

PRINCIPALI EFFETTI DEGLI  
INTERFERENTI ENDOCRINI  
NELL'UOMO



Gianluca Tognon

## INDICE

<u>INTRODUZIONE.....</u>	<u>Pag. 3</u>
1) <u>Classificazione degli EDC.....</u>	<u>“ 5</u>
2) <u>La valutazione del rischio.....</u>	<u>“ 6</u>
3) <u>Aumento delle anomalie dell'apparato riproduttivo.....</u>	<u>“ 7</u>
4) <u>Strategie operative.....</u>	<u>“ 8</u>
<u>I METODI DI STUDIO.....</u>	<u>“ 13</u>
1) <u>Saggi in vitro.....</u>	<u>“ 14</u>
<u>Saggi in vivo.....</u>	<u>“ 16</u>
<u>SCHEDA: “L'uso del dosaggio della vitellogenina come</u>	
<u>biomarcatore per gli estrogeni ambientali”.....</u>	<u>“ 17</u>
2) <u>I modelli QSAR (“Quantitative Structure-Activity Relationship”).....</u>	<u>“ 18</u>
<u>ALCUNI CONCETTI TEORICI.....</u>	<u>“ 21</u>
1) <u>Cenni di endocrinologia.....</u>	<u>“ 22</u>
<u>SCHEDA: “I recettori per gli ormoni steroidei.....</u>	<u>“ 25</u>
2) <u>Cenni di metabolismo degli xenobiotici.....</u>	<u>“ 25</u>
<u>USI ED EFFETTI DELLE DIVERSE CLASSI DI EDC.....</u>	<u>“ 27</u>
1) <u>Farmaci come distruttori endocrini.....</u>	<u>“ 28</u>
2) <u>I fenoli.....</u>	<u>“ 28</u>
3) <u>Pesticidi.....</u>	<u>“ 30</u>
4) <u>Proprietà degli ftalati come distruttori endocrini.....</u>	<u>“ 36</u>
5) <u>I ritardanti di fiamma (“Brominated Flame Retardants, BFR”).....</u>	<u>“ 38</u>
6) <u>L'acido perfluorooctanico e i suoi sali.....</u>	<u>“ 42</u>
7) <u>Le diossine.....</u>	<u>“ 47</u>
<u>SCHEDA: “Cancro e diossina”.....</u>	<u>“ 47</u>
<u>SCHEDA: “Il recettore arilico”.....</u>	<u>“ 48</u>
<u>SCHEDA: “Il caso Seveso”.....</u>	<u>“ 48</u>
8) <u>Policlorobifenili (PCB).....</u>	<u>“ 49</u>
<u>SCHEDA: “EDC e cancro”.....</u>	<u>“ 52</u>
<u>CONCLUSIONI.....</u>	<u>“ 54</u>
<u>BIBLIOGRAFIA.....</u>	<u>“ 55</u>

### CHI È GIANLUCA TOGNON

*Laureato in Scienze biologiche con una tesi presso il CNR di Pavia. Specialista in ricerca farmacologica al Mario Negri di Milano. Assegnista presso il Dip. di Sicurezza alimentare UniMilano. Tra pochi mesi specialista in Sc. dell'Alimentazione all'UniPavia. Alcune pubblicazioni su riviste scientifiche internazionali. Collaboratore del Wwf Italia.*

# INTRODUZIONE

Nel corso del ventesimo secolo il mondo ha vissuto un'esplosione tecnologica e industriale senza precedenti che ha avuto però diverse conseguenze negative tra cui un rischio sempre crescente derivante dagli effetti dei prodotti e dagli scarti derivanti dall'industria, colpevoli spesso di esercitare spiacevoli effetti tossici, frequentemente sull'apparato riproduttore. Fu solo a metà degli anni '90 che si iniziò a concretizzare il concetto della "tossicologia riproduttiva" con l'avvento di maggiori e sempre più dettagliate conoscenze nel campo dei distruttori endocrini.

L'esposizione a sostanze chimiche nell'ambiente di vita e di lavoro e negli alimenti ha un posto di rilievo fra i fattori di rischio per la salute riproduttiva, considerando l'insufficienza delle conoscenze scientifiche disponibili per un'efficace prevenzione. La Commissione Europea e altri organismi internazionali (OECD, WHO) indicano in particolare come prioritario l'incremento delle conoscenze sugli "Endocrine Disrupting Chemicals" (EDC), un eterogeneo gruppo di sostanze caratterizzate dalla capacità potenziale di interferire, attraverso svariati meccanismi, con il funzionamento del sistema endocrino, in particolare con l'omeostasi degli ormoni sessuali e della tiroide. La riproduzione e lo sviluppo pre- e postnatale sono le fasi biologiche più sensibili agli effetti endocrini degli EDC. Studi epidemiologici suggeriscono che vi sia una correlazione fra esposizione a specifici gruppi di EDC e alterazioni dell'apparato riproduttivo, quali ad esempio malformazioni, infertilità, aumentato rischio di seminomi e di endometriosi. Lo spettro di patologie correlabili a questi composti è comunque molto ampio e comprende anche l'aumento del numero di aborti precoci associato all'esposizione lavorativa a pesticidi, effetti a lungo termine sulla funzionalità tiroidea o riproduttiva in seguito a danni indotti *in utero* o durante l'infanzia, patologie metaboliche correlabili con un'alterata omeostasi di estrogeni e androgeni.

Numerosi punti restano tuttavia ancora da chiarire, tra questi i meccanismi biologici alla base di tali correlazioni e gli eventuali fattori di suscettibilità e/o di rischio concomitanti. Manca in particolare una conoscenza approfondita dell'intero spettro di patologie potenzialmente associabili all'esposizione a EDC.

I distruttori endocrini sono sostanze che mimano gli ormoni endogeni o che interferiscono con la farmacocinetica o ancora che operano secondo entrambi i suddetti meccanismi.

La definizione classica e ormai unanimemente accettata di distruttore endocrino è la seguente:

*“Una sostanza esogena che interferisce con la produzione, il rilascio, il trasporto, il metabolismo, il legame, l'azione o l'eliminazione degli ormoni naturali dell'organismo responsabili del mantenimento dell'omeostasi e della regolazione dei processi di sviluppo”.*

I loro effetti indesiderati finora osservati, mediante studi *in vivo* e *in vitro*, sono la compromissione della capacità riproduttiva, la presenza di difetti morfologici o funzionali alla nascita, lo sviluppo del cancro alcune alterazioni del sistema immunitario e altri problemi ancora.

Le ricerche finora condotte nel campo dei distruttori endocrini hanno dato risultati che portano alle seguenti cinque conclusioni principali:

- 1) I livelli di esposizione sufficienti a causare profondi e significativi effetti a livello fisiologico in esperimenti di laboratorio non sono molto elevati.
- 2) I distruttori endocrini sono un gruppo di contaminanti persistenti e bioaccumulanti che si ritrovano all'interno di numerose classi di sostanze chimiche, dei quali fino a poco tempo fa si ignoravano gli effetti sul sistema endocrino.
- 3) L'esposizione dell'uomo a queste sostanze è ubiquitaria.

- 4) Tutti i sistemi ormonali finora esaminati sono risultati sensibili alla distruzione endocrina.
- 5) L'esposizione *in utero* a un numero crescente di sostanze chimiche ha avuto un grosso impatto sullo sviluppo producendo risultati visibili precocemente alla nascita o tardivamente in età adulta.

Molti composti sospettati di essere distruttori endocrini sono sostanze di ampio impiego ed economicamente importanti che quindi richiedono delle adeguate soluzioni per un loro utilizzo consapevole.

### 1) **Classificazione degli EDC.**

L'enorme quantità di composti che potrebbero interferire con il sistema endocrino umano e animale non ne facilita la classificazione. In via generale è possibile raggruppare questi composti in cinque categorie principali:

- 1) Farmaci o estrogeni sintetici (come ad esempio il 17- $\beta$  estradiolo o l'estrogeno sintetico dietilstilbestrolo, DES).
  - Fitoestrogeni, tra cui:
    - isoflavonoidi (genistein e daidzein della soia);
    - cumestani (coumestrol);
    - lignani (secoisolariciresinolo e matairesinolo);
    - stilbeni (resveratrolo dell'uva).
- 2) Pesticidi, a loro volta distinguibili in:
  - organofosforici;
  - carbammati;
  - ditiocarbammati;
  - piretroidi sintetici;
  - organoclorurati;
  - fenossiacetici;
  - erbicidi del gruppo dell'ammonio quaternario;
  - topicidi derivati dalla cumarina;
  - altri.
- 3) Plastificanti (in particolare, gli ftalati) e prodotti derivanti dalla combustione del PVC (ma anche della carta e delle sostanze putrescibili) come le diossine.
- 4) Sostanze di origine industriale come:
  - fenoli;
  - ritardanti di fiamma;
  - acido perfluorooctanico e suoi sali;
  - diossine;
  - alcuni metalli pesanti (piombo, cadmio e mercurio).

Sono stati dimostrati effetti estrogeno-simili (sia *in vivo* che *in vitro*) anche per alcune sostanze naturali (incluse alcune micotossine), potenzialmente presenti in diverse componenti della dieta.

Un altro modo di classificare queste sostanze è quello che prende spunto dalla loro origine. Distinguiamo pertanto composti di origine:

- 1) Naturale (fitoestrogeni ed estrogeni).
- 2) Sintetica, ulteriormente suddivisibili in:
  - estrogeni sintetici, a loro volta distinti in:
    - farmaceutici (dietilstilbestrolo);
    - industriali tra cui: pesticidi, conservanti, solventi e plasticizzanti;
  - antiestrogeni sintetici, a loro volta suddivisi in:
    - farmaceutici (tamoxifen);
    - industriali (diossine).

Gli EDC hanno carattere lipofilo e questo permette loro di diffondere attraverso la membrana cellulare, di legare eventualmente i recettori per gli ormoni steroidei e di accumularsi a livello del tessuto adiposo. Il loro bioaccumulo ha sicuramente una notevole importanza dal punto di vista tossicologico, ma per quanto riguarda ad esempio gli alimenti è da citare il fatto che attraverso la sostanza grassa consumata insieme alla carne, al latte, ecc., vengono assunte numerose di queste sostanze derivanti dall'inquinamento ambientale.

## **2) La valutazione del rischio.**

La valutazione del rischio per la salute umana e l'ambiente derivanti dall'esposizione a EDC deve tenere conto di due ordini di problemi. Il primo è la messa a punto di sistemi sperimentali *in vitro* e *in vivo* atti sia ad identificare con sufficiente sensibilità che a caratterizzare con precisione gli effetti sull'equilibrio endocrino. I metodi di studio attualmente utilizzati purtroppo non sono sempre adeguati a valutare eventuali effetti sul sistema endocrino, soprattutto nel caso di esposizioni che accadono in periodi di maggiore suscettibilità, quali particolari momenti dello sviluppo dell'organismo, allorché il sistema endocrino ha un ruolo chiave nel regolare processi essenziali sia fisiologici che morfologici.

Un altro problema da affrontare è quello di stabilire se nell'ambiente esistono livelli di EDC tali da esercitare un'azione negativa sulla salute della popolazione generale, considerando la presenza di situazioni di maggiore suscettibilità (la gravidanza, lo sviluppo intrauterino e il periodo postnatale) e di gruppi particolarmente esposti (ad esempio per attività lavorative o abitudini alimentari).

L'impatto sanitario e ambientale può essere considerevole se si tiene conto da un lato dei potenziali effetti sugli esseri viventi, osservati sperimentalmente anche per dosi relativamente basse e dall'altro dei molteplici usi agricoli e industriali e/o della presenza ubiquitaria e persistente nell'ambiente delle sostanze chimiche attualmente individuate come EDC, il cui numero del resto è probabilmente destinato ad aumentare.

La vastità del problema richiede la collaborazione tra esperti in varie discipline quali la tossicologia clinica, la medicina di laboratorio, la tossicologia sperimentale, l'ecotossicologia, la microanalisi chimica e l'epidemiologia nelle sue branche clinica, ambientale e molecolare. È necessaria inoltre una razionalizzazione degli sforzi, al fine di colmare quelle lacune nelle attuali conoscenze che hanno un'importanza critica così da poter fornire un valido supporto scientifico utile per una regolamentazione dei livelli massimi consentiti di esposizione alle sostanze considerate, per la definizione delle priorità e per prendere decisioni nel campo della

salute pubblica e della qualità dell'ambiente. Occorre acquisire solide conoscenze scientifiche riguardo:

- a) i livelli di inquinamento ambientale (da valutare attraverso adeguati programmi di monitoraggio);
- b) l'entità dell'esposizione della popolazione generale e dei gruppi a rischio (ad esempio sul luogo di lavoro) attraverso un adeguato programma di monitoraggio biologico;
- c) la relazione tra la dose assorbita e la prevalenza o l'insorgenza di condizioni patologiche attraverso l'effettuazione di adeguati studi epidemiologici;
- d) l'insorgenza di eventi/alterazioni patologiche in modelli sperimentali animali e/o cellulari.

### **3) Aumento delle anomalie dell'apparato riproduttivo.**

Negli ultimi decenni si è assistito, in alcuni paesi, ad un aumento dell'incidenza di tumori testicolari (tumori delle cellule germinali, seminomi) e ad un probabile aumento dell'incidenza di alcune anomalie del tratto genitale maschile, quali il criptorchidismo e l'ipospadia (anomalie del tratto genito-urinario che si determinano durante lo sviluppo fetale). Parallelamente, secondo alcuni autori, si sarebbe verificato un declino nella qualità dello sperma e un decremento del numero medio di spermatozoi per eiaculato.

È stata avanzata l'ipotesi che questi cambiamenti possano essere stati causati da un aumento del livello di EDC ad azione estrogeno-simile nell'ambiente. Sembrano inoltre esservi variazioni notevoli fra le varie aree geografiche. L'esperienza clinica dimostra che può esservi un'eziologia comune alla base di tutte le anomalie osservate: il seminoma e il criptorchidismo, così come l'ipospadia, sono spesso associate a un quadro istologico di alterazioni della spermatogenesi.

Le basi biologiche per la suscettibilità del testicolo agli effetti negativi dovuti ad un incremento degli estrogeni risiedono invece negli effetti di questi ormoni sullo sviluppo e la funzione delle cellule del Sertoli nel testicolo fetale. La proliferazione e la funzione delle cellule del Sertoli sono entrambi fenomeni controllati dall'ormone FSH (follicolo-stimolante) il quale regola probabilmente anche la secrezione dell'ormone antimulleriano, responsabile, nei maschi, della regressione dei dotti mulleriani (primordio embrionale dell'apparato genitale femminile). Una diminuzione nella secrezione di FSH causata da un aumento degli estrogeni nel circolo materno-fetale può avere pertanto un effetto negativo sulla proliferazione delle cellule del Sertoli e sulla secrezione dell'ormone antimulleriano. Un'alterata secrezione di tale ormone sembra portare a differenti tipi di condizioni intersessuali o al criptorchidismo, dato il suo ruolo nella fase addominale della discesa testicolare. Alcune evidenze suggerirebbero che l'ormone antimulleriano controlli anche la divisione delle cellule germinali primordiali: un'insufficiente produzione di tale ormone causerebbe l'abnorme proliferazione di cellule germinali e questo potrebbe potenzialmente condurre allo sviluppo, nella vita adulta, di carcinomi *in situ* (seminomi).

La moltiplicazione delle cellule del Sertoli avviene principalmente durante la via fetale fino alle prime fasi della vita neonatale, sotto il controllo dell'ormone FSH. Ogni cellula del Sertoli può nutrire un numero limitato di cellule germinali regolandone lo sviluppo verso lo stadio finale di spermatozoi maturi. Un numero ridotto di cellule del Sertoli è un fattore limitante per la spermatogenesi così come un loro anomalo funzionamento ha un impatto negativo sulle cellule del Leydig, sulla produzione di androgeni e sul normale sviluppo del fenotipo maschile del feto.

Gli eventi critici nello sviluppo testicolare accadono in un periodo molto precoce dello sviluppo fetale, quando l'incremento nei livelli di estrogeni circolanti nel sangue materno non ha ancora avuto luogo. Un aumento nei livelli basali di estrogeni in questa fase dello sviluppo può avere un effetto deleterio sullo sviluppo degli organi riproduttivi. Gli estrogeni endogeni sono legati, per mezzo di un legame ad alta affinità, alla SHBG ("Sex Hormone Binding Globulin") mentre gli estrogeni sintetici non lo sono, per questo gli estrogeni sintetici potrebbero produrre effetti biologici rilevanti anche se presenti a basse concentrazioni.

Nel caso particolare invece degli estrogeni ambientali, va osservato come tra le diverse modalità di esposizione, quella collegata alle abitudini alimentari ha, con molta probabilità, una notevole rilevanza. Il consumo di grassi pro-capite è stato trovato essere correlato in modo significativo al tasso di mortalità per il cancro della mammella ed è anche stata avanzata l'ipotesi che la dieta dei paesi industrializzati, quando paragonata a diete vegetariane o semi-vegetariane, sia alla base di una maggiore incidenza di altri tumori, oltre quello della mammella, cosiddetti ormone-dipendenti. Molti contaminanti ambientali in effetti, identificati come potenziali EDC, si accumulano nei tessuti e quindi negli alimenti di origine animale. Secondo alcuni autori l'effetto protettivo della dieta vegetariana è dovuto alla presenza, negli alimenti di origine vegetale, di elevate quantità di fitoestrogeni, soprattutto isoflavonoidi e lignani.

#### **4) Strategie operative.**

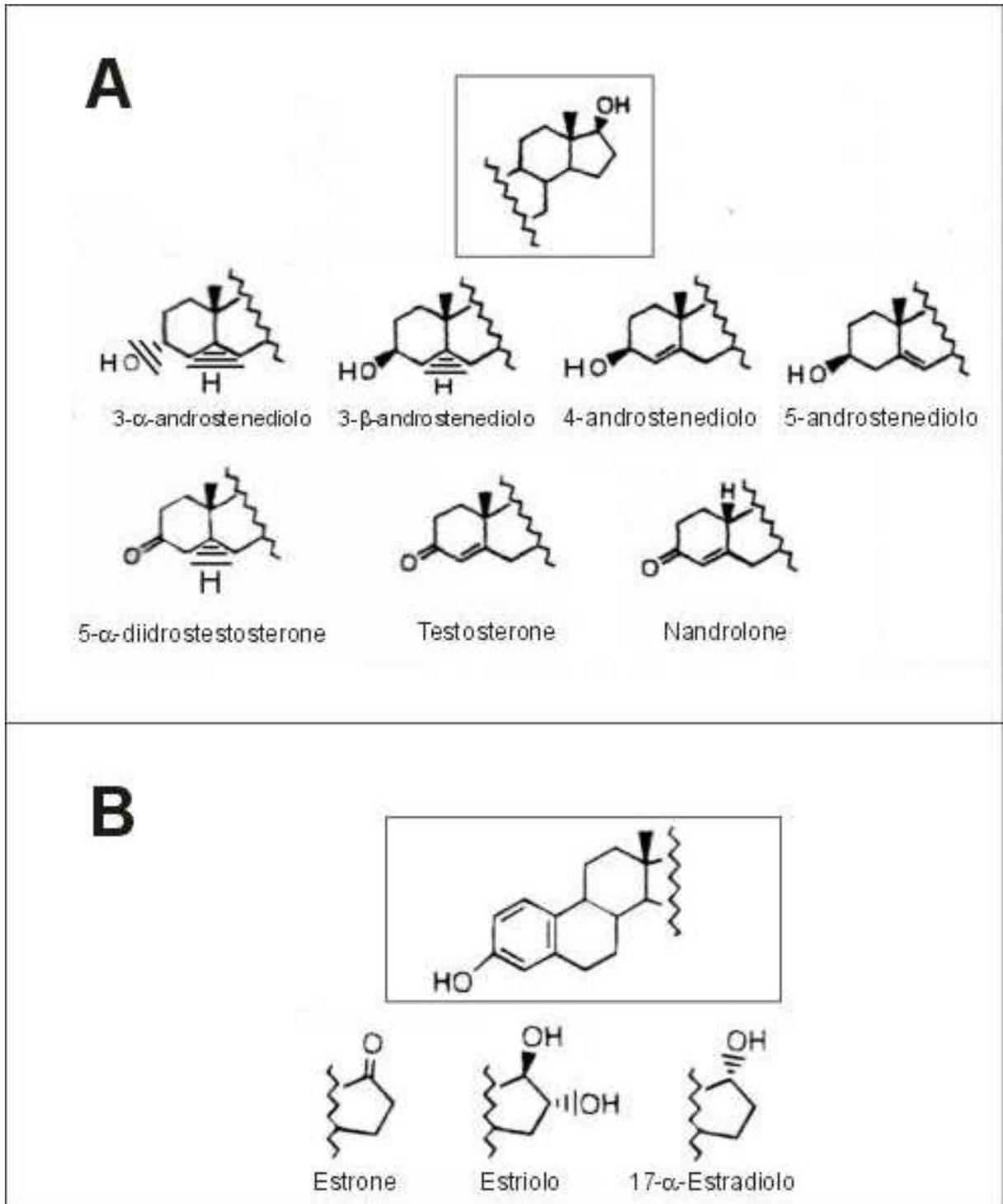
Al momento, quanto precedentemente esposto rimane un'ipotesi scientifica, sostenuta da autorevoli ricercatori sia europei che statunitensi, che deve essere sottoposta ad ulteriori verifiche.

Al fine di convalidare tali ipotesi sono necessari:

- a) studi epidemiologici retrospettivi, trasversali e prospettici, che riguardino sia gli esseri umani che gli animali, volti all'identificazione di variazioni nella prevalenza o nell'incidenza degli effetti negativi sulla salute ricollegabili all'azione degli EDC;
- b) una valutazione dei livelli di esposizione agli EDC sia nella popolazione generale che in gruppi di esposti (ad esempio in ambiente lavorativo), anche attraverso adeguati programmi di monitoraggio ambientale e di valutazione della presenza di residui tossici nei prodotti per l'alimentazione animale o umana;
- c) l'identificazione e la convalidazione di indicatori biologici che consentano una misura affidabile dei livelli di esposizione o la rivelazione della presenza di effetti subclinici;
- d) l'esecuzione di studi di laboratorio di carattere tossicologico per la verifica di ipotesi basate sia su studi epidemiologici che su risultati di osservazioni sul campo effettuate su popolazioni di fauna selvatica;
- e) la definizione di linee guida a valenza internazionale mirate all'individuazione e alla misura del potenziale associato alle sostanze chimiche di nuova introduzione e, se necessario, a quelle già in uso;
- f) la caratterizzazione di metodologie e modelli di valutazione del rischio derivante dall'esposizione contemporanea a diverse sostanze tossiche.

