

**ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA**

SCUOLA DI SCIENZE
Corso di Laurea Magistrale in Analisi e Gestione dell'Ambiente
Campus di Ravenna

**Utilizzo di cellule MCF-7 in coltura per valutare la
presenza di xenoestrogeni e composti genotossici in
acque ad uso potabile pre- e post- trattamento**

Tesi di Laurea in Fisiologia applicata all'ambiente

Relatore:
Prof.ssa Elena Fabbri

Laureanda:
Stefania Giani

Correlatori:
Dott.ssa Paola Valbonesi
Dott.ssa Annamaria Piano

II sessione
ANNO ACCADEMICO 2014-2015

PREMESSA

Gli esseri umani interagiscono da secoli, in tutte le loro attività, con l'ambiente, rappresentando la più importante forza di cambiamento e di distruzione del pianeta.

Come tutte le specie, l'uomo modifica il territorio in cui si trova per renderlo più confortevole e avvicinarlo alle sue esigenze di sopravvivenza; tuttavia, è la prima volta nella storia della vita sulla Terra, che una singola specie è in grado di influire così radicalmente sul destino di tutte le altre, animali e vegetali, sconvolgendo ed alterando ecosistemi. L'uomo primitivo era in grado di prelevare risorse, senza depauperare né eccessivamente modificare l'habitat, apprezzando il dono della vita offerto dalla natura e ringraziandola per i beni che metteva a disposizione, ma accettando, allo stesso tempo, la sua forza distruttiva. La prima grande trasformazione è cominciata con l'addomesticamento degli animali e delle piante, con il conseguente avvento della pastorizia e dell'agricoltura, responsabili del primo forte impatto sulla biodiversità.

A seguire, la nascita e l'incremento delle lavorazioni industriali, conseguenze dirette delle scoperte scientifiche e del capitalismo, determinarono, alla fine del diciottesimo secolo, quella che viene chiamata rivoluzione industriale, che portò ad un vero e proprio sconvolgimento degli ecosistemi naturali; il rapido incremento demografico della popolazione umana e l'impiego di nuove tecniche agricole, unite alla rinnovata capacità dell'uomo di sfruttamento delle risorse energetiche, iniziarono a minare pesantemente gli equilibri ecologici esistenti fino a quel momento. Nell'ultimo secolo, in particolare, l'avvento ed il progresso della chimica, quale motore primario dell'industria, hanno portato alla produzione di una sempre crescente varietà di composti organici di sintesi, largamente utilizzati nei settori tessile, delle materie plastiche, dei solventi e detergenti e come componenti di pesticidi in genere. Il continuo rilascio di queste sostanze in ambiente, spesso, ha causato un loro accumulo negli ecosistemi e nei tessuti degli organismi superiori, poiché solo alcuni di essi, essendo simili a composti naturali, vengono completamente demoliti dai microrganismi, mentre altri risultano persistenti con gravi effetti eco-tossicologici per gli ecosistemi. Il problema dell'inquinamento chimico venne per la prima volta segnalato e argomentato in modo scientifico, esattamente 53 anni fa, dall'ecologa statunitense Rachel Carson, con la pubblicazione di uno dei saggi scientifici più influenti di tutto il ventesimo secolo, per la ricaduta che ebbe sulla nascita e sullo sviluppo globale del pensiero ecologico.

«Più riusciamo a focalizzare la nostra attenzione sulle meraviglie e le realtà dell'universo attorno a noi, meno dovremmo trovare gusto nel distruggerlo» (Rachel Carson, *Silent Spring*, 1962).

Frutto di un lunghissimo lavoro sul campo e di una corposa documentazione scientifica, il celebre saggio *Silent Spring* (*Primavera silenziosa*), testimonia e denuncia l'avvelenamento della natura ad opera del DDT e di altre sostanze chimiche prodotte dall'uomo, rappresentando uno dei casi emblematici di come, attraverso la catena alimentare, l'uso indiscriminato, inconsapevole ed errato delle risorse e delle tecnologie, può arrivare a produrre effetti imprevedibili e disastrosi. Il titolo dell'opera è riferito al progressivo silenzio primaverile nelle campagne statunitensi, in seguito al decadimento nella popolazione di uccelli canori, causato dall'utilizzo massiccio di insetticidi, impiegati dapprima nelle fabbriche militari e successivamente anche all'interno delle case, allo scopo di debellare le malattie tropicali trasmesse dagli insetti, come il tifo e la malaria. Rachel Carson fu la prima a prevedere, con forte anticipo sui tempi, gli effetti deleteri delle tecniche in agricoltura e a denunciare i danni inferti agli organismi e agli ecosistemi dall'uso smisurato di composti chimici, individuando importanti collegamenti ambientali: un pesticida è creato e usato per eliminare un insetto, ma i suoi effetti si risentono attraverso la catena alimentare, cosicché quello che era nato per eliminare un solo insetto finisce per avvelenare animali e uomini. L'opera di Rachel Carson, fondamento del movimento ambientalista, cambiò notevolmente il corso della storia, mettendo in luce problemi che fino a quel momento non erano mai stati presi in considerazione, come la tutela degli habitat naturali, dei beni culturali e ambientali, temi sconosciuti dai Governi dei diversi Paesi, che non rientravano nemmeno nelle agende politiche. Dopo la pubblicazione di *Silent Spring*, il DDT è stato vietato e si sono presi una serie di provvedimenti legislativi in materia di tutela ambientale, contro l'uso crescente dei pesticidi e dei composti organici di sintesi, utilizzati in agricoltura, sebbene esso venga tuttora usato in moltissimi paesi subtropicali per combattere la malaria. Sulla base di questi principi, a partire dagli anni '70, cominciò a prendere forma il concetto di "sviluppo sostenibile", ovvero di sviluppo compatibile con la salvaguardia dell'ambiente e delle risorse per le generazioni future, affermandosi fortemente in contrasto con lo sviluppo classico, legato esclusivamente alla crescita economica e all'aumento della produttività.

La Conferenza delle Nazioni Unite sull'ambiente umano (UNCHE, United Nations Conference on Human Environment), tenutasi a Stoccolma nel 1972, ha segnato l'inizio di una presa di coscienza a livello globale ed istituzionale dei problemi legati all'ambiente.

Si legge nel relativo preambolo alla dichiarazione finale: "*Siamo arrivati ad un punto della storia in cui dobbiamo regolare le nostre azioni verso il mondo intero, tenendo conto innanzitutto delle loro ripercussioni sull'ambiente. Per ignoranza o per negligenza possiamo causare danni considerevoli ed irreparabili all'ambiente terrestre da cui dipendono la nostra vita ed il nostro benessere. Viceversa, approfondendo le nostre conoscenze ed agendo più saggiamente, possiamo assicurare a noi stessi ed alla nostra posterità, condizioni di vita migliori in un ambiente più adatto ai bisogni ed alle aspirazioni dell'umanità*". (Declaration of the United Nations Conference on the Human Environment, Stockholm, 5 to 16 June 1972). Da quel momento, la protezione ed il miglioramento dell'ambiente sono divenute di importanza prioritaria nelle intenzioni delle Nazioni Unite, consapevolmente al fatto che lo stile di vita improntato sulla crescita "sempre e comunque", aumenta il livello di inquinamento del pianeta; perciò, se vi si vuole porre un freno è necessario un ripensamento non solo delle singole azioni, ma di uno stile di vita differente, improntato su un nuovo modello di sviluppo che sia sostenibile con l'ambiente di cui anche l'uomo è parte, obbligando tutti, dai cittadini alle collettività, dalle imprese alle istituzioni, ad assumersi le proprie responsabilità.

INDICE

1	INTRODUZIONE.....	7
1.1	CONTAMINANTI EMERGENTI: INTERFERENTI ENDOCRINI	7
1.2	DEFINIZIONI DI SOSTANZE AD INTERFERENZA ENDOCRINA	11
1.3	QUADRO DI RIFERIMENTO NORMATIVO: DISPOSIZIONI LEGALI, LINEE GUIDA E PROGRAMMI DI MONITORAGGIO	12
1.3.1	Il sistema di ricerca italiano	18
1.3.2	Progetti di ricerca in Emilia-Romagna.....	21
1.4	ELEMENTI PRINCIPALI DI FISIOLOGIA ENDOCRINA.....	24
1.4.1	Estrogeni e struttura dei recettori degli estrogeni.....	25
1.4.2	Meccanismo d'azione dell'estradiolo.....	29
1.5	INTERFERENTI ENDOCRINI: XENOESTROGENI AMBIENTALI	32
1.5.1	Estrogeni naturali	32
1.5.2	Xenoestrogeni ambientali.....	34
1.5.3	Immissione di xenoestrogeni in ambiente e modalità di esposizione.....	35
1.5.4	Tossicocinetica: comportamento degli xenoestrogeni nell'organismo	38
1.5.5	Tossicodinamica: interazione con il bersaglio	41
1.5.6	Il problema delle miscele	44
1.5.7	Il caso del dietilstilbestrolo (DES)	45
1.5.8	Il Bisfenolo A (BPA)	46
1.6	LA QUALITA' DELL'ACQUA DA DESTINARE A CONSUMO UMANO.....	53
1.6.1	Trattamento delle acque reflue e rimozione dei contaminanti negli impianti di depurazione	55
1.6.2	Presenza di xenoestrogeni nel ciclo integrato dell'acqua.....	58
1.6.3	Composti ad attività genotossica nelle acque.....	61
1.7	VALUTAZIONE DEL RISCHIO PER L'AMBIENTE E LA SALUTE UMANA	63
1.7.1	Effetti sull'apparato riproduttivo umano.....	64
1.7.2	Effetti cancerogeni nell'uomo	65
1.7.3	Periodi critici di esposizione	66
2	SCOPO DELLA RICERCA	68
3	METODICHE SPERIMENTALI	69
3.1	LINEE CELLULARI MCF-7 DI ADENOCARCINOMA MAMMARIO.....	69
3.1.1	Congelamento e scongelamento delle linee cellulari	71
3.1.2	Condizioni colturali delle cellule MCF-7.....	71
3.1.3	Semina per esperimenti	73
3.2	E-SCREEN ASSAY O SAGGIO DI PROLIFERAZIONE CELLULARE	74

3.2.1	Condizioni di esposizione delle cellule.....	75
3.2.2	Test di vitalità (MTT).....	76
3.3	TEST DEI MICRONUCLEI.....	77
3.4	ANALISI STATISTICA DEI DATI.....	82
3.5	DESCRIZIONE DEI SITI CAMPIONATI.....	83
3.5.1	Procedura di campionamento.....	85
3.5.2	Conservazione dei campioni.....	86
3.5.3	Filtrazione primaria.....	87
3.5.4	Estrazione in fase solida - SPE (Solid phase extraction).....	88
3.5.5	Evaporazione sotto flusso di azoto.....	91
4	RISULTATI.....	92
4.1	MESSA A PUNTO DEL SAGGIO E-SCREEN PER VALUTARE L'ATTIVITA' ESTROGENICA.....	92
4.1.1	Sensibilità e ripetibilità del saggio: Curva standard 17β-estradiolo.....	92
4.1.2	Sensibilità del metodo: Curva di Bisfenolo A.....	93
4.1.3	Valutazioni preliminari: effetto del solvente.....	94
4.2	VALUTAZIONE DELL'ATTIVITA' ESTROGENICA NEI CAMPIONI DI ACQUA PERIMENTALE.....	95
4.2.1	Saggio E-screen 1° campionamento: Attività agonista.....	95
4.2.2	Saggio E-screen 2° campionamento: Attività agonista.....	96
4.2.3	Saggio E-screen 3° campionamento: Attività agonista.....	97
4.2.4	Saggio E-screen: Attività antagonista.....	97
4.3	MESSA A PUNTO DEL TEST DEI MICRONUCLEI PER VALUTARE L'ATTIVITA' GENOTOSSICA.....	98
4.3.1	Costruzione control database.....	98
4.3.2	Curva di Bisfenolo A: Controllo positivo.....	99
4.4	VALUTAZIONE DELL'ATTIVITA' GENOTOSSICA DEI CAMPIONI DI ACQUA SPERIMENTALE.....	99
4.4.1	Test dei micronuclei 1° campionamento.....	100
4.4.2	Test dei micronuclei 2° campionamento.....	100
4.4.3	Test dei micronuclei 3° campionamento.....	101
5	DISCUSSIONE E CONCLUSIONI.....	102
6	RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI.....	110

1 INTRODUZIONE

1.1 CONTAMINANTI EMERGENTI: INTERFERENTI ENDOCRINI

Dal 1930 ad oggi la produzione di sostanze chimiche è passata da un milione di tonnellate all'anno a 400 milioni di tonnellate, mentre è stato stimato che annualmente circa 100.000 diversi tipi di composti sono prodotti per una vastità di applicazioni in tutto il mondo, con un incremento di 2-3.000 prodotti all'anno (EEA, 1995).

Molti composti, soprattutto quelli fabbricati in quantità elevata o usati nei comuni beni di consumo, si disperdono facilmente nell'ambiente; altri invece, il cui uso è stato già vietato o limitato da tempo, continuano ancora a fuoriuscire dai vecchi prodotti o si ritrovano dispersi perché altamente persistenti (cioè in grado di resistere alla degradazione naturale), mentre nuove sostanze continuano ad essere sintetizzate ed immesse sul mercato.

Recentemente, è stata presa in considerazione una nuova classe di contaminanti, presente principalmente nelle acque, in concentrazioni variabili da qualche ng/L a pochi µg/L (Hartig et al 1999; Kasprzyk-Hordern et al., 2007, 2009) che, anche a così basse concentrazioni, possono causare disfunzioni sugli organismi e sulla fauna acquatica (Daughton, 2004).

Essi prendono il nome di “contaminanti emergenti” poiché sono sostanze scoperte recentemente di cui non si ha, ad oggi, una conoscenza totalmente compiuta e non sono ancora normate da valori limite di legge. Con il termine contaminanti emergenti si indicano diverse sostanze biologicamente attive di origine antropica quali farmaci, composti contenuti in prodotti per la cura e l'igiene personale (PPCPs – pharmaceuticals and personal care products) e composti endocrini (EDCs – endocrine disrupting compounds). Spesso, oltretutto, alcuni PPCPs ricadono nella classe degli EDCs, rendendo difficile una distinzione netta tra le due categorie. A partire dalla metà del ventesimo secolo, gli interferenti endocrini (IE), in particolare, hanno suscitato un'attenzione considerevole nelle comunità scientifica e politico-amministrativa, a causa del progressivo incremento del livello e dell'entità dei rischi per la salute umana, la sicurezza alimentare ed ambientale, associati all'utilizzo massiccio di questi composti chimici. Alcuni di essi sono capaci di interferire specificamente con il sistema endocrino mentre altri hanno evidenziato anche effetti genotossici.

Il sistema endocrino è un sistema biologicamente complesso, deputato all'invio di “messaggi” ai vari organi e tessuti dell'organismo.

Tali segnali sono forniti da sostanze chimiche di diversa natura, chiamate ormoni, termine che deriva dal verbo greco “ormao” (“sostanza che stimola o risveglia”). Gli ormoni sono in grado di intervenire su numerosi aspetti dell’organismo, tra cui il mantenimento dell’omeostasi, il controllo dello sviluppo somatico e neuropsichico, la riproduzione ed il metabolismo. Essi sono sintetizzati dalle ghiandole endocrine e dalle cellule neuroendocrine e vengono immessi nel sangue ad esercitare la loro azione a varie distanze, interagendo con le cellule bersaglio situate nei diversi organi e dotate di recettori specifici.

I recettori hanno la duplice funzione di riconoscere un ormone tra le numerose molecole presenti e di trasmettere alla cellula il segnale che provoca l’attivazione dei processi corrispondenti. Gli interferenti endocrini sono un gruppo eterogeneo di sostanze, utilizzate in attività produttive o di consumo quotidiano che, imitando gli effetti di ormoni naturali o interferendo con essi, possono legarsi ai recettori endocrini, incidendo negativamente sulle diverse funzioni vitali. Essi sono, infatti, in grado di:

- Riprodurre l'attività degli ormoni fisiologici, partecipando alle stesse reazioni e provocando gli stessi effetti;
- Bloccare, con azione competitiva, i recettori ormonali e quindi bloccare l'attività degli ormoni naturali;
- Interferire con la sintesi, il trasporto, il metabolismo e l'escrezione degli ormoni, alterandone le concentrazioni fisiologiche e la funzione endocrina corrispondente.

