

# Esposizione umana a sostanze chimiche con effetti endocrini e salute riproduttiva

## Un programma di ricerca dell'ISS



**Alberto Mantovani**

**N**ei Paesi industrializzati l'allungamento della vita media richiama il sistema di sanità pubblica a dare sempre maggiore priorità a patologie che colpiscono la qualità della vita; in questo ambito, meritano un particolare rilievo la salute riproduttiva e la protezione dello sviluppo sia prenatale che postnatale. Infatti, considerare la riproduzione come un *continuum* che comprende il benessere della generazione successiva è necessario per un'adeguata valutazione di molteplici e differenziati rischi. Questi possono comprendere patologie sia ad alta prevalenza (ad esempio, disturbi della fertilità) sia a bassa prevalenza, ma a elevato costo individuale e sociale (ad esempio, alterazioni dello sviluppo endocrino o riproduttivo).

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 una efficace prevenzione. In particolare, la Commissione Europea e altri organismi internazionali (OECD, WHO) indicano come priorità l'incremento delle conoscenze sugli Endocrine Disrupting Chemicals (EDC). Gli EDC sono un eterogeneo gruppo di sostanze caratterizzate dal potenzia-

le di interferire attraverso svariati meccanismi (recettore-mediati, metabolici, ecc.), con il funzionamento del sistema endocrino, soprattutto con l'omeostasi degli steroidi sessuali e della tiroide. I più noti EDC comprendono contaminanti alogenati persistenti (diossine, policlorobifenili), fitofarmaci e biocidi (ad esempio, etilene-bisditiocarbammati, clororganici), sostanze di uso industriale (composti fenolici, ftalati). Questa breve e incompleta elencazione sottolinea la potenziale importanza dell'esposizione complessiva a diverse classi di EDC attraverso l'ambiente e gli alimenti.

È inoltre riconosciuto come la riproduzione e lo sviluppo pre e postnatale siano fasi biologiche particolarmente sensibili agli effetti endocrini di EDC (1). Studi epidemiologici, infatti, suggeriscono correlazioni fra esposizione a specifici gruppi di EDC e alterazioni riproduttive, quali malformazioni dell'apparato riproduttivo, infertilità, aumentato rischio di seminoimi, endometriosi.

Gli studi, sperimentali e clinici, avviati nel corso del Programma di ricerca finalizzata (2000-03) "Esposizione umana a xenobiotici con potenziale attività endocrina: valutazione del rischio per la ripro-

duzione e per l'età evolutiva" (responsabile scientifico: Alberto Mantovani), consentono di mettere meglio a fuoco l'ampio spettro di patologie correlabili con l'esposizione a EDC. Queste comprendono l'incremento di abortività precoce 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 (ad esempio, osteoporosi postmenopausale) correlabili con un'alterata omeostasi di estrogeni e androgeni, ecc. (*cf.* sotto per una descrizione dettagliata delle attività delle Unità Operative, UO).

Tuttavia, numerosi punti restano da chiarire: tra questi, i meccanismi biologici alla base di tali correlazioni, gli eventuali fattori di suscettibilità e/o di rischio concomitanti, e soprattutto l'intero spettro di patologie potenzialmente associabili all'esposizione a EDC.

Il Progetto è stato avviato con l'obiettivo di contribuire a una migliore base scientifica per la gestione del rischio degli EDC, caratterizzando gli effetti di sostanze selezionate per il loro potenziale rilievo e indagandone il potenziale coinvolgimento in patologie umane a base endocrina. Il Progetto coinvolge otto UO, sia interne che esterne all'ISS, e ambisce a svilup-

**L'esposizione a sostanze chimiche è uno dei fattori di rischio per la salute riproduttiva**

**Alberto Mantovani**

Laboratorio di Tossicologia Comparata ed Ecotossicologia, ISS

pare un approccio interdisciplinare, promuovendo una rete nazionale che integri competenze specialistiche negli ambiti della ricerca di base, della tossicologia sperimentale, della clinica e dell'epidemiologia.

Il Progetto rappresenta il primo programma di ricerca finanziato dal Servizio Sanitario Nazionale sul problema degli EDC e ha, pertanto, un carattere di progetto pilota; il primo anno, di cui di seguito si presentano le attività, ha quindi costituito la fase preliminare di messa a punto di modelli, di selezione di molecole di interesse e di iniziale interazione fra le UO.

## ALTERAZIONI DELLO SVILUPPO DELL'APPARATO RIPRODUTTIVO (UO 1)

**Responsabile:** A. Mantovani, ISS.  
Collaborazioni interne: M.E. Traina, G. Petrelli. Collaborazioni esterne: F. Bianchi, CNR-Pisa; M. De Felici, Università di Roma "Tor Vergata"; G. Forti, Università di Firenze; G. Tiboni, Università di Chieti

L'obiettivo della UO 1 è integrare diversi approcci (studi *in vivo*, *in vitro*, clinico-epidemiologici) per indagare gli effetti di EDC selezionati sullo sviluppo prenatale e neonatale.