Le figure qui di seguito riportate illustrano le formule chimiche dei principali composti derivanti dalle attività antropiche che saranno oggetto di questa trattazione.

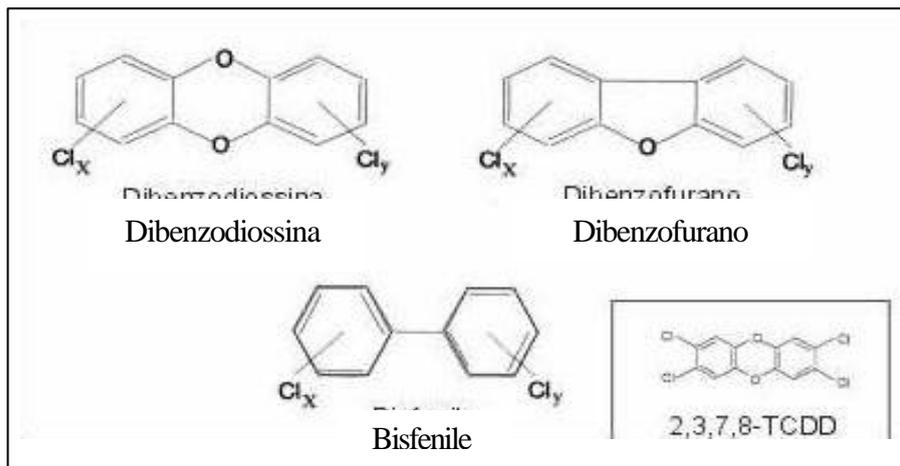
# Gli ormoni sessuali



**Figura 1:** Struttura chimica degli ormoni sessuali maschili (A) e femminili (B).

# I PRINCIPALI DISTRUTTORI ENDOCRINI (1)

## 1) Diossine.



## 2) Acido Perfluorooctanico e suoi sali.

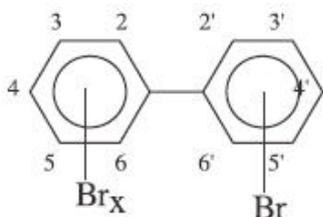


Acido	$X=OM^+$ ; $M=H$
Sale ammonio	$X=OM^+$ ; $M=NH_4$
Sale sodico	$X=OM^+$ ; $M=Na$
Sale di potassio	$X=OM^+$ ; $M=K$
Sale d'argento	$X=OM^+$ ; $M=Ag$
Acido fluoridrico	$X=F$
Estere metilico	$X=OM^+$ ; $M=CH_3$
Estere etilico	$X=OM^+$ ; $M=CH_2-CH_3$

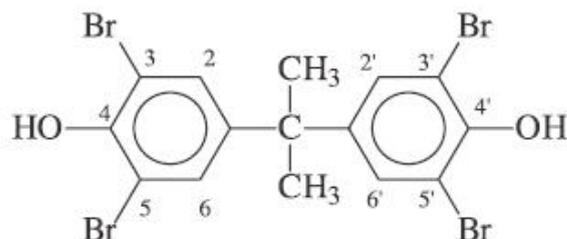
**Figura 2:** Struttura chimica dei principali EDC.

# I PRINCIPALI DISTRUTTORI ENDOCRINI (2)

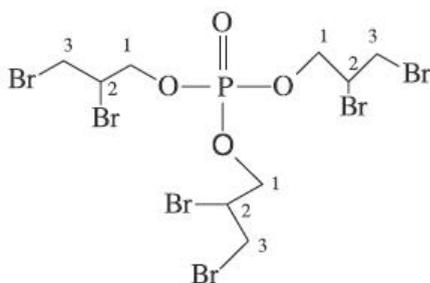
## 3) Ritardanti di fiamma.



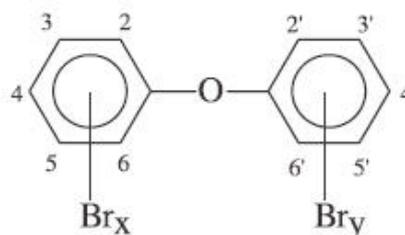
Difenili polibromurati (PBB;  $x + y = 6-10$ )



Tetrabromobisfenolo A (TBBP-A)



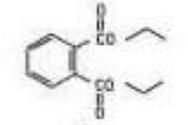
Tris(2,3-dibromopropil) fosfato (Tris)



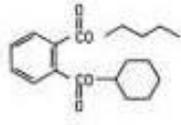
Polibromo-difenil-eteri (PBDE ;  $x + y = 3-10$ )

## 4) Ftalati

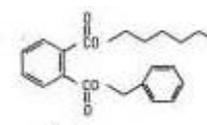
Dietil ftalato



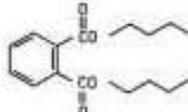
Butil cicloesil ftalato



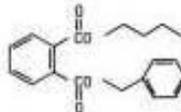
Isoxilbenzil ftalato



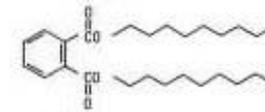
Dibutil ftalato



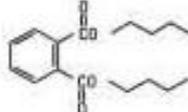
Butil benzil ftalato



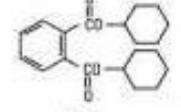
Diisononil ftalato



Difenil ftalato



Diisobutil ftalato



Ditridecil ftalato

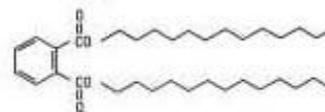
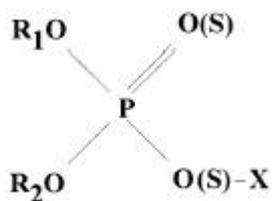


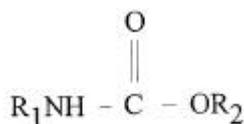
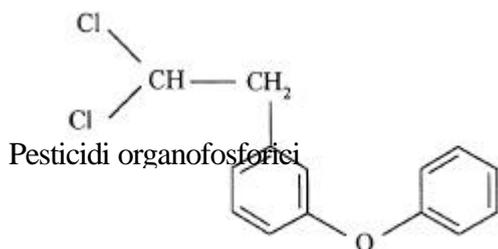
Figura 3: Struttura chimica dei principali EDC.

# I PRINCIPALI DISTRUTTORI ENDOCRINI (3)

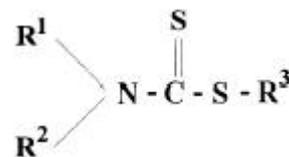
## 5) Pesticidi.



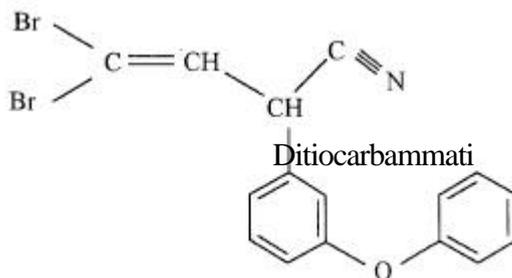
Tipo I



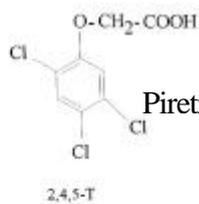
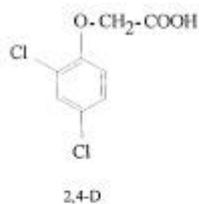
Carbammati



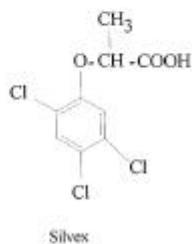
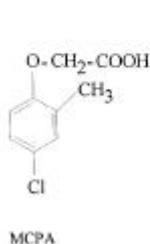
Tipo II



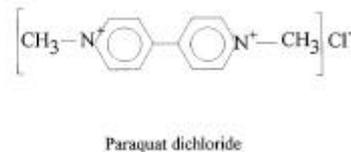
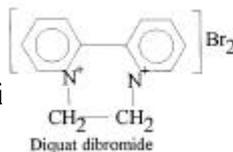
Pesticidi fenossiacetici



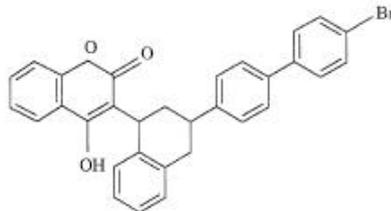
Piretroidi sintetici



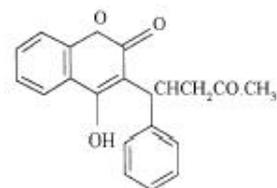
Gruppo dell'ammonio quaternario



Brodifacoum

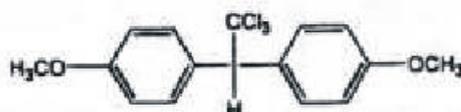
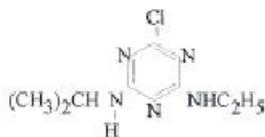


Warfarin



Altri composti

Atrazina



**Figura 4:** Struttura chimica dei principali EDC. I sostituenti dei pesticidi sono spiegati nel capitolo degli effetti.

# **I METODI DI STUDIO**

Come più volte ricordato l'interesse e la preoccupazione per quanto riguarda il ruolo di alcune sostanze ad azione estrogeno-simile, nel contribuire allo sviluppo di molti effetti avversi nell'uomo e nell'animale selvatico sta aumentando.

La preoccupazione nasce dal fatto che migliaia di composti vengono riversati ogni giorno nell'ambiente e un buon numero di essi ha un potenziale effetto di disturbo sul sistema endocrino; molti sono persistenti, lipofili e dotati di elevata tensione di vapore (il che facilita la loro dispersione nell'ambiente).

Il normale funzionamento del sistema endocrino si esplica attraverso un'ampia fluttuazione degli indici ormonali o di altri indici biologici che riflette l'andamento del ritmo circadiano, delle stagioni (variazioni di luce e temperatura), l'età e il sesso.

In campo animale la presenza di una certa quantità di un determinato ormone è un elemento critico per lo sviluppo in particolare dei programmi neurocomportamentali, sia nel campo degli invertebrati che in quello degli anfibi, rettili, pesci, uccelli e mammiferi. La preoccupazione nasce quindi dal numero di sostanze chimiche contaminanti l'ambiente che sono in grado di disturbare questi importanti equilibri ormonali. Queste sostanze possono agire attraverso numerosi meccanismi e alcuni agiscono solo in determinati periodi dello sviluppo. Molta attenzione è stata quindi data a quelle sostanze che hanno una struttura chimica simile a quella degli estrogeni naturali e che potrebbero quindi avere affinità per il loro recettore. È anche possibile che queste sostanze possano agire con un meccanismo indipendente dal recettore per gli estrogeni.

L'identificazione dell'attività estrogenica è basata principalmente su risultati ottenuti da saggi *in vitro* di legame al recettore estrogenico, di trascrizione genica e di proliferazione cellulare o da saggi a breve termine *in vivo* come la valutazione della crescita dell'utero. Purtroppo nessun metodo oggi disponibile permette di mostrare tutti gli effetti estrogenici di un composto; spesso inoltre i risultati di test diversi non sono confrontabili tra loro.

Le attuali metodologie per la valutazione delle conseguenze sulla vita selvatica sono generalmente volte ad identificare gli effetti piuttosto che i meccanismi d'azione degli EDC e non riescono sempre a fornire una corretta valutazione dell'interazione con il sistema endocrino.

In ogni caso diversi sono gli approcci che possono essere utilizzati per valutare l'attività estrogenica di un composto chimico; questi metodi sono suddivisibili in due grandi categorie a seconda che essi siano basati su modelli *in vitro* o su modelli *in vivo*.

### 1) **Saggi *in vitro*.**

Molti di questi saggi sono basati su meccanismi d'azione ben conosciuti e analizzano molti più obiettivi rispetto ai saggi *in vivo*, grazie anche a un uso sempre più di frequente delle tecniche più recenti della biologia molecolare.

#### **SAGGIO DI PROLIFERAZIONE CELLULARE.**

Questo test si basa sull'utilizzo di cellule di una linea cellulare di carcinoma della mammella, le MCF-7, le quali sono dotate del recettore estrogenico e che rimangono quiescenti fino a che non vengono stimolate (per esempio mediante somministrazione di 17- $\beta$ -estradiolo).

L'attività estrogenica degli xenobiotici da testare è valutata mediante:

- determinazione del tasso di crescita relativa, il quale misura il rapporto tra la minima concentrazione di estradiolo necessaria per la massima resa in termini di crescita cellulare e la minima concentrazione di xenobiotico necessario per ottenere lo stesso effetto;

- determinazione dell'effetto proliferativo relativo, il quale indica se il composto testato induce una risposta proliferativa quantitativamente simile a quella ottenuta con l'estradiolo oppure una resa inferiore.

Questo test suggerisce, ma non permette di dimostrare inequivocabilmente l'azione estrogenica di una sostanza.

Insieme al saggio di legame al recettore, questo rappresenta il primo test che viene effettuato su uno xenobiotico sospetto.

### **SAGGIO DI REGOLAZIONE DEL PROMOTORE ENDOGENO.**

Questo test consiste nell'utilizzare dei costrutti contenenti i promotori di geni che rispondono all'azione degli estrogeni e dei geni cosiddetti "reporter" quali per esempio, la  $\beta$ -galattosidasi o la luciferasi. L'induzione del promotore sensibile all'estrogeno ad opera del composto oggetto del test (in presenza ovviamente del recettore per gli estrogeni) viene rivelata come maggiore livello di trascrizione del gene "reporter" rispetto al controllo ed è quindi facilmente quantificabile (per esempio fornendo il substrato al primo enzima e valutando la concentrazione del prodotto formatosi o misurando con un luminometro, la fluorescenza cellulare data dalla luciferasi).

### **VALUTAZIONE DELLE VARIAZIONI NELL'ESPRESSIONE GENICA NEL SISTEMA RIPRODUTTIVO FETALE MEDIANTE "MICROARRAYS" A DNA.**

L'idea di fondo di questo test è che molti degli effetti che compaiono tardivamente durante la vita adulta riflettano in realtà variazioni nell'espressione di particolari geni durante lo sviluppo fetale in seguito all'esposizione *in utero* a sostanze capaci di disturbare il sistema endocrino.

In questo modo possono essere valutate le alterazioni a carico dell'espressione genica in seguito a trattamento con sostanze estrogeniche, androgeniche (o antiestrogeniche e antiandrogeniche) o tossiche per la tiroide. La tecnica dei microarrays è stata illustrata in figura 5.

### **VALUTAZIONE CITOFUORIMETRICA DEL DIFFERENZIAMENTO DEI TESTICOLI.**

Il test permette, mediante l'uso della citofluorimetria a flusso, di studiare le modificazioni che avvengono a carico delle cellule che, all'interno del testicolo, stanno differenziando a spermatozoi. Di queste cellule viene analizzata la ploidia (marcando il DNA con un fluorocromo specifico come lo ioduro di propidio), il rapporto DNA/RNA (sempre mediante l'uso di marcatori specifici), l'attività mitocondriale (durante la spermatogenesi si osserva un progressivo aumento del tasso respiratorio cellulare), ossia tutti quei parametri (o perlomeno i principali) che variano durante la spermatogenesi).

Le cellule isolate dal testicolo vengono innanzitutto marcate con un anticorpo anti-vimentina (un filamento intermedio presente nelle cellule somatiche e non in quelle germinali); il software associato al citofluorimetro permette così di scartare tutte le cellule positive per questa marcatura che quindi non sono cellule germinali). Le diverse popolazioni (corrispondenti ai diversi gradi di differenziamento) possono essere così distinte in base al diverso contenuto di DNA (gli spermatozoi maturi sono aploidi) nonché al diverso livello di attività mitocondriale (valutato mediante specifici fluorocromi come il "nonyl acridine orange" la cui intensità di fluorescenza aumenta con l'aumentare dell'attività mitocondriale).

Il tracciato fornito dallo strumento mostra chiaramente le diverse popolazioni ed è possibile anche stimare il numero di cellule per ciascuna regione (e quindi per ciascun livello differenziativo).

In questo modo, dal confronto con una popolazione di controllo, si rivelano facilmente eventuali alterazioni nella spermatogenesi.

Il funzionamento del citofluorimetro a flusso è stato illustrato nella figura 6.

## **2) Saggi *in vivo*.**

Questi saggi valutano una serie di parametri tra cui il peso di determinati organi, il “sex ratio” (rapporto maschi/femmine), la lunghezza del fallo, l’istopatologia delle gonadi, il differenziamento cellulare, il dosaggio di particolari proteine e l’attività di determinati enzimi nel sangue. Nonostante questi saggi siano ampiamente utilizzati, essi sono inadatti per uno screening d’ampio raggio e il loro uso è quindi limitato a causa dei costi elevati, della scarsa sensibilità, della modesta risposta e infine, dell’intenso lavoro di laboratorio che richiedono le diverse misure.

Molti saggi *in vivo* sfruttano risposte ad elevato grado di complessità come l’induzione del peso uterino, che viene considerato il risultato principale dell’attività estrogenica, ma che può essere influenzata e modulata da meccanismi che non coinvolgono direttamente il recettore degli estrogeni. Questo test potrebbe quindi rivelarsi non specifico per questo genere di fenomeno.

In ogni caso i saggi *in vivo* sono essenziali per esaminare l’attività estrogenica dei composti sospettati di essere degli EDC.

Qui di seguito viene presentata una breve panoramica sui principali test per lo studio degli effetti su diversi organismi viventi dei distruttori endocrini.

### **IL TEST UTEROTROFICO.**

L’animale oggetto di studio (in genere un roditore, soprattutto topi e ratti) viene sacrificato e l’utero (senza ovidotti) viene attentamente dissezionato, privato della membrana aponeurotica e del grasso e pesato in presenza e assenza del suo contenuto luminale. Questo test si propone di determinare la capacità di una sostanza chimica di stimolare o inibire la risposta estrogenica dell’utero.

### **IL TEST DI HERSHBERGER.**

Questo test permette di operare uno screening sulla base degli effetti androgenici, evidenziando la capacità di un composto di stimolare o inibire la risposta androgenica nei testicoli e negli organi sessuali secondari dei roditori. Vengono utilizzati a tale scopo degli animali castrati nei quali quindi l’aumento o il mantenimento del peso dei tessuti come la prostata, le vescicole seminali o il pene non può più essere regolato dagli ormoni endogeni ma è conseguenza diretta dell’esposizione a sostanze esogene ad azione androgenica o antiandrogenica.

### **IL TEST DI SCREENING DELLA PUBERTA’ FEMMINILE (O MASCHILE).**

Questa indagine mira alla valutazione dell’attività estrogenica (o androgenica) e tiroidea nelle femmine (o nei maschi) esposte/i a sostanze chimiche prima o durante la maturazione sessuale. In questo modo è possibile evidenziare le anomalie associate con lo sviluppo degli organi sessuali e dei caratteri sessuali secondari.

### **IL TEST DI SCREENING DELLA RIPRODUZIONE NEI PESCI.**

Questo metodo analizza le anomalie associate alla sopravvivenza, al comportamento riproduttivo, ai caratteri sessuali secondari e alla fecondità (numero di uova per deposizione, fertilità e sviluppo della prole) nei pesci teleostei.

**IL TEST DI SCREENING DELLA METAMORFOSI DELLA RANA.**

Questo screening punta ad identificare i potenziali effetti sulla tiroide, basandosi sul fatto che la metamorfosi da girino a rana è sotto il controllo di questa ghiandola. I parametri che vengono analizzati sono soprattutto legati alle anomalie associate con il riassorbimento della coda nel girino. I risultati che si ottengono possono essere traslati poi all'uomo.

**IL TEST DI RIPRODUZIONE DEI GAMBERETTI.**

Questo test è stato studiato per fornire informazioni riguardo la dose-risposta agli EDC negli invertebrati dal punto di vista delle alterazioni della capacità riproduttiva.

§ § § § §

Oltre a tutti questi studi nell'animale rientrano in questa categoria anche tutti gli studi epidemiologici e retrospettivi effettuati nell'uomo e volti a valutare le alterazioni nei soggetti esposti (o nati da genitori esposti) quali ad esempio il grado di fertilità, qualità e quantità del seme, il "sex ratio", le eventuali anomalie degli organi sessuali o dei caratteri sessuali secondari.

**SCHEDA: "L'uso del dosaggio della vitellogenina come biomarcatore per gli estrogeni ambientali".**

L'attuale scarsità di efficienti saggi biologici per una determinazione certa degli effetti degli EDC nell'uomo è considerata la causa primaria della carenza di politiche mirate al controllo di questo problema.

In questo contesto si inserisce il discorso legato alla vitellogenina, la quale rappresenta un potenziale marcatore biologico per la valutazione del potenziale effetto estrogenico di determinate sostanze chimiche.

La vitellogenina è un fosfolipoproteina serica ad elevato peso molecolare che rappresenta il maggiore precursore delle proteine del sacco vitellino nei vertebrati ovipari. Questa proteina è sintetizzata e secreta dal fegato in risposta agli estrogeni circolanti nelle femmine in corso di maturazione sessuale e non è normalmente misurabile nel plasma dei maschi e delle femmine immature.

La presenza di questa proteina estrogeno-inducibile nel plasma di un animale può essere presa come l'evidenza dell'esposizione a estrogeni endogeni o ambientali o ancora a sostanze che mimano il comportamento degli estrogeni.

Le proprietà immunologiche e strutturali della vitellogenina possono variare enormemente da una specie all'altra anche tra quelle più ravvicinate e ciò limita un'applicazione su vasta scala di questo saggio.

Recentemente è stato chiarito il fatto che la vitellogenina appartiene ad un'antica famiglia di proteine che includono una serie di lipoproteine tra cui tutta una serie di "vitellogenine" proprie di invertebrati e vertebrati; appartengono a questa classe anche numerose proteine seriche umane come l'apolipoproteina B-100 e il fattore di Von-Willebrand coinvolte la prima nel trasporto del colesterolo, la seconda nella coagulazione del sangue.

Il fatto che la vitellogenina sia una proteina così ben conservata nel corso dell'evoluzione, fa ben sperare che essa possa contenere epitopi comuni a numerose specie esistenti che permettano quindi di sviluppare anticorpi da sfruttare per la messa a punto di un saggio immunologico da utilizzare per uno screening d'ampio raggio.

### 3) I modelli QSAR (“Quantitative Structure-Activity Relationship”).

Questo tipo di modello (sviluppato all’elaboratore) permette di predire, sulla base della struttura chimica di una sostanza, il suo grado di attività (valutato nel nostro caso come affinità per il recettore per gli estrogeni, ad esempio).