Le sostanze che possono, o potrebbero, alterare il sistema endocrino sono raggruppabili in sostanze di origine naturale, quali gli ormoni naturali, che comprendono gli estrogeni, il progesterone ed il testosterone, naturalmente prodotti nell’organismo umano o animale, ed i fitoestrogeni, sostanze contenute in alcune piante (ad esempio la soia), e sostanze sintetizzate dall’uomo, quali gli ormoni di sintesi, utilizzati come contraccettivi orali, le sostanze impiegate nella terapia sostitutiva degli ormoni e alcuni additivi per mangimi, composti utilizzati per usi industriali (ad esempio alcuni detergenti industriali), agricoli (alcuni antiparassitari) e per alcuni prodotti di consumo (ad esempio additivi per sostanze plastiche), e derivati dai processi industriali, come le diossine, oltre che metalli pesanti come il cadmio ed il mercurio (Tabella 1.1).

Tabella 1.1. Principali categorie di interferenti endocrini.

Classi di IE	Esempi di sostanze
Sostanze chimiche usate come solventi/lubrificanti e loro derivati	Bisfenil Policlorinati (PCBs) Bisfenil Polibrominati (PBBs) Diossine
Antiossidanti alimentari	Idrossianisolo butilato (BHA)
Detergenti domestici	Alchilfenoli
Materie plastiche e plastificanti	Bisfenolo A (BPA) Ftalati Ritardanti di fiamma Bromurati
Pesticidi	Metossicloro Diclorodifeniltricloroetano (DDT) Tributilin Clordano
Fungicidi	Vinclozolin
Nematodi	Aldicarb Dibromodicloropropano
Erbicidi	Alaclor Atrazina Linuron Nitrofenne
Farmaci	Dietilstilbestrolo (DES) Contraccettivi orali
Ormoni di origine vegetale	Fitoestrogeni (Genisteina)
Metalli pesanti	Arsenico Cadmio Mercurio

Ci sono, tuttavia, molti altri composti chimici sospetti che devono ancora essere testati dagli attuali metodi sperimentali (Kim et al., 2007).

Gli IE possono essere considerati degli inquinanti ambientali ubiquitari che contaminano l'ambiente attraverso una miriade di fonti di inquinamento diffuse.

In più, alcuni di questi contaminanti, se restano per lungo tempo in condizioni senza ossigeno, possono accumularsi nei sedimenti, costituendo una contaminazione degli ambienti acquatici, ancora attiva e disponibile.

Sono, inoltre, sostanze semi-persistenti, in quanto il tasso di immissione supera la velocità di degradazione e, quando entrano in contatto con organismi viventi, colpiscono bersagli molto specifici. Molti interferenti endocrini sono liposolubili e ciò garantisce, in molti casi, un agevole passaggio attraverso le membrane ed un progressivo accumulo a livello del tessuto adiposo. Nei viventi, spesso, gli IE non vengono eliminati in quanto l'organismo non possiede gli enzimi in grado di metabolizzarli, pertanto si assiste ad un progressivo fenomeno di bioaccumulo, enfatizzato soprattutto all'interno delle catene alimentari. Questo avviene perché, seguendo la catena alimentare, gli organismi si nutrono con cibo che presenta concentrazioni sempre maggiori (Fossi et al., 1999).

Altro punto di interesse riguarda le interazioni che i vari IE possono avere tra loro, con possibili effetti additivi o sinergici (Daston et al. 2003), i cui esiti sono difficilmente prevedibili.

Esistono, inoltre, delle cosiddette "finestre critiche", ovvero fasi dello sviluppo caratterizzate da una maggiore suscettibilità, per cui, ad esempio, gruppi di popolazione come feti, neonati e bambini risultano essere particolarmente sensibili all'attività ormonale di tali sostanze (Bigsby et al., 1999). Fino ad oggi, in base alle osservazioni raccolte sull'uomo e negli animali, l'attenzione è stata rivolta soprattutto allo studio di quelle sostanze che possono avere effetti sugli ormoni che regolano lo sviluppo e la riproduzione, vale a dire gli ormoni steroidei (estrogeni e androgeni) prodotti nelle gonadi. Gli IE ad attività estrogenica prendono il nome di xenoestrogeni e sono considerati i possibili, principali responsabili di molti squilibri correlati alla fertilità e allo sviluppo (Uzumcu et al., 2007). L'incremento della sterilità maschile, in parte documentata da una diminuzione della qualità dello sperma umano, osservata già a partire dagli anni Trenta, l'aumento degli aborti spontanei, l'induzione di malformazioni neonatali più o meno gravi (criptorchidismo, ipospadia), le anomalie nello sviluppo neuronale e del comportamento riproduttivo, l'obesità e il diabete, le alterazioni della funzionalità tiroidea, sono ipoteticamente ascrivibili ad una esposizione continuata a questa classe di IE ad attività estrogenica, sebbene questa correlazione causa-

effetto resti in gran parte ancora speculativa (Anway et al., 2006). Essi possono anche esercitare dei potenziali effetti genotossici, incluse patologie tumorali in quei tessuti/organi in cui siano presenti recettori specifici per gli ormoni steroidei, tra cui il tessuto scheletrico, il sistema cardiovascolare, il sistema nervoso centrale; esiste, inoltre, un'ampia gamma di effetti che prescindono dalla semplice competizione per il legame al recettore. E' necessario, quindi, non solo approfondire i meccanismi con cui gli IE possono alterare l'omeostasi fisiologica dell'organismo ma anche sviluppare adeguate procedure di biomonitoraggio per rilevare la presenza di metaboliti attivi in ambiente.

1.2 DEFINIZIONI DI SOSTANZE AD INTERFERENZA ENDOCRINA

Negli ultimi anni la ricerca in campo eco-tossicologico e le agenzie preposte alla regolamentazione delle sostanze chimiche (Unione Europea, OECD, WHO) hanno mostrato un crescente interesse nei confronti delle sostanze ad interferenza endocrina, attualmente identificate quali possibili fattori di rischio prioritari per la popolazione umana e gli ecosistemi naturali (Menditto et Turrio-Baidassarri, 1999). La prima definizione di interferente endocrino è stata pubblicata nella relazione conclusiva del workshop tenutosi nell'aprile del 1995 a Raleigh, North Carolina, organizzato dall'Agenzia per la Protezione dell'Ambiente degli Stati Uniti (EPA). E' stato definito come interferente endocrino: *“un agente esogeno 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 la regolazione dei processi di sviluppo...”*.

Nel 1996, in occasione del “European Workshop on the Impact of Endocrine Disrupters on Human Health and Wildlife”, che si è tenuto a Weybridge, in Inghilterra, a cui hanno partecipato esperti scientifici, rappresentanti politici dell'Unione Europea, degli Stati Uniti ed organizzazioni internazionali come l'OCSE e l'OMS, è stata concordata questa definizione: *“Una sostanza che altera il sistema endocrino è una sostanza o una miscela esogena che agisce sulle funzioni del sistema endocrino, provocando di conseguenza effetti negativi per la salute di un organismo intatto, della sua progenie o delle (sotto)popolazioni”*. Tale definizione è stata, in seguito, adottata dall'Unione Europea ed integrata dalle valutazioni di diverse agenzie internazionali, che indicano gli interferenti endocrini come *“un ampio, eterogeneo e tuttora incompletamente conosciuto gruppo di sostanze che spazia da contaminanti ambientali persistenti a composti utilizzati come fitosanitari od*

antiparassitari a composti utilizzati in prodotti industriali e di consumo ed infine a composti naturali come i fitoestrogeni...” [CE COM(99)706].

Il National Research Council (NRC, USA 1999) ha, quindi, proposto la definizione di “*Composti ormonalmente attivi (hormonally active agents) definiti come agenti che dimostrano attività ormono-simile*”.

Attualmente la definizione più largamente condivisa è quella formulata dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) nel 2002: “*Un interferente endocrino è una sostanza esogena che altera la/le funzione/i del sistema endocrino causando di conseguenza effetti avversi sulla salute di un organismo intatto, della sua discendenza o delle sue (sotto)popolazioni*”. Rispetto alle definizioni precedenti, quest'ultima contiene il concetto di sostanza nociva che agisce da sola o associata ad altre, nonché il riferimento agli effetti tossici a livello delle popolazioni. Attualmente, tuttavia, non è ancora stato raggiunto un consenso scientifico e regolatorio, a livello europeo, sulla definizione di sostanza ad interferenza endocrina; secondo un rapporto pubblicato in Francia dall'Agence nationale de sécurité sanitaire (Agenzia Nazionale per la Sicurezza Sanitaria, Anses) nel marzo 2013, “*l'assenza di una definizione condivisa pone dei problemi per la ricerca, la valutazione dei rischi e la produzione di una regolamentazione*”.

1.3 QUADRO DI RIFERIMENTO NORMATIVO: DISPOSIZIONI LEGALI, LINEE GUIDA E PROGRAMMI DI MONITORAGGIO

Nel corso degli ultimi dieci anni, considerevoli quantità di risorse scientifiche ed economiche sono state impiegate per chiarire i potenziali rischi per la salute umana, derivanti dalle sostanze ad interferenza endocrina; in molti casi, tuttavia, risulta del tutto assente un quadro di riferimento normativo o, laddove presente, si dimostra ancora insufficiente a disciplinare in maniera organica un argomento così complesso.

Negli USA il problema degli IE è stato affrontato fin dal 1996, quando nella legge *Safe Drinking Water Act /SDWA* furono previste azioni per accertare gli effetti endocrini delle sostanze chimiche e degli antiparassitari nelle acque potabili. Nello stesso anno è stata emanata la *Food Quality Protection Act (FQPA)* che definiva dei limiti soglia per la presenza di pesticidi e altre sostanze chimiche negli alimenti. Questi due emendamenti richiedevano all'agenzia di protezione ambientale statunitense (USEPA, United States Environmental Protection Agency) di mettere a punto un programma di monitoraggio adeguato e un sistema di test validati, volto ad accertare se gli effetti sull'uomo degli IE fossero paragonabili a

quelli degli ormoni naturali (USEPA, 2005). A livello federale, anche la Commissione per l'Ambiente e le Risorse Naturali (CENR, *Committee on the Environment and Natural Resources*) ha incluso le sostanze ad interferenza endocrina in una delle cinque aree di ricerca prioritarie, sviluppando un programma quadro per l'individuazione dei livelli critici, oltre i quali può considerarsi reale il rischio di effetti negativi sul sistema endocrino.

Parallelamente in Europa, in virtù del cosiddetto principio di precauzione e nel rispetto del principio di proporzionalità, nell'ottobre del 1998, il Parlamento ha elaborato una risoluzione che invita la Commissione europea ad intervenire, in tema di interferenti endocrini, sul miglioramento del quadro legislativo e sul rafforzamento delle attività di ricerca, allo scopo di fornire dei criteri per la definizione di interferente endocrino sulla base degli effetti avversi ormono-correlati, e adottare, quindi, delle misure adeguate che permettano di ridurre l'esposizione della popolazione a dette sostanze, incentivando lo sviluppo di nuove metodologie di sperimentazione e di analisi.

Il 4 Marzo 1999, il Comitato scientifico della tossicità, ecotossicità e ambiente (SCTEE-Scientific Committee for Toxicity, Ecotoxicity and the Environment) istituito presso la Commissione Europea, ha pubblicato un rapporto, sugli *“Effetti degli interferenti endocrini sulla salute umana e sulla fauna selvatica”* che testimonia l'esistenza di una correlazione causale tra sostanze chimiche che alterano il sistema endocrino e disturbi della riproduzione e dello sviluppo in numerose specie selvatiche, fornendo delle linee guida per la valutazione del rischio dal punto di vista eco-tossicologico. Perciò, allo scopo di definire un'azione politica adeguata nei confronti degli interferenti endocrini, la Commissione europea ha pubblicato, il 17 dicembre 1999, la *“Strategia comunitaria in materia di sostanze che alterano il sistema endocrino - una serie di sostanze con sospetta azione di interferenza sui sistemi ormonali nei soggetti umani e nella fauna selvatica”* [CE COM(1999)706], avente l'obiettivo di inquadrare il problema delle sostanze che alterano il sistema endocrino, le sue cause e le sue conseguenze. La strategia europea propone, da un lato, l'elaborazione di ricerche più approfondite per stabilire i livelli di contaminazione ambientali, dall'altro la valutazione dell'entità di esposizione di popolazioni sensibili, allo scopo di validare metodologie di screening, sui legami tra gli effetti nocivi per la salute umana e la fauna selvatica. Obiettivi primari sono, tra gli altri, il coordinamento internazionale e la cooperazione, non solo a livello comunitario, ma anche nel contesto mondiale, oltre che lo sviluppo e l'applicazione di criteri di valutazione riconosciuti a livello internazionale. La Strategia Europea si propone, inoltre, di agire politicamente attraverso la revisione della legislazione, stabilendo una serie di azioni da realizzare nel breve, medio e lungo termine,

oltre che un costante monitoraggio dei progressi compiuti. Il 14 giugno 2001, rispondendo alla richiesta del Consiglio Europeo, è stata presentata la prima relazione intermedia sulle attività della Commissione [CE COM(2001)262] dall'adozione della Strategia, che copre il periodo dal 1999 al 2001. In accordo con quanto previsto dalla Strategia, è stato definito, in base ad uno studio condotto dalla società olandese BKH, un elenco prioritario composto da 9 ormoni di sintesi/naturali e 553 sostanze candidate, fra le quali è stata confermata l'azione o la potenziale azione IE, in 118. A seguito di questo studio, nel 2001 sono stati finanziati due progetti, il primo sulle 9 sostanze, condotto da WRC-NSF (Regno Unito) ed il secondo sulle 435 sostanze i cui dati, nel rapporto del 2000, erano insufficienti per definirle come sostanze con effetti IE o di potenziale IE. Di queste 435 sostanze valutate, 204 sostanze sono state raggruppate in tre categorie:

- 94 sostanze presentavano chiara evidenza di interferenza sul sistema endocrino (alta, media o bassa esposizione);
- 53 sostanze mostravano una potenziale evidenza;
- 57 sostanze non presentavano basi scientifiche o dati sufficienti per poter deciderne l'inclusione o meno nella lista degli IE (Figura 1.1).

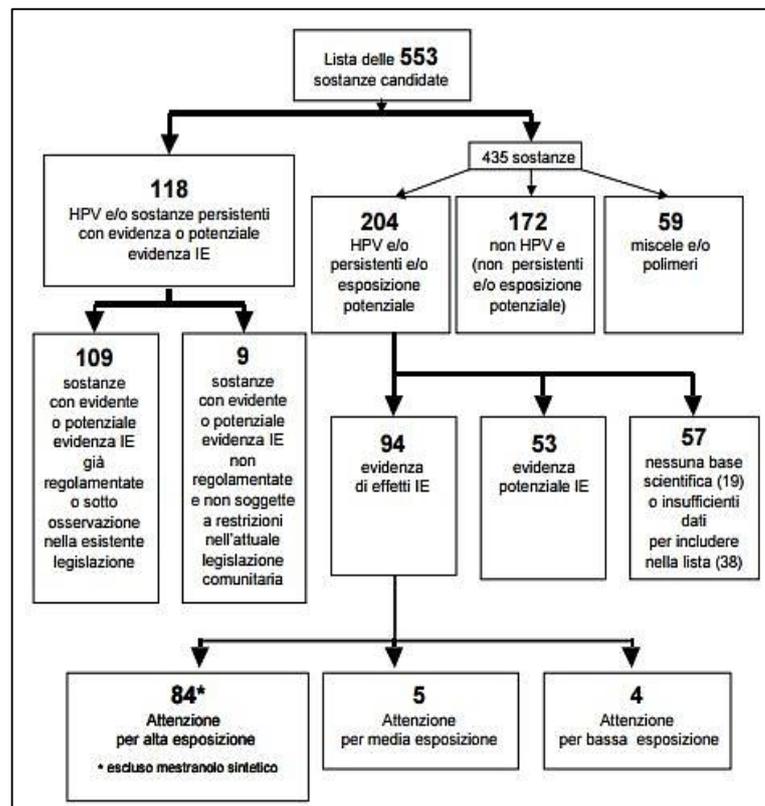


Figura 1.1. Elenco di sostanze candidate realizzato dalla società olandese BKH.

In seguito, sono stati pubblicati quattro rapporti sullo stato di avanzamento della Strategia comunitaria, rispettivamente negli anni 2004, 2007 2011 e 2013.