Per gli studi *in vivo* sono stati selezionati due composti:

a) il fungicida tioallafanato tiofanato metile, che ha mostrato effetti sulla tiroide e sul corticosurrene in studi di tossicità cronica su roditori da laboratorio, ma sul quale i dati di letteratura scientifica sono del tutto inadeguati per una valutazione di effetti organo-specifici sullo sviluppo. È stata effettuata una serie di esperimenti nel ratto in seguito a esposizione in diverse fasi della organogenesi e differenziazione dei tessuti endocrini. La sostanza causa una minima tossicità generale sia materna che prenatale o neonatale. Per contro, un esame istologico qualitativo nei feti e nei neonati esposti in utero ha messo in evidenza un incremento di alterazioni a carico sia della tiroide che dei surreni. Sono in corso esami istomorfometrici, che possono risultare l'indicatore più sensibile per effetti sullo sviluppo a carattere organo-specifico e soprattutto fornire indicazioni più complete sul significato funzionale delle alterazioni osservate;

b) l'insetticida organoclorurato lindano, un composto che in passato è stato largamente utilizzato in Italia, e che può persistere nell'ambiente e nei tessuti e bioaccumularsi (2). Il lindano è noto per indurre, a livello sperimentale, effetti complessi sulla riproduzione e sull'equilibrio endocrino, con bersagli e meccanismi tuttora da chiarire. In colla-

borazione con la UO 3 è stato effettuato uno studio sugli effetti sullo sviluppo riproduttivo del topo sino all'età adulta in seguito a esposizione, prenatale o durante l'allattamento, a lindano. Mentre la molecola non induce una evidente tossicità generale, i risultati preliminari mostrano nei maschi una specifica riduzione dello sviluppo del tessuto testicolare, evidente soprattutto al raggiungimento della maturità sessuale e non accompagnata da danni a particolari fasi della spermatogenesi; nelle femmine si osservano effetti di tipo estrogenico, in particolare una iperplasia/ipertrofia del tessuto uterino. Le alterazioni sono nettamente più evidenti in seguito a esposizione prenatale rispetto all'esposizione postnatale. Va notato che il tipo di effetti osservati in ambedue i sessi è paragonabile a quelli indotti dal dietilstilbestrolo, estrogeno di sintesi utilizzato nella sperimentazione come controllo positivo (4).

In conclusione, oltre a fornire dati che integrino le informazioni (tuttora largamente incomplete) sugli effetti delle sostanze in esame, gli studi *in vivo* effettuati nell'ambito del Progetto intendono contribuire alla messa a punto di modelli per valutare gli effetti sullo sviluppo endocrino e riproduttivo. Ulteriori studi riguarderanno composti con meccanismi di azione diversi, ad esempio, inibitori delle aromatasi come i triazoli.

**Il Programma di ricerca  
sull'esposizione umana  
a Endocrine Disrupting  
Chemicals (EDC)  
è finanziato dal Servizio  
Sanitario Nazionale**

## PRINCIPALI GRUPPI DI PESTICIDI CON POTENZIALI EFFETTI ENDOCRINI

- Insetticidi clorurati (lindano, dieldrin)
- Fungicidi diversi (vinclozolin, linorun)
- Triazoli (ciproconazolo)
- Imidazoli (imazalil)
- Triazine (atrazina, simazina)
- Etilene bisditiocarbammatal (mancozeb)
- Coformulanti (alchifenoli)

Gli studi *in vitro* sono stati programmati per integrare i risultati *in vivo* con informazioni sui meccanismi di azione. I sistemi utilizzati comprendono:

a) cellule germinali primordiali e ovociti fetali di topo (Università di Roma "Tor Vergata"). Su questo sistema sono stati saggiati tre composti a diverso meccanismo di azione: zeralenone (micotossina estrogenica), lindano e mono-(2-etilene)-ftalato, EDC utilizzato per la preparazione di materiali plastici, che non interagisce con i recettori per gli steroidi. I risultati preliminari consentono di discriminare gli effetti (stimolazione o inibizione della crescita, alterati processi adesivi) e i bersagli (cellule germinali primordiali od ovociti fetali) dei tre composti, ognuno dei quali mostra aspetti specifici riportabili ai meccanismi di azione;