Esistono diversi metodi QSAR e una loro trattazione completa richiederebbe numerose pagine. In questa sede verranno pertanto solo brevemente descritte le principali caratteristiche di questo tipo di analisi.

Scopo di questi studi è quello di correlare le proprietà fisico-chimiche (elettroniche, steriche, idrofobiche) di un composto all’attività biologica in questione, valutata per esempio come  $EC_{50}$ ,  $IC_{50}$ ,  $K_m$ , ecc. Idealmente, i parametri scelti dovrebbero avere la minima variabilità.

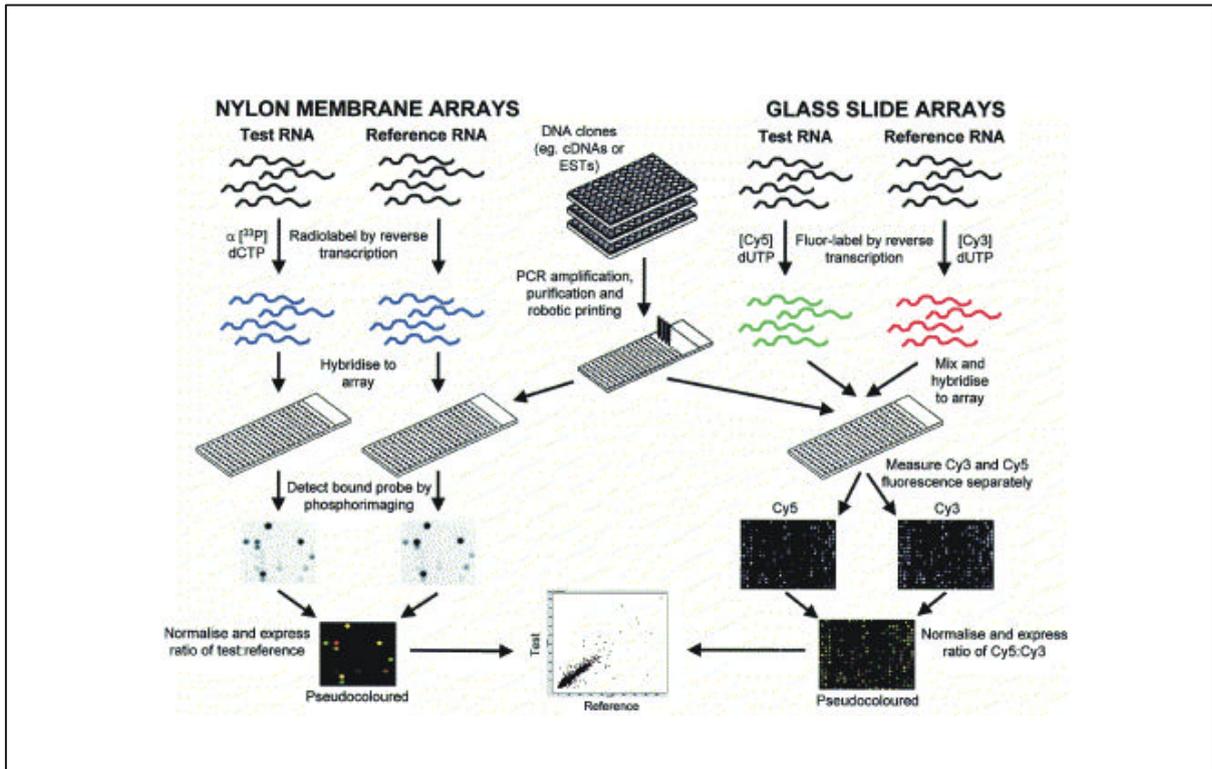
La relazione fra proprietà e attività biologica viene espressa come una funzione, ossia un’espressione matematica derivata mediante tecniche statistiche come ad esempio la regressione multipla lineare. I parametri che descrivono le proprietà fisico-chimiche vengono usati come variabili indipendenti, quelli che esprimono l’attività biologica come variabili dipendenti. In alcuni casi non è possibile ottenere una funzione e ciò riflette la natura multivariata e non lineare delle proprietà biologiche e chimico-fisiche.

I risultati permettono anche di capire le interazioni fra i diversi gruppi funzionali delle molecole a maggiore attività e i loro “target”.

Questi modelli permettono di quantificare le relazioni tra struttura e attività e permettono quindi di fare uno screening predittivo.

Essi possono però dare origine anche a delle false correlazioni; inoltre, i dati raccolti non forniscono sempre sufficienti informazioni riguardo tutti i possibili effetti di un composto.

# Analisi dell'espressione genica mediante microarrays



**Figura 5:** L'analisi dell'espressione genica mediante microarrays permette di valutare simultaneamente l'espressione di migliaia di geni in un campione biologico (in questo caso esposto ad un sospetto EDC) mediante ibridazione del DNA estratto dal campione con del cDNA o degli oligonucleotidi stampati ad elevata densità su di un appropriato supporto e disposti ordinatamente su di esso. Questa tecnica permette anche l'identificazione di nuovi target poiché valuta:

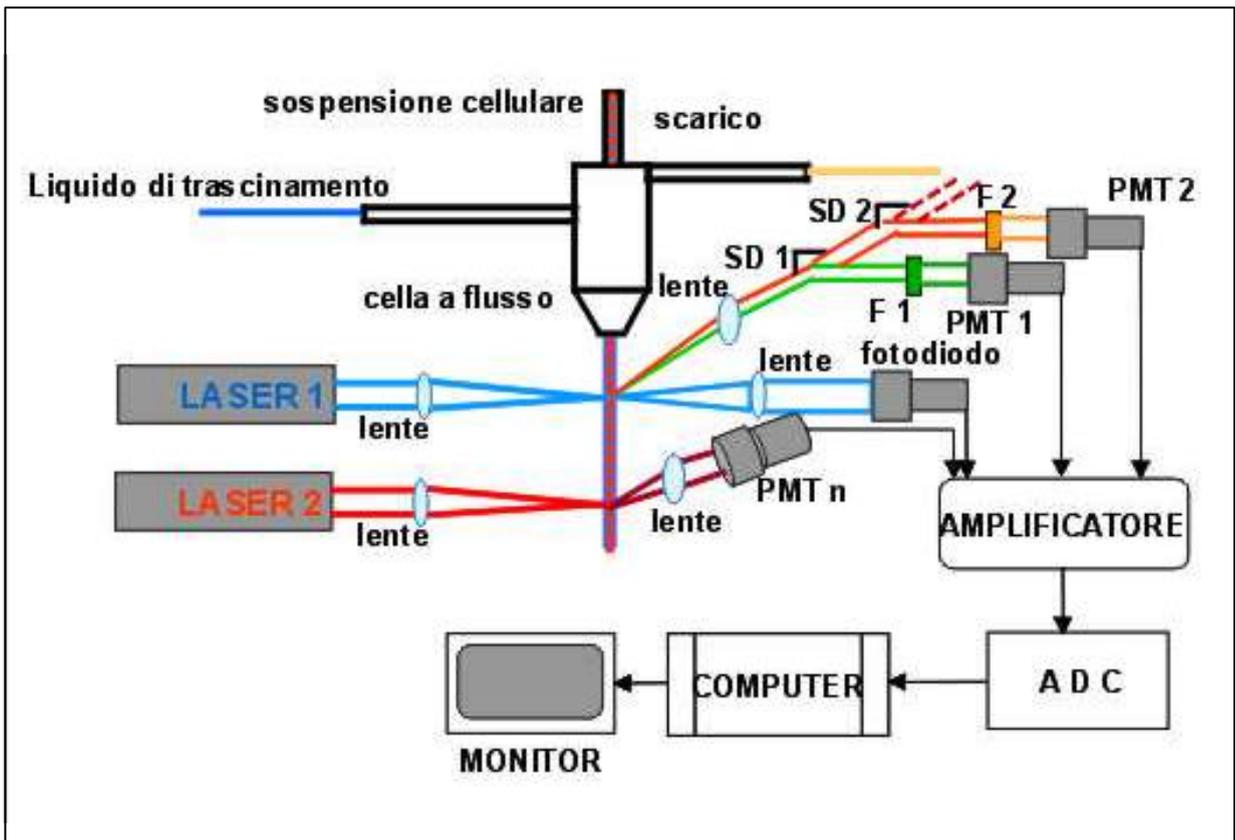
- l'amplificazione e il riarrangiamento genico;
- l'espressione e la funzione di proteine;
- l'espressione genica.

I microarrays sono uno strumento versatile perché permettono:

- l'analisi del profilo di espressione;
- la valutazione delle alterazioni del DNA;
- il sequenziamento genico.

I risultati sono semi-quantitativi e permettono di valutare differenze di espressione tra campioni diversi.

# Struttura di un cimometro a flusso



**Figura 6:** Una sospensione di cellule fissate in etanolo 70° o in formalina nelle quali è stato marcato con un apposito fluorocromo una particolare macromolecola (DNA o proteine) viene colpita da un raggio laser a lunghezza d'onda prestabilita (generalmente 488 nm); il fluorocromo viene così eccitato ed emette una fluorescenza che viene trasformata in impulso elettrico da un fotomoltiplicatore (PMT) che è così misurabile in Volt. Il computer, mediante un apposito software, permette di visualizzare con un grafico, l'intensità della corrente misurata in funzione delle conte di cellule caratterizzate da quella particolare intensità, oppure in funzione dell'intensità misurata di un altro fluorocromo presente nella cellula.

# **ALCUNI CONCETTI TEORICI**

### 1) Cenni di endocrinologia.

La coordinazione del metabolismo nei diversi organi dei mammiferi avviene mediante segnali ormonali o neuronali. A seguito di modificazioni nell'organismo, le singole cellule in un tessuto rispondono secernendo un messaggero chimico extracellulare. Le cellule endocrine secernono ormoni, mentre i neuroni secernono i neurotrasmettitori; in entrambi i casi il messaggero extracellulare passa ad un'altra cellula dove si lega a un recettore specifico e innesca una modificazione delle attività di questa seconda cellula. Nella trasmissione di segnali neuronali, il messaggero chimico (il neurotrasmettitore, per esempio, acetilcolina) può spostarsi solo per spazi brevissimi, frazioni di micrometro, attraverso la sinapsi fino a raggiungere l'altra cellula, al contrario gli ormoni sono trasportati dal sangue a organi molto distanti dalla loro sede di produzione: possono percorrere metri prima di incontrare la loro cellula bersaglio. A parte questa differenza, i segnali chimici trasmessi dal sistema nervoso o dal sistema endocrino utilizzano meccanismi simili tra loro e alcuni dei messaggeri chimici possono essere condivisi dai due sistemi. L'adrenalina e la noradrenalina, per esempio, funzionano da neurotrasmettitori in alcune sinapsi del cervello e del muscolo liscio, oltre che da ormoni nel controllare il metabolismo energetico del fegato e nel muscolo. Anche se i sistemi endocrino e neurale sono di solito trattati come entità separate, sta diventando sempre più evidente che nella regolazione del metabolismo essi si comportano come un solo sistema neuroendocrino.

La parola ormone deriva dal verbo greco *horman*, che significa "stimolare, eccitare". Vi sono tre classi chimicamente distinte di ormoni: peptidi, ammine e steroidi. Un quarto gruppo di segnali extracellulari, gli eicosanoidi, ha proprietà simili a quelle degli ormoni per quanto riguarda l'azione biologica, ma agiscono solo a livello locale. Gli ormoni peptidici, che hanno da tre a oltre 200 residui amminoacidici, comprendono tutti gli ormoni dell'ipotalamo e dell'ipofisi e gli ormoni pancreatici insulina, glucagone e somatostatina. Gli ormoni amminici sono composti a basso peso molecolare, che derivano dall'amminoacido tirosina e comprendono l'adrenalina e la noradrenalina prodotte dalle ghiandole surrenali e gli ormoni tiroidei meno solubili in acqua. Gli ormoni steroidei sono solubili nei lipidi e comprendono gli ormoni della corteccia del surrene, ormoni derivati dalla vitamina D e gli androgeni e gli estrogeni (gli ormoni sessuali maschili e femminili). Essi si spostano nel flusso sanguigno legati a specifiche proteine trasportatrici. Gli eicosanoidi sono derivati dall'acido grasso insaturo a 20 atomi di carbonio arachidonato.

Gli ormoni sono di solito presenti nel sangue a concentrazioni molto basse, dell'ordine di misura da micromolare a picomolare, al contrario, per esempio, del glucosio presente in questo fluido corporeo a concentrazioni millimolari. Per questo motivo, è molto difficoltoso isolare, identificare e valutare accuratamente gli ormoni.

Quando un ormone viene secreto, la sua concentrazione nel sangue aumenta, qualche volta anche di diversi ordini di grandezza. Quando la secrezione si ferma, la concentrazione dell'ormone ritorna rapidamente ai livelli normali. Gli ormoni hanno nel sangue un'esistenza piuttosto breve, spesso solo di pochi minuti. Quando il processo che essi mediano non è più necessario per l'organismo, sono inattivati da sistemi enzimatici.

Alcuni ormoni producono intermedi fisiologici o risposte biochimiche. Pochi secondi dopo la secrezione dell'adrenalina nel flusso sanguigno, il fegato risponde rilasciando glucosio nel sangue. Al contrario gli ormoni tiroidei e gli estrogeni inducono una risposta massima nei loro tessuti bersaglio soltanto dopo ore o giorni. Queste differenze nei tempi di risposta corrispondono a differenze nel meccanismo d'azione di queste molecole. In genere gli ormoni che agiscono rapidamente determinano variazione nell'attività di uno o più enzimi preesistenti nella cellula bersaglio, mediante meccanismi allosterici o modificazioni covalenti degli enzimi

stessi. Gli ormoni che agiscono più lentamente alterano di solito l'espressione di geni, inducendo la sintesi di più copie di una proteina.

Tutti gli ormoni agiscono attraverso specifici recettori, presenti nelle loro cellule bersaglio, a cui gli ormoni si legano con alta affinità e specificità. Ogni tipo di cellula ha una sua combinazione di recettori per ormoni che definisce il suo campo di sensibilità a queste molecole. Due tipi di cellule con lo stesso recettore possono avere bersagli intracellulari diversi per l'azione dell'ormone e quindi possono rispondere in modo diverso.

Gli ormoni peptidici e amminici solubili in acqua non possono attraversare la membrana plasmatica e i loro recettori sono localizzati sulla superficie esterna delle cellule bersaglio. Gli ormoni steroidei e tiroidei solubili nei lipidi attraversano facilmente la membrana plasmatica delle loro cellule bersaglio; i loro recettori sono specifiche proteine localizzate nel nucleo. Dopo il legame dell'ormone la proteina recettrice, presente nella membrana plasmatica della cellula, va incontro a una modificazione conformazionale analoga a quella prodotta in un enzima allosterico dal legame di un effettore. In questa conformazione modificata, il recettore produce o determina la produzione di una molecola di messaggero intracellulare, chiamato anche secondo messaggero. Il secondo messaggero trasferisce il segnale dal recettore dell'ormone a qualche enzima o sistema molecolare della cellula, che genera la risposta. Il secondo messaggero può agire anche regolando la reazione di uno specifico enzima o modificando la velocità con cui un certo gene o gruppo di geni viene tradotto in proteina o proteine. Nel caso degli ormoni steroidei e tiroidei, è il complesso recettore-ormone che trasferisce il messaggio, provocando l'alterazione dell'espressione di specifici geni.

Analizziamo brevemente i principali sistemi endocrini del corpo umano e alcuni dei loro sinergismi funzionali. La parola endocrino significa che le secrezioni di queste ghiandole sono interne, cioè sono rilasciate nel sangue.

L'ipotalamo, una porzione specializzata del cervello, è il centro di coordinazione del sistema endocrino: riceve ed integra messaggi provenienti dal sistema nervoso centrale. In risposta a questi messaggi, l'ipotalamo produce ormoni regolatori destinati all'ipofisi anteriore (adenipofisi), posta appena sotto l'ipotalamo. Alcuni di questi ormoni ipotalamici (fattori di rilascio) stimolano l'ipofisi anteriore a secernere a sua volta un determinato ormone; altri hanno invece effetti inibitori. Una volta stimolata, l'ipofisi anteriore rilascia ormoni nel sangue che li trasporta agli organi che costituiscono la tappa successiva del sistema endocrino, cioè la corteccia surrenale, la ghiandola tiroidea, l'ovaio, i testicoli e le cellule endocrine del pancreas. Queste ghiandole sono a loro volta stimolate a secernere i loro ormoni specifici che sono trasportati dal sangue ai recettori posti sulle o entro le cellule dei tessuti bersaglio.

L'ipofisi posteriore (neuroipofisi) contiene terminazioni assoniche di molti neuroni che hanno il corpo nell'ipotalamo. In questi neuroni, si formano due piccoli ormoni peptidici, l'ossitocina e la vasopressina, dalla degradazione di precursori proteici più grandi. Questi ormoni peptidici si spostano lungo gli assoni ipotalamici fino alle terminazioni nervose presenti nell'ipofisi posteriore, dove vengono conservati in granuli di secrezione. L'ossitocina agisce sul muscolo liscio dell'utero e della ghiandola mammaria, determinando contrazioni uterine durante il travaglio o la secrezione di latte durante la lattazione. La vasopressina (detta anche ormone antidiferico) aumenta il riassorbimento di acqua nel rene e induce una costrizione dei vasi sanguigni, favorendo quindi un aumento della pressione sanguigna.

La tappa finale in questo sistema è rappresentata dal meccanismo intracellulare innescato dal recettore dell'ormone: la formazione di un secondo messaggero che trasporta il messaggio dal recettore dell'ormone a una struttura cellulare specifica o a un enzima come bersaglio finale, oppure l'alterazione dell'espressione di geni da parte del complesso recettore-ormone che si lega al DNA. Quindi, ogni sistema endocrino ricorda un circuito elettrico con una serie di relé,

che trasporta messaggi dal sistema nervoso centrale, attraverso diverse tappe intermedie, a una specifica molecola presente nelle cellule bersaglio.

L'ipotalamo è posto in cima a questa piramide gerarchica, composta da molti tessuti che producono anch'essi ormoni. Riceve segnali neurali positivi (di innesco) da diverse parti del cervello e segnali negativi (di spegnimento) dagli ormoni che circolano nel sangue. Questi segnali sono integrati nell'ipotalamo, che risponde rilasciando l'opportuno ormone al tessuto successivo della cascata cioè l'ipofisi. Gli ormoni secreti dall'ipotalamo sono in genere peptidi relativamente piccoli, prodotti in minime quantità.

Gli ormoni ipotalamici passano direttamente all'ipofisi attraverso vasi sanguigni speciali e neuroni che collegano queste due ghiandole. L'ipofisi è composta da due parti funzionalmente distinte: la porzione anteriore (adenipofisi) risponde agli ormoni ipotalamici che arrivano con il sangue, producendo sei ormoni tropici o tropine costituiti da polipeptidi relativamente lunghi che attivano le ghiandole endocrine della tappa successiva del sistema. L'ormone adrenocorticotropo (ACTH) stimola la corteccia surrenale; l'ormone che stimola la tiroide (TSH, detto anche tireotropina) agisce sulla ghiandola tiroidea; l'ormone che stimola il follicolo (FSH, follicolostimolante) e l'ormone luteinizzante (LH) agiscono sulle gonadi; l'ormone della crescita (GH, detto anche somatotropina) stimola il fegato a produrre diversi fattori. L'ipofisi posteriore (neuroipofisi) produce invece l'ossitocina (che stimola la contrazione dell'utero al parto) o l'ormone antidiuretico (ADH, che stimola il riassorbimento dell'acqua nei tubuli del rene).

Citiamo più in particolare due classi di ormoni che sono implicati nell'azione dei distruttori endocrini: gli ormoni tiroidei e steroidei.

#### Ormoni tiroidei.

Gli ormoni tiroidei sono rilasciati quando l'ipotalamo secerne l'ormone che rilascia la tireotropina, che a sua volta stimola l'ipofisi a rilasciare la tireotropina; quest'ultima agisce sulla ghiandola tiroidea provocando la secrezione di due ormoni caratteristici: l'L-tiroxina (T4) e l'L-triiodotironina (T3). Piccole quantità di T3 e T4 stimolano il metabolismo che produce energia, in particolare nel fegato e nel muscolo. Questi ormoni si legano a specifici recettori proteici intracellulari; il complesso recettore-ormone attiva certi geni che codificano enzimi legati al metabolismo che produce energia, aumentandone la sintesi e di conseguenza anche la velocità del metabolismo basale dell'animale.

#### Ormoni steroidei.

I principali ormoni steroidei sono gli ormoni corticosurrenali, gli ormoni sessuali (androgeni ed estrogeni) e gli ormoni derivati dalla vitamina D. Questi ormoni sono liposolubili e possono attraversare facilmente la membrana plasmatica e penetrare nel citosol delle cellule bersaglio. In questa localizzazione si combinano con recettori proteici intracellulari ed i complessi, simili ai complessi recettore-ormone tiroideo, agiscono nel nucleo determinando l'espressione di alcuni geni. La maggior parte dei recettori degli ormoni steroidei sono localizzati nel nucleo; altri possono spostarsi dal citosol al nucleo soltanto dopo aver legato l'ormone. Gli ormoni corticosurrenali sono prodotti dalle cellule disposte nella porzione esterna (corteccia) delle ghiandole surrenali. Quando un animale è sottoposto ad uno stress, l'ipotalamo secerne l'ormone che rilascia la corticotropina, che stimola l'ipofisi anteriore a rilasciare corticotropina nel sangue. La corticotropina a sua volta segnala alla corteccia del surrene di produrre i suoi caratteristici ormoni corticosteroidi, compreso il cortisolo, il corticosterone e l'aldosterone. Nella corteccia surrenale sono prodotti più di cinquanta ormoni corticosteroidi di due diversi tipi: i glucocorticoidi ed i mineralcorticoidi. I glucocorticoidi

agiscono preferenzialmente sul metabolismo dei carboidrati, mentre i mineralcorticoidi regolano la concentrazione di elettroliti nel sangue.

Gli androgeni (testosterone) e gli estrogeni (per esempio l'estradiolo) sono sintetizzati rispettivamente nei testicoli e nell'ovaio. Essi controllano lo sviluppo sessuale, il comportamento sessuale e una varietà di altre funzioni legate alla riproduzione e non. Gli ormoni steroidei prodotti dalla vitamina D da parte di enzimi presenti nel fegato e nei reni regolano l'assunzione e il metabolismo del calcio e del fosfato, compreso la formazione e la mobilitazione del fosfato di calcio nell'osso.