Ulteriori attività di ricerca e sviluppo sono state finanziate nel 2003 per la realizzazione di quattro progetti, che formano il gruppo CREDO (Cluster of Research into Endocrine Disruption in Europe) coinvolgendo 63 laboratori in tutta Europa, allo scopo di indagare alcuni aspetti inerenti la presenza degli interferenti endocrini nell'alimentazione.

I quattro progetti di ricerca fondamentali del CREDO coprono, sinteticamente, i seguenti temi:

- EDEN (ricerca di nuovi parametri, esposizione, effetti di basse dosi e di miscele nell'uomo, nella fauna acquatica ed animali da laboratorio);
- EURISKED (valutazione del rischio complessivo di alcuni IE);
- COMPRENDO (ricerca comparativa sugli IE, approccio filogenetico e principi comuni di composti con effetti androgeni/antiandrogeni);
- FIRE (valutazione del rischio da ritardanti della fiamma bromurati, sospettati di essere interferenti endocrini per l'uomo e animali selvatici).

Nel 2004 è stato avviato il progetto CASCADE che ha incentrato le ricerche sulla valutazione del rischio delle sostanze chimiche come contaminanti negli alimenti.

La Direzione generale dell'Ambiente della Commissione europea (DG Ambiente) ha finanziato, nel 2005, un ulteriore studio alla DHI Water and Environment concentrato sulle sostanze LPVC (*sostanze chimiche prodotte o importate in Unione europea con peso superiore a 10 t/annue ma inferiore alle 1000 t/anno*), accogliendo la richiesta del CSTEE (Scientific Committee on Toxicity, Ecotoxicity and the Environment) che ha ritenuto queste sostanze non sufficientemente trattate nei precedenti studi.

Alla fine della valutazione delle 107 sostanze prese in esame, 34 hanno mostrato una chiara evidenza di effetti negativi sul sistema endocrino (cat.1 – *paraffine clorurate, ftalati, ottilfenoli, PCB, PCT, disossine, ecc*), 21 mostravano alcune evidenze come potenziali interferenti endocrini (cat.2) e 52 sostanze mostravano dati insufficienti per poter essere incluse nella lista prioritaria (cat.3a o 3b). Delle 34 sostanze che hanno mostrato chiara evidenza come interferenti endocrini, 12 sono state definite “molto preoccupanti”, 16 “mediamente preoccupanti” e 6 con “bassa preoccupazione”. Nel 2004 è stato finanziato anche il progetto integrato REPROTECT avente l'obiettivo, tra gli altri, di sviluppare un'ampia batteria di test *in vitro*, per lo studio dei diversi aspetti della tossicità degli IE, attraverso l'utilizzo di tecnologie avanzate. Numerosi altri progetti di ricerca sono stati finanziati dalla Commissione europea: NEWGENERIS, PHIME, BIOCOP, NOMIRACLE,

INTARESE, HEIMSTA e 2-FUN. La gestione del rischio dovuto all'esposizione ai contaminati chimici è stato affrontato grazie all'introduzione del regolamento REACH istituito dall'Unione europea, un sistema integrato di registrazione, valutazione e autorizzazione delle sostanze chimiche, entrato in vigore il 1 giugno 2007, che mira ad assicurare un maggiore livello di protezione della salute umana e dell'ambiente. Il Regolamento prevede la registrazione di tutte le sostanze prodotte o importate nel territorio dell'Unione Europea in quantità pari o superiore ad una tonnellata all'anno. La registrazione delle sostanze comporta, per i fabbricanti e gli importatori di sostanze e preparati (miscele di due o più sostanze), l'obbligo di presentare all'Agenzia europea una serie di informazioni di base sulle caratteristiche delle sostanze. La valutazione dei composti chimici viene effettuata secondo un ordine di priorità che tiene conto delle caratteristiche di pericolo dei composti, dell'esposizione e del tonnellaggio complessivo. Ciascuna autorità nazionale dovrà redigere un rapporto di valutazione e, se necessario, un progetto di decisione per definire o modificare le misure di riduzione del rischio. Il REACH istituisce, inoltre, l'Agenzia europea per le sostanze chimiche (ECHA, European Chemicals Agency) che svolge un ruolo centrale di coordinamento e di attuazione nell'intero processo. L'obbligo di autorizzazione è richiesto per le sostanze cancerogene, mutagene o tossiche per la riproduzione (CMR), le sostanze persistenti, bioaccumulabili e tossiche (PBT) o molto persistenti, molto bioaccumulabili (vPvB). Ci sono poi sostanze che non sono classificate, in base a questi criteri, ma quando causano effetti gravi e irreversibili per l'uomo e l'ambiente, sono considerate "di preoccupazione equivalente". Tali sostanze includono quelle aventi proprietà di interferenti endocrini, che vengono trattati nel Titolo VII riguardante l'*Autorizzazione* (Art.57, lettera f). Tutte le sostanze soggette a restrizione (condizione o proibizione relativa alla fabbricazione, all'uso o all'immissione sul mercato di una sostanza) e le condizioni di tali restrizioni ai sensi del regolamento sono elencate nell'allegato XVII. Le restrizioni si applicano alle sostanze in quanto tali o in quanto componenti di miscele o articoli e possono riguardare la fabbricazione, l'immissione sul mercato e l'uso della sostanza.

Nello stesso periodo sono state intraprese ulteriori iniziative tra cui la proposta di Direttiva per la definizione degli standard di qualità ambientale per le sostanze prioritarie nell'ambito della Direttiva quadro sulle acque e la proposta di regolamento che modifica la Direttiva 91/414/CE sui prodotti fitosanitari (2006). La Direttiva quadro sulle acque 2000/60 che istituisce un quadro per l'azione comunitaria in materia di acque, nell'allegato VII, punto 4, riporta: "*Sostanze e preparati, o i relativi prodotti di decomposizione, di cui è dimostrata la*

cancerogenicità o mutagenicità e che possono avere ripercussioni sulle funzioni steroidea, tiroidea, riproduttiva o su altre funzioni endocrine connesse nell'ambiente acquatico o attraverso di esso" . Con la DIR 2013/39/UE che modifica la DIR 60/2000, viene inserita (art. 8-ter) una lista di controllo di sostanze tra cui il diclofenac, il 17- α -etinilestradiolo ed il 17- β -estradiolo, allo scopo di definire le priorità di intervento nel campo del monitoraggio e i conseguenti valori limite da adottare. Per quanto riguarda la Direttiva 98/83/EC per le acque destinate al consumo umano, essa non prevede valori di parametro per la categoria degli IE in generale; a questo proposito si ricorda che la Direttiva 98/83/CE, recepita in Italia dal D.L. 31/2001, cita nelle premesse gli interferenti endocrini, "..... *considerando che, pur non esistendo attualmente sufficienti certezze su cui basarsi, per fissare valori parametrici a livello comunitario per i prodotti chimici nocivi per il sistema endocrino, è sempre più forte la preoccupazione per il potenziale impatto sugli essere umani e sulla fauna e flora selvatiche*". La legislazione europea offre ancora opportunità limitate per una valutazione integrata degli effetti di tali sostanze sul sistema endocrino. Un altro provvedimento legislativo che tratta gli IE è il Regolamento (CE) 1107/2009 sui prodotti fitosanitari. Ai sensi di questo regolamento, le sostanze identificate come aventi proprietà IE e che possono causare effetti avversi negli esseri umani, non possono essere autorizzate. A livello internazionale, l'OCSE (Organizzazione per la cooperazione e lo sviluppo economico) ha dedicato un importante programma agli interferenti endocrini, a cui stanno partecipando attivamente l'ECHA (European Chemicals Agency) l'EFSA (European Food Safety Authority) e alcuni Stati membri, attraverso la pubblicazione di una serie di linee guida, volte alla loro identificazione. L'11 e 12 giugno 2012 si è svolta a Bruxelles la conferenza "*Endocrine Disruptors: current challenges in science and policy*" organizzata dalla Commissione europea. Vi hanno partecipato circa 300 tra responsabili politici, esperti, scienziati, gruppi industriali, organizzazioni di categoria e organizzazioni non governative. Le presentazioni e le discussioni hanno riguardato gli effetti degli interferenti endocrini sulla salute umana e l'ambiente, i rischi, la loro identificazione e gli obiettivi politici. Il 4 e il 5 febbraio 2013 si è svolta, presso il Joint Research Centre (JRC) della Commissione Europea di Ispra (Varese) la quinta riunione del gruppo Expert Advisory Group on Endocrine Disruptors (ED EAG), formato da esperti sugli interferenti endocrini nominati dagli Stati membri, dalle associazioni industriali e dalle associazioni non governative. Nel corso dell'incontro sono stati affrontati temi rilevanti quali l'identificazione e la caratterizzazione delle sostanze che alterano il sistema endocrino e la determinazione di una soglia, anche in previsione di una prossima revisione del Regolamento REACH. Il gruppo

ED EAG ha poi redatto un rapporto (*Report on key scientific issues relevant to the identification and characterisation of endocrine disrupting substances*), che verrà utilizzato dalla Commissione come base per lo sviluppo di criteri orizzontali da applicare a seconda dei vari tipi di normativa che attualmente regolano gli interferenti endocrini. Il 14 marzo 2013 il Parlamento Europeo ha approvato una Risoluzione (2012/2066(INI)) sulla protezione della salute pubblica dagli interferenti endocrini che, pur non essendo di per sé un atto legislativo, impegna la Commissione Europea a potenziare la ricerca e l'analisi del rischio nei confronti degli interferenti endocrini.

1.3.1 Il sistema di ricerca italiano

L'esposizione dell'ambiente e della popolazione agli IE è stato ed è oggetto, in Italia, di iniziative scientifiche di rilievo ma è mancata sinora un'azione di coordinamento a livello nazionale in grado di creare un elemento di unione fra ricerca, interventi ambientali ed iniziative legislative. Nel 2007 è stato pubblicato, a cura del Gruppo di Lavoro costituito nell'ambito del Comitato Nazionale per la Biosicurezza e le Biotecnologie, il documento *“La sorveglianza dell'esposizione a interferenti endocrini”*.

Il Gruppo di Lavoro ha formulato alcune raccomandazioni che riguardano, principalmente, la valutazione tossicologica dei diversi tipi di composti sulla base degli effetti endocrini e lo sviluppo di strategie integrate *in vitro/in vivo* che completino il quadro di conoscenze, in riferimento alle diverse fasi di suscettibilità del ciclo vitale. Viene raccomandato, inoltre, lo sviluppo di biomarcatori di esposizione, di effetto e di suscettibilità, oltre che indagini epidemiologiche per tutti gli IE riconosciuti come prioritari, integrando le nuove conoscenze scientifiche nei programmi per la sorveglianza degli ecosistemi e la sicurezza alimentare. Viene evidenziata, inoltre, la necessità di costituire una rete nazionale per raccogliere tutti i dati raccolti sull'esposizione ad IE in ambito nazionale, allo scopo, da un lato, di aumentare il livello di attenzione nei confronti di questi contaminanti ambientali, dall'altro di definire un'azione capillare e coordinata e meno legata ad “allarmi” contingenti. Il 25 gennaio 2010 il Comitato Nazionale per la Biosicurezza, le Biotecnologie e le Scienze della Vita della Presidenza del Consiglio dei Ministri italiano, pubblica una *“Proposta di Piattaforma - Ambiente e Salute - Priorità e obiettivi per la valutazione e gestione del rischio per la salute umana e la qualità ambientale da esposizione a Interferenti Endocrini”* elaborata da un nuovo Gruppo di Lavoro.

La piattaforma elaborata, è articolata in 3 settori:

- Metodi per la sorveglianza della contaminazione e dell'esposizione;
- Valutazione del rischio per l'ambiente e la salute umana;
- Prevenzione, gestione e riduzione del rischio.

Nel 2008 è stato avviato PREVIENI, un progetto triennale (2008-2011) finanziato dal Ministero dell'Ambiente e della tutela del territorio e del mare, coordinato dall'Istituto Superiore di Sanità con la collaborazione dell'Università di Siena (Dipartimento di Scienze Ambientali) e Ospedale S. Andrea, Dipartimento di Scienze Ginecologiche, Perinatologia e Puericultura e Università degli Studi di Roma La Sapienza, II Facoltà di Medicina e Chirurgia. Il Progetto PREVIENI è uno Studio in aree Pilota sui Riflessi ambientali e sanitari di alcuni contaminanti chimici emergenti riconosciuti come in grado di alterare gli equilibri ormonali (Figura 1.2). Gli obiettivi principali del progetto sono stati di verificare i livelli di esposizione ad IE e di acquisire dati scientifici sulla correlazione tra questi e alcune patologie dell'apparato riproduttivo. In particolare PREVIENI ha dato priorità a quegli IE di cui è nota la diffusa esposizione, anche per il loro uso in numerosi prodotti di consumo, tra cui:

- Perfluorottano sulfonato e acido perfluorottanoico (PFOS e PFOA);
- Di-2-etilesilftalato (DEHP) ed il suo metabolita attivo mono-2-etilesilftalato (MEHP);
- Bisfenolo A (BPA).

L'indagine si è articolata in tre programmi di ricerca che hanno coinvolto uno studio su popolazioni animali sentinella in due oasi del WWF, uno studio sull'infertilità umana, uno studio satellite sull'esposizione transgenerazionale (trasferimento madre-neonato) ad interferenti endocrini. Le indagini su organismi sentinella hanno dimostrato una presenza diffusa di IE nelle aree protette, sebbene siano state osservati dei bassi livelli di concentrazione, tali da ritenere in salute l'ambiente naturale. Nello studio sull'infertilità umana, è stata confermata l'influenza dell'ambiente di vita nella valutazione dell'esposizione della popolazione ad interferenti endocrini, rilevando un'esposizione diffusa e maggiore nei grandi centri urbani; i dati indicano, inoltre, una differenza di genere (esposizione maggiore nella donna che nell'uomo), correlata allo stato d'infertilità.



Figura 1.2. Progetto PREVIENI.

Lo studio satellite sull'esposizione transgenerazionale ha valutato il trasferimento madre-neonato di interferenti endocrini in situazioni di gravidanza "fisiologica", allo scopo di rappresentare il cosiddetto stato di "background" o controllo. E' stato osservato che, anche in gravidanze del tutto prive di problemi, erano presenti livelli significativi di IE definiti "non persistenti", come il Mono(2-etilesil) ftalato (MEHP) ed il Bisfenolo A (BPA) sia nella madre che nel bambino e, in quest'ultimo, i valori di espressione di AR (Androgen Receptor), recettore implicato nel meccanismo di azione di tali IE, erano significativamente elevati. Questo dato suggerisce un'esposizione ambientale diffusa e continua e deve essere valutato con qualche preoccupazione, alla luce dei dati sperimentali sugli effetti a lungo termine di questi IE sulle complesse dinamiche fisiologiche. A conclusione del progetto, è stato messo a punto il "Decalogo per il cittadino", per favorire scelte e comportamenti consapevoli, orientati alla prevenzione per la salute e per informare il cittadino, in merito ai rischi derivanti dall'esposizione a talune sostanze chimiche, presenti in oggetti di utilizzo quotidiano (Figura 1.3).