b) spermatozoi e cellule di corpo cavernoso umane (Università di Firenze). Sono state studiate le alterazioni di parametri funzionali degli spermatozoi (livelli di calcio intracellulare, reazione acrosomiale spontanea e indotta con il progesterone) in presenza di composti ambientali ad azione estrogenica (bisfenolo A e otilfenolo polietossilato). I risultati preliminari indicano come unico effetto un modesto incremento dei livelli di calcio intracellulare; pertanto gli spermatozoi umani maturi non sembrano essere bersagli importanti di tali composti. Tuttavia, resta da chiarire se alterazioni dei parametri considerati possano essere indotte in seguito a esposizioni nel corso della maturazione funzionale del sistema riproduttivo. Sono, inoltre, in corso studi su colture di cellule di corpo cavernoso sia fetali che da soggetti adulti. Questo sistema sperimentale, sinora pressoché inutilizzato in tossicologia, può fornire risultati di interesse sulla patogenesi delle ipospadie, malformazioni potenzialmente correlate all'esposizione a EDC con azione estrogeni-

ca e/o antiandrogena (Figura 1 e Figura 2). I dati preliminari indicano che i recettori per gli estrogeni e per gli androgeni sono espressi e attivi sia nelle cellule fetali che adulte, e incoraggiano quindi a proseguire l'attività sperimentale utilizzando diversi EDC.

L'indagine epidemiologica consiste in uno studio multicentrico retrospettivo su popolazioni lavorative esposte a specifici pesticidi potenziali EDC; lo studio è stato pianificato per verificare l'associazione tra livelli crescenti di esposizione e differenti danni riproduttivi, tra cui particolare rilievo è stato dato al momento del concepimento (Time To Pregnancy, TTP). I gruppi identificati con diversi livelli di esposizione sono gli agricoltori in possesso del patentino per l'uso di antiparassitari (esposizione media e discontinua), i lavoratori in serra (esposizione alta e continua) e i lavoratori dei centri di disinfestazione (esposizione massima). Per ciascuna popolazione sono stati identificati i controlli interni (lavoratori che al primo concepimento svolgevano un differente lavoro) e popolazioni di riferimento non esposte. I lavoratori sono stati intervistati ed

è stato loro somministrato un questionario standard; sono state pertanto ricostruite la storia lavorativa, l'esposizione a tossici riproduttivi, sia al momento dell'intervista sia alla prima e all'ultima gravidanza, la storia riproduttiva (numero e sesso dei figli nati vivi, aborti spontanei, TTP, patologie riproduttive) e la presenza di alcuni fattori di confondimento (abitudine al fumo, età dell'uomo e della donna alla gravidanza). Secondo l'approccio generalmente accettato, l'analisi del TTP è stata condotta alla prima gravidanza. In totale sono stati intervistati 1 171 lavoratori.

Ritardi significativi nel concepimento sono stati osservati fra i lavoratori in serra rispetto agli agricoltori e alla popolazione di riferimento; a loro volta gli agricoltori mostravano un modesto aumento, non significativo, rispetto ai controlli. Inoltre, le mogli dei lavoratori in serra che all'intervista hanno dichiarato di utilizzare e/o di aver utilizzato al momento delle gravidanze almeno uno dei principi attivi identificati come EDC (n. 56) hanno sperimentato un rischio di abortività 2,6 volte più elevato delle mogli dei rimanenti lavoratori in serra (n. 118) che hanno di-

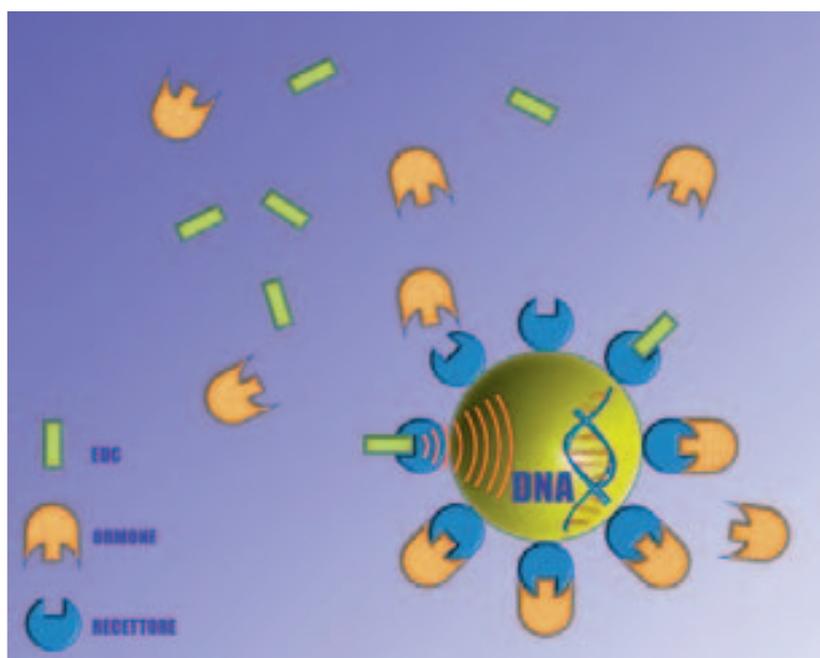
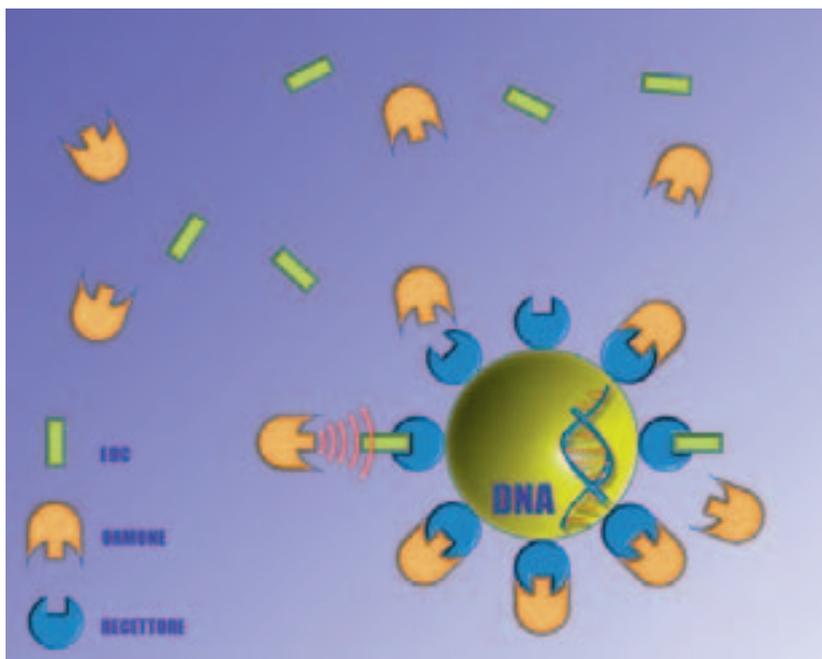