### **SCHEDA: “I recettori per gli ormoni steroidei”**

Schematicamente il meccanismo d'azione degli ormoni steroidei può essere riassunto come segue: l'ormone, trasportato al tessuto bersaglio dalla proteina serica che lo lega, diffonde attraverso la membrana plasmatica e si lega al suo recettore proteico nel nucleo della cellula bersaglio. Il legame dell'ormone modifica la conformazione del recettore, consentendogli di formare nel nucleo dimeri con altri complessi recettore-ormone dello stesso tipo.

I dimeri si legano a specifiche regioni regolatrici, gli elementi di risposta ormonale (HRE, “Hormone-Responsive Elements”), nel DNA adiacente a specifici geni.

Il legame facilita in qualche modo la trascrizione dei geni adiacenti da parte dell'RNA polimerasi, aumentando la velocità di formazione dell'RNA messaggero e della sintesi della proteina codificata dal gene regolato dall'ormone. La variazione dei livelli di questa proteina determina la risposta della cellula all'ormone.

### **2) Cenni di metabolismo degli xenobiotici.**

Tutte le sostanze estranee ad un organismo e che entrano in contatto con esso vengono raggruppate sotto la definizione di “xenobiotico” (dal greco “xenos”, ossia “estraneo”).

Quali sono i fattori che influenzano il metabolismo di queste sostanze? Che ruolo gioca il metabolismo epatico nell'attivazione o inattivazione delle sostanze tossiche? E nella loro tossicità? Vediamo di rispondere in modo soddisfacente a queste e ad altre domande inerenti.

Innanzitutto occorre sottolineare che numerose sostanze sia tossiche che farmacologiche sono lipofile e quindi insolubili nei liquidi biologici. Questo significa prima di tutto che se l'escrezione renale è l'unica via di inattivazione, l'effetto di tali molecole durerà più a lungo. In secondo luogo questo ha fatto sì che il fegato abbia sviluppato dei meccanismi di trasformazione metabolica degli xenobiotici, tali da incrementarne la solubilità in acqua e quindi facilitarne l'eliminazione.

Il metabolismo epatico delle sostanze estranee all'organismo (o “biotrasformazione”) può essere comodamente suddiviso in due fasi:

- fase I: addizione o smascheramento di gruppi funzionali polari (ossidazione e/o riduzione), idrolisi;
- fase II: coniugazione con piccole molecole, spesso sfruttando come sito d'attacco i gruppi addizionati durante la fase I.

#### Metabolismo di fase I.

Gli enzimi chiave di questo stadio sono localizzati nel reticolo endoplasmatico liscio (un organello subcellulare responsabile principalmente della sintesi dei lipidi e della detossificazione, NdA): sono le citocromo P450 monoossigenasi, una famiglia cui appartengono più di 4.000 isoforme in tutti i regni animali (18 famiglie solo nell'uomo),

denominate secondo l'esempio seguente: CYP2B10 (CYP=citocromo P450 monoossigenasi; B=sottofamiglia genica; 10=numero del membro della sottofamiglia). Le reazioni catalizzate da questi enzimi sono principalmente idrossilazione aromatica o alifatica, dealchilazione ossidativa, N- e S- ossidazione e deaminazione.

Il più comune induttore del CYP1A sono le molecole aromatiche planari come gli IPA e i PCB, mentre CYP2B e CYP3A sono indotti da molecole globulari (PCB orto-sostituiti).

Tra gli enzimi coinvolti in questa fase ritroviamo la flavin-monoossigenasi, che catalizza le reazioni di N- e S- ossidazione, le deidrogenasi come l'alcol e l'aldeide deidrogenasi, nonché delle idrolasi come l'epossi-idrolasi e la carbossil-esterasi.

### Metabolismo di fase II.

La fase II del metabolismo epatico comprende invece le reazioni di coniugazione di particolari molecole (vedi oltre) con i gruppi funzionali addizionati o smascherati durante la fase I.

Una volta che la sostanza da detossificare è stata coniugata diviene generalmente più polare e meno tossica.

Gli enzimi che catalizzano queste reazioni appartengono alla classe delle transferasi. Analizziamole nel dettaglio:

- UDP-glucuronosil-transferasi, una proteina di membrana del reticolo endoplasmico che catalizza l'attacco dell'acido glucuronico agli atomi di ossigeno, azoto o zolfo del composto da detossificare;
- N-acetiltransferasi, che a livello degli stessi atomi addiziona gruppi acetilici;
- sulfotransferasi, che comprendono due famiglie di enzimi citosolici in grado di legare un gruppo solfato ( $\text{SO}_4$ ) alla molecola da eliminare;
- glutatione-S-transferasi, che catalizza l'attacco del glutatione (un tripeptide composto dagli aminoacidi glicina, acido glutammico e cisteina) allo xenobiotico in questione. Gli addotti col glutatione non vengono escreti direttamente, ma subiscono in genere un ulteriore metabolismo con successivo distacco dei residui di acido glutammico e glicina e acetilazione del gruppo amminico della cisteina;
- metiltransferasi, che trasferiscono gruppi metilici ( $\text{CH}_3$ ).

Tra i fattori che possono influenzare il metabolismo ritroviamo la contemporanea esposizione ad altre sostanze (come gli idrocarburi policiclici aromatici) che sono in grado di indurre sia gli enzimi di fase I che quelli di fase II, la variabilità genetica (materia di studio della moderna farmacogenetica) la quale comporta che la suscettibilità ad una sostanza tossica (come pure a un farmaco) sia variabile da un soggetto all'altro a causa di particolari polimorfismi (piccole diversità interindividuali nella sequenza di un gene) nei geni che codificano per gli enzimi coinvolti nella detossificazione. Un fattore molto importante è rappresentato dall'età (influenza l'espressione genica) nonché il sesso (anche se scarsamente rilevante nella specie umana).

**USI ED EFFETTI  
DELE DIVERSE  
CLASSI DI EDC**

La tossicità di un estrogeno esogeno può coinvolgere una serie di fattori e può esplicarsi attraverso una serie di meccanismi distinti, ma correlati fra loro. Il primo e più ovvio motivo di tossicità consiste nella possibilità che queste sostanze possano legare il recettore estrogenico producendo una risposta ormonale. Un secondo tipo di tossicità è legato alle loro proprietà chimiche piuttosto che a quelle ormonali.

Un terzo e più sottile motivo è la possibilità che un composto possa produrre una sbilanciata risposta estrogenica a livello di un tessuto particolare.

Gli EDC sono tra le sostanze che sono sospettate di avere questo tipo di effetto poiché essi possono:

- indurre nel feto particolari effetti che non si manifestano fino a che l'organismo non raggiunge l'età riproduttiva;
- stimolare particolari cambiamenti a livello biochimico e/o fisiologico che intaccano la capacità riproduttiva di un organismo, senza ridurre il grado di sopravvivenza e la crescita;
- influenzare negativamente i processi endocrini caratteristici di alcune specie, ma assenti in altre specie surrogate usate nei test di tossicità.

Molti degli effetti degli EDC che sono stati riportati nella vita selvatica sono associati con la presenza di un contaminante tossico nell'organismo della madre, dovuta all'esposizione prima della produzione dell'uovo negli uccelli e nei pesci o durante la gestazione e l'allattamento nei mammiferi.

Come già discusso in precedenza, va inoltre ricordato che il problema della contaminazione ambientale e quello alimentare sono strettamente ricollegabili tra loro, poiché qualsiasi sostanza dispersa nell'ambiente non può esimersi dall'entrare nella catena alimentare. Nel caso particolare degli EDC ci troviamo di fronte, come già ricordato, a sostanze lipofile, che quindi tendono ad accumularsi nel tessuto adiposo dell'uomo e degli animali. A questo punto quindi, qualsiasi di questa sostanza può essere ritrovata nella carne, nel pesce e nel latte (in quest'ultimo caso si ha anche il problema della trasmissione di queste sostanze da madre a figlio durante l'allattamento): quello alimentare è pertanto solo uno dei tanti punti di vista dal quale il problema può essere considerato.

In letteratura sono presenti centinaia di studi sugli effetti degli EDC nell'uomo e negli animali. In questa sede ci si limiterà a trattare l'argomento dal punto di vista delle sole sostanze prodotte dall'uomo.

### **1) Farmaci come distruttori endocrini.**

Oltre alle sostanze chimiche sintetiche risultanti dalle attività industriali, l'uomo ha trovato un altro modo per appesantire l'influenza dell'ambiente sul sistema ormonale: molti composti farmaceutici sono stati infatti sintetizzati per funzionare come estrogeni (si pensi ai contraccettivi orali). Un esempio per tutti è il dietilstilbestrolo (DES), un estrogeno sintetico usato per più di 40 anni non solo per incrementare la crescita dei bovini da carne, ma anche (negli anni '50 e '60) nell'uomo grazie all'ampio spettro d'azione e ai bassi costi. Grazie al fatto che il DES è attivo anche quando somministrato per via orale, esso venne ampiamente utilizzato per la prevenzione degli aborti spontanei, come estrogeno per la terapia sostitutiva in menopausa, per sopprimere la lattazione, come contraccettivo post-coitale e addirittura negli uomini per prevenire il cancro della prostata.

Tutto ciò continuò fino a che non ci si rese conto che i figli delle donne trattate con questo farmaco soffrivano di disfunzioni agli organi riproduttivi.

Oggi è ormai assodato il concetto che il DES predispone ad una serie di tumori ginecologici che vanno dal carcinoma della vagina a quello dell'endometrio e non è quindi più usato.

## 2) I fenoli.

Gli alchilfenoli (AF) sono composti fenolici con catene alchiliche di varia lunghezza. Il nonilfenolo è utilizzato come intermedio nella produzione di resine fenoliche ed epossidiche, stabilizzanti plastici e trinonilfenilfosfito. È inoltre utilizzato nella produzione degli alchilfenoli polietossilati (APE), in particolare nonilfenoli polietossilati (NPE); questi ultimi sono tensioattivi non-ionici largamente utilizzati nei detergenti delle industrie tessile e conciaria, in attività domestiche, nelle vernici, come disperdenti nella formulazione di pesticidi ad uso agricolo e domestico e come emulsionanti in diversi prodotti per l'igiene e l'uso personale. Il nonilfenolo (NF) è di gran lunga il composto più importante commercialmente tra gli alchilfenoli.

La presenza di AF (soprattutto NF, in parte minore octilfenolo, OF) nei corpi idrici è dovuta ai processi degradativi degli APE che si verificano in essi o negli impianti di depurazione.

Gli AF, essendo caratterizzati da buone proprietà antiossidanti, vengono impiegati anche nella produzione delle plastiche trasparenti utilizzate nell'industria alimentare, al fine di ritardarne l'ingiallimento o l'opacizzazione; pertanto, le bevande e gli alimenti che ne vengono a contatto possono risultare contaminati.

NF e NPE sono stati riscontrati in acque superficiali, dolci e marine, sotterranee, nei sedimenti e in acque degli affluenti ed effluenti degli scarichi fognari.

Il nonilfenolo, essendo lipofilo e persistente, tende ad accumularsi negli organismi acquatici come crostacei, molluschi e pesci. Le concentrazioni di NF in pesci e molluschi possono essere anche superiori a 0,5 mg/Kg di peso fresco; in particolare, in uno studio italiano è stata riscontrata la presenza diffusa di NF in molluschi filtratori (bivalvi) e predatori (cefalopodi) prelevati nel 1997 lungo tutta la costa del Mare Adriatico. Le concentrazioni di OF riportate sono sempre risultate notevolmente inferiori, probabilmente in ragione della minore emissione di octifenoloetossilati.

Gli effetti estrogenici degli AF sono noti dal 1938 e sono stati confermati da svariati studi. Essi vanno quindi considerati a tutti gli effetti come EDC nei mammiferi, in quanto inducono alterazioni endocrine nell'organismo integro. Gli effetti endocrini sono considerati il parametro principale su cui basare la valutazione del rischio tossicologico degli AF. Sulla base delle informazioni disponibili, le proprietà tossicologiche intrinseche degli AF mostrano caratteristiche specifiche nonché alcuni punti critici suscettibili di ulteriori chiarimenti.

Gli AF interagiscono direttamente con i recettori estrogenici *in vitro* e non possono essere esclusi anche effetti sulla sintesi ed il trasporto ormonali.

Diversi dati recenti indicano che gli AF potrebbero alterare l'equilibrio endocrino anche attraverso vie diverse dalla diretta interazione recettoriale nei tessuti riproduttivi. Tuttavia, non è ancora chiaro se questi dati siano estrapolabili all'essere umano e quale sia l'effettiva rilevanza per la valutazione del rischio, in particolare riguardo alle alterazioni dell'asse ipotalamico-ipofisario.

### Il Bisfenolo A.

Il bisfenolo A (BPA) è causa di apprensione perché viene ampiamente prodotto ed ha un uso piuttosto diffuso. Il BPA viene utilizzato nella produzione di plastiche policarbonate, resine epossidiche e come stabilizzante per il PVC.

Gli studi *in vitro* e i saggi *in vivo* hanno mostrato che il BPA può avere effetto estrogenico mediante l'attivazione di alcuni geni controllati da promotori sensibili agli estrogeni.

Nei roditori gli effetti osservabili sono simili a quelli prodotti dal 17 $\beta$ -estradiolo: crescita e differenziamento del tessuto mammario, aumento della permeabilità vascolare a livello uterino, diminuzione dei livelli plasmatici di colesterolo e aumento dei livelli di prolattina.

Nonostante i numerosi dati sugli animali, non esistono tuttavia ancora delle evidenze convincenti di possibili effetti sull'uomo.

Una possibile esposizione dell'uomo in ogni caso deriva dalla cessione da prodotti come biberon, resine delle lattine e altri prodotti plastici.

Il livello di cessione di BPA dal rivestimento epossidico di un recipiente per alimenti è stato recentemente testato da Munguia-Lopez e coll. (2002) prima usando come simulante una soluzione di acido acetico al 3% lasciata a 25°C per 0, 40, 70 e 160 giorni e successivamente i due terzi dei contenitori sono stati processati al calore e conservati a 25 e 35°C per 0, 40, 70 e 160 giorni e i risultati hanno indicato che vi è un minimo effetto del calore, mentre si è osservato un effetto di cessione dopo 40 giorni a 25°C con un aumento nei contenitori conservati a 35°C ed un picco a 35°C dopo 160 giorni. Il livello di cessione osservato è comunque inferiore a quello stabilito dalla legislazione europea (3 mg/Kg).

Il calore aumenta la cessione di BPA anche nel caso dell'acqua distillata usata come simulante, mentre nessun effetto è osservabile con la conservazione a temperatura ambiente. I livelli di cessione anche in questo caso sono al di sotto dei limiti stabiliti dalla legislazione.

### 3) Pesticidi.

I pesticidi occupano una posizione molto particolare fra le numerose sostanze chimiche cui l'uomo è esposto, poiché essi vengono deliberatamente sparsi nell'ambiente con l'intento di eliminare alcune forme di vita. Il pesticida ideale dovrebbe essere estremamente tossico per la specie che si desidera eliminare e innocuo per l'uomo e per gli altri organismi, purtroppo pochissimi pesticidi attualmente in commercio sono così selettivi. Questo fatto fa sì che essi divengano un rischio per la salute umana e per l'ambiente soprattutto in quei paesi laddove i controlli e le attività di sorveglianza non sono molto sviluppati.

A differenza di altre sostanze chimiche, l'esposizione ai pesticidi interessa un vasto numero di persone, non soltanto un gruppo di lavoratori esposti, poiché si possono trovare sia nell'acqua che nel cibo. Inoltre va sottolineato che i lavoratori impiegati nelle industrie produttrici di questi composti sono esposti soltanto ad un solo composto (o ad un numero molto limitato), mentre i lavoratori impiegati in agricoltura sono esposti ad un numero molto maggiore di sostanze.

Tramite il monitoraggio biologico (misura dei metaboliti dei pesticidi nei soggetti esposti o valutazione di alcuni effetti particolari) è possibile stimare l'esposizione e la via di assorbimento (respiratoria, dermica o orale) e di valutare l'esposizione globale come somma delle diverse fonti di contaminazione. Quando l'assorbimento avviene tramite vie diverse è possibile inoltre, con il biomonitoraggio, distinguere la via predominante.

I dati sul reale ammontare di pesticidi oggi prodotti sono scarsi anche a causa della difficoltà ad ottenerli dalle industrie produttrici che sono restie a rivelare le cifre relative. L'uso dei pesticidi è comunque aumentato drammaticamente negli ultimi decenni, sia nei Paesi occidentali che in quelli in via di sviluppo. Nel 1985 la produzione stimata di pesticidi formulati era di 3 milioni di tonnellate. Nella sola Unione Europea agli inizi degli anni '90 la produzione era di circa 350.000 tonnellate.

In generale gli erbicidi costituiscono il 45 % del mercato, gli insetticidi il 30%, i fungicidi il 19% e gli altri pesticidi il 5%.

Il numero di pesticidi conosciuti è quindi molto elevato ed è possibile classificare queste sostanze in diverse classi a seconda, ad esempio, del tipo di molecola. Analizziamoli brevemente.

### 1) Pesticidi organofosforici.

Rappresentano la principale classe di pesticidi. Vengono usati soprattutto come insetticidi, meno frequentemente come erbicidi. Agiscono tramite l'inibizione della colinesterasi.

I principali composti che fanno parte di questa classe sono:

- acefato, insetticida sintetico che agisce alla concentrazione di 50-100 g/hl su un vasto numero di insetti e afidi. Usato su piante ornamentali, cotone, fagioli e lattuga, oltre che per il controllo dei parassiti umani e dei mammiferi in generale. E' classificato dall'OMS in classe III ("Leggermente pericoloso");
- azinphos metile, insetticida persistente non-sistemico, attivo anche come acaricida. Classificato in classe Ib ("Altamente pericoloso");
- chlorpyrifos, insetticida non-sistemico attivo su un vasto numero di parassiti. Classificato in classe II ("Moderatamente pericoloso");
- diazinon, insetticida non-sistemico, usato su piante da frutto, cereali, patate, tabacco, viti. Classe II;
- disulfoton, insetticida sistemico e acaricida usato in granuli su suolo e piante. Classe Ia ("Estremamente pericoloso");
- fenitrothion, insetticida da contatto, efficace contro un gran numero di parassiti. Classe II;
- glifosato, erbicida non selettivo che non ha potere inibitorio nei confronti della colinesterasi. Classificato dall'OMS come "Improbabile fonte di pericolo con uso normale";
- methamidophos, oltre ad essere uno dei metaboliti dell'acefato, è un insetticida sistemico e un acaricida. E' usato sulle piante ornamentali, sulle patate, sui frutti, piante da cotone, mais, tabacco e alcuni cereali. Classe Ib;
- malathion, insetticida non-sistemico e acaricida. Usato per il controllo degli artropodi, degli ectoparassiti animali, dei pidocchi e degli insetti domestici. Classe III;
- mevinphos, insetticida sistemico e acaricida. Classe Ia ("Estremamente pericoloso");
- monocrotophos, insetticida sistemico o attivo al contatto su una vasta gamma di parassiti. Classe Ib;
- parathion, insetticida non-sistemico o attivo al contatto e acaricida. Classe Ia;
- parathion metile, insetticida attivo al contatto o per ingestione. Classe Ia;
- phorate, insetticida sia sistemico che da contatto e acaricida. Classe Ia.
- terbufos, attivo su artropodi e nematodi. Classe Ia.

### 2) Carbammati.

La classe dei carbammati comprende insetticidi, nematocidici, fungicidi ed erbicidi. Queste sostanze sono degli esteri N-sostituiti dell'acido carbammico, in cui l'atomo di azoto è sostituito da un gruppo metilico. La natura chimica del gruppo R1 (vedi figura 4) cambia a seconda della classe: metile negli insetticidi, aromatico negli erbicidi, benzoimidazolo nei fungicidi. Il gruppo R2 può essere sia un sostituente aromatico che alifatico.

La tossicità dei carbammati è dovuta al fatto che sono degli inibitori della colinesterasi, anche se altri effetti stanno alla base della loro attività come erbicidi e fungicidi.

Di seguito sono elencati i principali composti che appartengono a questa classe:

- benomyl, fungicida ad azione sistemica, attivo anche sulle uova degli acari. Classificato come “Improbabile fonte di pericolo con uso normale”;
- carbaryl, insetticida tossico al contatto e attivo sullo stomaco, usato soprattutto contro gli insetti. Classe II.
- pirimicarb, aficida selettivo. Classe II;
- propoxur, insetticida non-sistemico usato soprattutto contro i parassiti domestici e degli animali domestici. Classe II.

### 3) Ditiocarbammati.

Sono utilizzati prevalentemente in agricoltura come fungicidi e, in misura minore, come insetticidi ed erbicidi. La loro formula generale è espressa in figura X e in generale, si suddividono in quattro categorie: thiramams (thiram, methiram, disulfiram), dimetilditiocarbammati (ferbam, ziram) e alchiliditiocarbammati insaturi (EBDTCs) e propilene-bis-ditiocarbammati. Nessun metodo per il loro biomonitoraggio è attualmente accettato.

Seguono i tre composti più comuni fra gli appartenenti a questa classe:

- mancozeb, fungicida usato per il trattamento del fogliame e dei semi, al fine di controllare un vasto range di patogeni in diversi settori (cereali, frutta, piante ornamentali e verdure);
- maneb, fungicida utilizzato nel trattamento delle micosi dei cereali;
- zineb, fungicida usato per proteggere il fogliame e i frutti di un gran numero di cereali.

Questi tre composti vengono classificati come “Improbabile fonte di pericolo con uso normale”.

### 4) Piretroidi sintetici.

I piretroidi sintetici rappresentano un vasto gruppo di insetticidi usati in agricoltura per la loro bassa tossicità sia sull'uomo che sui mammiferi in generale nonché per la loro scarsa persistenza nell'ambiente. Sono degli esteri che contengono acidi particolari (crisantemico, crisantemico alo-sostituito, ecc.) e alcoli (alletrone, 3-fenossibenzil alcol). A seconda dei sintomi che produce l'avvelenamento si distinguono in piretroidi:

- di tipo 1 che non contengono il gruppo C=N;
- di tipo 2 che contengono un gruppo C=N legato al carbonio in  $\alpha$ ;

I sintomi del primo gruppo comprendono tremori, ipereccitazione, atassia, convulsioni e (nei casi più severi) paralisi, mentre i secondi causano ipersalivazione, ipersensibilità agli stimoli esterni, coreo-atetosi e paralisi. Entrambi agiscono mantenendo aperti i canali del sodio causando la depolarizzazione dei neuroni.

