio in vitro

Effetti dell'acido glicerritinico (GE) e del carbenoxolone (Cbx) sulla funzionalità mitocondriale

L'acido glicerritinico (GE), un prodotto di idrolisi di uno dei principali componenti della liquirizia, cioè il glicoside triterpenico dell'acido glicirrizico, quando aggiunto a mitocondri isolati da fegato di ratto a concentrazioni micromolari (10 microM), induce swelling, perdita del potenziale di membrana, aumento del consumo di ossigeno, ossidazione dei piridin nucleotidi e rilascio del citocromo c (cyt c) e dell'AIF (apoptosis inducing factor). Questi fenomeni sono Ca^{2+} dipendenti e sono inibiti dalla presenza di ciclosporina A, acido bongkrekico e N-etilmaleimmide. Tutte queste osservazioni indicano che l'acido glicerritinico è un potente induttore della transizione di permeabilità mitocondriale e può attivare la via-pro-apoptotica tramite l'attivazione della cascata delle caspasi in seguito al rilascio del cyt c e dell'AIF [1].

L'induzione della transizione di permeabilità è causata da stress ossidativo indotto dal GE. Infatti, GE, interagendo con la catena respiratoria mitocondriale, provoca la generazione di acqua ossigenata che ossida gruppi tiolici critici per l'apertura del poro della transizione. Il gruppo reattivo del GE è l'ossigeno carbonilico in C-11 che, interagendo con un centro Fe/S del complesso I, genera un radicale responsabile dell'azione pro-ossidante [2].

Anche il Carbenoxolone (Cbx), un derivato del GE, che interagisce con i recettori dei mineralcorticoidi e dei glucocorticoidi, provoca nei mitocondri di fegato l'induzione della transizione di permeabilità, anche se gli effetti sono ridotti rispetto a quelli del GE. Infatti, l'ampiezza dello swelling prodotto dal Cbx 10 □M risulta inferiore a quella del GE alla stessa concentrazione, verisimilmente in seguito a una minor produzione di acqua ossigenata [3].

La differenza tra le due molecole è una coda succinica carica, presente nel Cbx, che rende la molecola più idrofilica e, quindi, meno permeabile, percui l'interazione con il sito critico nella membrana mitocondriale risulta impedita. Questo spiegherebbe la ridotta efficacia del Cbx ad indurre la transizione di permeabilità.

Dal punto di vista fisio-patologico i nostri risultati suggeriscono che "*in vivo*" gli effetti pro-apoptotici indotti dal GE [4, 5] possano essere mediati non solo come proposto dall' inibizione dell'enzima epatico 11beta-idrossisteroido deidrogenasi di tipo 1 coinvolto nel metabolismo dei glucocorticoidi, come proposto da alcuni studi [4, 5], ma anche in base all'induzione della transizione di permeabilità della membrana mitocondriale.

Poiché l'apoptosi viene anche considerata come un dispositivo di sicurezza attivabile dagli organismi per eliminare cellule anomale o danneggiate, le due vie utilizzate dal GE per indurre l'apoptosi potrebbero spiegare i parecchi effetti benefici esibiti dalla liquirizia e i componenti da essa derivabili, come antinfiammatori, antivirali e anticancerogeni [6].

Gli osservati effetti anticancerogeni potrebbero essere ascrivibili alle potenziali proprietà pro-apoptotiche attribuibili al GE, proprio perché l'induzione dell'apoptosi sarebbe lo scopo della terapia anticancro [7].

Attualmente sono in corso ulteriori studi in mitocondri isolati da diversi organi di ratto: per quanto riguarda i mitocondri di rene e cervello, il GE ha i medesimi effetti dimostrati nei mitocondri di fegato. Al contrario, in mitocondri isolati da cuore di ratto, il GE ha un opposto effetto a concentrazioni inferiori al 10 microM. In questo caso, infatti, il GE ha un effetto protettivo sul rigonfiamento e sull'ossidazione dei tioli dovuta al solo Ca^{2+}. La caduta del potenziale di membrana invece non viene ripristinata. Ulteriori studi sono ancora in corso per spiegare questi effetti.