Figura 1 - Meccanismo di azione di EDC agonisti di recettori per ormoni steroidi



**Figura 2** - Meccanismo di azione di EDC antagonisti di recettori per ormoni steroidi

chiarato di non avere mai fatto uso di tali sostanze. Sui 31 dipendenti del Centro di Disinfestazione del Comune di Roma, non è stato possibile calcolare il TTP a causa del numero ridotto; tuttavia, un significativo aumento del tasso di aborti spontanei è stato evidenziato nelle mogli dei lavoratori rispetto alla popolazione di riferimento (*odds ratio* 3,8, intervallo di confidenza 95% 1,2-12,0). I dati mettono quindi in evidenza come l'esposizione paterna a sostanze tossiche per la riproduzione, e in particolare a EDC, possa indurre un danno alle prime fasi embrionali, evidenziato in primo luogo dall'aumentato tasso di abortività nelle mogli. Inoltre, viene corroborato il ruolo del TTP come indicatore, a livello di coppia dell'esposizione anche di uno solo dei due partner.

### XENOBIOTICI E FERTILITÀ UMANA: STUDI DI BASE E CLINICI (UO 2)

**Responsabile:** L. Silvestroni, Università di Roma "La Sapienza"

Le attività di ricerca di base in corso presso il Laboratorio di Biofluorimetria (Dipartimento di Fi-

siopatologia Medica) sono focalizzate sullo studio di possibili meccanismi dell'infertilità maschile in cellule e tessuti del sistema riproduttivo umano.

In particolare, è in corso la messa a punto di una metodica ultrarapida che consente di visualizzare lo stato dell'acrosoma in spermatozoi umani: tale metodologia sarà applicata allo studio degli effetti di EDC selezionati sulla reattività biologica di spermatozoi capacitati in termini di sviluppo di reazioni acrosomiali spontanee e stimulate dall'induttore fisiologico progesterone e da un induttore farmacologico (lo ionoforo a calcio ionomicina). È inoltre in corso uno studio (in collaborazione con la UO 1) sull'espressione e localizzazione del recettore arilico (AhR) nelle diverse componenti cellulari del testicolo di topo. Tale recettore è il bersaglio primario per l'azione di composti alogenati potenziali EDC, quali diossine e taluni policlorobifenili; tuttavia, mancano informazio-

ni adeguate sulla sua espressione nel sistema riproduttivo maschile dei mammiferi e sulla possibile modulazione in diverse condizioni di esposizione e/o stadi di sviluppo.

La UO 2 è inoltre impegnata in attività di ricerca clinica. In collaborazione con la UO 6 è in atto una raccolta di campioni di sangue periferico da soggetti normali e da soggetti affetti da patologie di interesse endocrinologico: infertilità maschile con oligo(asteno)zoospermia, alterazioni, degli assi ipotalamo-ipofisi-ovario/surrene, obesità (soggetti ambosessi). Nei soggetti affetti da obesità e che affrontano interventi di chirurgia bariatrica si prelevano anche campioni di tessuto adiposo. I campioni biologici vengono in parte inviati alla UO 6 per il dosaggio di diversi EDC e in parte utilizzati per la localizzazione immunoistoichimica di potenziali bersagli di EDC (ad esempio, AhR). L'arruolamento dei soggetti prevede la compilazione di una scheda anamnestica elaborata *ad*

*hoc* per gli studi di ricerca clinica nell'ambito del Progetto e consultabile online all'indirizzo: [www.iss.it/notiziario](http://www.iss.it/notiziario)

Le caratteristiche clinico-laboratoristiche dei soggetti arruolati sono archiviate

presso il Day Hospital di Diagnostica Endocrina Morfofunzionale (Policlinico Umberto I, Roma).