Alcuni esempi:

- cypermethrin, una miscela racemica di 8 isomeri (4 cis e 4 trans il cui rapporto varia da 50:50 a 40:60). Sono insetticidi attivi contro un vasto range di parassiti usati in agricoltura, salute pubblica e sugli animali. Classe II;
- deltamethrin, un insetticida utilizzato contro un vasto numero di parassiti delle piante. Classe II.
- fenvalerate, un insetticida altamente attivo al contatto contro un gran numero di parassiti. Classe II;

- permethrin, un insetticida attivo al contatto contro un gran numero di parassiti: insetti ed ectoparassiti. Classe II.

#### 5) Pesticidi organoclorurati.

Quella dei pesticidi organoclorurati è una classe molto vasta di composti che furono usati negli anni '50 e '60; negli anni seguenti il loro utilizzo divenne sempre più rarefatto a causa della loro persistenza e della capacità di accumularsi.

A seconda della struttura chimica è possibile distinguere tre classe di composti:

- isomeri dell'esacloruro di benzene, come il lindano;
- ciclodieni, come aldrin, dieldrin, endrin, clordano, heptachlor e endosulfam;
- DDT e suoi analoghi come il methoxichlor, il dicofol e il clorobenzilato.

A causa della loro persistenza molti di essi sono divenuti contaminanti ubiquitari e sono entrati nella catena alimentare; la loro presenza è identificabile nei tessuti animali (uomo compreso). Composti vietati ormai da molti anni sono ancora ritrovabili nei tessuti e nei fluidi umani.

Dopo l'assorbimento questi composti si distribuiscono rapidamente nei vari distretti dell'organismo, soprattutto laddove vi sia un buon contenuto di tessuto adiposo, mantenendo uno scambio attivo fra il sangue e i tessuti.

Gli studi sui volontari e sui lavoratori esposti hanno permesso di calcolare l'emivita di queste sostanze: 267 giorni per il dieldrin, 3,4 anni per il DDT nel tessuto adiposo, 24 h per l'endrin e 10-20 giorni per il lindano e il clordano.

Poche sono le informazioni che si ottengono dalla letteratura riguardo gli effetti di molti pesticidi organoclorurati usati in agricoltura e per le politiche di salute pubblica. Vediamo nel dettaglio alcune informazioni riguardo i composti più noti:

- aldrin e dieldrin, insetticidi ad ampio spettro attivi anche contro le termiti. Sono stati usati nell'industria, in agricoltura e per scopi di salute pubblica. Classe Ib;
- clordano, un insetticida non-sistemico persistente con azione fumigante. Il prodotto commerciale è un miscuglio fra  $\alpha$ - e  $\gamma$ -clordano, heptachlor e nonachlor. Classe II;
- clorobenzilato, un acaricida non-sistemico con una modesta attività insetticida. Classe III;
- DDT, efficace insetticida non-sistemico, persistente e che si accumula nel grasso animale. Inattivo contro gli acari. Classe II;
- 1,3-dicloropropene, gas usato come fumigante per i suoli e come nematodocida. Non è stato classificato dall'OMS;
- endrin, insetticida usato soprattutto per il cotone. E' stato anch'esso progressivamente sostituito da altri composti meno tossici e meno persistenti. Attualmente il suo uso in agricoltura è molto limitato. Classe Ib;
- heptachlor, un insetticida persistente, non-sistemico con azione leggermente fumigante. Viene utilizzato per il trattamento del suolo, delle sementi o direttamente sul fogliame. Classe II;
- lindano, un insetticida d'ampio spettro, usato fin dai primi anni '50 per il trattamento delle sementi, dei suoli, degli alberi, degli animali e anche per le manovre di salute pubblica. Classe II.

6) Erbicidi fenossiacetici.

I fenossiacetati vengono ampiamente utilizzati come erbicidi in agricoltura, nelle foreste e, anche se in misura ridotta, nel giardinaggio. Il composto più comunemente utilizzati sono l'acido 2,4-diclorofenossiacetico, l'acido 2,4,5-triclorofenossiacetico e l'acido 4-cloro, 2-metilfenossiacetico (MCPA). Il secondo composto è stato ormai vietato in molti Paesi perché in molte formulazioni commerciali furono riscontrate contaminazioni da diossina. Attualmente il livello di diossina di questi prodotto è notevolmente ridotto.

Vediamo brevemente alcuni esempi:

- acido 2,4-diclorofenossiacetico e i suoi sali ed esteri, vengono usati per il controllo delle erbe infestanti nei cereali. Classe II;
- MCPA, erbicida sistemico assorbito prontamente dalle foglie e dalle radici. Usato per il controllo delle erbacce annuali e perenni nei cereali e per i tappeti erbosi. Classe III;
- acido 2,4,5-triclorofenossiacetico, un erbicida sistemico usato da solo o in combinazione con il 2,4-D per controllare arbusti ed alberi. Classe II.

7) Erbicidi del gruppo dell'ammonio quaternario.

Sono molto usati i sali di diquat (essiccante ed erbicida rapidamente assorbito dalle piante che muoiono con l'esposizione alla luce, classe II) e paraquat (agisce al contatto, rapidamente degradato nel suolo, classe II).

8) Topicidi derivati della coumarina.

I composti derivati dalla coumarina vengono usati in medicina come anticoagulanti perché sono antagonisti della vitamina K. Sfruttando questo meccanismo vengono quindi utilizzati per la derattizzazione. Distinguiamo composti di prima generazione (come il warfarin) e di seconda generazione (brodifacoum), gli ultimi caratterizzati da un'emivita biologica molto elevata.

9) Altri composti.

Esistono alcuni altri pesticidi che non possono essere raggruppati in questo tipo di classificazione basata sulla struttura chimica. Tra queste ritroviamo l'atrazina, il dinitro-*o*-cresolo e il pentaclorofenolo.

**Pesticidi e cancro.**

Molti pesticidi hanno evidenziato un certo grado di cancerogenicità negli studi *in vivo* sull'animale (creosote e sulfallate ad esempio) oppure promotori del processo di cancerogenesi (DDT, clordano, lindano). Nel caso specifico di aldrin ed esacloruro di benzene, si è osservato un aumento nei roditori degli adenomi del fegato.

Desti anche qualche preoccupazione il fatto che in alcune formulazioni siano presenti dei contaminanti cancerogeni (come la 2,3,7,8-TCDD). I dati di letteratura che valutano la pericolosità dell'esposizione ai pesticidi sono purtroppo limitati. Gli studi epidemiologici (anche se a volte in modo contraddittorio) hanno mostrato che alcuni erbicidi aumentano la probabilità di sviluppare il sarcoma dei tessuti molli, un linfoma di tipo "non-Hodgkin", una leucemia o, anche se in misura molto minore, alcuni altri tumori (polmone e mammella ad esempio). Ulteriori studi epidemiologici sono quindi necessari per approfondire questo argomento.

Va infine ricordato che molte formulazioni commerciali comprendono delle sostanze veicolanti definite dal produttore come "ingredienti inerti", che possono in alcuni casi,

presentare un certo grado di tossicità. Il cloroformio ad esempio, è tossico per il fegato e per il sistema nervoso centrale.

### **Ancora qualcosa sui composti più noti.**

Vediamo più nel dettaglio qualche esempio di composti fra i più noti che interagiscono col sistema ormonale: methoxychlor, DDT e atrazina.

#### Il Methoxychlor.

Il Methoxychlor è un idrocarburo clorurato usato correntemente negli Stati Uniti come pesticida di rimpiazzo del DDT che ha mostrato deboli proprietà estrogeniche.

Questo composto può essere metabolizzato nel fegato in due composti demetilati, il 2,2-bis-(p-idrossifenil)-1,1,1-tricloroetano (HPTE) e il 2,2-bis-(p-idrossifenil)-1,1,1-dicloroetano (HPDE) oltre a due composti metilati. È stato dimostrato che ognuno di questi metaboliti può legare i recettori androgenici e estrogenici. Il metabolita estrogenico più attivo è l'HPTE, il quale stimola l'espressione del recettore estrogenico e può far diminuire la concentrazione di testosterone nonché determinare una riduzione di peso a livello seminale e della prostata quando somministrato a roditori neonati.

È stato anche dimostrato come il methoxychlor possa avere degli effetti sul sistema riproduttivo femminile con conseguente ridotta efficienza di impianto dell'embrione, aumentato tasso di abortività e formazione di gonadi di ridotta dimensione con associato un elevato tasso di apoptosi a livello delle cellule germinali. L'esposizione a questo pesticida a livello tardo-embriionale o nella fase postnatale precoce può causare anomalie a livello del sistema riproduttivo nonché un alterato comportamento nei maschi.

Il methoxychlor è un distruttore endocrino che a livello biologico produce metaboliti ad azione estrogenica e anti-androgenica i quali possono dare una diversa risposta a seconda dei recettori che legano.

#### Il DDT.

Il pesticida DDT (diclorodifeniltricloroetano) ha una storia lunga e travagliata. Nonostante sia stato bandito da molti paesi occidentali, viene ancora utilizzato dai paesi del Terzo Mondo come utile arma contro la malaria (uccidendo le zanzare elimina anche quelle portatrici del temuto *Plasmodium*).

Questo insetticida a basso costo e a largo spettro, il diclorodifeniltricloroetano, venne sintetizzato nel 1939 e il suo uso si diffuse rapidamente.

Negli anni '60 ci si rese però conto che il suo uso indiscriminato aveva portato alla scomparsa di alcune specie di uccelli canterini e rapaci e ben presto si sospettò anche di un eventuale effetto cancerogenico, tuttora però non verificato.

Ancora oggi gli organismi della maggior parte delle persone porta ancora traccia di questo composto che si accumula a livello del tessuto adiposo grazie alla sua idrofobicità.

Il suo prodotto di degradazione più comune è il diclorodifenildicloroetilene (DDE) il quale è anch'esso persistente nell'ambiente, si accumula nella catena alimentare e nel tessuto adiposo ed è stato ritrovato sia nel latte (umano e bovino) che nelle polveri degli ambienti casalinghi.

Le prime informazioni riguardo la tossicità del DDT furono molto rassicuranti poiché si notarono solo rischi di tossicità acuta molto limitati. L'ingestione del DDT, anche quando ripetuta, da volontari o da persone che hanno tentato il suicidio, provoca un basso tasso di letalità, ma una forte esposizione acuta può portare al vomito, con espulsione della sostanza. I primi sintomi sono iperestesia della bocca, seguita da parestesia della lingua, vertigini, tremori e vomito. Pochi effetti tossici correlati con l'inalazione di questo composto sono stati riportati.

Molte morti attribuite al DDT sono state dovute in realtà alla sua presenza in combinazione

con altri composti o solventi. Le dermatiti riscontrate nei lavoratori esposti al DDT erano anch'esse probabilmente dovute al solvente.

Quello che in realtà preoccupa di più è l'esposizione cronica al DDT. Grande rilievo è stato dato all'associazione tra l'esposizione a questa sostanza e il cancro. Gli studi di mutagenicità effettuati non hanno però portato ad alcun risultato chiaro. Nonostante esso agisca a dosi elevate come epatocarcinogeno in alcuni ceppi di topo, non ci sono dati convincenti per quanto riguarda l'uomo. Non esiste infatti una forte correlazione tra l'esposizione e il rischio di sviluppare il cancro, eccetto forse per quei lavoratori che sono stati esposti al DDT insieme ad altre sostanze chimiche per i quali vi è il rischio di sviluppare un tumore al pancreas.

A causa della sua enorme stabilità nel tempo e della preoccupazione riguardo i suoi non ancora chiari effetti di tossicità cronica, la maggior parte dei paesi sviluppati vietò l'uso di questo composto entro l'inizio degli anni '70 anche se i paesi che ancora ne fanno uso sono almeno due dozzine. Tra i motivi che ne rendono difficile l'eradicazione vi è ovviamente il basso costo e l'elevata efficacia come insetticida. Oggi i maggiori produttori di questo composto (introvabile in Europa o negli Stati Uniti) sono la Cina e l'India.

Tra le alternative proposte vi sono i piretroidi e i carbammati (i secondi particolarmente costosi).

L'OMS e altre organizzazioni internazionali sono inoltre del parere che per la lotta alla malaria sono necessarie anche altre strategie quali l'uso di predatori naturali (pesci e pipistrelli), l'eliminazione delle aree di crescita delle zanzare e la ricerca di batteri e altri patogeni che possano attaccare il parassita ospite della zanzara.

#### L'atrazina.

Le clorotriazine rappresentano oggi gli erbicidi più pesantemente utilizzati. Fra di essi il composto più comunemente utilizzato è l'atrazina, alla quale circa il 60% della popolazione degli USA è oggi esposta. L'atrazina, utilizzata per il controllo dell'erbacce contaminanti, desta preoccupazioni perché quando viene assunta con la dieta, aumenta il rischio di sviluppare il carcinoma della mammella. Questa sostanza è inoltre in grado di distruggere il controllo ipotalamico della funzione pituitario-ovarica, riducendo anche i livelli circolanti di prolattina e ormone LH.

L'esposizione *in utero* all'atrazina altera lo sviluppo della ghiandola mammaria durante lo sviluppo, come dimostrato nei ratti, oltre ad aumentare la sensibilità ai cancerogeni dopo il completamento dello sviluppo sessuale.

I meccanismi alla base della tossicità dell'atrazina siano ancora in buona parte da chiarire, come pure la possibilità che si possano avere anche nella specie umana.

#### **4) Proprietà degli ftalati come distruttori endocrini.**

I composti clororganici sono tra le sostanze più persistenti nell'ambiente mai prodotte. Essi possono conservarsi senza degradarsi ed accumularsi negli organismi viventi. Numerose evidenze fanno inoltre sospettare che questi composti possano appartenere alla classe dei distruttori endocrini.

Un ottimo esempio è rappresentato dal PVC, un prodotto di consumo di vita breve ritrovabile negli oggetti usati ogni giorno come imballaggi alimentari, giocattoli, tubi, cavi, ecc. Greenpeace crede fermamente che il PVC sia il tipo di plastica più pericolosa a causa del suo elevato contenuto di sostanze clorate e dell'elevato contenuto di additivi che ne ostacolano la riciclabilità poiché durante i processi di riciclaggio esso può dare origine a diossine.

L'uso di additivi è necessario durante i processi di plastificazione e la formulazione del PVC ne contiene pressoché di tutti i tipi, dai lubrificanti, ai plasticizzanti, stabilizzanti all'UV,

ritardanti di fiamma, anti-statici, stabilizzatori al calore, stabilizzatori alla luce, vernici, inchiostri e adesivi.

Gli additivi permettono anche di evitare il naturale rilascio di HCl dal PVC in seguito a depolimerizzazione dovuta a irradiazione.

Un gran numero di esteri di ftalati usati nella produzione del PVC al quale conferiscono flessibilità e lavorabilità, hanno mostrato una debole attività estrogenica *in vitro*, suggerendo come essi possano rappresentare una minaccia per la salute riproduttiva umana.

Gli ftalati sono presenti nell'acqua in quantità variabili fra i nanogrammi e i milligrammi per litro. La variabilità osservata è dovuta alle diverse sensibilità delle diverse metodologie utilizzate per l'analisi e al punto in cui il campione viene prelevato (affluente, effluente, fiume di raccolta).

Molti degli ftalati studiati mostrano di poter ridurre l'affinità di legame del 17- $\beta$ -estradiolo al suo recettore. Tra questi ritroviamo il BBP ("Butyl-Benzyl-Phtalate"), il DBP ("Di-*n*-Butyl-Phtalate"), il DEHP ("Bis(2-Ethylhexyl)Phtalate"), il DEHA ("Bis-(2-Ethylhexyl)Adipate"), il benzofenone, l'*n*-butilbenzene, il 4-nitrotoluene, il BHA ("Butylated Hydroxyanisole") e il 2,4-diclorofenolo.

Il BBP, il DBP e il BHA sono molto potenti anche nell'induzione della proliferazione in cellule dotate di recettore estrogenico e sono in grado di attivarne *in vitro* l'attività trascrizionale.

Purtroppo non esistono ancora dati né riguardo gli effetti estrogenici acuti *in vivo* né riguardo quelli cronici. Il BHA viene aggiunto a molti alimenti come antiossidante e quindi la sua principale via d'accesso all'organismo umano è quella per ingestione. Ha una bassa tossicità orale e di esso viene ingerita ogni giorno una quantità media pari a 0,13 mg/kg di peso corporeo. Il BHA può accumularsi in piccola parte a livello biologico. Questo composto non è l'unico ftalato a poter essere assunto con la dieta, anche molti altri che vengono ceduti dagli imballaggi possono essere introdotti nell'organismo per via orale. Ad esempio i livelli di DBP nel cibo possono variare da 50 a 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (secondo stime effettuate negli USA). Gli ftalati (data la loro lipofilità) si ritrovano soprattutto in alimenti grassi come creme, burro o formaggi.

Una valutazione approfondita dei dati esistenti sulla tossicità degli ftalati è stata effettuata recentemente dal National Toxicology Program's Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction (CERHR), con lo scopo di uniformare le valutazioni sui potenziali effetti di queste sostanze sulla salute umana.

Dei composti studiati, commentiamo brevemente i seguenti cinque:

- butil-benzil-ftalato (BBP);
- di-(2-etil)-ftalato (DEHP);
- di-isodecil-ftalato (DIDP);
- di-isononil-ftalato (DINP);
- di-*n*-butil-ftalato (DBP).

### BBP

Il BBP è utilizzato nella manifattura delle mattonelle di vinile e del PVC da utilizzare nella produzione di nastri trasportatori per alimenti, prodotti di vinile e, in misura minore, guanti di vinile e adesivi.

La stima più affidabile dell'esposizione nella popolazione generale è di 2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  di peso corporeo al giorno negli adulti, con livelli di esposizione fino a 2-3 volte superiori nei bambini. L'esposizione occupazionale può arrivare invece fino a 286  $\mu\text{g}/\text{kg}$  per giorno lavorativo.

Gli studi nell'animale hanno evidenziato che il BBP è tossico per lo sviluppo di topi e ratti, anche se i dati sono insufficienti per valutare il rischio potenziale, anche per quanto riguarda gli effetti dell'esposizione perinatale sulla capacità riproduttiva. Vi è quindi la necessità di uno studio multigenerazionale che valuti gli effetti sulla capacità riproduttiva, sulla fertilità e sull'apparato genitale nell'animale.

Nell'uomo i dati sui lavoratori esposti andrebbero meglio organizzati, anche se la principale via di esposizione sembra essere la dieta. Per questo motivo urge una raccolta accurata di dati più affidabili circa i livelli di esposizione.

#### DEHP

La tossicità di questo composto deriva principalmente dalla conversione nel suo metabolita attivo che dà tossicità testicolare, il MEHP (mono-(2-etil-esil)-ftalato) da parte delle lipasi intestinali, presenti in misura nettamente superiore nei roditori rispetto ai primati. Per questo motivo si pensa che gli effetti sull'uomo siano probabilmente minimi. Non è ancora noto inoltre se il MEHP sia tossico nella stessa misura per le cellule del Sertoli umane e murine.

Risulta quindi di primaria importanza stabilire i livelli di esposizione nell'uomo oltre a valutare le conseguenze nel lungo periodo su soggetti esposti pesantemente al DEHP. Una più accurata comprensione delle diverse sensibilità fra una specie e l'altra è inoltre auspicabile.

#### DIDP

Questo composto viene usato in molti prodotti di consumo. I livelli di esposizione sembrano essere inferiori a quelli del DEHP e probabilmente non eccedono i 3-30 µg/kg al giorno. L'esposizione occupazionale avviene per via inalatoria e dermica.

I dati disponibili nell'animale sono sufficienti per stabilire che l'esposizione orale materna al DIDP può causare problemi sullo sviluppo del feto durante la vita adulta.

#### DINP

Anche questo plastificante viene utilizzato in molti prodotti di consumo. I livelli di esposizione dell'adulto non sembrano essere superiori a 3-30 µg/kg al giorno.

Nei ratti il DINP ha mostrato di essere in grado di provocare effetti negativi sulla capacità riproduttiva. Il fatto che questo ftalato sia presente nei giocattoli impone la necessità di approfondire i rischi derivanti dal fatto che questi possano essere messi in bocca dai bambini.

#### DBP

Il livello di esposizione di questo ftalato (presente anche nei solventi per vernici) è di circa 2-10 µg/kg al giorno.

Nei ratti provoca malformazione dell'apparato riproduttore quando somministrato per via orale, perché agisce sulla biosintesi del testosterone. Nei primati sono necessari elevati livelli plasmatici per ottenere gli stessi effetti.

In generale risulta ancora piuttosto difficile utilizzare i dati attualmente disponibili sull'animale per valutare i potenziali rischi per l'uomo. Di primaria importanza sarebbero degli studi volti a valutare gli effetti dell'esposizione perinatale agli ftalati, nonché valutare con maggiore accuratezza i livelli di esposizione nell'uomo.

### **5) I ritardanti di fiamma ("Brominated Flame Retardants, BFR").**

I progressi nella scienza dei polimeri degli ultimi 50 anni hanno portato all'introduzione di numerosi nuovi composti con diverse proprietà e applicazioni. Il risultato è che ognuno di noi

è circondato da una vasta gamma di polimeri presenti nei vestiti, nei materiali elettronici, nei veicoli e in molti altri prodotti di consumo. Le automobili moderne contengono addirittura 100 kg di polimeri di vario genere.

Molti di questi composti derivano dal petrolio e sono dunque infiammabili. Al fine di aumentarne la sicurezza numerosi ritardanti di fiamma sono oggi usati nella produzione di molti prodotti, al fine di incrementarne la resistenza alla combustione. La domanda di BFR quindi in continuo aumento: oggi ne esistono più di 175. Gli alogeni (ma soprattutto i composti bromurati) sono molto efficaci nell'evitare la propagazione della fiamma e vengono impiegati anche nei processi che richiedono elevate temperature.

I ritardanti di fiamma sono sfruttati per proteggere gli utenti da fuochi accidentali riducendo il potere infiammabile di un prodotto plastico o fatto di un polimero sintetico.

Il composto bromurato tris(2,3-dibromopropil)fosfato (Tris) è ad esempio un ritardante di fiamma usato nei pigiami per bambini fino al 1977 quando fu vietato perché è un potente cancerogeno e mutageno.