Decalogo	
LIMITA O EVITA	PRIVILEGIA O SOSTITUISCI
1. Non riutilizzare contenitori in plastica per alimenti e bevande usurati o "monouso"	Utilizza contenitori in plastica integri e solo per gli usi indicati dal produttore
2. Limita l'utilizzo di padelle antiaderenti, se "graffiate"	Utilizza padelle antiaderenti integre e pentolame in ceramica idonea al contatto alimentare o in acciaio inossidabile
3. Utilizza la carta oleata o la pellicola a contatto con gli alimenti solo secondo le indicazioni del produttore. Leggi l'etichetta!	
4. Durante la cottura dei cibi garantisci un'adeguata ventilazione dei locali e utilizza cappe d'aspirazione	
5. Limita la combustione di incenso e il fumo di candela, ed evita il fumo di sigaretta nell'ambiente dove vivi	Assicura il ricambio frequente dell'aria negli ambienti chiusi
6. Sostituisci gli involucri lacerati e/o usurati degli oggetti con imbottitura in schiuma (sedili dell'auto, materassi ecc.)	
7. Limita l'uso di capi di abbigliamento con trattamenti opzionali idrorepellenti o antimacchia	Privilegia capi di abbigliamento di origine e composizione ben identificabili
8. Evita il consumo di alimenti con parti carbonizzate/bruciate e limita l'uso di alimenti affumicati. Elimina dai cibi le parti bruciate (anche dalla pizza)	
9. Nella scelta di materiale per la casa limita l'uso di PVC morbido contenente DEHP	
10. Evita il ristagno della polvere negli ambienti chiusi	Effettua una adeguata e periodica pulizia degli ambienti e assicura una corretta manutenzione degli aspirapolveri (pulizia filtri e camera di raccolta, sostituzione sacchi ove presenti)

Decalogo per l'infanzia	
LIMITA O EVITA	PRIVILEGIA O SOSTITUISCI
1. Evita il ristagno di aria e polvere negli ambienti chiusi dove i bambini piccoli gattonano o giocano in terra	Garantisci il ricambio di aria negli ambienti chiusi ed effettua una adeguata e periodica pulizia; assicura una corretta manutenzione degli aspirapolveri (pulizia filtri e camera di raccolta, sostituzione sacchi ove presenti)
2. Se hai pavimenti in PVC contenenti DEHP su cui giocano bambini, utilizza un tappeto in fibra non trattata	
3. Limita l'uso di capi di abbigliamento per l'infanzia con trattamenti opzionali idrorepellenti o antimacchia	Privilegia capi di abbigliamento di origine e composizione ben identificabili
4. Evita materassi per lettini con rivestimento o telo impermeabile non conforme alle norme vigenti e comunque evita rivestimenti per materassi in PVC morbido contenente DEHP	
5. Utilizza fodere in fibre non trattate se hai fasciatoi e/o passeggini rivestiti in PVC morbido contenente DEHP; in generale, evita che i bambini entrino in contatto con la bocca con oggetti in PVC	
6. Per scaldare latte, bevande e pappe utilizza contenitori integri e solo secondo le indicazioni del produttore	
7. Lascia che i liquidi caldi si raffreddino prima di travasarli in contenitori di plastica non destinati all'uso ad elevate temperature	
8. Lava accuratamente biberon e altri contenitori dopo la sterilizzazione; non utilizzare biberon in policarbonato (non più consentiti)	
9. Abituati il bambino a consumare alimenti freschi e di stagione; risciacqua frutta e verdura in scatola prima del consumo	
10. Evita il consumo di alimenti con parti carbonizzate o bruciate	Per la cottura dei cibi destinati ai bambini, privilegia metodi che preservino il contenuto di vitamine idrosolubili (ad es. cottura a vapore)

Figura 1.3. Decalogo per il cittadino elaborato dal Ministero dell'Ambiente.

1.3.2 Progetti di ricerca in Emilia-Romagna

L'Emilia-Romagna è la quarta regione per spesa in Ricerca e Sviluppo in Italia e, a conferma della forte propensione all'innovazione e alla ricerca del sistema produttivo regionale, ha ottenuto per due volte il *PAXIS Award of Region of Excellence*, posizionandosi prima tra le regioni europee che hanno ottenuto questo premio. L'Agenzia per lo sviluppo tecnologico dell'Emilia Romagna (ASTER) rappresenta l'unica realtà a livello nazionale, che riesce a riunire in consorzio i Sistemi della Ricerca e dell'Innovazione, comprendenti la Regione, gli Enti di Ricerca nazionali, le Università operanti, Unioncamere e le Associazioni Imprenditoriali regionali, allo scopo di promuovere e coordinare la ricerca industriale e lo sviluppo di strategie e di azioni congiunte tra ricerca e impresa.

La regione Emilia Romagna, in collaborazione con diverse Università, agenzie ambientali e Centri di Ricerca, è impegnata attivamente in attività di ricerca per poter contribuire ad un miglioramento della conoscenza nel campo dei contaminanti ambientali ed alimentari ad interferenza endocrina. Il Laboratorio Enviren della Regione Emilia-Romagna, ad esempio, ha sviluppato un approccio multidisciplinare allo studio delle problematiche ambientali dei vari sistemi aria, acqua-suoli e rifiuti attraverso l'aggregazione delle competenze scientifiche, tecnologiche e strumentali presenti nei laboratori "LaRIA", "LARA" e "LICAR". Particolare attenzione è dedicata allo studio del trasporto e del destino dei contaminanti emergenti, al fine di validare metodi esistenti e di proporre di nuovi per rilevare la presenza multipla di IE e di sviluppare ricerche specifiche e controlli sull'efficienza degli attuali impianti di depurazione per l'abbattimento degli IE, affrontando anche aspetti del loro impatto sugli ecosistemi della regione. Un ruolo fondamentale in termini di ricerca, analisi e sviluppo è svolto dall'integrazione degli enti ambientali (ArpaER, Hera, Romagna Acque-Società delle fonti) operanti in regione in collaborazione con la Sanità, allo scopo di garantire il raggiungimento ed il mantenimento degli standard di qualità ambientale. Hera, già a partire dal 2007, ha avviato diverse attività di ricerca finalizzate a identificare i principali contaminanti emergenti nei sistemi idrici (con particolare riferimento alle acque naturali destinate alla potabilizzazione) e a mettere a punto metodiche analitiche per la loro determinazione quantitativa, allo scopo di valutare l'efficacia di rimozione degli attuali sistemi di trattamento (potabilizzazione e depurazione) (Gruppo Hera, 2010). Inoltre, partecipa attivamente al gruppo di studio "*Interferenti endocrini ed acque destinate al consumo umano*", promosso dalla Fondazione Amga di Genova che si interessa di approfondire lo stato delle conoscenze sul potenziale impatto degli interferenti endocrini sui sistemi idrici, per la produzione e distribuzione di acque da destinare al

consumo umano nel contesto nazionale (Fondazione AMGA, 2011). Del gruppo di studio fanno parte altre società italiane, diversi dipartimenti universitari e l'Istituto Superiore di Sanità. Nel 2008 è stata avviata una collaborazione anche con il Centro Ferrara Ricerche e con l'Istituto Mario Negri, al fine di effettuare alcune indagini sui microinquinanti di origine farmaceutica nelle acque reflue. L'attività fino ad ora svolta ha creato una solida base per la rivelazione analitica delle sostanze, la valutazione dell'efficacia dei trattamenti, la potenziale esposizione per la salute umana, l'accrescimento del livello di conoscenza sul tema in diversi gruppi di interesse, sebbene gli esiti siano ancora preliminari. E' stato osservato che tracce di IE possono riscontrarsi in acque destinate a consumo umano ma le concentrazioni degli analiti di interesse determinate nelle acque campionate, indicano l'assenza di rischio per la salute della popolazione esposta. Nel corso del 2009 sono state acquisite e testate dai laboratori del Gruppo alcune metodiche analitiche e sono state effettuate alcune analisi su acque naturali destinate alla potabilizzazione e su ulteriori campioni di acque reflue, in collaborazione con l'Istituto Mario Negri. Nel 2011 è stata avviata una collaborazione con il Politecnico di Milano finalizzata a valutare le migliori tecnologie di trattamento per la rimozione di talune classi di contaminanti emergenti. Da alcuni anni, è stata intrapresa anche una collaborazione tra la rete laboratoristica di Arpa e quella dei gestori operanti nella regione, permettendo ai soggetti coinvolti di confrontarsi tecnicamente per garantire risultati sempre più attendibili, in una logica di miglioramento complessivo di tutta la filiera e di utilizzo ottimale delle risorse. ArpaER ha promosso diverse iniziative per raccogliere una rete di collaborazioni, dando vita nel 2004 a EDENetwork (Endocrine Disrupters in the Environment Network), una rete di riferimento per il monitoraggio di situazioni reali di contaminazioni e di valutazione del rischio per la salute umana, per affrontare in modo organico e puntuale il problema della contaminazione ambientale da IE (Figura 1.4). Obiettivi dell'EDEN Network sono il monitoraggio della presenza di IE nell'ambiente, la valutazione dei livelli ambientali di esposizione, la caratterizzazione dei possibili danni a lungo termine per la riproduzione, lo sviluppo e la cancerogenesi, attraverso l'utilizzo di test *in vitro* idonei a tracciare il profilo tossicologico dei composti analizzati. Nel primo convegno sul tema, organizzato in collaborazione con l'Università di Bologna, nel 2005, Arpa ha cercato di perseguire gli scopi prefissati, avviando progetti di ricerca per poter contribuire ad un miglioramento della conoscenza nel campo dei contaminanti ambientali e alimentari ad attività ormono-simile, con particolare riferimento all'effetto matrice, che può



Figura 1.4. EDENetwork.

determinare una differenza nell'induzione di effetti tossicologici rispetto alla molecola originaria. In virtù del decreto legislativo 31/2001– norma di riferimento per le acque destinate al consumo umano, che recepisce la direttiva comunitaria 98/83/CE- la regione Emilia-Romagna ha realizzato diversi progetti, basati sull'integrazione delle strutture operative competenti. Le attività di monitoraggio devono essere eseguite sia dal Gestore del servizio idrico integrato (controlli interni), sia dall'Ausl (controlli esterni). Sulla base di questi principi nel 2008 è stato organizzato dalla Direzione tecnica di ArpaER un circuito di interconfronto sullo studio dei residui dei prodotti della potabilizzazione delle acque destinate al consumo umano, che ha coinvolto sia i laboratori ArpaER, che i gestori della rete regionale dell'Emilia-Romagna, Hera, Romagna Acque, Iren e Aimag per un totale di 8 laboratori. L'organizzazione delle prove, che sono a tutt'oggi attive, prevede che i campioni siano inviati contemporaneamente a tutti i laboratori, secondo una periodicità condivisa, in un numero complessivo di 5 prove distribuite nell'arco di 6 mesi (Figura 1.5). Ogni prova analitica è effettuata in triplo per avere una valutazione attendibile degli indici di ripetibilità di ogni sede partecipante, allo scopo di garantire con ragionevole affidabilità la qualità dei dati analitici prodotti, garantendo, di conseguenza, la qualità dell'acqua distribuita.

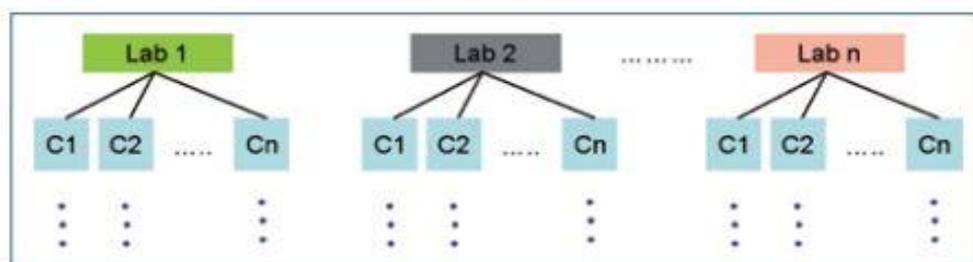


Figura 1.5. Organizzazione delle prove analitiche.

Ad oggi l'attenzione è rivolta alla rilevazione dei livelli di concentrazione dei cosiddetti contaminanti emergenti per i quali non sono ancora previsti dei valori soglia, ma necessitano di attività di monitoraggio e raccolta di dati per valutare il rischio associato alla loro esposizione, principalmente nell'alimentazione e nelle acque destinate al consumo umano. Coerentemente con questi principi, Romagna Acque-Società delle Fonti ha realizzato una Convenzione di ricerca con Scienze Ambientali dell'Università degli Studi di Bologna, allo scopo di assicurare e preservare la massima qualità dell'acqua distribuita, valutando la presenza di interferenti endocrini e composti genotossici nelle acque destinate a potabilizzazione pre- e post- trattamenti.

1.4 ELEMENTI PRINCIPALI DI FISIOLOGIA ENDOCRINA

Il sistema endocrino è un sistema di comunicazione complesso che, integrato con i sistemi nervoso e immunitario, regola e coordina tutte le attività svolte dai diversi sistemi e apparati di un organismo al fine di:

- Mantenere l'omeostasi interna dell'organismo, permettendo la regolazione della temperatura corporea, dell'equilibrio acido-base e idroelettrolitico, del bilancio energetico, della pressione arteriosa, delle risposte adattative all'ambiente e allo stress;
- Controllare lo sviluppo somatico, neuropsichico e dell'apparato scheletrico, risultanti dell'azione combinata di più ormoni (ormoni tiroidei, ormoni steroidei);
- Garantire la riproduzione, attraverso la regolazione della gametogenesi, dello sviluppo delle gonadi, dello sviluppo dei caratteri sessuali secondari, del comportamento sessuale, del mantenimento della gravidanza, oltre che dell'espletamento del parto e della lattazione;
- Coordinare il metabolismo energetico, la sintesi e l'utilizzo di zuccheri, grassi, proteine ed il bilancio idrico e minerale dell'organismo.

Il sistema endocrino è composto da ghiandole endocrine e da cellule dette neuroendocrine, che producono e secernono ormoni, sostanze chimiche deputate all'invio di messaggi che regolano l'attività cellulari degli organi bersaglio. Fanno parte dell'intero sistema l'ipotalamo, l'ipofisi, la tiroide, le paratiroidi, il surrene, il pancreas, le ovaie e i testicoli. Secondo la teoria tradizionale gli ormoni, dopo essere stati prodotti da ghiandole o cellule, prive di dotti escretori, sono secreti nel sangue; gli ormoni steroidei come gli estrogeni, per la loro natura lipofila sono veicolate, per via ematica, da proteine come le SHBG (Sex Hormone Binding Globulin); da qui vengono trasportati fino ai tessuti bersaglio, dove sono localizzati specifici recettori, aventi la duplice funzione di riconoscere un ormone tra le numerose molecole presenti e di trasmettere alla cellula il segnale che provoca l'attivazione dei processi cellulari desiderati. L'attività ormonale si distingue in autocrina (azione sulla cellula da cui l'ormone è stato prodotto), paracrina (su cellule assai vicine che l'hanno prodotto), ed endocrina (su cellule assai lontane, raggiunte per via ematica). Molti ormoni hanno un'ampia gamma di cellule bersaglio, mentre altri esercitano la loro azione solo su pochi tipi di cellule; la risposta cellulare dipende dal tipo di recettore e di cellula oltre che dall'eventuale esposizione contemporanea ad altri ormoni. Gli ormoni, interagendo con i

recettori localizzati a livello dei tessuti bersaglio, evocano risposte specifiche: regolano le attività enzimatiche, l'espressione genica e la sintesi delle proteine. I livelli ormonali e la loro disponibilità periferica si regolano adeguandosi alle esigenze e funzioni dell'organismo grazie ad una serie di meccanismi di contro-regolazione (feed-back). L'intima struttura delle ghiandole endocrine e le caratteristiche degli ormoni presentano una straordinaria somiglianza in tutti i vertebrati. Le differenze riguardano soprattutto la forma, la collocazione anatomica, l'assenza o la presenza di alcune di queste ghiandole e la funzione che ormoni pressoché identici possono esplicare in organismi diversi.

1.4.1 Estrogeni e struttura dei recettori degli estrogeni

Gli estrogeni appartengono alla famiglia degli ormoni steroidei, un vasto gruppo di ormoni lipofilici derivanti dal colesterolo (Figura 1.6).

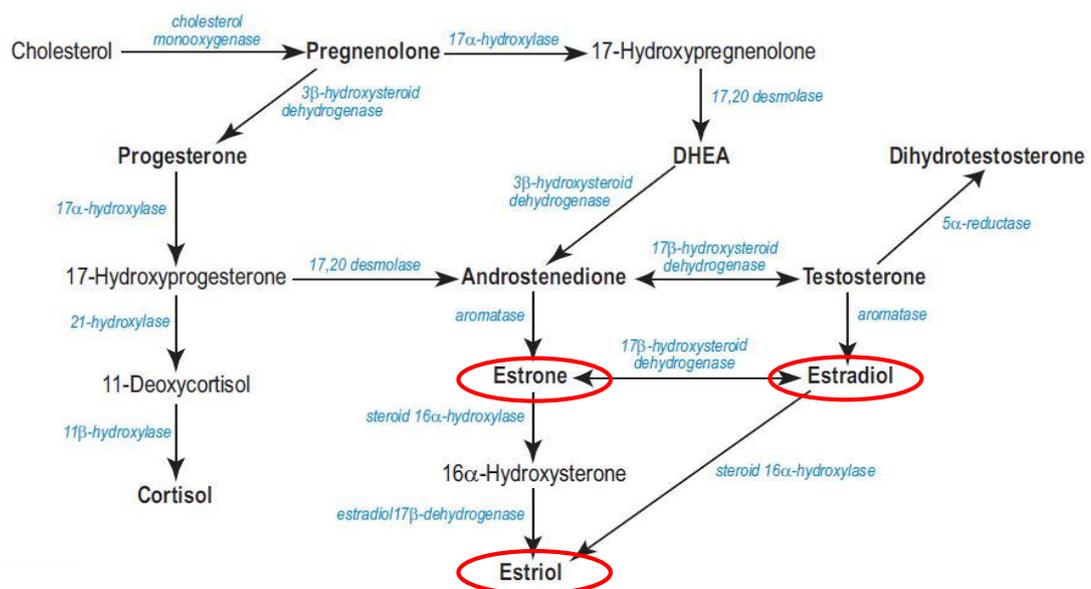


Figura 1.6. Via biosintetica degli estrogeni. Il colesterolo viene convertito per scissione della catena laterale in pregnenolone, che a sua volta è trasformato in progesterone oppure idrossilato a 17 α -idrossipregnenolone. In questo secondo caso, con la perdita di una catena acilica e attraverso l'enzima 17,20-liasi, il 17 α -idrossipregnenolone viene convertito in deidroepiandrosterone. L'enzima 3 β -idrossisteroide deidrogenasi converte il deidroepiandrosterone in androstenedione che, a sua volta, è ridotto a testosterone dall'enzima 17 β -idrossisteroide deidrogenasi. Una demetilazione e una aromatizzazione del testosterone producono l'estradiolo, mentre nell'androstenedione portano all'estrone.