Studio in vivo

Effetto della liquerizia sul profilo circadiano ormonale nel soggetto sano

La liquirizia è utilizzata da centinaia di anni come prodotto medico erboristico, nella preparazione di dolci ed è presente in un gran numero di alimenti. Il principio attivo è l'acido glicirrizico che è idrolizzato nel suo aglicole acido glicirritinico *in vivo*.

Tra gli effetti collaterali conosciuti durante l'ingestione cronica è la sindrome di pseudoaldosteronismo caratterizzata da ipertensione, ipokaliemia, alcalosi metabolica, bassa renina e bassi livelli di aldosterone. Il meccanismo fisiopatogenetico è duplice in quanto legato sia alla inibizione dell'enzima renale 11beta-HSD tipo 2, che normalmente metabolizza il cortisolo in cortisone, permettendo quindi al primo di occupare i recettori renali per i mineralcorticoidi, sia agendo direttamente su questi quando si raggiungono concentrazioni circolanti elevate del principio attivo.

Altro effetto descritto dell'ingestione di liquirizia è una ridotta concentrazione plasmatica di testosterone legata alla inibizione dell'enzima 17-idrossisteroidodeidrogenasi e 17-20 liasi con contemporaneo incremento degli ormoni a monte nella cascata enzimatica, A-dione e 17-OHP.

Scopo dello studio clinico è stato quello 1) di valutare l'effetto della liquerizia sul ritmo circadiano ormonale e 2) di determinare il valore dei singoli ormoni come concentrazione integrata durante la giornata mediante appositi programmi statistici.

In 8 volontari maschi sani, di età compresa fra 22 e 38 anni, abbiamo dosato il cortisolo e il cortisone plasmatico ed urinario, testosterone plasmatici, 17-OHP, A-dione e gonadotropine ogni due ore per dodici ore (dalle 8.00 alle 20.00) prima e dopo una settimana di somministrazione di liquirizia alla dose di 7.5 g/*die*, dosaggio dimostratosi attivo in precedenti esperimenti (si tratta di un prodotto del commercio contenente l'estratto secco delle radici, con un contenuto di acido glicirrizico pari a circa il 7.6% (W.W.).

Il valore del rapporto cortisolo/cortisone urinarie è risultato significativamente aumentato (0.27 pre-somministrazione; 0.62 post-somministrazione, $p<0.01$) dimostrando quindi un effetto inibitorio sull'11HSD2, sebbene senza variazione dei valori pressori. Non si sono registrate, invece, variazioni significative delle concentrazioni integrate giornaliere degli altri ormoni dosati, dopo sette giorni di terapia, rispetto al valore basale. Solo il testosterone ha mostrato una modesta riduzione, senza arrivare però alla significatività statistica ($p<0.063$). È possibile che la liquirizia, se somministrata cronicamente, metta in funzione meccanismi compensatori, come un modesto incremento della secrezione gonadotropinica, tali da compensare l'inibizione della produzione del testosterone causata dal blocco parziale degli enzimi 17-idrossisteroidodeidrogenasi e 17-20 liasi. È verosimile che l'assunzione di liquirizia non rivesta importanza clinica per i livelli di testosteronemia nell'uomo.

Bibliografia

1. M. Salvi, C. Fiore, D. Armanini, A. Toninello, Glycyrrhetinic acid-induced permeability transition in rat liver mitochondria, Biochem. Pharmacol. 66 (2003) 2375-9.
2. C. Fiore, M. Salvi, M. Palermo, G. Sinigaglia, D. Armanini, A. Toninello On the mechanism of mitochondrial permeability transition induction by glycyrrhetinic acid. Biochim Biophys Acta. 1658(2004) 195-201.
3. M. Salvi, C. Fiore, V. Battaglia, M. Palermo, D. Armanini, A. Toninello. Carbenoxolone Induces Oxidative Stress in Liver Mitochondria, Which Is Responsible for Transition Pore Opening. Endocrinology 146(2005) 2306–12.
4. H. Horigome, M. Homma, T. Hirano, K. Oka, Glycyrrhetinic acid induced apoptosis in murine splenocytes, Biol. Pharm. Bull. 24 (2001) 54-58.
5. H. Horigome, A. Horigome, M. Homma, T. Hirano, K. Oka, Glycyrrhetinic acid-induced apoptosis in thymocytes: impact of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase inhibition, Am. J. Physiol. 277 (1999) E624-630
6. Wang ZW, Nixon DW. Licorice and cancer. Nutr Cancer 2001; 39: 1-11.
7. Evtodienko YV, Teplova VV, Azarashvily TS, Virtanen I, Saris N-EL. Mechanisms of the resistance to the mitochondrial permeability transition in tumour cells. Pathophysiology 1996; 6: 171-178.