HBCDD è un BFR ciclico-aromatico che viene prodotto commercialmente da una miscela di stereoisomeri. Alfa, beta e gamma-HBCDD si ritrovano in molti prodotti commerciali a percentuali che variano dal 6 all'8% fino all'80%. HBCDD è stato prodotto per venti anni in tutto il mondo e veniva addizionato a bassissimi livelli (0,67% - 2,5%) alle schiume di polistirene che viene usato come materiale isolante nell'industria. Il PBDE è il ritardante di fiamma più importante in termini di concentrazione nell'ambiente e per la sua persistenza sia nei compartimenti abiotici che nell'uomo e negli animali.

BTBPE è un BFR utilizzato nella produzione dei materiali plastici che richiedono elevate temperature di produzione. Si pensa che la rottura di questa molecola possa portare alla produzione del 2,4,6-tribromofenolo, un agente alchilante.

#### Classificazione.

I BFR si suddividono in tre grosse categorie secondo il modo in cui vengono incorporati nel polimero: monomeri bromurati, reattivi ed additivi.

I reattivi (come il tetrabromobisfenolo A, TBBPA) si legano chimicamente alle plastiche mentre i composti additivi (eteri bifenili polibromurati, PBDE; esabromociclododecano, HBCDD) sono invece semplicemente miscelati nel prodotto.

Molti bromofluorometani sono invece stati utilizzati come estintori di fiamma.

I polibromodifenili (PBB) infine, sono oggi proibiti. Nel 1973 in Michigan per un errore, queste sostanze finirono nel mangime di numerosi bovini causando una contaminazione diffusa. I soggetti che furono esposti a questa contaminazione presentano a tutt'oggi dei livelli significativi di questa diossina nel loro sangue poiché l'emivita dei PBB è di circa 29 anni.

#### Fonti di BFR.

La fonte più ovvia di BFR sono le industrie che producono plastiche cui vengono addizionati questi composti, oltre ad altre fonti possibili come ospedali, inceneritori, impianti di riciclaggio della plastiche derivate da apparecchi elettrici. Molti apparecchi elettrici come computer e televisori, contengono diversi ritardanti di fiamma al loro interno e possono quindi divenire una fonte preoccupante di contaminazione ambientale.

#### Comportamento nell'ambiente.

La maggior parte dei BFR sono composti ad elevato grado di bromurazione. Queste sostanze sono generalmente poco volatili, hanno bassa solubilità e si accumulano negli organismi viventi e si diffondono quindi poco nell'ambiente. D'altro canto i composti a più ridotto grado di bromurazione sono invece caratterizzati da un più elevato grado di volatilità, da una

maggiore solubilità, pur mantenendo la capacità di accumularsi negli organismi viventi. Questi ultimi hanno quindi un comportamento molto simile a quello osservato per i contaminanti clorurati come diossine e PCB.

La pressione di vapore inoltre, è un parametro fisico-chimico molto importante per valutare il comportamento di un composto nell'atmosfera: essa correla inversamente con il numero di atomi di bromo presenti in un composto. Si ipotizza quindi che i composti a maggior livello di bromurazione siano per lo più presenti sotto forma di particolato piuttosto che in fase di vapore.

Si discute ancora se i deca-BDE possano trasformarsi nell'ambiente (ad esempio per azione fotolitica) in composti a minor livello di bromurazione, poiché essi sono i composti maggiormente utilizzati mentre il BDE-47 e il BDE-99 sono quelli che si riscontrano più frequentemente.

I livelli di PBDE nei lavoratori esposti risultano ovviamente superiori a quelli riscontrati nella popolazione generale (diversi anche di un ordine di grandezza).

#### Vie di esposizione

Il comportamento nell'ambiente dei BFR varia secondo le caratteristiche chimiche ed è quindi piuttosto eterogeneo.

Una delle principali vie di esposizione è sicuramente la dieta (soprattutto pesce grasso): il consumo di pesce è stato ad esempio correlato con il quantitativo di PBDE nel latte materno. Anche il rilascio di PBDE dagli oggetti di consumo è una fonte di esposizione. I luoghi di lavoro che contengono molto materiale elettronico sono altamente contaminati.

È stato stimato che la media giornaliera di esposizione al PBDE nell'uomo è di 123 ng/persona (32,9 attraverso la sola via respiratoria).

I livelli ambientali (oltre che nel latte materno) di PBDE sono in aumento dagli anni '70 e ci si domanda per quanto tempo potranno ancora crescere in futuro. In Europa questo trend varia da regione a regione.

La presenza di queste sostanze negli ambienti chiusi costituisce un rischio per l'esposizione, mentre l'esposizione per via dermica sembra invece la meno verosimile. La concentrazione di BDE-47 (il composto dominante nei soggetti non esposti per lavoro) è aumentato nella popolazione europea dai primi anni '70 fino alla metà degli anni '90.

#### Effetti.

Recentemente è sempre più evidente l'effetto dell'impatto ambientale di queste sostanze, soprattutto dopo che si è rivelata la presenza di BPDE e TBBPA nel latte materno.

La preoccupazione deriva inoltre dalla scoperta che queste sostanze sono tossiche e hanno effetti simili a quelli delle diossine, oltre a disturbare il corretto funzionamento degli ormoni. Uno dei fenomeni che desta particolare preoccupazione è la termodegradazione a prodotti quali dibenzo-p-diossine e dibenzofurani, giudicati dall'OMS come altrettanto tossici e persistenti delle diossine tradizionali.

Nei tessuti umani i composti riscontrati più frequentemente sono il BDE-47 (più frequente), il BDE-99, il BDE-100, il BDE-153, il BDE-154 e il BDE-183.

I BFR sono in grado di disturbare il meccanismo degli ormoni tiroidei.

Il BDE in particolare, condivide le potenzialità di molti composti organoalogenati che provocano nel topo una riduzione della concentrazione di ormone tiroideo (T4) nel siero.

Il meccanismo d'azione coinvolge tre livelli di interazione:

- a) funzione e regolazione della ghiandola tiroidea;
- b) metabolismo dell'ormone tiroideo;

## c) meccanismi di trasporto.

Limitate sono invece le evidenze di un'azione diretta sulla ghiandola tiroidea, anche se i topi esposti cronicamente al Deca-BDE hanno sviluppato iperplasia e tumori della tiroide.

Nell'uomo l'esposizione occupazionale provoca ipotiroidismo primario.

A livello metabolico gli organoalogenati potrebbero agire sulla sulfonilazione, deiodinazione e glucuronidazione degli ormoni tiroidei.

Il TBBPA ha mostrato di inibire ad esempio la sulfonilazione dell'ormone tiroideo alle stesse concentrazioni dei composti organoclorurati. Molti studi hanno anche dimostrato la capacità dei BFR (tra cui il DE-71, il DE-79 e il BDE-47) di indurre la glucuronidasi epatica.

Anche il trasporto dell'ormone tiroideo può essere influenzato dai BFR.

Il metabolita idrossilato del BDE-47 (ritrovato nel plasma umano) lega la proteina transtiretina (TTR) responsabile del trasporto dell'ormone T4 dalla madre al feto e attraverso la barriera emato-encefalica.

Il legame dei metaboliti organoalogenati alla proteina TTR potrebbe così facilitarne il trasporto nel feto dove possono così interagire con lo sviluppo cerebrale, portando anche a successive alterazioni comportamentali. Alcuni BFR possono infine legare e attivare i recettori per gli estrogeni, anche se gli studi sono ancora limitati.

Esposizione occupazionale.

Particolarmente esposti a queste sostanze sono i lavoratori impiegati nel settore dei computer e delle gomme. Anche i lavoratori coinvolti nello smaltimento dei computer sono particolarmente a rischio.

Gli impianti dove vengono riciclati i componenti elettronici sono infatti ricchi di BDE-183, BDE-209 e, in misura minore, di BDE-47, BDE-153 e BDE-154. Anche i composti TBBPA, TBBPE e BB-209 sono stati spesso ritrovati in misura considerevole, anche nel siero dei lavoratori esposti.

Un'importante via di esposizione è rappresentata dall'inalazione delle polveri che si originano dai materiali elettronici e che vengono mobilitate dall'intervento dell'uomo.

Metabolismo.

Negli organismi esposti il metabolismo è un importante fattore che determina il bioaccumulo, il destino, la farmacocinetica la tossicità di un contaminante. L'esposizione a questi determina un'induzione dell'attività della citocromo P450 monossigenasi di fase I oltre agli enzimi di fase II come i glucuronosiltransferasi, sulfotransferasi e glutatione-S-transferasi.

I metaboliti della fase I sono idrossilati e coniugati in fase II.

Si possono formare anche dei metaboliti dealogenati per l'azione degli enzimi dealogenanti.

Le attuali conoscenze sul metabolismo dei BFR sono limitate a poche classi di composti: PBDE, PBB, TBBPA, HBCDD e BTBPE.

Vediamo nel dettaglio alcune classi principali di ritardanti di fiamma.

1) PBDE.

Questo gruppo comprende, fra i composti maggiormente utilizzati, i cosiddetti penta-, octa- e decabromodifenil eteri. Quest'ultimo in particolare, rappresenta l'80% della produzione di PBDE. La maggior parte degli studi effettuati per stabilire i loro effetti tossici ha utilizzato delle miscele, anche se esistono studi che hanno preso in considerazione un composto singolo, senza problemi di interferenza dei possibili contaminanti. Un altro problema consiste nella possibilità che si formino altri composti derivati nel corso dei processi di combustione.

In generale, questi composti provocano effetti tossici sugli animali da esperimento. Il Deca-PBDE sembra essere il composto con la più bassa dose tossica.

L'effetto più critico del penta-PBDE è quello provocato sullo sviluppo neurocomportamentale e, anche se in misura minore, sul funzionamento degli ormoni tiroidei nella prole. L'octa-PBDE è teratogeno su ratti e conigli, mentre il Deca-PBDE provoca malformazione della tiroide, del fegato e dei reni nell'animale adulto.

Il Deca-PBDE non ha evidenziato un comportamento tale da poter essere classificato come carcinogeno per cui lo IARC lo ha posto nel Gruppo 3 ("probabili cancerogeni").

A tutt'oggi non è noto se il quantitativo di PBDE che si riscontra nei tessuti umani sia sufficiente a causare effetti tossici, anche se la dose minima che causa effetti nell'animale è superiore alla quantità riscontrata nella dieta umana.

Ancora da valutare è infine la possibilità che i PBDE siano degradati ad altri composti a minore contenuto di bromo o ad altri composti bromurati con una maggiore tossicità rispetto al composto di partenza.

In generale la tossicità dei PBDE non sembra essere elevata.

## 2) HBCD.

L'esabromocicloesano è un ritardante di fiamma usato nei polimeri e nell'industria tessile. L'applicazione principale è il polistirene. L'HBCD viene assorbito nel tratto gastrointestinale e per questo motivo si può ipotizzare che la principale via di esposizione sia l'alimentazione. Dopo somministrazione orale questo composto si ritrova in diversi organi, accumulandosi nel tessuto adiposo. Molti metaboliti sono ancora da identificare.

Mancano ancora molti studi per poter effettuare una corretta valutazione del rischio; dai dati ottenuti nell'animale si evince comunque che il fegato è il bersaglio principale. Anche la tiroide sembra essere sensibile.

I test di mutagenesi sono negativi.

I test sui topi hanno infine evidenziato alcuni effetti sul comportamento.

## 3) PBB.

Teoricamente i PBB dovrebbero presentare gli stessi effetti della loro controparte clorurata: i PCB. Di conseguenza i PBB planari dovrebbero essere i più tossici perché si legano al recettore arilico. In effetti il 3,3',4,4',5,5'-esabromobifenile è planare ed è il composto più tossico fra quelli che appartengono a questa categoria. In generale però l'abbondanza nell'ambiente di queste sostanze è minore di quella dei PCB.

Gli studi epidemiologici sugli effetti sull'uomo di questi composti possono essere suddivisi in due categorie: il caso di contaminazione accidentale avvenuto nel Michigan nel 1973 (in cui non fu però possibile correlare i livelli plasmatici ai sintomi sviluppati) e quello del Wisconsin dove l'incidenza dei sintomi, perlopiù a livello neurologico e scheletro-muscolare, fu nettamente superiore. In nessuno dei due casi fu possibile una correlazione fra la concentrazione plasmatica e/o nel tessuto adiposo e i sintomi sviluppati.

Riassumendo, la preoccupazione principale nei confronti di questi composti scaturisce dal fatto che molte lacune nella caratterizzazione del rischio di queste sostanze devono ancora essere colmate, anche se finora questi composti non hanno evidenziato elevati gradi di esposizione e tossicità.

## Composti derivati

Composti quali le dibenzo-p-diossine bromurate (PBDD) e i dibenzofurani (DF) non sono presenti naturalmente ma si formano per reazione fotochimica o termica da precursori che

sono soprattutto BFR. Sono dunque necessari studi di approfondimento anche sugli effetti di questi composti derivati per i quali ancora non è possibile una corretta valutazione del rischio e delle conseguenze ecologiche.

È inoltre necessario approfondire il fenomeno di produzione di PBDD e DF durante i processi di incenerimento: queste sostanze sono infatti state ritrovate nei gas e nei liquidi effluenti oltre che nelle ceneri.

Scarse sono anche le informazioni sulla distribuzione e sulla degradazione nell'ambiente di queste diossine. È noto che queste sostanze sono meno mobili della controparte clorurata, oltre a decomporsi più rapidamente per via fotochimica.

#### Effetti delle dibenzo-p-diossine e dei dibenzofurani polibromurati.

Il rapido incremento nell'utilizzo dei composti ritardanti di fiamma è stato accompagnato da una crescente preoccupazione per le diossine bromurate (dibenzo-p-diossine polibromurate, PBDD e dibenzofurani polibromurati, PBDF) che possono essere presenti in alcune miscele commerciali oppure derivare dalla combustione di prodotti contenenti BFR.

Le diossine polibromurate sono meno persistenti nell'ambiente rispetto a quelle clorate (nonostante il loro maggior grado di lipofilità) probabilmente a causa della loro maggiore sensibilità alla fotodegradazione dovuta alla minore forza del legame del carbonio con il bromo rispetto a quello con il cloro.

Gli effetti di questi composti sono sostanzialmente paragonabili a quelli delle classiche diossine policlorurate: teratogenesi, cancerogenesi, disturbo sulla riproduzione, immunotossicità, cloracne, ecc.

Ciononostante queste sostanze hanno una tossicità molto minore rispetto al TCDD, probabilmente a causa di una loro diversa capacità di legame al recettore arilico.

I dati epidemiologici per questi composti sono pressoché inesistenti data l'assenza di dati sui livelli di esposizione della popolazione.

Il fatto che comunque essi derivino dai BFR che sono sempre più utilizzati e che, seppur in misura minore, essi agiscano con gli stessi meccanismi delle diossine clorate, impone quindi un certo grado di cautela.

#### Conclusioni.

È inutile dire che la vasta distribuzione nell'ambiente dei BFR, unita alla loro comparsa nei tessuti umani e animali e alla loro tossicità rappresentano nell'insieme un problema emergente, anche e soprattutto alla luce delle scarse conoscenze sui loro effetti e sul loro destino nell'ambiente.

Nonostante il problema sia noto già dagli anni '80, soltanto negli ultimi cinque anni si è iniziato a considerare seriamente il problema, anche dopo la messa a punto delle metodiche per la loro corretta identificazione.

Purtroppo le attuali conoscenze sul loro comportamento nell'ambiente rimangono ancora confinate a poche delle numerosissime sostanze che compongono la categoria dei ritardanti di fiamma.

Il numero delle pubblicazioni scientifiche sull'argomento è comunque in continua crescita, segno che questo problema ha catturato l'attenzione della comunità scientifica internazionale.

Desti poi particolare preoccupazione la formazione di diossine polibromurate e di furani (ad esempio durante i processi che richiedono elevate temperature) oltre che dei loro metaboliti idrossilati ancora più pericolosi della diossina da cui derivano.

## 6) L'acido perfluorooctanico e i suoi sali.

L'acido perfluorooctanoico (PFOA) e i suoi sali sono composti organici fluorurati che sono stati sintetizzati per più di 50 anni. Queste sostanze hanno numerose applicazioni sia industriali che commerciali nel campo dei refrigeranti, tensioattivi e dei polimeri oltre che come componenti di farmaci, ritardanti di fiamma, lubrificanti, adesivi, cosmetici, insetticidi, ecc.

Il PFOA è usato soprattutto come intermedio nella sintesi di esteri fluoroacrilici, mentre i suoi sali sono usati come coadiuvanti nella sintesi di fluoropolimeri e fluoroelastomeri.

Il PFOA è stabile nell'ambiente a causa della stabilità del legame carbonio-fluoro. Non ci sono evidenze che indichino che possa degradarsi per fotolisi, né che possa subire una biodegradazione (nemmeno una defluorurazione a livello di fase II del metabolismo).

Già nel 1968 si era notato che nel siero umano erano presenti dei composti organici fluorurati successivamente identificati come PFOA e PFOS (acido perfluorooctanosulfonico) nel siero dei lavoratori esposti. La maggior parte degli studi è stata però effettuata con il sale di ammonio del PFOA (APFO).

La tossicocinetica di questi composti nell'uomo è ancora da chiarire, nonostante l'importanza del tema dal punto di vista degli effetti sulla salute. La concentrazione plasmatica media nel plasma dei lavoratori della 3M varia ad esempio da 0,1 a 81,3 ppm.

I dati sull'emivita di questi composti nell'organismo umano sono pochi e limitati ai lavoratori esposti (4,37 anni).

Nel maggio del 2000 la 3M annunciò che avrebbe volontariamente interrotto la produzione di materiale a base di perfluorooctanosulfonil fluoruro (POSF) dopo la scoperta che un metabolita di questo composto, il perfluorooctanosulfonato (PFOS), è ampiamente distribuito negli organismi animali (uomo compreso) a causa della sua propensione al bioaccumulo e alla sua persistenza. La presenza di questo metabolita nel plasma è probabilmente segno dell'esposizione ad esso o ai suoi precursori, anche se il meccanismo attraverso il quale arriva al plasma non è ancora stato chiarito.

In uno studio di Olsen e coll. (2003) la concentrazione plasmatica di PFOS e PFOA sono state correlate tra loro e questo è molto interessante dato che ciascuno dei due composti non può essere convertito direttamente nell'altro. Ancora da individuare è però la fonte di PFOS.

La tossicità di quest'ultimo non è ancora stata completamente compresa, ma sembra interferire con il trasporto degli acidi grassi e il loro metabolismo, con le funzioni della membrana plasmatica e con il funzionamento del mitocondrio.

Il range di concentrazione plasmatica nel plasma della popolazione generale è compreso tra 30 e 40 ppb.

Studi sull'animale hanno mostrato che l'APFO si assorbe bene per via orale e inalatoria e in misura minore per via dermica.

Il PFOA si distribuisce soprattutto nel fegato, plasma e rene e in misura minore, in altri tessuti incluse le gonadi.

Nel ratto la sua eliminazione sembra essere regolata a livello ormonale, ma questo non avviene nei primati e nell'uomo.

### Studi epidemiologici.

Un primo studio epidemiologico è stato condotto analizzando i dati ottenuti tramite la sorveglianza medica dei dipendenti di due stabilimenti a Decatur e Anversa.

Una correlazione positiva è stata ottenuta tra la concentrazione plasmatica di PFOA e quella di colesterolo e trigliceridi, mentre è stata osservata una correlazione negativa con l'HDL.

I dati furono sostanzialmente confermati con una successiva indagine longitudinale condotta nello stesso stabilimento.

Va sottolineato che i livelli plasmatici di PFOA erano superiori nei dipendenti dello stabilimento di Decatur perché quelli di Anversa erano più giovani e presentavano dei valori emopoietici più regolari.

Un altro studio longitudinale è stato invece effettuato all'impianto di Cottage Grove nel Minnesota, raccogliendo i dati nel '93, nel '95 e nel '97 (111, 80 e 74 soggetti rispettivamente).

Nello studio furono inclusi solo gli uomini. Nessuna correlazione è stata ottenuta fra parametri plasmatici e concentrazione di PFOA tranne che per i livelli di CCK che correlavano negativamente.

In seguito venne effettuato anche uno studio retrospettivo di mortalità su 3.537 soggetti (di cui solo 749 donne) di cui 398 deceduti, calcolando l'SMR corretto per età, sesso, razza e comparato con la mortalità media degli USA e del Minnesota. Da questo studio emerse che la mortalità per carcinoma della prostata era significativamente superiore alla media (SMR=2,03 con 4 morti anziché 1,97 attesi).

In uno studio successivo, venne calcolato un SMR di 1,31 per il cancro della vescica, 1,67 per il grosso intestino, 1,30 per la prostata, 1,34 per il cancro del pancreas, anche se va detto che il numero di soggetti deceduti per queste patologie era pari a 1 o 2 al massimo.

#### Studi in vivo sull'animale.

##### TOSSICITA' ACUTA

Distinguiamo gli studi a seconda dell'obiettivo:

- tossicità orale: è stata studiata su ratti in tre studi. La morte si è avuta a concentrazioni superiori a 464 mg/kg e sono state osservate delle anomalie negli organi (rene, stomaco e utero) a 500 mg/kg. Tra i sintomi osservati ritroviamo rossore al viso, ipoattività, andatura e postura anomale, salivazione eccessiva, atassia, ecc.
- tossicità per inalazione: è stato condotto uno studio con i ratti ai quali venne fatto inalare del PFOA alla concentrazione di 18,6 mg/l per 1 ora. I sintomi si sono manifestati dopo circa 14 giorni, tra questi ipoattività, lacrimazione, respirazione irregolare, tremori, ecc. Questa concentrazione non è stata letale per i ratti trattati.
- tossicità dermica: nessuna lesione è stata osservata nei conigli trattati. L'irritazione dermica osservata è consistita in un moderato eritema, edemi e una lieve atonia.
- tossicità oculare: nei conigli testati con 0,1 g l'APFO ha mostrato di essere un irritante.

##### TOSSICITÀ SUBCRONICA.

Questi studi sono stati effettuati su diverse specie animali tra cui scimmie e ratti. Nei roditori il fegato sembra essere l'organo target d'elezione.

Lo studio effettuato sui ratti prevedeva la somministrazione di diverse dosi di APFO (0, 30, 100, 300, 1.000, 3.000, 10.000, 30.000 ppm) per 28 giorni.

Tutti gli animali trattati con le due dosi più alte sono morti entro la prima settimana. Negli animali trattati con 1.000 ppm o più si è osservato un ridotto intake alimentare, mentre la perdita di peso si è osservata da 300 ppm nei maschi e da 100 nelle femmine.