### ANOMALIE DELLE CELLULE GERMINALI E DELL'EMBRIONE PREIMPIANTO (UO 3)

**Responsabile:** M. Spanò, ENEA-Casaccia. Collaborazioni interne: F. Pacchierotti

L'attività sperimentale della UO 3 si è svolta sinora principalmente in collaborazione con la

**L'esposizione maschile a pesticidi potenziali EDC è associata a un aumentato tasso di abortività nelle donne**



UO 1. Per valutare l'eventuale azione del lindano sull'integrità delle cellule germinali maschili sono state utilizzate due tecniche di citometria a flusso a integrazione dell'informazione ottenibile con metodi istopatologici e biochimici: a) analisi ad alta risoluzione del contenuto di DNA delle cellule testicolari (attraverso l'identificazione e la quantificazione dei compartimenti cellulari aploidi, diploidi e tetraploidi essa permette di evidenziare alterazioni nella spermatogenesi); b) Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA), che attraverso l'analisi della suscettibilità della cromatina spermatozoaria a una denaturazione *in situ* a basso pH permette di evidenziare alterazioni della spermioistogenesi.

I risultati preliminari evidenziano, in seguito a esposizione prenatale a lindano, un incremento della frazione di spermatozoi con cromatina alterata, e in misura meno evidente una diversa distribuzione dei vari compartimenti cellulari rispetto al controllo. Questi dati incoraggiano a proseguire le indagini su alcuni EDC come fattori di rischio anche per alterazioni sottili della qualità e integrità dei gameti.

È inoltre in corso di avviamento uno studio *in vivo* sugli effetti del lindano sulla cinetica delle prime fasi di segmentazione embrionale nel topo. Questa fase è un periodo critico per la morte embrionale precoce e anche per l'induzione di alterazioni dello sviluppo a comparsa più tardiva nel corso della gestazione; tuttavia, i modelli sperimentali disponibili devono ancora essere perfezionati. I miglioramenti in campo metodologico riguardano: l'utilizzo della superovulazione, che permette di sincronizzare il ciclo estrale, e di conseguire precisamente l'orario dell'ovulazione e della fecondazione; la messa a punto di un protocollo per l'osservazione degli embrioni, compreso il trattamento delle morule per isolare i blastomeri senza danneggiarli. I dati preliminari ottenuti permettono di descrivere la cinetica di sviluppo embrionale nel topo (ceppo CD1 in assenza di trattamento) fino a circa 63 ore dopo la fecondazione.

#### MECCANISMI DI AZIONE RECETTORE-MEDIATI DEGLI XENOESTROGENI (UO 4)

Responsabile: M.L. Brandi, Università di Firenze

Primo obiettivo della UO è quello di analizzare i polimorfismi dei geni codificanti per il recettore della vitamina D, per i recettori estrogenici (ER), ER $\alpha$  ed ER $\beta$  e aromatasi come potenziali fattori di suscettibilità a patologie su base endocrina e/o agli effetti di xenoe-

**Il Progetto prevede l'utilizzo di schede anamnestiche per i soggetti arruolati affetti da patologie endocrinologiche**

strogeni (Figura 3). Nella prima fase del Progetto sono state messe a punto le analisi molecolari per lo studio dei polimorfismi di tali geni e per la valutazione della loro distribuzione. In particolare è stata messa a punto l'analisi dei seguenti polimorfismi: a) per il gene di ER $\alpha$  (braccio lungo del cromosoma 6) sei diversi tipi di polimorfismi, inclusi (TA) $n$  repeats e polimorfismi che determinano alterazione del sito di taglio di un'endonucleasi di re-

strizione; b) per il gene di ER $\beta$  (braccio lungo del cromosoma 14) un polimorfismo identificato dalla endonucleasi di restrizione; c) per il gene del recettore della vitamina D (braccio lungo del cromosoma 12), quattro diversi tipi di polimorfismi identificati da endonucleasi di restrizione. Infine, un risultato di notevole interesse è la messa in evidenza di polimorfismi del gene codificante l'aromatasi quali fattori di rischio per l'osteoporosi nella donne in menopausa, a conferma che i disturbi nell'omeostasi di estrogeni e androgeni possono avere ricadute sulla salute ad ampio spettro.