In natura gli estrogeni sono rappresentati da 17 β -estradiolo (E2), estrone (E1), estriolo (E3) i quali funzionano principalmente come ormoni sessuali femminili. Sono costituiti da un sistema ad anelli fusi (6-6-6-5), in cui l'anello fenolico è idrossilato in posizione C-3. L'ossidrilico in posizione C-17 dell'anello pentamerico presente nel 17 β -estradiolo conferisce l'attività estrogenica, mentre la sua assenza, nell'estrone, determina una riduzione

dell'attività ormonale. Sia l'estrone che il 17 β -estradiolo possono essere convertiti in estriolo, il quale presenta un ossidrilico anche in posizione C-16 (Figura 1.7).

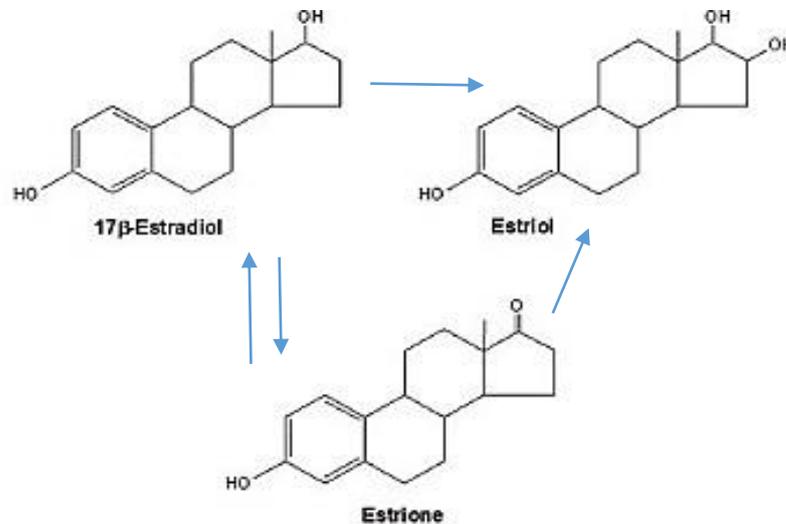


Figura 1.7. 17 β -estradiolo, estrone, estriolo.

Nella donna, gli estrogeni sono prodotti dalle cellule della teca e della granulosa, dal corpo luteo e dall'unità feto-placentare, oltre che in piccole quantità anche dal surrene e dal tessuto adiposo. Nell'uomo, invece, sono prodotti principalmente dai testicoli. L'estrogeno endogeno più abbondante è il 17- β -estradiolo. Tale ormone è essenziale per il funzionamento del sistema riproduttivo femminile ed è indispensabile per la proliferazione e la differenziazione dell'epitelio mammario. L'estradiolo ha un ruolo fondamentale anche nel bilancio energetico dell'organismo e nell'omeostasi del glucosio. Una volta prodotto o assorbito, l'E2 si lega alle proteine plasmatiche del sangue (albumina, SHGB), che hanno il compito di limitare i livelli degli ormoni sessuali, liberi nel corpo, in grado di entrare nelle cellule. Gli effetti biologici degli estrogeni sono mediati dal legame degli ormoni ad uno specifico recettore intracellulare (Estrogen Receptor, ER), appartenente alla superfamiglia dei recettori nucleari dei fattori di trascrizione, di cui si conoscono due isoforme, ER α (66 kDa) ed ER β (56 kDa). Entrambe le isoforme hanno una struttura suddivisa in cinque domini:

1. La regione ammino-terminale, detta "A/B domain" è la meno conservata tra i diversi membri della famiglia dei recettori nucleari e contiene un dominio detto AF-1 ("Activation Function 1"), che stimola la trascrizione dei geni bersaglio in modo indipendente dal ligando, attraverso una via di segnalazione mediata dalle MAP kinasi;

- Il dominio C o di legame al DNA (“DNA Binding Domain”, DBD), è il più conservato e determina la specificità del recettore rispetto ad una classe di geni. Nel DBD sono presenti due strutture digitiformi ad α elica, chiamate “zinc finger”, in cui uno ione di Zn^{2+} è coordinato da quattro cisteine. Nella prima si trova il P-box (Proximal box), che permette di riconoscere una specifica sequenza sul DNA, mentre nella seconda si trova il D-box (Distal box), che è coinvolto nella dimerizzazione recettoriale sul DNA;
- Il dominio D è una regione cerniera (“hinge”), che collega il dominio C al dominio E ed è sede di legame della chaperonina hsp 90. Esso può anche contenere sequenze di localizzazione nucleare (Nuclear Localization Signal, NLS).
- La regione E, oltre ad essere il dominio di legame del ligando (Ligand Binding Domain, LBD), contiene un dominio per la dimerizzazione recettoriale e media l'interazione con le proteine dello shock termico (HSP). A livello dell'LBD è localizzato il dominio AF-2 (Activation Function 2), coinvolto nell'9.a trascrizione ligando-dipendente. Infine all'interno del dominio E è contenuto un NLS;
- La regione carbossi-terminale F è poco conservata ed è presente solo in alcuni recettori nucleari, tra cui i recettori per gli estrogeni (Figura 1.8).

(A Roman-Blas et al., 2009; Mosselman et al., 1996; Dalei e Mitchell, 1999; Gronemeyer e Laudet, 1995).

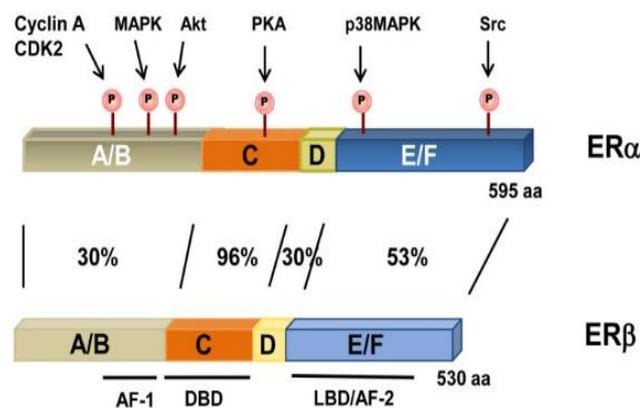


Figura 1.8. Struttura dei recettori ER α e ER β .

ER α e ER β presentano il 96% di omologia nel dominio di legame del DNA ma solo il 53% nel sito di legame degli estrogeni e sono codificati da geni differenti, localizzati rispettivamente sul cromosoma 6 (6q25.1), e sul cromosoma 14 (14q22-24). ER α è espresso soprattutto nei classici tessuti bersaglio degli estrogeni, come l'utero, la placenta, l'ipofisi e il sistema cardiovascolare, mentre ER β è più abbondante nella prostata ventrale,

nell'apparato urogenitale, nei follicoli ovarici, nel polmone, e a livello del sistema immunitario. Tuttavia, i due recettori sono co-espressi in tessuti come la ghiandola mammaria, le ossa, e alcune regioni del cervello (Figura 1.9).

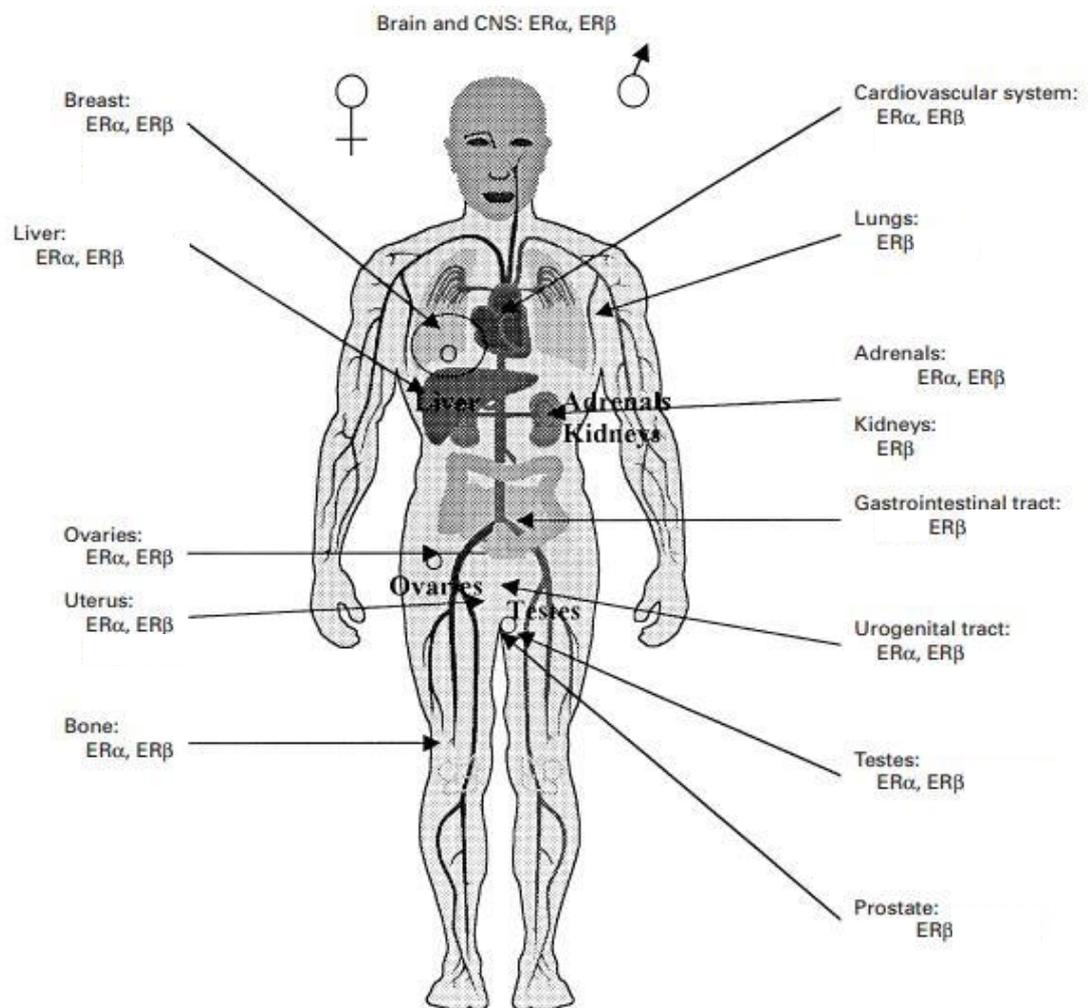


Figura 1.9. Distribuzione dei recettori ormonali nell'organismo umano.

La stimolazione di ERα attiva la trascrizione di geni bersaglio che innescano i processi di proliferazione e differenziamento cellulari. Al contrario, ERβ sembra agire da repressore trascrizionale, esplicando un effetto antiproliferativo. A questo proposito sono stati proposti due diversi modelli di meccanismo d'azione di ERβ, quale inibitore della proliferazione cellulare:

- Il primo prevede un effetto diretto di ERβ sulla trascrizione genica, che risulta da un effetto combinato di repressione dei geni della proliferazione e di attivazione dei geni proapoptotici;

- Il secondo modello propone la competizione tra ER α ed ER β per il legame al DNA, per cui la presenza di ER β sulle regioni promotrici impedirebbe il legame di ER α .

1.4.2 Meccanismo d'azione dell'estradiolo

Gli effetti biologici di E2 sono mediati da almeno quattro diverse vie di segnale, la cui regolazione è fondamentale per il mantenimento dell'omeostasi cellulare.

Via classica ligando-dipendente

In assenza di E2, il recettore degli estrogeni è sequestrato nel nucleo delle cellule bersaglio ed è complessato con proteine dello shock termico (heat shock proteins, Hsp) che lo mantengono nella conformazione inattiva. In seguito al legame con l'estrogeno, il recettore va incontro a un cambiamento conformazionale che determina il distacco delle Hsp e la successiva dimerizzazione recettoriale (Sommer et Fuqua 2001). Le regioni del recettore coinvolte nella dimerizzazione sono localizzate sui domini D-box, i quali contengono una regione ricca di amminoacidi idrofili, che permette di organizzare spazialmente un' α -elica. Da questa struttura secondaria sporgono numerosi residui di leucina allineati, che possono andare a interagire con un'analogia struttura presente su un altro monomero recettoriale, formando una sorta di cerniera di residui di leucina, detta leucinzipper, che consente la dimerizzazione.

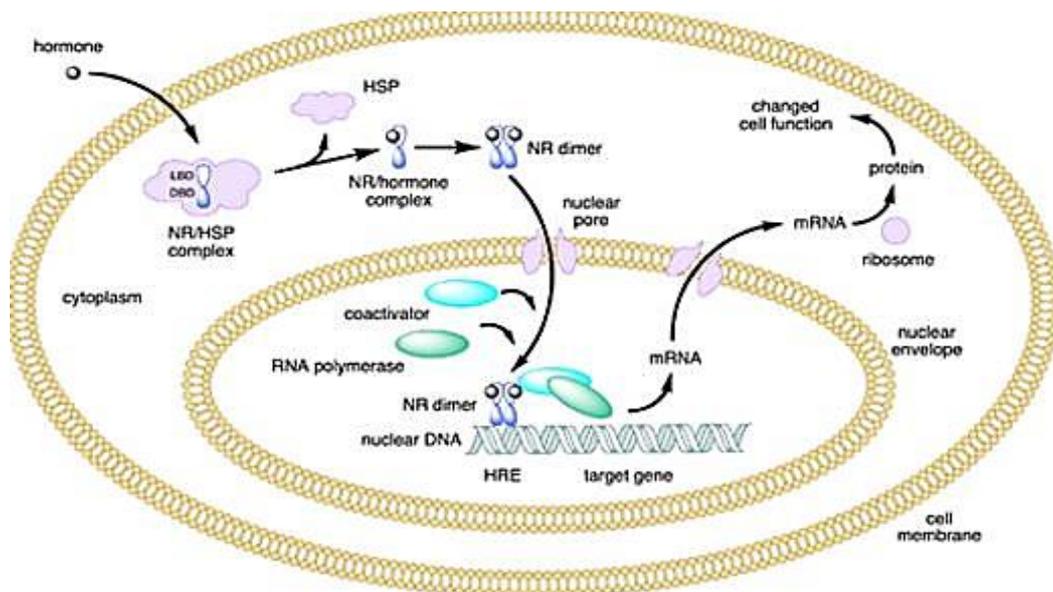


Figura 1.10 Meccanismo d'azione di E2 via ligando- dipendente.

L'ER può legarsi al DNA sia sottoforma di omodimero sia di eterodimero. Il recettore utilizza entrambe le sue regioni di attivazioni AF-1 e AF-2 per reclutare i co-attivatori o i co-inibitori, dipendentemente dalla sua azione agonista o antagonista, rispettivamente. Il legame del complesso ormone-recettore agli elementi responsivi agli estrogeni (ERE, estrogen responsive elements) sul DNA stabilizza il complesso d'inizio della trascrizione e favorisce il reclutamento dell'RNA polimerasi II per dare inizio alla trascrizione dello specifico mRNA (Figura 1.10).