Il peso del fegato è aumentato in quasi tutti gli animali, mentre nessun altro organo è risultato danneggiato.

In uno studio di tossicità subcronica di 90 giorni effettuato sulle scimmie, vennero somministrate dosi di PFOA di 0, 3, 10, 30 e 100 mg/kg. Alla fine dell'esposizione gli animali

furono sacrificati, i loro organi e tessuti pesati, esaminati per patologie evidenti e avviate all'indagine istologica. Tutti gli animali nel gruppo trattato con 100 mg/kg morirono nel corso dell'esperimento, mentre alle due dosi più basse nessun animale morì.

I risultati degli esami ematochimici erano alterati in alcuni gruppi (ridotti valori di ematocrito, emoglobina, fosfatasi alcalina, AST, ALT, ecc.) mentre era aumentato il numero di piastrine.

Nessuna lesione macroscopica fu osservata nei tessuti di nessun animale.

In un altro studio effettuato sui ratti ai quali furono somministrati per via orale concentrazioni di PFOA pari a 0, 10, 30, 100, 300 e 1.000 ppm vennero invece osservate (oltre alle alterazioni dei parametri ematochimici) anche delle lesioni epatiche che correlavano con le dosi di sostanza.

#### Studi di mutagenesi.

L'APFO non è risultato mutageno nei test effettuati con *S. typhimurium* e *E. coli*, nemmeno dopo attivazione con microsomi di mammifero.

I risultati dei test per le aberrazioni cromosomiche e la poliploidia sono contraddittori.

#### Cancerogenesi.

E' ormai documentato che l'APFO è un potente induttore della proliferazione dei perossisomi a livello epatico (nei ratti è strettamente dipendente dagli ormoni) ed è una possibile causa di epatomegalia nei roditori oltre ad essere in grado di indurre un danno ossidativo al DNA.

I dati raccolti fino a oggi fanno pensare che il meccanismo di induzione della proliferazione dei perossisomi epatici sia alla base della tossicità epatica e della cancerogenesi epatica.

Molti composti non genotossici sono in grado di indurre il cancro a livello delle cellule di Leydig; alla base di questo fenomeno sembra esserci la distruzione dell'asse ipotalamo-ipofisario con risultate aumento dell'ormone luteinizzante (LH) il quale potrebbe avere un ruolo mitogenico su queste cellule, oltre ad indurre la secrezione di testosterone.

Nei ratti non è stato osservato questo aumento, ma un incremento dell'attività dell'enzima aromatasi (responsabile della conversione del testosterone in estradiolo) che potrebbe causare di riflesso un aumento dei livelli di LH con il compito di riportare alla normalità i livelli di testosterone.

L'incremento non osservato di ormone LH potrebbe poi a sua volta essere compensato per il riassetto dell'omeostasi ormonale.

L'incremento della concentrazione di estradiolo stimolata dall'APFO potrebbe essere responsabile dello sviluppo di carcinomi della mammella.

L'APFO induce infine il tumore del pancreas attraverso meccanismi tuttora ignoti: si pensa ad un possibile ruolo dell'incremento dei livelli di colecistochinina (CCK), ma i dati in proposito sono ancora conflittuali.

#### Tossicocinetica

Il PFOA è ben assorbito in caso di esposizione orale e inalatoria. Il PFOA si distribuisce prima di tutto nel fegato, nel plasma e nel rene e, in misura minore, negli altri distretti dell'organismo.

L'emivita del PFOA è stata determinata nel ratto, nel topo, nel coniglio e nelle scimmie con differenze significative fra le razze. Il PFOA viene escreto nelle urine e nelle feci senza essere biotrasformato. L'eliminazione renale sembra essere influenzata dalla concentrazione degli ormoni sessuali.

### Conclusioni

La tossicità acuta di questi composti non sembra essere elevata mentre il vero problema è la possibilità di un loro bioaccumulo nell'organismo, inoltre il PFOA non si accumula solo nei lavoratori esposti, ma anche nella popolazione generale.

Anche in questo caso quindi la preoccupazione deriva principalmente dal fatto che gli effetti a lungo termine della sostanza accumulata nell'organismo non sono di fatto prevedibili e questo rende dunque plausibile ogni precauzione volta a ridurre, o meglio eliminare, il contatto fra questi composti e la popolazione esposta e quella generale.

### **7) Le diossine .**

Questa categoria di composti chimici si riferisce a tutti gli agenti che legano il recettore arilico Ah ed è comunemente raggruppata sotto la sigla DLC ("Dioxin Like Compounds"). Essa include strutture multianello alogeno-sostituite coplanari come le dibenzodiossine policlorurate (PCDD), i dibenzofurani policlorurati (PCDF) e altri composti ritrovabili di solito come miscele di bifenili policlorurati ("PCB mixtures"). Il più famoso e meglio studiato di questi è la 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-diossina (TCDD).

Le diossine mostrano di agire attraverso una serie di effettori multisistema, intaccando i sistemi endocrini, di sviluppo e riproduttivi. La fonte maggiore di diossine nell'uomo è la carne animale, nel cui grasso le diossine si accumulano facilmente.

Per quanto riguarda i loro effetti sull'essere umano va citato un caso interessante è quello avvenuto a Taiwan nel 1979 quando ci fu una contaminazione da PCB e dibenzofurani policlorurati nell'olio di riso. Nei bambini nati a distanza di pochi anni dalle donne esposte, si osservarono delle deficienze intellettive valutabili come un difetto nel quoziente intellettivo, valutato con diversi strumenti, pari a 4-8 punti in meno rispetto alla media nazionale. Lo stesso deficit fu osservato in bambini nati a distanza di sei anni dall'incidente.

### **SCHEDA: "Cancro e diossina".**

Il termine "diossina" è stato utilizzato per definire quelle sostanze alogenate persistenti e bioaccumulanti che agiscono nell'organismo vivente legando il recettore aril-idrocarburico (Ah). Il prototipo di queste sostanze è la 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-diossina (TCDD) tristemente famosa per l'incidente di Seveso del 1976. Gli effetti provocati dalle diossine sono tra i più svariati: tossicità epatica, immunotossicità, interferenza col sistema endocrino e cancro.

Le diossine causano diversi problemi nell'organismo e possono provocare alterazioni nella proliferazione, nel differenziamento e a livello dell'omeostasi. Il TCDD ad esempio, può alterare il metabolismo degli ormoni, ad esempio gli estrogeni, attraverso l'induzione di alcuni enzimi. Le diossine possono inoltre alterare il trasporto degli ormoni agendo a livello delle proteine di trasporto plasmatiche, oltre ad alterare il funzionamento di molti fattori di crescita, dei loro recettori nonché del segnale a valle di questi ultimi. Il TCDD è inoltre un noto cancerogeno: numerosi studi hanno dimostrato un'associazione fra esposizione lavorativa a questa diossina e il carcinoma polmonare. Negli animali inoltre si osserva lo sviluppo di neoplasie in diversi distretti dell'organismo: le diossine sono dei potenti promotori che incrementano sia l'incidenza che la molteplicità di tumori di diverso genere dopo l'iniziazione ad opera di un mutageno. Il carcinoma della mammella, anche se sono ancora presenti dati contrastanti, sembra essere uno dei tumori favoriti dal TCDD il quale si è dimostrato in grado di incrementarne il numero dopo induzione, nell'animale, con DMBA. Si pensa che una

possibilità sia che questa diossina sia in grado di incrementare la sensibilità della mammella ai mutageni.

Il meccanismo di induzione della cancerogenesi di molti composti ad azione estrogenica (e degli stessi estrogeni) potrebbe essere epigenetico, queste sostanze potrebbero agire cioè alterando il pattern di metilazione/demetilazione del DNA, modificando in questo modo l'espressione genica dei geni coinvolti nella regolazione della proliferazione cellulare.

### **SCHEDA: “Il recettore arilico”.**

Il recettore per gli idrocarburi arilici (AhR) fu identificato nel 1976 grazie alla sua capacità di legare il composto 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-diossina (TCDD), un prodotto di numerosi processi industriali e di combustione di materiali organici inclusi i rifiuti urbani.

Il recettore Ah è espresso nei mammiferi in numerosi tessuti; fin dai primi studi si vide come il legame di TCDD a questo recettore fosse in grado di indurre l'attività di CYP1A1. Studi successivi chiarirono che questo complesso contiene sia il recettore Ah che la proteina che funge da traslocatore nucleare di AhR. Questo complesso interagisce con alcune diossine o con gli elementi di risposta agli xenobiotici presenti a livello del promotore di CYP1A1 e nei promotori di molti geni che rispondono ad AhR, con successivo reclutamento dei fattori di trascrizione che portano all'attivazione della trascrizione genica.

Le classi di ligandi di AhR più studiate sono quelle degli idrocarburi aromatici alogenati (HAH, dibenzo-p-diossine policlorurate, dei dibenzofurani e dei bifenili nonché dei relativi derivati) e degli idrocarburi aromatici policiclici (PAH, benzopirene, 3-metilcolantrene, benzoflavonoidi, rutacarpina, alcaloidi, amine aromatiche e relativi derivati).

Probabilmente la maggiore esposizione ai ligandi di AhR si ha mediante la dieta. In effetti la maggior parte dei ligandi “naturali” identificati finora sono ricollegabili all'alimentazione o prodotti alimentari delle piante. Tra questi composti ritroviamo i flavonoidi, i carotenoidi e i fenoli, che possono attivare il “pathway” di segnale di AhR, anche se la maggior parte di essi presenta solo una debole attività. In ogni caso è stata riportata la presenza di ligandi per questo recettore in diversi tipi di vegetali, frutti, erbe e anche nel the. La cosa interessante è che diversi tipi di indoli alimentari (incluso l'indolo-3 carbinolo e il triptofano) possono essere convertiti, all'interno del tratto digerente dei mammiferi, in composti molto più potenti nell'attivazione della via di segnale di AhR.

Gli studi nel campo dei ligandi di AhR sono tuttora in corso. Rappresentano delle aree di futura ricerca la determinazione della struttura tridimensionale di AhR e del suo dominio funzionale, nonché l'identificazione di nuovi ligandi esogeni ed endogeni.

### **SCHEDA: “Il caso Seveso”.**

10 luglio 1976. Dallo stabilimento chimico ICMESA di Seveso (MI), produttore di triclorofenolo (la cui produzione venne accettata anche in Italia, nonostante una legge ne proibisse l'uso), fuoriusce una nube di gas che si espande nelle zone circostanti. Dieci giorni dopo nei laboratori dello stabilimento GIVAUDAN a Zurigo, la sostanza tossica viene identificata: si tratta della 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-diossina. Si decide di evacuare un'area di 15 ettari, circondando la zona con i reticolati.

Il direttore e il vicedirettore dell'ICMESA vengono arrestati per disastro colposo, accusati di aver aumentato la temperatura di reazione pur di ridurre i tempi di reazione (da 5 ore a 1 ora), consci (al contrario dei loro dipendenti) che questo aumento di temperatura avrebbe incrementato i rischi di produrre la diossina, come già avvenuto altrove; i termometri erano

infatti insufficienti per controllare la reazione, inoltre il reattore che produceva triclorofenolo aveva come unico sfogo un camino privo di abbattitore che dava sul tetto della fabbrica.

L'elevato grado di allarme riguardo l'incidente era dovuto al fatto che la TCDD era risultata molto tossica in esperimenti sugli animali e in grado di indurre il cancro in condizioni sperimentali. Poco era però conosciuto sui riguardo i effetti sull'uomo. La quantità di diossina rilasciata con l'incidente di Seveso fu oggetto di stime conflittuali. L'ultima stima effettuata si aggira intorno ai 34 Kg mentre stime precedenti parlavano di qualche centinaia di grammi fino a un chilogrammo. Sulla base delle analisi del suolo, l'area interessata venne suddivisa in 3 aree: A (da 15,5 a 580  $\mu\text{g}/\text{m}^2$ ), B (da 1,5 a 5  $\mu\text{g}/\text{m}^2$ ) e C (fino a 1,5  $\mu\text{g}/\text{m}^2$ ).

Subito dopo l'incidente venne osservata una rapida moria di conigli e di pollame. Elevate concentrazioni di TCDD vennero inoltre rilevate nel latte proveniente dai bovini della zona.

Nell'uomo i segni più precoci furono delle alterazioni della pelle, in particolare si osservarono numerosi casi di cloracne.

Dopo l'incidente numerosi campioni di sangue vennero raccolti e propriamente conservati. A quel tempo non esistevano metodi adatti per misurare la concentrazione di diossina nel sangue; i metodi più accurati di misura diedero i seguenti risultati medi: 333,8 ppt nei soggetti della zona A, 111,4 ppt nei soggetti della zona B e 83,6 ppt nei soggetti della zona C. L'esame degli effetti a breve e medio termine dell'esposizione a TCDD non fu semplice, complicata dall'agitazione dovuta all'incidente. I problemi più comuni furono una partecipazione selettiva agli studi, la mancanza di dati di riferimento e una limitata standardizzazione dei metodi di analisi e dei test effettuati. Non vi è alcun dubbio invece riguardo la relazione fra l'esposizione e i casi di cloracne osservati, grazie alla forte correlazione fra l'incidenza e il grado di esposizione.

Si osservò un eccesso di mortalità nei pazienti cardiopatici, ma questo fatto potrebbe essere anche dovuto allo stress psicologico associato con la particolare situazione, il quale potrebbe essere stato anche fatale per soggetti di questo tipo.

La TCDD altera il metabolismo lipidico, la funzione cardiaca e la morfologia cellulare in studi di laboratorio, ma i dati sull'uomo sono purtroppo tuttora inconcludenti.

Si registrò inoltre un aumento della mortalità in soggetti affetti da malattie respiratorie, ma anche qui valgono gli stessi dubbi espressi per l'aumento nei pazienti cardiopatici, anche se l'immunotossicità della diossina potrebbe aver alterato i meccanismi di difesa che normalmente proteggono contro gli episodi infettivi che possono essere fatali per questi soggetti.

Negli studi di Seveso, il più interessante aumento di rischio si osservò per il cancro all'apparato digerente e per alcune leucemie; nel periodo che va dal 1976 al 1991 si osservò infatti un aumento dell'incidenza di questi tumori nei residenti della zona B.

Studi epidemiologici precedenti effettuati su una coorte di lavoratori tedeschi esposti accidentalmente alla TCDD avevano mostrato un incremento dose-dipendente nell'incidenza del cancro all'apparato digerente.

Molti studi sui lavoratori esposti avevano inoltre associato alla diossina l'aumento di incidenza delle leucemie, nonché di un tipo particolare di sarcoma (il sarcoma dei tessuti molli). Gli studi effettuati su Seveso, in conclusione, non hanno però portato prove schiaccianti riguardo i possibili effetti tossici della diossina. Per questo motivo gli studi di "follow-up" sono stati estesi e sono stati avviati degli studi di epidemiologia molecolare.

## **8) Policlorobifenili (PCB).**

I PCB sono una famiglia composta da 209 sostanze la cui molecola è costituita da due anelli fenilici con diverso grado di clorurazione.

La produzione di queste sostanze e il loro uso iniziò ad essere proibito a partire dagli anni '70 a causa della loro tossicità e biopersistenza.

La preoccupazione nei confronti di questi composti nacque successivamente a due incidenti il primo nel 1968 in Giappone, il secondo a Taiwan 11 anni dopo, quando 1.000 persone nel primo caso e 2.000 nel secondo vennero esposte accidentalmente ai PCB attraverso l'olio di riso contaminato, con conseguenze a livello di sviluppo neuronale e di QI nei bambini che furono seguiti per diversi anni.

Uno studio condotto nel Michigan su 313 madri correlò la concentrazione di PCB nel cordone ombelicale con un ridotto sviluppo motorio, cognitivo e intellettuale.

In uno studio europeo multicentrico venne invece misurata la concentrazione di PCB nel cordone ombelicale e nel latte materno e vennero ritrovate delle correlazioni negative fra concentrazione nel latte e sviluppo cognitivo del bambino.

In sintesi quindi vi è una forte evidenza che i PCB possano influire sullo sviluppo neurologico.

#### Effetti sulla tiroide.

Gli effetti dei fattori ambientali sulla funzionalità tiroidea e dell'asse ipotalamo-ipofisario non sono ancora stati studiati estensivamente a causa della difficoltà di riconoscere anche i minimi disturbi alla funzione tiroidea.

La maggior parte degli studi è stata effettuata prima che fossero disponibili i test di terza generazione per la misurazione del TSH. Anche la misura del T3 e del T4 è particolarmente delicata, purtroppo le metodiche più affidabili vengono usate poco frequentemente.

Va inoltre ricordato che la concentrazione plasmatica di TSH e di ormone T3 è soggetta a variazioni che seguono l'alternarsi delle stagioni: occorre quindi sempre valutare se le differenze misurate non siano effettivamente l'espressione di queste variazioni e non del fattore ambientale.

Anche un'eventuale deficienza di selenio potrebbe influenzare (anche se marginalmente) la concentrazione di questi ormoni, dato che esso agisce come cofattore di molte monodeiodinasi.

Un deficit degli ormoni tiroidei durante lo sviluppo potrebbe avere degli effetti profondi, permanenti e pervasivi sulla funzionalità cerebrale dell'adulto. Studi recenti hanno mostrato come anche minime modificazioni nei livelli circolanti di ormone tiroideo nelle donne gravide possano influenzare lo sviluppo neurologico del feto. Esistono ancora molti punti oscuri da chiarire sulle relazioni fra ormoni tiroidei e sviluppo cerebrale tra cui le interazioni fra le sostanze chimiche presenti nell'ambiente esterno e il sistema tiroideo e le conseguenze negative di queste interazioni. Questo punto è particolarmente importante dato l'elevato numero di composti che sono in grado di interagire con l'azione dell'ormone tiroideo.

Gli ormoni tiroidei sono presenti nel liquido amniotico già dopo 8 settimane di gestazione, prima cioè dell'inizio dello sviluppo della tiroide che avviene intorno alle 10a 12a settimana. Inoltre il cervello fetale esprime i recettori per questi ormoni già alla nona settimana.

Due sono le situazioni patologiche che rivelano delle conseguenze funzionali di un deficit degli ormoni tiroidei: il cretinismo (normalmente associato ad un difetto di iodio nella dieta) e l'ipotiroidismo, quest'ultima possibilmente associata alla presenza nell'organismo materno di anticorpi per la perossidasi tiroidea, che potrebbero tradursi in un ridotto QI del neonato.

A questo punto è quindi logico pensare che tutti quei fattori ambientali in grado di influenzare l'attività degli ormoni tiroidei potrebbero verosimilmente interferire con lo sviluppo neuronale fetale. E' stato evidenziato come i livelli serici di PCB correlino in modo inversamente proporzionale con i livelli di ormone T4; va comunque ricordato che le oscillazioni nella concentrazione di ormone tiroideo rimangono entro i limiti della normalità.

In ogni caso sia i PCB con molecola planare che gli altri sono in grado di ridurre i livelli circolanti di T4.

Non è chiaro se i PCB siano o meno in grado di ridurre la risposta della tiroide all'azione del TSH oppure se influenzino il metabolismo dell'ormone tiroideo.

I PCB è però in grado di stimolare la glucuronoconiugazione (fase II del metabolismo epatico) dell'ormone tiroideo incrementandone così l'eliminazione.

I PCB sono infine in grado di legare le proteine che trasportano l'ormone tiroideo (come la transtiretina) spiazzandolo.

La preoccupazione deriva quindi dal fatto che esistono le prove che i PCB possano, anche se in misura parziale, interferire con l'azione dell'ormone tiroideo. Le conseguenze di ciò non sono state ancora del tutto chiarite ed è quindi di fondamentale importanza sviluppare dei marcatori per la valutazione degli effetti dell'interferenza sull'azione dell'ormone tiroideo sullo sviluppo cerebrale da utilizzare negli studi tossicologici.

#### Effetti sul sistema riproduttivo.

Le miscele di PCB causano infertilità nella prole dei ratti maschi trattati nonché ritardo della crescita nella prole di femmine di ratto o di scimpanzé esposte.

Mentre i DLCs operano presumibilmente attraverso il legame al recettore arilico la TCDD diminuisce le conte degli spermatozoi senza influenzare la fertilità. In particolare la TCDD e i composti "TCDD-like", in animali esposti dopo la nascita, alterano il peso dei testicoli e delle ghiandole accessorie, nonché la morfologia testicolare, la spermatogenesi e la fertilità. Nelle femmine esposte invece, si osserva una ridotta fertilità (probabilmente a causa di un aumento nelle endometriosi) oltre all'incapacità di mantenere la gravidanza.

Poco si sa invece degli effetti sull'uomo, a causa dell'enorme varietà di sostanze cui si ritrova esposto. A questo proposito sono in corso degli studi su alcune popolazioni ad elevato grado di esposizione fra cui gli Inuit del Québec i quali assumono grandi quantità di grasso di animali artici nei quali è presente una grossa quantità di composti organoclorurati. Nel latte materno delle donne di questa popolazione vi è una concentrazione di bifenili policlorurati pari a sette volte quella presente nelle donne del Québec meridionale. Lo studio verrà condotto analizzando le placente e i cordoni ombelicali per ottenere la concentrazione di composti organoclorurati, per valutare la presenza del recettore arilico e l'attivazione del citocromo P450, mentre nei figli di queste donne verrà calcolato il tasso di crescita.

#### Effetti sul sistema endocrino.

Studi sulle femmine di ratto esposte durante la gravidanza, hanno mostrato che la TCDD può causare effetti sulla prole di sesso maschile, tra cui ad esempio, inibizione della spermatogenesi e cambiamenti nel comportamento sessuale.

L'esposizione invece degli animali a miscele di PCB aumenta il metabolismo dell'ormone T4 (tetraiodotironina) e diminuendo i livelli serici degli ormoni tiroidei.

Gli studi nell'uomo effettuati in caso di esposizione perinatale, hanno mostrato come si abbia nei neonati esposti un aumento nei livelli di TSH tra il decimo giorno di vita e i primi 3 mesi, senza alterazione nei livelli di T4. Non esiste nessuna correlazione fra i livelli di questi ormoni e la concentrazione di PCB nel latte materno, come pure nessuna correlazione è stata trovata con il tasso di crescita.

#### Effetti sul sistema immunitario.

La TCDD è in grado di indurre atrofia a livello del timo, probabilmente provocando una riduzione del numero di prolinfociti nel midollo osseo.