Un ulteriore obiettivo è la messa a punto del modello *in vitro* HEK 293 che utilizza cellule umane embrionali renali per valutare le attività trascrizionali di ER $\alpha$  ed ER $\beta$  in presenza di un ligando attivatore. Sono attualmente in corso esperimenti di competizione di legame con il ligando marcato, con l'agonista-antagonista estrogenico raloxifene e con dimostrati o potenziali xenoestrogeni di interesse lavorativo e/o ambientale (clorurati come metossicloro, dieldrin, lindano, ftalati, bisfenolo A). Lo studio comprende anche la caratterizzazione di possibili variazioni dell'attività trascrizionale di ER $\alpha$  indotta dalle stesse molecole in combinazione e in presenza o assenza del ligando fisiologico. Verrà infine valutata, mediante tecnica di competizione di le-

game, la capacità di tali miscele di sostituirsi al ligando fisiologico nell'interazione con i due recettori. Lo studio produrrà, quindi, anche la messa a punto di un modello *in vitro*

per lo studio comparato di EDC ad azione estrogenica sia come singole molecole che come miscele presenti nell'ambiente o negli alimenti.

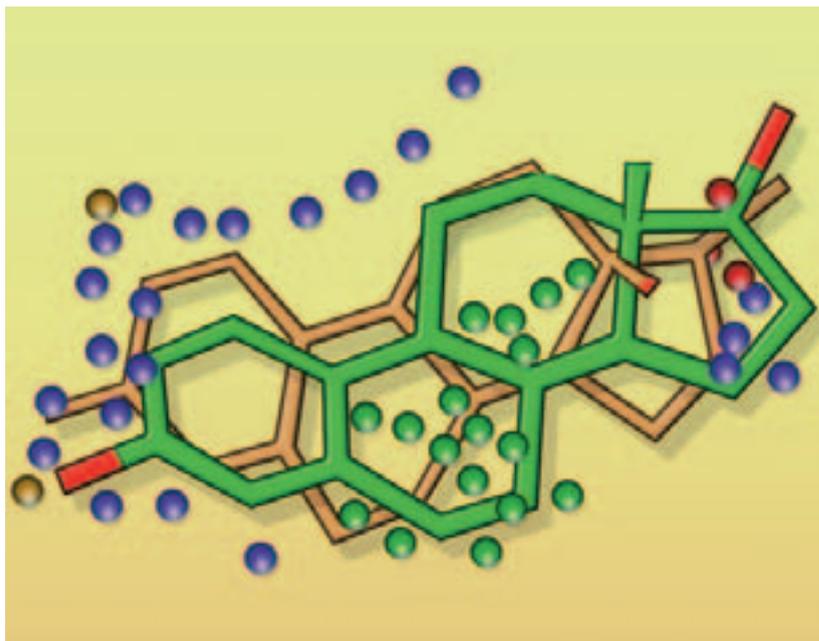


Figura 3 - Modello di un recettore per gli estrogeni

**EFFETTI DI INTERAZIONI TRA EDC IN MISCELE COMPLESSE: ALTERAZIONI MOLECOLARI, IDENTIFICAZIONE DI FATTORI METABOLICI DI SUSCETTIBILITÀ E DI POSSIBILI FATTORI DI PROTEZIONE (UO 5)**

Responsabile: A. Colacci, IST- Sezione di Bologna. Collaborazioni esterne: E. Testai, ISS

I policlorobifenili (PCB) sono miscele di composti organici prodotti a elevato volume fino agli inizi degli anni '80, capaci di persistere nell'ambiente e di accumularsi nelle catene alimentari: la tossicità e in particolare gli effetti endocrini dipendono dai differenti congeneri che compongono la miscela. Nel-

l'ambiente i PCB subiscono processi complessi che determinano una variazione della composizione in congeneri e di conseguenza della tossicità. Pertanto, potreb-

be risultare inaccurato l'utilizzo delle miscele commerciali come standard per la caratterizzazione chimica e tossicologica delle miscele ambientali. L'attività della UO 5 si è focalizzata sulla messa a punto di un nuovo approccio per lo studio di miscele ambientali di PCB che prevede l'abbinamento di una caratterizzazione chimica congenere-specifica con test *in vitro* che consentano di identificare il possibile meccanismo di azione. In particolare, l'individuazione e quantificazione dei congeneri viene effettuata mediante analisi gas cromatografica con rivelatore a spettrometria di massa; la caratterizzazione tossicologica prevede lo studio della induzione di effetti quali trasformazione cellulare, inibizione della comunicazione cellulare e apoptosi in fibroblasti di topo BalbC/3. I risultati ottenuti con le miscele ambientali vengono confrontati con la miscela standard Aroclor 1260. Inoltre, viene esaminata la capacità dei parametri biologici di discriminare le diverse miscele. I risultati preliminari indicano una risposta correlata alla dose per tutti i parametri esaminati, nonché una diversa risposta per le differenti miscele.