Via ligando indipendente

Recentemente è stato dimostrato che l'attività trascrizionale del recettore degli estrogeni può essere attivata anche in assenza del ligando, ad esempio attraverso un meccanismo di fosforilazione del recettore. L'introduzione dei gruppi fosforici è mediata da diversi enzimi dotati di attività protein chinasi: fra questi i più importanti sono le MAPK che fosforilano i residui di serina posti all'interno di sequenze amminoacidiche consenso. Gli eventi di fosforilazione che riguardano il recettore degli estrogeni sono specifici per il tipo cellulare in cui avvengono.

Via ERE-indipendente

I recettori degli estrogeni, una volta attivati dal ligando, sono in grado di modulare anche la trascrizione di geni che non presentano sequenze ERE nei propri promotori, interagendo con i fattori di trascrizione AP-1 (Activating Protein-1) e Sp-1 (Stimulating protein-1) (meccanismo ERE-indipendente).

Via non genomica

È stato osservato che la somministrazione di E2 può avere effetti a breve termine (da secondi a minuti), che comprendono, ad esempio, l'attivazione di chinasi e fosfatasi o il flusso di ioni Ca^{2+} attraverso la membrana cellulare. Gli estrogeni possono anche indurre risposte rapide extra-nucleari interagendo con ER localizzati sulla membrana cellulare. Questo piccolo pool di ER α e ER β , può, infatti, interagire con proteine di segnale (ad esempio fattori di crescita) e formare complessi multi-molecolari (Ascenzi et al., 2006). Gli effetti rapidi indotti dal legame degli estrogeni con i mER possono interferire e modulare quelli mediati dai ER intracellulari. Alcuni studi hanno dimostrato che i mER sono localizzati all'interno delle caveole, piccole invaginazioni della membrana plasmatica, ricche di colesterolo e sfingolipidi, caratterizzate dalla presenza di proteine denominate caveoline. Il trasporto del recettore degli estrogeni all'interno di tali strutture è consentito dal legame tra il suo residuo di serina 522 e la caveolina-1. Marino e collaboratori hanno osservato che

il residuo di cisteina 447, presente nella regione E dell'isoforma ER α , può subire una modificazione post-traduzionale di palmitoilazione, ossia legarsi, mediante legame tioestereo, ad una unità di acido palmitico. Tale modificazione consente il legame con la caveolina-1. Il processo di palmitoilazione, oltre ad essere necessario per la localizzazione dei ER a livello della membrana plasmatica, svolge un ruolo importante nell'induzione dei segnali di trasduzione rapida che regolano la proliferazione cellulare, mediante le proteine chinasi ERK e PI3. E' stato dimostrato che il legame tra il mER ed il proprio ligando regola la palmitoilazione di ER α e di ER β . In diversi tipi cellulari ER di membrana rappresentano circa il 5-10% del totale di ER, includendo sia ER α che ER β , a seconda del tipo cellulare. Ad esempio, nelle cellule endoteliali vascolari sono state rilevate entrambe le isoforme, mentre nelle linee cellulari MCF-7 di adenocarcinoma mammario si trovano principalmente ER α (Pedram et al., 2006).

Di recente è stata identificata una nuova proteina transmembrana capace di legare gli estrogeni, la G-protein coupled receptor 30 (GPR30), espressa in una varietà di tessuti tra cui il cervello, la placenta, le ovaie, i testicoli, la prostata, il cuore, il pancreas, i polmoni, il muscolo scheletrico, il colon, l'epitelio vascolare e i tessuti linfoidei (O'Dowd et al., 1998; Thomas and Dong, 2006). L'interazione di GPR30 con E2 promuove l'attivazione di ERK1/2, tramite una via mediata dalla subunità beta-gamma della proteina G, associata al recettore. Gli effetti biologici mediati da GPR30 non sono, tuttavia, ancora del tutto conosciuti. La proteina GPR30 è coespressa insieme ad ER in carcinomi mammari primari positivi (Carmeci, et al., 1997), probabilmente in virtù di una possibile correlazione funzionale tra queste due classi di recettori per gli estrogeni. I differenti meccanismi molecolari di trasduzione del segnale mediati da GPR30 potrebbero spiegare gli effetti pleiotropici causati dagli estrogeni nelle cellule tumorali, anche se il ruolo di questo recettore di membrana è ancora dibattuto (Vivacqua et al., 2006). Sulla base di queste conoscenze, è possibile ritenere che gli effetti pleiotropici mediati da E2 e influenzati dalle molecole ad azione estrogeno-simile siano il risultato di interazioni sinergiche tra differenti vie di trasduzione del segnale (nucleare, extra-nucleare e mediate da recettori diversi), la cui attivazione dipende dalle cellule bersaglio, dai tipi recettoriali presenti e dalla loro localizzazione all'interno delle cellule (membrana, citosol, nucleo), così come dalla natura chimica del ligando stesso (Acconcia et al., 2015). Come verrà discusso in maniera più approfondita nel corso della presenti tesi, il Bisfenolo A (BPA), uno xenoestrogeno ambientale praticamente ubiquitario, presenta una debole attività estrogenica se via meccanismo nucleare classico; tuttavia, il BPA possiede una elevata affinità per i recettori

di membrana per gli estrogeni, mediatori di effetti molto rapidi sull'omeostasi metabolica e per molti altri bersagli, come il recettore GPR30 e il recettore orfano ERRgamma, di recente scoperta. Questa complessa interazione con diversi pathways fisiologici potrebbe giustificare la molteplicità di effetti derivanti dall'esposizione prolungata agli interferenti endocrini, anche a piccole dosi.

1.5 INTERFERENTI ENDOCRINI: XENOESTROGENI AMBIENTALI

Gli xenoestrogeni sono sostanze chimiche di origine antropica che mimano l'azione degli estrogeni naturali, interferendo sugli stessi meccanismi d'azione dei normali ormoni fisiologici. Essenzialmente possono agire in tre diverse modalità:

- Mimare l'attività biologica degli estrogeni legandosi ai recettori cellulari ed avviando una normale risposta fisiologica ma al momento sbagliato o in misura eccessiva (effetto agonista);
- Legarsi al recettore ma non attivarlo, in quanto la presenza della sostanza chimica sul recettore impedirà il legame dell'estrogeno (effetto antagonista);
- Legarsi alle proteine di trasporto nel sangue, alterando così la quantità di estrogeni naturali presenti in circolo;
- Interferire con i processi metabolici del corpo, alterando la sintesi o i tassi di degradazione degli ormoni fisiologici (Hanet et al., 2008);

Il numero di sostanze chimiche per le quali è stata dimostrata un'attività estrogenica è molto elevato ed in generale queste sostanze possono essere distinte in composti di origine naturale e in composti di sintesi.

1.5.1 Estrogeni naturali

I principali estrogeni naturali sono (Figura 1.11):

- E2 ed i suoi principali metaboliti, E1 e E3; il crescente utilizzo di tali composti negli allevamenti e nelle terapie ormonali o contraccettive (sottoforma di 17 α -Etilil-Estradiolo), ne ha causato un aumento dei livelli di concentrazioni in ambiente. In Metcalfe e collaboratori (2001) è documentata una classificazione degli ormoni ponendo come riferimento l'E2 a cui è associato il valore di massima potenzialità estrogenica (Tabella 1.2).

Tabella 1.2. Classificazione degli ormoni secondo Metcalfe e collaboratori. (2001).

Ormone	17 β -Estradiolo	Estrone	Estriolo	17 α -Etilil-Estradiolo
Potenzialità estrogenica	1	0,14	0,03	0,38

- I micoestrogeni, sostanze prodotte dai funghi, come lo zearalenone, che si possono trovare nella muffa presente nei cibi mal conservati ed anche nel grano;

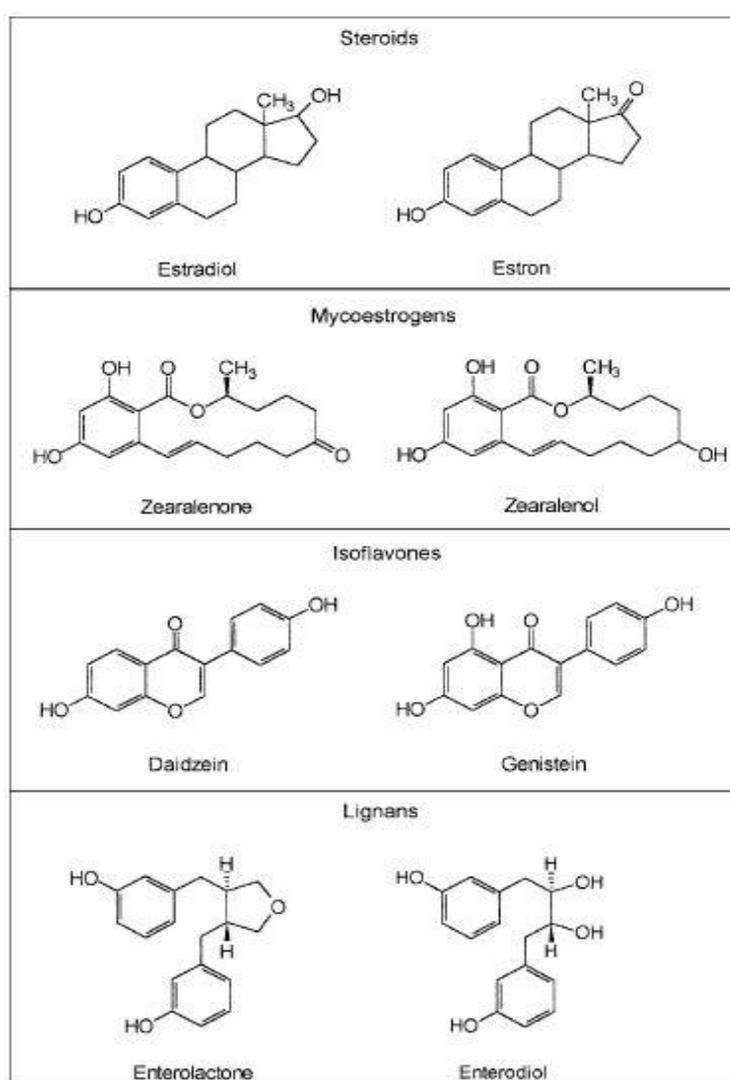


Figura 1.11. Estrogeni naturali

- I fitoestrogeni, più di 300 composti sintetizzati dalle piante, quali la soia, la barbabietola, la segale, il frumento, da mele e ciliegie. Lignani, isoflavoni e cumestani sono i fitoestrogeni più noti. Una volta assunti con gli alimenti, dove sono presenti sotto forma di

precursori inattivi, i fitoestrogeni vengono scissi nell'intestino ad opera della flora batterica e assorbiti quindi in forma attiva. I fitoestrogeni sembrano possedere sia attività estrogenica che antiestrogenica, in relazione alla quantità di estrogeni endogeni circolanti e a caratteristiche individuali come il sesso, lo stato menopausale, la quantità e tipo di recettori estrogenici presenti nel tessuto bersaglio.

1.5.2 Xenoestrogeni ambientali

I composti di sintesi con potenzialità estrogenica sono:

- Gli ftalati, composti largamente diffusi nell'ambiente, utilizzati per conferire elasticità alle plastiche (soprattutto PVC), nella produzione di repellenti per gli insetti, nei cosmetici e negli oli lubrificanti; in particolare una esposizione prolungata al di(2-etilesil) - ftalato ha mostrato l'induzione di alti livelli dell'ormone luteinizzante e l'incremento dei livelli sierici degli ormoni sessuali;
- Gli alchilfenoli, che sono tensioattivi non ionici impiegati da oltre 40 anni nei formulati per la detergenza, nell'industria della plastica, tessile, cartiera e come additivi nei pesticidi;
- Il Bisfenolo A, utilizzato nella produzione di resine ad uso odontoiatrico e di materie plastiche, come il policarbonato e le resine epossidiche; presente, inoltre, come rivestimento in alcuni contenitori ad uso alimentare;
- I pesticidi organoalogenati, erbicidi, fungicidi ed insetticidi, tra i quali il DDT ed i suoi metaboliti (DDE e DDD), il lindano, il metossicloro e l'atrazina, tutte sostanze altamente idrofobe e resistenti ai processi degradativi;
- I Bifenili Policlorurati (PCB) e loro metaboliti (PCB idrossilati), presenti nei trasformatori elettrici, nei condensatori e nei sistemi di raffreddamento;
- Gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA), risultato di diverse attività industriali, originati dai processi di combustione incompleta di combustibili fossili e dalle emissioni del traffico veicolare, ma provenienti anche dall'autocombustione delle foreste o dalla biosintesi ad opera di batteri;
- I composti organostannici, in modo particolare il tributilstagno (TBT) usato come biocida nelle vernici antivegetative che rivestono il fondo delle imbarcazioni;
- Le diossine, tra cui la più tossica e la 2,3,7,8-tetracloro-p-diossina (TCDD), ottenuta come sottoprodotto di vari processi di combustione;

- Gli ormoni sintetici, utilizzati come prodotti farmaceutici, in particolare il 17 α -etinilestradiolo, principale componente delle pillole contraccettive, ma anche gli steroidi anabolizzanti, come ad esempio la BST (somatotropina bovina)
- Alcuni metalli pesanti come Cd, As, Pb, Hg, Mn, hanno una tossicità per il sistema riproduttivo documentata da anni: incremento di rischio di aborti spontanei, morte fetale intrauterina, parti pretermine per la popolazione femminile, inducono oligospermia e riduzione della motilità degli spermatozoi per la maschile (Tabella 1.3).

Tabella 1.3. Composti ad attività estrogenica.

Composti IE	Utilizzo	Potenza estrogenica (riferita a estradiolo)	Concentrazioni osservate	
			in animali da laboratorio con effetti biologici significativi	in ambiente acquatico
Pesticidi organoclorurati (DDT, DDE, metossicloro, lindano, clordecone)	Insetticida	Estrogenico (100-100000 x < potente)	> 32 ($\mu\text{g/L}$)	0-2,8 ($\mu\text{g/L}$)
Difenili policlorurati	Applicazioni relative a trasferimento di elettricità e calore, impianti idraulici, materiali plastici, pigmenti	Estrogenico (50-500 x < potente)	nd	nd
Diossine	Combustione composti organici	Estrogenico	0,1-1 ($\mu\text{g/L}$)	0-40 ($\mu\text{g/L}$)
Alchilfenoli	Detergenti industriali, emulsionanti, plastificanti, antiparassitari	Estrogenico (2000-100000 x < potente)	0,32-10 ($\mu\text{g/L}$)	nd
Composti derivati dai Policarbonati e Resine epossidiche	Rivestimento per contenitori e tubazioni	Estrogenico (2000 x < potente)	> 10 ($\mu\text{g/L}$)	0-1 ($\mu\text{g/L}$)
Ftalati	Manifattura di plastiche, repellenti, cosmetici, oli, inchiostri	Estrogenico	> 320 ($\mu\text{g/L}$)	0-30 ($\mu\text{g/L}$)
Vinclozolin	Farmaco fungicida	Androgenico	nd	nd
Composti organostannici	Antivegetativo carene barche	Androgenico	1-5 ng/L	0-30 ng/L
Estrogeni sintetici	Controllo delle nascite	Estrogenico (0,7 x < potente)	1-10 ng/L	0-7 ng/L
Estrogeni naturali		Estrogenico	0,002-0,003 pg/L (sangue)	1-80 ng/L

1.5.3 Immissione di xenoestrogeni in ambiente e modalità di esposizione

Molte sostanze chimiche non si degradano rapidamente in ambiente e possono accumularsi in diversi compartimenti, come i sedimenti o il biota, oppure essere trasportate a lunga distanza dalla loro sorgente originaria. Ci sono dei composti che, oltre a possedere proprietà tossiche, sono caratterizzati dalla resistenza alla degradazione chimica e biologica,

rientrando nella più ampia categoria dei contaminanti organici persistenti (*Persistent Organic Pollutants-POP*), come le diossine e i PCB. Alcuni contaminanti ambientali, possono essere immessi in ambiente intenzionalmente (pesticidi in agricoltura), mentre per altri l'introduzione in ambiente è involontaria, e può avvenire in seguito alla produzione, all'uso o allo smaltimento di rifiuti (percolato delle discariche, fanghi dei liquami) o al rilascio di sottoprodotti in diversi processi industriali. L'esposizione agli xenoestrogeni può avvenire attraverso l'aria, l'acqua, il suolo, i sedimenti, gli alimenti e i prodotti di consumo. La presenza di contaminanti nell'aria dipende dalla loro volatilità, oltre che dalle condizioni meteorologiche (temperatura, velocità del vento, umidità), che ne influenzano in maniera diretta i livelli concentrazione. Anche le emissioni industriali possono contenere contaminanti ad attività estrogenica, come le diossine ed i metalli pesanti (ad esempio l'arsenico aumenta i livelli di trascrizione del recettore per gli estrogeni ER α) (Klein et al., 2006; Fucic et al., 2012). Alcuni studi hanno dimostrato che un certo numero di sostanze chimiche rilasciate nell'aria da emissioni di traffico veicolare sono composti ad azione estrogeno-simile (tra questi, gli IPA interferiscono con la normale omeostasi ormonale) (Laden et al., 2006). Gli ambienti indoor (abitazioni, uffici pubblici e privati, ospedali, scuole ecc), rappresentano un'ulteriore fonte di esposizione ad eventuali sorgenti di molecole tossiche, presenti nell'aria e nel particolato atmosferico. Si tratta di ambienti nei quali la popolazione trascorre gran parte del proprio tempo subendo, di conseguenza, un prolungato contatto con le potenziali fonti di contaminazione, tenendo conto della minor ventilazione di questi ambienti e della conseguente lentezza nei processi di degradazione delle sostanze chimiche. Rudel e collaboratori (2003) hanno indagato la presenza di oltre 30 IE nell'aria e nelle polveri di ambienti indoor, considerando alchifenoli, PBDEs, 2,3-dibromo-1-propanolo, parabeni e alcuni fenoli (es BPA, 4-tert-butil fenolo), rilevando livelli di concentrazione superiori rispetto a quelli registrati in campioni di aria provenienti da ambienti outdoors.