I DLC possono ridurre la risposta immunitaria: sia nell'uomo che nei roditori l'esposizione prenatale a queste sostanze riduce il tasso di linfociti T "helper" e T "suppressor" nel timo. L'esposizione perinatale, in ogni caso, intacca quasi sempre le cellule linfocitarie della linea T.

L'immunotossicità della TCDD sembra essere dovuta al legame con il recettore arilico. Esso colpisce preferenzialmente, a differenza degli altri composti, i linfociti della linea B.

#### Il ruolo dei biomarcatori.

Molte diossine, tra cui i dibenzofurani e i PCB, resistono alla biodegradazione e, grazie alla loro lipofilia, si accumulano a livello del tessuto adiposo. La concentrazione tissutale di questi composti è una buona misura dell'esposizione ambientale e la misura dei livelli residui nel corpo grasso o nella porzione grassa del latte materno o del sangue sono utili indicatori del grado di esposizione. La letteratura descrive la presenza di residui di organoclorurati ritrovati nei fluidi organici o nei tessuti animali e dell'uomo e documenta l'aumentata concentrazione di questi contaminanti nel grasso di animali ai livelli trofici più elevati della catena alimentare.

Oltre alla misura diretta della concentrazione di diossina in determinati tessuti, altri utili biomarcatori per lo studio nell'animale dell'esposizione ambientale possono essere:

- una ridotta conta degli spermatozoi, come indice dell'effetto sulla fertilità maschile;
- i livelli cerebrali di T4 e di dopamina (ridotti dopo esposizione perinatale);
- un'aumentata espressione di TNF e di numerose citochine, a sostegno dell'ipotesi che vi è l'attivazione di una risposta infiammatoria;
- modifiche nel rapporto tra classi di linfociti (come il rapporto tra linfociti T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>) come pure la ridotta quantità di protimociti nel midollo osseo.

A causa delle forti conseguenze sui sistemi riproduttivo, endocrino, immunitario e nervoso dell'esposizione perinatale alle diossine, ha portato alla continua ricerca di biomarcatori come quelli sopra elencati al fine di valutare l'entità dell'esposizione degli organismi viventi in un determinato ecosistema.

Questi e altri marcatori verranno usati in studi futuri al fine di chiarire meglio quali sono gli effetti di questi composti. Una volta convalidati, questi biomarcatori potranno inoltre servire per studi epidemiologici.

#### **SCHEDA: "EDC e cancro".**

Lo sviluppo fetale è un periodo molto delicato ed estremamente sensibile ai possibili insulti derivanti dall'ambiente che lo circonda, poiché è un processo altamente integrato durante il quale si combinano meccanismi come la proliferazione, la differenziazione e la morte cellulare.

Le barriere protettive come la placenta per il feto e la barriera emato-encefalica nel neonato non sono ancora complete e ciò provoca inevitabilmente che il feto e il neonato siano esposti agli effetti di tutti gli xenobiotici presenti nell'ambiente. La capacità di eliminare queste sostanze non è inoltre completa fino a dopo la nascita.

L'esposizione *in utero* ad inquinanti ambientali cancerogeni è stata associata allo sviluppo di tumori sia nel bambino (leucemie linfoblastiche acute, ad esempio) che nel giovane adulto.

L'associazione fra l'esposizione al DES (diethylstilbestrol) e lo sviluppo di adenocarcinomi vaginali in giovani donne ha fatto supporre che l'esposizione a sostanze attive dal punto di vista ormonale potesse provocare in un secondo momento, la formazione di un tumore.

L'esposizione a sostanze chimiche tossiche da parte dei genitori può inoltre provocare la formazione di tumori nella prole. Shu e coll. hanno dimostrato come l'esposizione dei genitori agli idrocarburi porta spesso allo sviluppo di leucemie linfoblastiche acute nei loro figli e che l'esposizione preconcezionale dei padri e postnatale delle madri a sostanze plastiche di diverso tipo si associa ad un aumentato rischio di leucemia linfoblastica acuta; anche l'esposizione materna a solventi e vernici provoca ne aumenta il rischio. Anche l'esposizione ai pesticidi provoca un aumento di probabilità di sviluppare questa leucemia nella prole.

Il quadro è comunque complicato dal fatto che i tumori pediatrici e infantili sono molto rari ed è quindi necessario effettuare dei vasti e lunghi studi epidemiologici per valutare gli effetti delle sostanze tossiche.

## CONCLUSIONI

Al lettore giunto fino a questo punto non potrà essere sfuggito il concetto alla base del problema dei distruttori endocrini, ossia l'incertezza degli effetti derivanti dal loro accumulo sia nell'ambiente che nei tessuti, nonché l'elevato grado di assunzione attraverso una via principale: la dieta.

Nulla soprattutto si sa (né si può prevedere) circa gli effetti derivanti dall'esposizione combinata di decine di questi composti, molti dei quali potrebbero originare non solo effetti additivi, ma bensì sinergici con una conseguente moltiplicazione dei loro effetti negativi.

Il loro continuo incremento correla di pari passo con un aumento dei disturbi della fertilità (in particolare nei soggetti esposti per motivi di lavoro) nonché con il numero di soggetti che presentano alterazioni alla nascita dell'apparato genitale ed è opinione comune che la presenza di distruttori endocrini nell'ambiente possa essere una delle cause alla base di questi fenomeni. È dunque giustificato credere che ci si stia rendendo conto in ritardo di questo pericolo, quando ormai le conseguenze di un uso indiscriminato di composti clorurati sta ormai appalesando le proprie spiacevoli conseguenze.

Non bisogna inoltre cadere nell'errore di chi ad esempio, alla luce di una bassa tossicità acuta, considera come "innocue" o "poco pericolose" queste sostanze. Ognuno è circondato da un numero spaventoso di composti chimici tossici dagli effetti imprevedibili. Contro di essi la massima prudenza è l'unica arma disponibile.

# **BIBLIOGRAFIA**

- 1) "Abstracts of the 30<sup>th</sup> Conference of the European Teratology Society". Hannover, 7<sup>th</sup>-11<sup>th</sup> September 2002.
- 2) Adlercreutz H. "Phytoestrogens: epidemiology and possible role in cancer protection." (1995). Environ. Health Perspect., **103** (Suppl. 7): 103-112.
- 3) Alae M., Arias P., Sjodin A., and Bergman A. "An overview of commercially used brominated flame retardants, their applications, their use patterns in different countries/regions and possible modes of release". (2003). Environ Int., **29**: 683-689.
- 4) Bertazzi P.A., Bernucci I., Brambilla G., Consonni D., and Pesatori A.C.. "The Seveso studies on early and long-term effects of dioxin exposure: a review." (1998). Environ. Health Perspect., **106** (Suppl. 2): 625-633.
- 5) Birnbaum L.S., and Fenton S.E. *Cancer and developmental exposure to endocrine disruptors*. (2003). Environ Health Perspect., **111**: 389-94.
- 6) Birnbaum L.S., Staskal D.F., and Diliberto J.J. "Health effects of polybrominated dibenzo-p-dioxins (PBDDs) and dibenzofurans (PBDFs)". (2003). Environ Int., **29**: 855-60.
- 7) Carlsen E., Giwercman A., Keiding N., and Skakkebaek N.E.. "Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years." (1992). Br. Med. J., **305**: 609-613.
- 8) Carnevali O, and Maradonna F. *Exposure to xenobiotic compounds: looking for new biomarkers*. (2003). Gen Comp Endocrinol., **131**: 203-8.
- 9) Choi K.C., and Jeung E.B. *The biomarker and endocrine disruptors in mammals*. (2003). J Reprod Dev., **49**: 337-45.
- 10) Colborn T., vom-Saal F.S. and Soto A.M.. "Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans" (1993). Environ. Health Perspect., **101**: 379-384.
- 11) Covaci A., Voorspoels S., and de Boer J. "Determination of brominated flame retardants, with emphasis on polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in environmental and human samples-a review". (2003). Environ Int., **29**: 735-56.
- 12) Damstra T. "Potential effects of certain persistent organic pollutants and endocrine disrupting chemicals on the health of children." (2002). J. Toxicol. Clin. Toxicol. **40**: 457-465.
- 13) Darnerud P.O. "Toxic effects of brominated flame retardants in man and in wildlife". (2003). Environ Int., **29**: 841-53.
- 14) Degen G.H. and Bolt H.M. "Endocrine disruptors: update on xenoestrogens" (2000). Int. Arch. Occup. Environ. Health, **73**: 433-441.
- 15) Denison M.S., Pandini A., Nagy S.R., Baldwin E.P., and Bonati L.. "Ligand binding and activation of the Ah receptor." (2002). Chemico-Biological Interactions, **141**: 3-24.
- 16) Dich J., Zahm S.H., Hanberg A., and Adami H.O. *Pesticides and cancer*. (1997). Cancer causes and control **8**: 420-443.
- 17) Eskenazi B. and Kimmel G.. "Workshop on perinatal exposure to dioxin-like compounds. II. Reproductive effects." (1995). Environ. Health Perspect., **103** (Suppl. 2): 143-145.
- 18) Feeley M.M.. "Workshop on perinatal exposure to dioxin-like compounds. III. Endocrine effects." (1995). Environ. Health Perspect., **103** (Suppl. 2): 147-150.
- 19) Ferrara F., Funari E., De Felip E., Donati G., Traina M.E. and Mantovani A.. "Alchilfenoli: valutazione dei rischi per gli ecosistemi acquatici e per la salute umana con particolare riferimento agli effetti endocrini." (2001). Ann. Ist. Sup. Sanità, **37**: 615-625.

- 20) Golub M.S., and Jacobson S.W.. “*Workshop on perinatal exposure to dioxin-like compounds. IV. Neurobehavioral effects.*” (1995). *Environ. Health Perspect.*, **103** (Suppl. 2): 151-155.
- 21) Hakk H., and Letcher R.J. “*Metabolism in the toxicokinetics and fate of brominated flame retardants - a review.*” (2003). *Environ Int.*, **29**: 801-28.
- 22) Hardy M.L., Biesemeier J., Manor O. and Gentit W. “*Industry-sponsored research on the potential health and environmental effects of selected brominated flame retardants.*” (2003). *Environ Int.*, **29**: 793-99.
- 23) Harris C.A., Henttu P., Parker M.G.,and Sumpter J.P.. “*The estrogenic activity of phtalate esters in vitro.*” (1997). *Environ. Health Perspect.*, **105**: 802-811.
- 24) Harvey P.W., and Everett D.J. “*The adrenal cortex and steroidogenesis as cellular and molecular targets for toxicity: critical omissions from regulatory endocrine disrupter screening strategies for human health?*” (2003). *J Appl Toxicol.*, **23**: 81-87.
- 25) Heppell S.A., Denslow N.D., Folmar L.C., and Sullivan C.V.. “*Universal assay of vitellogenin as a biomarker for environmental estrogens.*” (1995). *Environ. Health Perspect.*, **103** (Suppl. 7): 9-15.
- 26) Hooper K., and Clark G.C.. “*Workshop on perinatal exposure to dioxin-like compounds. VI. Role of biomarkers.*” (1995). *Environ. Health Perspect.*, **103** (Suppl. 2): 161-167.
- 27) Hoyer P.B. “*Reproductive toxicology: current and future directions*” (2001). *Biochem. Pharmacol.* **62**: 1557-1564.
- 28) Hoyer P.B. “*Reproductive toxicology: current and future directions.*” (2001). *Biochem Pharmacol.*, **62**: 1557-1564.
- 29) Jimènez B.. “*Environmental effects of endocrine disruptors and current methodologies for assessing wildlife health effects.*” (1997). *Trends in Analytical Chemistry*, **16**: 596-606.
- 30) Jobling S., Reynolds T., White R., Parker M.G., and Sumpter J.P.. “*A variety of environmentally persistent chemicals, including some phtalate plasticizers, are weakly estrogenic.*” (1995). *Environ. Health Perspect.*, **103**: 582-587.
- 31) Kavlock R., Boekelheide K., Chapin R., Cunningham M., Faustman E., Foster P., Golub M., enderson R., Hinberg I., Little R., Seed J., Shea K., Tabacova S., Tyl R., Williams P., and Zacharewski T. “*NTP Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction: phtalates expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of di-n-octyl phtalate.*” (2002). *Reprod. Toxicol.*, **16**: 721-734.
- 32) Kavlock R., Boekelheide K., Chapin R., Cunningham M., Faustman E., Foster P., Golub M., Henderson R., Hinberg I., Little R., Seed J., Shea K., Tabacova S, Tyl R., Williams P., and Zacharewski T. “*NTP Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction: phtalates expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of di-n-hexyl phtalate.*” (2002). *Reprod. Toxicol.*, **16**: 709-719.
- 33) Kavlock R., Boekelheide K., Chapin R., Cunningham M., Faustman E., Foster P., Golub M., Henderson R., Hinberg I., Little R., Seed J., Shea K., Tabacova S., Tyl R., Williams P., and Zacharewski T. “*NTP Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction: phtalates expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of di-isononyl phtalate.*” (2002). *Reprod. Toxicol.*, **16**: 679-708.
- 34) Kavlock R., Boekelheide K., Chapin R., Cunningham M., Faustman E., Foster P., Golub M., Henderson R., Hinberg I., Little R., Seed J., Shea K., Tabacova S., Tyl R., Williams P., and Zacharewski T. “*NTP Center for the Evaluation of Risks to Human*

- Reproduction: phthalates expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of di-isodecyl phthalate.* (2002). *Reprod Toxicol.*, **16**: 655-78.
- 35) Kavlock R., Boekelheide K., Chapin R., Cunningham M., Faustman E., Foster P., Golub M., Henderson R., Hinberg I., Little R., Seed J., Shea K., Tabacova S., Tyl R., Williams P., and Zacharewski T. *NTP Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction: phthalates expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of di(2-ethylhexyl) phthalate.* (2002). *Reprod Toxicol.*, **16**: 529-653.
- 36) Kavlock R., Boekelheide K., Chapin R., Cunningham M., Faustman E., Foster P., Golub M., Henderson R., Hinberg I., Little R., Seed J., Shea K., Tabacova S., Tyl R., Williams P., and Zacharewski T. *NTP Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction: phthalates expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of di-n-butyl phthalate.* (2002). *Reprod. Toxicol.*, **16**: 489-527.
- 37) Kavlock R., Boekelheide K., Chapin R., Cunningham M., Faustman E., Foster P., Golub M., Henderson R., Hinberg I., Little R., Seed J., Shea K., Tabacova S., Tyl R., Williams P., and Zacharewski T. *NTP Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction: phthalates expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of butyl benzyl phthalate.* (2002). *Reprod. Toxicol.* **16**: 453-487.
- 38) Kavlock R.J., Daston G.P., De Rosa C., Fenner-Crisp P., Gray L.E., Kaattari S., Lucier G., Luster M., Mac M.J., Maczka C., Miller R., Moore J., Rolland R., Scott G., Sheehan D.M., Sinks T., and Tilson H.A.. “*Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop.*” (1996). *Environ. Health Perspect.*, **104** (Suppl. 4): 1-26.
- 39) Kudo N. and Kawashima Y. “*Toxicity and toxicokinetics of perfluorooctanoic acid in humans and animals.*” (2003). *The Journal of Toxicological Sciences*, **28**: 49-57.
- 40) Lai K.M., Scrimshaw M.D. and Lester J.N.. “*The effects of natural and synthetic steroid estrogens in relation to their environmental occurrence.*” (2002). *Crit. Rev. Toxicol.*, **32**: 113-132.
- 41) Legler J., and Brouwer A. “*Are brominated flame retardants endocrine disruptors?*” (2003). *Environ Int.* **29**: 879-85.
- 42) Lindström G., Hooper K., Petreas M., Stephens R. and Gilman A.. “*Workshop on perinatal exposure to dioxin-like compounds. I. Summary.*” (1995). *Environ. Health Perspect.*, **103** (Suppl. 2): 135-142.
- 43) Mantovani A. “*Hazard identification and risk assessment of endocrine disrupting chemicals with regard to developmental effects*”. (2002). *Toxicology*, **181-182**: 367-370.
- 44) Maroni M., Colosio C., Ferioli A., and Fait A. *Biological Monitoring of Pesticide Exposure: a review. Introduction.* (2000). *Toxicology*, **143**: 1-118.
- 45) McLachlan J.A. “*Environmental signalling: what embryos and evolution teach us about endocrine disrupting chemicals*” (2001). *Endocrine Reviews*, **22**: 319-341.
- 46) McLachlan J.A. “*Environmental signaling: what embryos and evolution teach us about endocrine disrupting chemicals*”. (2001). *Endocr. Rev.*, **22**: 319-341.
- 47) Melnick R., Lucier G., Wolfe M., Hall R., Stancel G., Prins G., Gallo M., Reuhl K., Ho S.M., Brown T., Moore J., Leakey J., Haseman J., and Kohn M. “*Summary of the National Toxicology Program's report of the endocrine disruptors low-dose peer review*”. (2002). *Environ Health Perspect.*, **110**: 427-431.
- 48) Menditto A., Caroli S., di Domenico A., Mantovani A., Silvestroni L., Spagnolo A., Traina M.E. and Alleva E.. “*Gli “endocrine disruptors”: un problema emergente nel campo della sicurezza dei composti chimici.*” (1997). *Notiz. Ist. Sup. Sanità*, **10**: 1-7.

- 49) Munguia-Lopez E.M. and Soto-Valdez H. “Effect of heat processing and storage time on migration of bisphenol A (BPA) and bisphenol A-diglycidyl ether (BADGE) to aqueous food simulant from Mexican can coatings.” (2001). *J. Agric. Food Chem.*, **49**: 3666-3671.
- 50) Munguia-Lopez E.M., Peralta E, Gonzalez-Leon A, Vargas-Requena C and Soto-Valdez H. “Migration of Bisphenol A (BPA) from Epoxy Can Coatings to Jalapeno Peppers and an Acid Food Simulant.” (2002). *J. Agric. Food Chem.*, **50**: 7299-7302.
- 51) OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). 2002. *Hazard Assessment of Perfluorooctane Sulfonate (PFOS) and Its Salts*. U.S. EPA docket AR-226-1140.
- 52) Olsen G.W., Church T.R., Miller J.P., Burris J.M., Hansen K.J., Lundberg J.K., Armitage J.B., Herron R.M., Medhdizadehkashi Z., Nobiletti J.B., O’Neill E.M., Mandel J.H., and Zobel L.R. “Perfluorooctanesulfonate and other fluorochemicals in the serum of American Red Cross adult blood donors” (2003). *Env. Health Persp.*, **111**: 1892-1901.
- 53) Pocar P., Brevini T.A., Fischer B., Gandolfi F. “The impact of endocrine disruptors on oocyte competence”. (2003). *Reproduction*, **125**: 313-325.
- 54) Safe S.. “Molecular biology of the Ah receptor and its role in carcinogenesis.” (2001). *Toxicology Letters*, **120**: 1-7.
- 55) Santillo D., and Johnston P. “Playing with fire: the global threat presented by brominated flame retardants justifies urgent substitution”. (2003). *Environ Int.*, **29**: 725-34.
- 56) Shi L.M., Fang H., Tong W., Wu J., Perkins R., Blair R.M., Branham W.S., Dial S.L., Moland C.L., and Sheehan D.M.. “QSAR models using a large diverse set of estrogens.” (2001). *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, **41**: 186-195.
- 57) Singleton D.W., and Khan S.A. “Xenoestrogen exposure and mechanisms of endocrine disruption”. (2003). *Front Biosci.*, **8**: s110-s118.
- 58) Sjodin A., Patterson D.G. Jr, and Bergman A. “A review on human exposure to brominated flame retardants—particularly polybrominated diphenyl ethers”. (2003). *Environ Int.*, **29**: 829-39.
- 59) Suter L., Koch E., Bechter R., and Bobadilla M.. “Three-parameter flow cytometric analysis of rat spermatogenesis.” (1997). *Cytometry*, **27**: 161-168.
- 60) Takeyoshi M., Yamasaki K., Sawaki M., Nakai M., Noda S. and Takatsuki M.. “The efficacy of endocrine disruptor screening tests in detecting anti-estrogenic effects downstream of receptor-ligand interactions.” (2002). *Toxicology Letters*, **126**: 91-98.
- 61) Tong W., Lowis D.R., Perkins R., Chen Y., Welsh W.J., Goddette D.W., Heritage T.W. and Sheehan D.M.. “Evaluation of quantitative structure-activity relationship methods for large-scale prediction of chemicals binding to the estrogen receptor.” (1998). *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, **38**: 669-677.
- 62) Toppari J., Larsen J.C., Christiansen P., Giwercman A., Grandjean P., Guillette Jr L.J., Jégou B., Jensen T.K., Jouannet P., Keiding N., Leffers H., McLachlan J.A., Meyer O., Maller J., Rajpert-De Meyts E., Scheike T., Sharpe R., Sumpter J., and Skakkebaek N.E.. “Male reproductive health and environmental xenoestrogens.” (1996). *Environ. Health Perspect.*, **104** (Suppl. 4): 741-803.
- 63) Watanabe I., and Sakai S. “Environmental release and behavior of brominated flame retardants”. (2003). *Environ Int.*, **29**: 665-82.

- 64) Winneke G., Walkowiak J. and Lilienthal H. “*PCB-induced neurodevelopmental toxicity in human infants and its potential mediation by endocrine dysfunction*” (2002). *Toxicology*, **181-182**: 161-165.
- 65) Winneke G., Walkowiak J., and Lilienthal H. “*PCB-induced neurodevelopmental toxicity in human infants and its potential mediation by endocrine dysfunction*”. *Toxicology*, **181-182**: 161-165.
- 66) Witorsch R.J. “*Endocrine disruptors: can biological effects and environmental risks be predicted?*” (2002). *Regul Toxicol Pharmacol.*, **36**: 118-30.
- 67) Yamada T., Sunami O., Kunimatsu T., Kamita Y., Okuno Y., Seki T., Nakatsuka I. and Matsuo M.. “*Dissection and weighing of accessory sex glands after formalin fixation, and a 5-day assay using young mature rats are reliable and feasible in the Hershberger assay.*” (2000). *Toxicology*, **162**: 103-119.
- 68) Zoeller T.R., Dowling A.L., Herzig C.T., Iannacone E.A., Gauger K.J., and Bansal R. “*Thyroid hormone, brain development, and the environment*”. (2002). *Environ. Health Perspect.*, **110** (Suppl 3): 355-61.
- 69) Shu X.O., Stewart P., Wen W.Q., Han D., Potter J.D., Buckley J.D., Heineman E, and Robison L.L. “*Parental occupational exposure to hydrocarbons and risk of acute lymphocytic leukemia in offspring*”. (1999). *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **8**: 783-791.