INTERFERENTI ENDOCRINI E RISCHIO AMBIENTALE: ASPETTI RIPRODUTTIVI, NERVOSI ED IMMUNITARI IN DIVERSI MODELLI SPERIMENTALI

L. Canesi, C. Falugi, A. Mandich, G. Tagliaferro - Dipartimento di Biologia, Università di Genova, Italy

La maggioranza degli inquinanti organici presenti nell'ecosistema acquatico svolge un ruolo di interferenti endocrini; anche se la loro azione può essere inferiore a quella degli ormoni naturali, le concentrazioni ambientali di queste sostanze contaminanti possono essere tuttavia sufficientemente elevate da determinare dannosi effetti biologici. Ad esempio, il fiume Po ed i suoi affluenti ricevono composti che possono agire come distruttori endocrini (ED) sulla popolazione ittica. Il fiume Lambro, uno degli affluenti del Po, raccoglie le acque provenienti da un bacino densamente abitato ed industrializzato; i siti localizzati a monte ed a valle della sua confluenza sono potenzialmente interessati da livelli diversi di sostanze che possono agire come ED. Le carpe, pesci d'acqua dolce ampiamente distribuiti nel sud europa, e recentemente proposte come specie sentinella in grado di tollerare acque altamente inquinate, sono usate sia in studi di campo che in laboratorio. Nell'ambito di un progetto finanziato dalla Comunità Europea, numerose carpe intersesso sono state prelevate a valle della confluenza del fiume Lambro con il Po; esse presentavano cisti spermatogeniche negli ovari e ovociti previtellogenici nei testicoli. Inoltre in esemplari maschi sono stati osservati elevati livelli plasmatici di vitellogenina (VTG) e di 17beta-estradiolo.
Larve di carpe esposte per lunghi periodi ad una miscela di sei diversi ED identificati nella frazione estrogenica proveniente dal fiume Lambro, mostravano alterata differenziazione gonadica ed alterate concentrazioni plasmatiche di VTG. Ricerche simili sugli invertebrati sono poco numerose mancando dati sufficienti sulla loro endocrinologia, sulla presenza di estrogeni e dei loro recettori, come anche sul meccanismo di azione degli ormoni e del loroo metabolismo. Data l'importanza degli invertebrati nell'ecosistema acquatico, abbiamo ritenuto utile investigare una completa serie di risposte a ED in specie ecologicalmente importanti, in modo tale da sviluppare opportuni biomarkers da utilizzare come strumenti diagnostici per valutare la interferenza endocrina in questi organismi. Attualmente esistono dati sempre più numerosi che mostrano come anche negli invertebrati, come nei mammiferi, le sostanze estrogeniche possano agire non solo sulla riproduzione, ma anche sul sistema immunitario e nervoso. In particolare, noi abbiamo recentemente messo in evidenza che, nel mitilo, il sistema immunitario rappresenta l'organo bersaglio per estrogeni naturali ed ambientali. In questa sede noi dimostriamo che i parametri immunitari possono essere efficacemente usati come biomarker per valutare composti estrogenici usati singolarmente o come miscele sia in vivo che in vitro. Inoltre l'aver messo in evidenza che alcuni pesticidi neurotossici possono alterare la metamorfosi del riccio di mare ed il rilascio di melatonina nel pesce zebrato, ci fa supporre che queste sostanze possano svolgere un ruolo anche come distruttori endocrini.