Gli ambienti acquatici, in particolare, rappresentano una componente dell'ecosistema vulnerabile alla contaminazione chimica, soprattutto attraverso la catena trofica, i sedimenti e l'immissione nei corpi idrici di scarichi urbani, industriali e agrozootecnici.

Come verrà approfondito nel corso della tesi, una gran varietà di pesticidi, prodotti chimici industriali e ormoni naturali, sono stati rilevati nelle acque di superficie. È stato dimostrato che organismi acquatici accumulano etinil-estradiolo (Larsson et al., 1999), BPA (Lindholm et al., 2000) e molti altri composti organici persistenti (Sumpter et Jobling, 1995). Anche l'acqua potabile rappresenta una potenziale fonte di esposizione umana agli IE, anche se non

è la via di esposizione più importante. Nei paesi sviluppati l'acqua destinata al consumo umano è generalmente trattata per eliminare eventuali fonti di contaminazione, sebbene in alcuni casi, alcune sostanze chimiche ad attività estrogenica possano essere introdotte negli stessi processi di potabilizzazione (IPCS, 1999). Al contrario, nei paesi in via di sviluppo, l'acqua è spesso contaminata da prodotti chimici, a causa della mancanza di impianti di trattamento degli scarichi fognari. I sedimenti possono essere una via di esposizione per talune specie di fauna selvatica che vivono in stretto contatto con o nei sedimenti, per tutto o parte del loro ciclo vitale. Sono disponibili diversi dati riguardo PCDDs/PCDFs, PCBs, e alcuni ritardanti di fiamma nei sedimenti di estuari europei (Sellström et al., 1999; Eljarrat et Barcelo, 2003; Verslycke et al., 2005).

Un gran numero di IE è stato riscontrato anche nel suolo e nei fanghi di depurazione, in differenti parti del mondo (Kocan et al., 2001; Loffredo et Senesi, 2006; Gorga et al., 2013) e, per alcune specie di fauna selvatica (ad esempio, vermi, lumache, insetti), che vivono in stretto contatto con il suolo, questa può essere un' importante via di esposizione. Questi organismi sono una parte di reti trofiche di alcuni uccelli e animali terrestri, che potrebbero, a propria volta, contribuire all'esposizione umana attraverso la catena alimentare. Sia per il genere umano che per la maggior parte della fauna selvatica, si ritiene che la fonte principale di IE sia rappresentata dall'alimentazione, che contribuisce ai fenomeni di bioaccumulo e biomagnificazione.

Nel mar Baltico, ad esempio, le foche grigie presentano una concentrazione di DDT e PCB nei tessuti adiposi in media 100 volte superiori a quelli trovati nell'aringa, il loro alimento principale (Bignert et al., 1998). L'uomo tende a consumare vegetali e prodotti alimentari di origine animale, e poiché le abitudini alimentari variano tra culture e popolazioni, l'esposizione agli IE può differire in maniera significativa tra singoli individui (Borrell et al., 1993; Hansen et al., 1998; Lindström et al., 1999).

I prodotti alimentari di origine animale potrebbero contenere residui di trattamenti ormonali utilizzati negli allevamenti, sebbene questa pratica sia proibita dalla legislazione vigente, in quanto, come dichiarato dal Comitato Scientifico Veterinario Europeo "*l'uso di ormoni per promuovere la crescita del bestiame può provocare potenziali rischi alla salute dei consumatori*". Infine, composti ad azione estrogeno-simile possono derivare dalle applicazioni medicinali e cosmetiche, oltre che da numerosi prodotti di consumo.

Queste sostanze chimiche possono immettersi nell'organismo attraverso l'ingestione, l'inalazione o il contatto con la pelle ed attraversare le membrane cellulari (Capel et Larson, 2001). La dose a cui avviene l'esposizione è molto importante, in quanto livelli elevati di

uno xenoestrogeno possono esercitare un'azione inibitrice, mentre livelli molto bassi possono avere un effetto stimolante, anche se questa considerazione non è valida sempre, né per tutti i composti. E' necessario, pertanto, considerare anche molti altri aspetti come l'assorbimento, il metabolismo, l'escrezione, il bioaccumulo, e le possibili interazioni di miscele. Anche il momento dell'esposizione è estremamente significativo poiché, come verrà approfondito meglio nel paragrafo 1.7.3, esistono periodi più critici rispetto ad altri, come quello precedente e corrispondente alla nascita o l'inizio della pubertà, con conseguenti effetti reversibili (sulla maturazione) o irreversibili (sulla differenziazione) sugli organismi esposti.

1.5.4 Tossicocinetica: comportamento degli xenoestrogeni nell'organismo

L'assimilazione di contaminati chimici da parte degli organismi dipende dalla loro biodisponibilità, ovvero dalla loro possibilità di essere effettivamente assorbiti, e dal loro tasso di assorbimento. Gli estrogeni di sintesi possono essere distinti in composti a struttura steroidea (17-etinilestradiolo), che rappresentano una variazione della struttura degli estrogeni naturali, e composti non steroidei (es dietilstilbestrolo, derivati del difeniletano ecc). Esistono, poi, alcune sostanze chimiche che, normalmente, sono prive di azione estrogenica ma possono divenire attive, in seguito a trasformazioni metaboliche che avvengono all'interno dell'organismo.

Gli xenoestrogeni che presentano caratteristiche lipofile (elevato K_{ow}), diffondono facilmente, per trasporto passivo, attraverso le membrane cellulari, scondo la legge di Fick:

$$J = \Delta C * K * A/d$$

ΔC = gradiente di concentrazione della sostanza;

K = coefficiente di permeabilità;

A = area attraverso cui avviene la diffusione;

d = spessore della membrana.

Il flusso di sostanze chimiche che attraversa la membrana cellulare è proporzionale al gradiente di concentrazione (ΔC), all'estensione dell'area attraverso cui avviene la diffusione (A) ed inversamente proporzionale allo spessore della membrana cellulare da attraversare (d). Molecole idrofile (basso K_{ow}) necessitano, talvolta, di sistemi di trasporto attivo per attraversare le barriere cellulari, sebbene un certo grado di idrofilicità sia necessario per muoversi attraverso i fluidi extracellulari dell'organismo. Anche il pH può

influenzare l'attraversamento delle membrane cellulari, favorendo l'uptake degli acidi deboli a basso pH e quello delle basi deboli a pH elevato. La combinazione di proprietà fisiche e chimiche con la reale biodisponibilità delle sostanze, può tradursi in un bioaccumulo delle stesse nel corpo, nel momento in cui l'assorbimento della sostanza da parte di un organismo, eccede la sua capacità di depurazione. Molte sostanze ad interferenza endocrina possono depositarsi nei diversi tessuti di un organismo, in particolare, nel tessuto osseo (es. piombo), e in quello adiposo (es. diossine), collocandosi all'interno di micelle lipoproteiche o delle membrane cellulari e venendo rimessi in circolo in tempi successivi.

Il bioaccumulo è un fenomeno di grande interesse dal punto di vista tossicologico, perché anche in presenza di concentrazioni minime di IE nell'ambiente, con il passare del tempo, si possono osservare, negli organismi, degli effetti biologici. Una possibile conseguenza del bioaccumulo è la biomagnificazione, che consiste in un progressivo aumento di queste sostanze lungo la catena alimentare, in quanto i predatori assumono non solo i contaminanti presenti nell'ambiente, ma anche quelli presenti nelle prede.

Il bioaccumulo delle sostanze tossiche può avvenire anche direttamente dall'ambiente in cui l'organismo vive. Nel caso della bioconcentrazione, le concentrazioni della sostanza nei tessuti dell'organismo diventano progressivamente più alte di quelle presenti nell'ambiente, da cui è stata assorbita. Il fattore di bioconcentrazione (BCF), viene definito come il rapporto all'equilibrio tra la concentrazione di una sostanza tossica nell'organismo e quella nel mezzo circostante. Nel caso in cui $BCF > 1$, la sostanza ha la tendenza a bioaccumularsi, ovvero per quel composto chimico, reazioni biochimiche di quello specifico organismo ne favoriscono l'assunzione e la ritenzione.

Le catene alimentari acquatiche sono generalmente più lunghe e molto più complesse di quelle terrestri, pertanto, mentre la concentrazione di un inquinante nell'acqua può essere inferiore al limite di rilevazione attualmente vigente, nei predatori al vertice della catena alimentare si possono riscontrare gravi effetti tossicologici (White e Hoffman, 1995; Henny et al., 1996). Clarkson (1995) ha verificato che, affinché un contaminante venga accumulato all'interno di un organismo deve essere lipofilo, chimicamente e metabolicamente stabile in acqua e negli organismi e deve avere relativamente bassa tossicità negli organismi della fascia bassa della catena alimentare, per consentire l'accumulo nei predatori al vertice. Esistono, essenzialmente, due approcci generali per valutare, quindi quantificare, il fenomeno del bioaccumulo. Il primo è un approccio empirico, dove BCF (fattore di bioconcentrazione) o BAF (fattore di bioaccumulo), può essere dedotto dalla relazione fra la concentrazione nell'organismo e la contaminazione ambientale. Questi valori, se calcolati

su campioni ambientali, possono essere soggetti a errori dovuti alla variabilità biologica, ma hanno il vantaggio di essere rappresentativi delle reali condizioni ambientali.

Il secondo approccio, più laborioso, consiste nell'organizzare un modello di bilancio di massa in cui vengono quantificati gli assorbimenti e le perdite di tali composti (Figura 1.12).

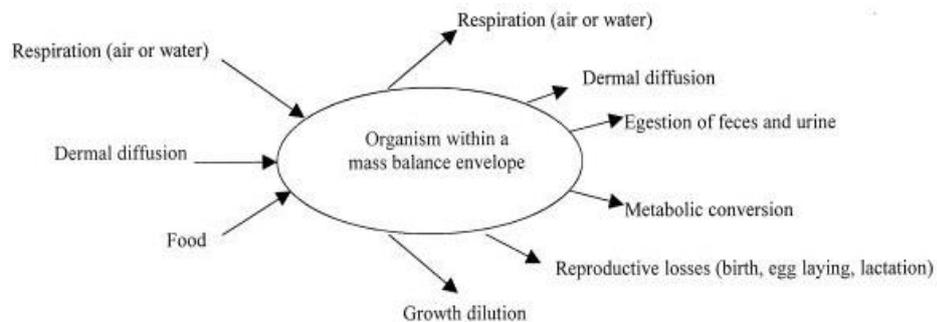


Figura 1.12. Bilancio di massa per il bioaccumulo.

Questo modello richiede necessariamente molte informazioni che riguardano la caratteristiche chimiche della sostanza in esame e la fisiologia dell'organismo, tenendo conto, oltretutto, dell'effetto di diluizione dovuto alla crescita e al tasso metabolico specifico del composto (Mackay e Fraser, 2000). Normalmente, tuttavia, quando una sostanza endogena entra in un organismo, viene riconosciuta come estranea e deve essere da questo metabolizzata, per favorirne l'eliminazione. Le sostanze lipofile, per le caratteristiche fisico-chimiche sopracitate, sono le più difficili da rimuovere e necessitano di meccanismi metabolici che portano ad un aumento della loro idrofilia, facilitando così la loro escrezione attraverso le urine, l'aria espirata, le feci, le secrezioni biliari, il latte. Gli estrogeni naturali vengono escreti normalmente per via urinaria, dalle donne in età fertile e in gravidanza, periodo durante il quale vengono sintetizzati in elevate quantità, dal sistema feto-placentare. In generale, la biotrasformazione di una sostanza endogena può portare alla formazione di metaboliti inattivi, metaboliti attivi dotati di spettro d'azione uguale a quello del composto d'origine, metaboliti attivi dotati di spettro d'azione diverso da quello del composto di origine, oppure metaboliti tossici, che potenzialmente, possono tornare in ambiente, una volta eliminati.

1.5.5 Tossicodinamica: interazione con il bersaglio

Gli effetti biologici che si possono osservare, in seguito ad esposizione ambientale ad uno xenobiotico (molecola estranea all'organismo) sono risultato dell'interazione fisica della sostanza chimica con uno o più recettori, secondo la seguente relazione:

$$RX = [X] * R(\text{tot}) / Kd + [X]$$

[RX] = concentrazione del complesso xenobiotico-recettore;

[X] = concentrazione dello xenobiotico libero;

Rtot = concentrazione totale dei recettori;

Kd = costante di dissociazione

L'interazione ligando-recettore è generalmente mediata da legami deboli. Il recettore è saturabile, pertanto, il numero di molecole capaci di entrare nella cellula bersaglio, è limitato e variabile, a seconda delle diverse situazioni fisiologiche e questo determina l'ampiezza della risposta biologica. Ogni recettore è specifico per una classe di composti (il recettore per gli estrogeni lega solo le strutture di tipo estrogenico) e, inoltre, maggiore è la specificità di legame e più è lenta la velocità di dissociazione ligando-recettore. La differenza tra organi non ormono-responsivi ed organi ormono-responsivi, risiede nella distribuzione sia quantitativa che qualitativa dei recettori ormonali. La presenza di una risposta biologica, perciò, testimonia la presenza di uno specifico recettore. La relazione fra la concentrazione (espressa in molarità o in peso dello xenobiotico per volume di soluzione, es. mM o mg/l) di uno xenobiotico e il grado di risposta ottenuto, prende il nome di curva dose-risposta.

Per le sostanze chimiche senza potenziale genotossico, esiste una dose soglia (NOEC, No Observed Effect Concentration), al di sotto della quale non ci sono effetti avversi. A partire da questa concentrazione, l'effetto biologico aumenta linearmente all'aumentare della concentrazione della sostanza presa in esame, fino al raggiungimento di un effetto massimo, quando la risposta tende ad un plateau, in quanto tutti i recettori disponibili arrivano a saturazione e all'aumentare della dose non si osservano più variazioni significative nella risposta. Un parametro molto utilizzato come misura di tossicità per una data sostanza è l'EC50, ovvero la concentrazione di quel composto che produce una risposta pari al 50% dell'effetto massimo (Figura 1.13).

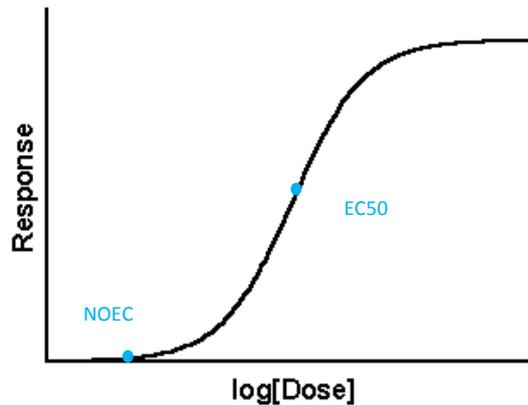


Figura 1.13. Curva dose- risposta monotonica.