**I policlorobifenili (PCB) sono composti organici che persistono nell'ambiente e si accumulano nelle catene alimentari**

Un altro obiettivo della UO 5 è l'identificazione di biomarcatori di suscettibilità individuale alle molecole di interesse per il Progetto, e di come questo possa essere influenzato



dalla modulazione metabolica da parte di xenobiotici quali i PCB. È stata pertanto avviata, in collaborazione con la UO 7, l'identificazione dei citocromi (CYP) responsabili della formazione di etilene tiourea (ETU), il metabolita tossico del mancozeb, un pesticida largamente utilizzato in viticoltura. L'azione endocrina a livello tiroideo di tale pesticida è ben nota, così come è noto che la formazione di ETU è mediata dal P450 epatico. Al momento non è noto però quale CYP sia responsabile della bioattivazione nell'uomo, e se livelli diversi dovuti a polimorfismi metabolici nella popolazione esposta possano determinare diversa suscettibilità all'azione endocrina del mancozeb.

### VALUTAZIONE DELLA ESPOSIZIONE (UO 6)

**Responsabile:** A. Di Domenico, ISS. Collaborazioni interne: A. Menditto, L. Turrio Baldassarri, S. Caroli, A. Di Muccio. Collaborazioni esterne: P. Apostoli, Università di Brescia

Obiettivo della UO 6 è la collaborazione con le UO impegnate in studi clinici, assicurando il mo-

onitoraggio biologico in fluidi o tessuti umani di EDC quali contaminanti alogenati persistenti (PCB, diossine), insetticidi clorurati (ad esempio, lindano, dieldrin, DDT)

e metalli (speciazione di composti di arsenico, mercurio, piombo e stagno); infatti, anche taluni composti metallici vengono considerati da numerosi autori come potenziali EDC. In prospettiva, potrà venire allestita una banca di campioni biologici.

Al momento è in corso la collaborazione con la UO 2 sui livelli di esposizione a EDC in pazienti con patologie su base endocrina.

Sono inoltre in corso indagini su tre gruppi di soggetti in Lombardia: lavoratori dell'industria siderurgica (esposizione a metalli e organoalogenati, tra cui diossine); ex addetti alla produzione di PCB; persone con assunzione alimentare di PCB elevata e avvenuta in tempi contenuti (accidentale). Su tali soggetti, oltre al monitoraggio biologico dell'esposizione, verranno valutati indicatori clinici, tra cui anche il bilancio degli steroidi e, in collaborazione con la UO 7, marcatori di funzionalità tiroidea.

### STUDIO DEGLI EFFETTI DELL'ESPOSIZIONE PROFESSIONALE ED AMBIENTALE AD AGENTI CHIMICI DI SINTESI INTERFERENTI CON LA FUNZIONALITÀ TIROIDEA: ETILENBISDITIOCARBAMATI (UO 7)

**Responsabile:** A. Olivieri, ISS. Collaborazioni interne: M. Sorcini. Collaborazioni esterne: M.T. Mechi, ASL Firenze; L. Chiovato, Università di Pisa

Obiettivo delle UO 7 e UO 8 è la valutazione dei potenziali effetti sulla funzione tiroidea in seguito all'esposizione a EDC. In tale ambito, infatti, i dati in letteratura sono gravemente carenti, nonostante il crescente rilievo dei disturbi tiroidei come problema di sanità pubblica. Inoltre, va verificata la possibile maggiore suscettibilità a EDC tireostatici delle popolazioni che vivono in aree con carenza subclinica di iodio, e comprendono anche regioni italiane come la Toscana.

Tra le molecole che, almeno in studi sperimentali, hanno uno specifico effetto sulla tiroide vi è la ETU (UO 5), metabolita

comune ai fungicidi agricoli etilenbisditiocarbamati (EBDC). Al fine di studiare i possibili effetti dell'esposizione professionale e ambientale a ETU sulla fun-

zionalità tiroidea, è stato identificato un comune toscano a forte vocazione vinicola e con un intenso utilizzo di EBDC, in particolare di mancozeb. In collaborazione con l'ASL di Firenze, viene effettuata una completa anamnesi ambientale (comprese tecniche di coltivazione, quantitativi di prodotti fitosanitari utilizzati, metodi di tratta-

**Gli EDC possono essere presenti come miscele complesse nell'ambiente e negli alimenti**

mento): l'esposizione nella fase di rientro è ritenuta quella a maggior rischio, in quanto il tempo di esposizione è generalmente più lungo rispetto alla fase di trattamento. Inoltre, è stato accertato che si pone una maggiore attenzione alla protezione durante la distribuzione che non nel rientro in coltura, in quanto la percezione del rischio connesso a questa fase da parte degli addetti è molto ridotta. L'esposizione viene valutata su una coorte di addetti all'agricoltura: a) indirettamente, mediante questionario (attività lavorativa, stili di vita e abitudini alimentari, uso domestico di pesticidi); b) direttamente, mediante monitoraggio biologico (ioduria, livelli urinari di ETU) in varie fasi delle attività agricole che prevedono l'uso di EBDC. In un sottogruppo della coorte identificata vengono valutati biomarcatori di effetto (pannello biochimico di funzionalità tiroidea, autoanticorpi) e viene effettuato un esame obiettivo clinico.

Lo studio si estende anche alla esposizione residenziale, con particolare riguardo ai bambini in età scolare. Al momento vengono raccolti dati su stili di vita, abitudini alimentari e un'anamnesi familiare e personale rivolta all'identificazione di disturbi attuali e pregressi a carico della tiroide, come base per successive indagini mirate.

I dati preliminari evidenziano elevate concentrazioni di ETU soprattutto nella fase di rientro in coltura, che viene quindi confermata come la fase a maggiore rischio di esposizione.

## EFFETTI DELL'ESPOSIZIONE CRONICA ALLO STIRENE SULLA GHIANDOLA TIROIDEA E SULL'EQUILIBRIO ORMONALE TIROIDEO (UO 8)

**Responsabile:** A. Pinchera, Università di Pisa. **Collaborazioni interne:** L. Chiovato, F. Santini. **Collaborazioni esterne:** A. Olivieri, M. Sorcini, ISS

Come già accennato anche l'attività della UO 8 si incentra sulla valutazione di possibili effetti in seguito a esposizione lavorativa a una sostanza potenzialmente tirostatica, lo stirene, nelle aziende impegnate nella lavorazione di vetroresine. Nella fase attuale sono state selezionate e contattate aziende (Provincia di La Spezia) nelle quali lo stirene viene regolarmente utilizzato nel ciclo di produzione ed è stata effettuata un'anamnesi patologica remota e lavorativa per reclutare i soggetti sottoposti a esposizione cronica allo stirene. L'inserimento dei soggetti nel gruppo "esposti" è stata confermata mediante misurazione dei metaboliti urinari dello stirene (acido mandelico e acido fenilglicosilico). È stata infine messa a punto l'organizzazione pratica del lavoro, compreso l'allestimento di un ambulatorio mobile per la valutazione morfofunzionale della ghiandola tiroidea: i parametri considerati comprendono ioduria, pannello biochimico di funzionalità, autoanticorpi, ecografia, e infine agoaspirazione di eventuali noduli tiroidei.

## CONCLUSIONI

Nel suo primo anno di attività, oltre alla messa a punto di approcci metodologici sia sperimentali che clinici e al consolidarsi delle interazioni fra le UO, il Progetto ha pro-

dotto risultati quali l'identificazione di possibili parametri critici per la valutazione del rischio di EDC selezionati (3-5); approcci e parametri, quali ad esempio, il TTP, per lo studio della salute riproduttiva in gruppi esposti (6, 7); marcatori di suscettibilità per patologie su base endocrina (8).

Lo sviluppo ulteriore del Progetto dovrà basarsi sul potenziamento dell'aspetto interdisciplinare, in modo da produrre, nel corso e al termine delle attività, modelli e strategie per valutare i rischi sanitari da EDC sia nell'ambito della regolamentazione delle sostanze chimiche che in quello della sorveglianza di popolazioni potenzialmente esposte.

## Riferimenti bibliografici

1. Stazi AV, Mantovani A. *Notiziario Ist Super Sanità* 2001; 14 (2): 13-5.
2. Traina ME, Urbani E, Rescia M, et al. *Rapporti ISTISAN* 01/3 2001; 59 p.
3. Mantovani A, Macrì C, Ricciardi C, et al. *Toxicology Letters* 2001; 116 (Suppl. 1): 88.
4. Spanò M, Cordelli E, Eleuteri P, et al. *Toxicology* 2001; 164: 125.
5. Luconi M, Bonaccorsi L, Forti G, et al. *Mol Cell Endocrinol* 2001; 178: 39-45.
6. Petrelli G, Figà-Talamanca I, Tropeano R, et al. *Europ J Epidemiol* 2000; 16: 391-3.
7. Petrelli G, Figà-Talamanca I, Taggi F. *Central Europ J Occupat Environ Med* 2000; 6: 265-71.
8. Masi L, Becherini L, Gennari L, et al. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 2263-9.

## In brief

### Human exposure to endocrine disrupting chemicals and reproductive health

Endocrine Disrupting Chemicals (EDC) are a growing public health concern, especially considering both widespread exposure and potentially enhanced susceptibility of children. Since 2000 the Italian Health system supports a pilot interdisciplinary project on risk evaluation of EDC. The activities focus on a) in vivo/in vitro toxicological studies on agrochemicals and industrial compounds, investigating endpoints relevant to fertility and reproductive development; b) epidemiological studies on selected groups with b.1) occupational exposures to EDC (including thyrostatic compounds) or b.2) endocrine-related disturbances. Outcomes will improve strategies for risk assessment as well as for monitoring health status of exposed and/or susceptible groups.