Per gli agenti genotossici cancerogeni, non è ancora chiaro se esistano dosi soglia al di sotto delle quali non ci sia effetto; piuttosto, è dimostrato un aumento del rischio, all'aumentare della dose. Si presume, infatti, che un composto che interagisca con il materiale genetico possa indurre sempre un danno, sebbene questo possa essere riparato da normali meccanismi di riparo cellulare, oppure che la cellula danneggiata possa restare silente per tutta la vita, controllata da meccanismi omeostatici dell'organismo. Questi meccanismi omeostatici sono efficienti fin tanto che il danno è limitato, pertanto per l'esposizione a cancerogeni genotossici non esiste un rischio nullo, esiste solo un rischio accettabile (Zeise et al, 1999). Uno degli aspetti più dibattuti relativamente all'esposizione ambientale agli xenoestrogeni, o più in generale, agli interferenti endocrini, è quello relativo alle basse concentrazioni. Molti dati sperimentali, infatti, dimostrano che il comportamento della maggior parte degli interferenti endocrini alle basse dosi (ordine di concentrazione nano- e micro- molare) sia difficilmente prevedibile. Spesso, infatti, gli interferenti endocrini rispondono in modo non-monotonico, cioè la pendenza della curva dose-risposta cambia di segno (dal positivo al negativo o viceversa) una o più volte (curve bifasiche o multifasiche) in diversi punti del range delle dosi esaminate, pertanto, non è appropriato, in questi casi, usare le alte dosi per predire gli effetti delle basse dosi. Le curve non-monotoniche sono infatti frequentemente curve a U, con risposte maggiori a bassi e alti livelli di esposizione; in altri casi seguono un andamento a U invertita, con le maggiori risposte per dosi intermedie (Figura 1.14).

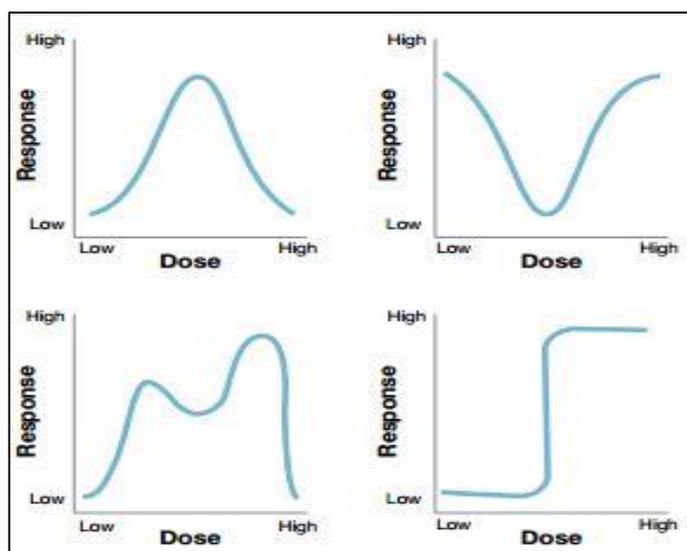


Figura 1.14. Curve dose-risposta non monotoniche.

Ci sono diverse ragioni che spiegano come gli interferenti endocrini siano capaci di esercitare la propria azione a basse concentrazioni; così come gli ormoni naturali, anche quelli endogeni possono essere acutamente citotossici ad alte dosi ed alterare endpoint biologici a basse dosi. Per esempio, le cellule MCF-7 di adenocarcinoma mammario, utilizzate come sistema biologico nel presente lavoro di tesi, vanno incontro a proliferazione cellulare se esposte a basse dosi di E2 (da 10^{-12} M a 10^{-11} M) o a dosi farmacologiche (da 10^{-11} M a 10^{-6} M) della molecola, mentre le dosi elevate sono tossiche, da cui risulta una risposta ad U invertita. Il BPA a basse dosi (1 $\mu\text{g/mL}$) aumenta il peso del tessuto adiposo in femmine di topo, mentre ad alte dosi (10 $\mu\text{g/mL}$) non mostra alcun effetto; il contrario si verifica nei topi maschi (Miyawaky et al., 2007).

Nei neuroni cerebellari il BPA aumenta la fosforilazione di ERK (attraverso meccanismi ER extra-nucleari) a basse (da 10^{-10} M a 10^{-12} M) ed alte (da 10^{-7} M a 10^{-6} M) dosi, mentre a livelli di concentrazione intermedi il BPA non interferisce con la via di segnale di ERK. Alcuni profili non-monotonici sono generati dalla sovrapposizione di due o più risposte monotoniche che influenzano un endpoint in modo opposto, attraverso differenti pathways che portano allo stesso effetto biologico finale. In più, un ormone a basse dosi può legare selettivamente uno specifico recettore, mentre ad alte dosi può legare debolmente anche altri recettori ormonali (Sohoni e Sumpter, 1995). La competizione recettoriale, infine, fa sì che, in presenza di ormoni esogeni, basse dosi di xenoestrogeni leghino i recettori ormonali disponibili aumentando la risposta biologica, mentre ad alte concentrazioni competano con i ligandi ormonali naturali riducendone l'azione (Vandenberg et al., 2012). La capacità di interazione tra sostanze ad attività estrogenica a "piccole dosi" ha suggerito la possibilità di

potenziali effetti additivi tra diversi xenoestrogeni sugli stessi bersagli, tenuto conto della varietà di sostanze chimiche presenti nelle diverse matrici ambientali e dei rischi ad essi connessi. La valutazione del rischio associato all'esposizione ad interferenti endocrini dovrebbe, quindi, tener conto della molteplicità degli elementi interagenti nel sistema e del rischio potenziale risultante dal verificarsi di effetti additivi tra le diverse sostanze attive.

1.5.6 Il problema delle miscele

Il primo report che dichiarava l'esistenza di un evidente sinergismo tra miscele binarie di pesticidi ad attività estrogenica (Arnold et al., 1996) risale al 1996. Questo lavoro è stato in seguito ritirato poiché studi successivi non hanno permesso di rilevare gli stessi risultati (Ashby et al., 1997; Ramamoorthy et al., 1997).

Negli ultimi quindici anni, tuttavia, sono stati pubblicati numerosi lavori che sostengono l'esistenza di possibili sinergie tra differenti composti chimici. La comunità scientifica ha, pertanto, adottato diversi sistemi per determinare la concentrazione totale e la tossicità complessiva delle miscele di IE presenti in campioni biologici (tessuti animali, prodotti alimentari contaminati) o in matrici ambientali (acqua, suolo, sedimenti). Il metodo più largamente utilizzato prevede che, a ciascun composto si assegni un valore di TEF (Toxicity Equivalent Factor), determinato in base alla potenza d'azione (che risulta da dati di tossicità *in vitro* o *in vivo*), in confronto a quella di una sostanza di riferimento per quella classe di composti, posta pari a 1. I valori individuali di TEF, moltiplicati per le concentrazioni dei singoli composti, forniscono il valore totale delle "concentrazioni tossiche equivalenti" (TEQ). Tale parametro è comunemente utilizzato per determinare la dose complessiva di una certa classe di composti, sia negli studi di esposizione e di risk assessment, che nella valutazione della relazione dose-risposta per le miscele complesse di IE (Rapporti ISTISAN 09/18). Rajapakse e collaboratori (2002) hanno dimostrato, utilizzando un sistema biologico *in vitro*, l'esistenza di un effetto sinergico fra differenti molecole debolmente estrogeniche presenti in concentrazioni al di sotto dei singoli valori di NOEC (No Observable Effect Concentration) e di EC01 (concentrazione che produce l'1% degli effetti). Nello stesso anno Silva e collaboratori hanno verificato gli stessi effetti sinergici in una miscela di 12 xenoestrogeni differenti.

Coerentemente con questi risultati, Charles e collaboratori (2002) hanno indagato gli effetti di miscele ternarie di xenoestrogeni in cellule MCF-7, rilevando un effetto additivo combinato delle molecole in diverse concentrazioni, fino al raggiungimento di condizioni di

saturazione. Le attività di ricerca condotte da Heneweer et collaboratori (2005) e La Page e collaboratori (2006) sono in accordo con gli studi sopracitati.

1.5.7 Il caso del dietilstilbestrolo (DES)

Il dietilstilbestrolo (DES) è una molecola sintetica ad azione estrogeno-simile (la sua struttura, pur non essendo steroidea, mima quella degli estrogeni), prescritta come antiabortivo dal 1948 fino al 1971, quando il suo uso a tale scopo è stato bandito, in seguito alla scoperta di un'associazione positiva tra l'esposizione prenatale a DES e l'insorgenza di una rara forma di adenocarcinoma vaginale nella prole femminile, oltre che di gravi malformazioni del tratto riproduttivo. Alcuni effetti si manifestano soltanto ad alcuni anni dalla nascita, seppure sia stato individuato un tempo di esposizione critico, prima della 10^a settimana di gestazione. Il DES contiene due gruppi –OH sui rispettivi anelli benzenici, la cui distanza è molto simile a quella esistente tra i gruppi –OH di E2. Grazie alla sua struttura molecolare DES può inserirsi facilmente nel dominio di legame del recettore degli estrogeni (Figura 1.15).

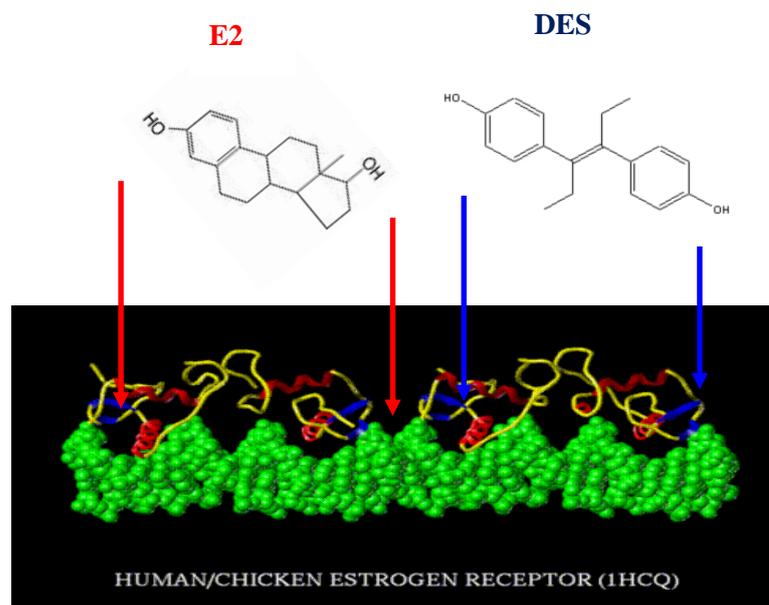


Figura 1.15. Interazione E2 e DES con il recettore degli estrogeni.

E2 e DES interagiscono diversamente con l'alfa-fetoproteina, le globuline leganti gli ormoni sessuali (SHBG) e l'albumina. L'affinità di E2 per le SHBG dei mammiferi e per l'alfa-fetoproteina è nell'ordine dei nM, mentre quella del DES è nell'ordine dei μM. Pertanto, in virtù delle loro simili affinità, in presenza di ER e delle proteine di legame, il DES può legarsi con ER in concentrazioni fino a 100 volte maggiori. Negli esseri umani e negli animali da laboratorio il DES sembra essere in grado di agire come agente genotossico

cancerogeno attraverso la placenta (McLachlan et al., 1984). La frequenza di alterazioni genitali nei figli di donne esposte al DES durante la gravidanza è piuttosto significativa: il 20.8% dei maschi esposti a DES durante la vita intrauterina presentano cisti epididimali (contro i 4.9% nei controlli), il 4.4% mostra isospadia (contro l'1.1% dei controlli), l'11.4% presenta criptorchidismo e ipoplasia dei testicoli (contro il 2.1% dei controlli) (Sultan et al., 2001). Uno studio statunitense, inoltre, ha raccolto, a distanza di tanti anni, i dati cumulativi di tre studi, iniziati negli anni '70, sull'esposizione di donne in gravidanza al DES (4653 madri trattate rispetto a 1927 controlli) che ha rilevato un rischio di infertilità del 33,3% per le trattate rispetto al 15,5% nei controlli, di aborto spontaneo del 50,3% rispetto al 38,6%, di parto pretermine del 5,3% rispetto al 17,8%, di perdita fetale nel secondo trimestre di gravidanza del 16,4% rispetto al 1,7%, di gravidanza ectopica del 14,6% rispetto al 2,9%, di natimortalità del 8,9% rispetto al 2,6%, di menopausa precoce del 5,1% rispetto al 1,7%, di neoplasia intraepiteliale cervicale di grado 2 o maggiore del 6,9% rispetto al 3,4% e di adenocarcinoma mammario dopo i 40 anni del 3,9% rispetto al 2,2% (Hoover et al., 2011). Nell'azione del DES, oltre al tempo di esposizione, anche la dose somministrata è estremamente rilevante se si considera, ad esempio che, l'esposizione a basse dosi di DES a femmine di topo gravide provoca un aumento del peso della prostata nella prole, mentre ad alte dosi si osserva una diminuzione del peso dello stesso organo (Vom Saal, 1997). Dal caso del DES si è evinto che, durante la gravidanza, l'esposizione a sostanze ormonalmente attive può provocare effetti deleteri nella prole, anche a decenni di distanza.

1.5.8 Il Bisfenolo A (BPA)

Il 2,2-bis (4-idrossifenil) propano, più comunemente conosciuto come Bisfenolo A (BPA), è stato creato da un chimico russo nel 1891 (Figura 1.16). La sua capacità di simulare gli effetti degli estrogeni nel corpo umano è stata accertata già a partire dal 1930, testandolo per un potenziale uso farmaceutico come estrogeno sintetico (Vogel, 2009). Nel 1950, il BPA ha trovato il suo utilizzo come sostanza chimica nella produzione della plastica, diventando una delle sostanze chimiche più prodotte al mondo, con più di 3,5 milioni di tonnellate sintetizzate annualmente (Environ Health Perspect 2010). Il BPA è utilizzato principalmente come monomero nella produzione di policarbonato e di resine epossidiche e come additivo nei prodotti in polivinilcloruro. Le plastiche in policarbonato sono utilizzate nel packaging alimentare e nella produzione di stoviglie, mentre le resine epossidiche per la produzione di rivestimenti protettivi di barattoli e lattine. Il BPA è anche impiegato in una varietà di altre

applicazioni: vernici a base di resine epossidiche, stucco per legno, adesivi, rivestimenti per superfici, ritardanti di fiamma, fabbricazione di pneumatici e fluido dei freni, resine e sigillanti dentali, rivestimenti di cd e dvd e inchiostri per stampanti. È, inoltre, presente in almeno 15 tipologie di prodotti cartacei, tra cui volantini, riviste e giornali, tovaglioli e fazzoletti di carta, carta igienica, banconote, biglietti da visita, buste postali, carte d'imbarco aereo e carta termica, impiegata, ad esempio, nei registratori di cassa, nelle etichette per bagagli, nei biglietti del bus, del treno e della lotteria.

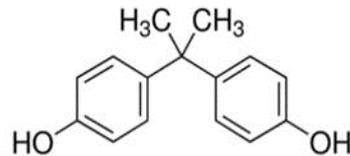


Figura 1.16 Bisfenolo A (BPA).

In Europa, le emissioni totali annuali durante la produzione di BPA sono di 2,1 tonnellate nell'aria, 199 tonnellate nell'acqua e 30 tonnellate nel suolo. Le emissioni derivanti dall'utilizzo di prodotti contenenti BPA sono stimate all'incirca in 160 kg dalla plastica in polycarbonato e meno di 1 kg dalle resine epossidiche dei rivestimenti dei contenitori. È necessario, oltretutto, tener conto anche del rilascio da articoli in polivinilcloruro, che corrisponde a 20 tonnellate nell'aria e 30 tonnellate nell'acqua (ArpaER, 2007).

Il BPA può essere rilasciato direttamente o indirettamente nell'ambiente a qualsiasi livello del ciclo di vita di un prodotto, produzione, consumo o smaltimento e, pur degradandosi rapidamente, è persistente in ambiente a causa di continue immissioni (Oehlmann et al., 2009) che gli consentono di migrare anche nel cibo (Bolli et al., 2008), nell'aria (Calafat et al., 2008, 2009), nella pelle (Braun et al., 2011) e nel sangue (Calafat et al., 2009). L'esposizione al BPA è legata per più del 90% all'alimentazione e a meno del 5% con l'ingestione di polveri, le resine dentali e l'assorbimento dermico (Geens et al., 2012). Considerevoli quantità di BPA (0,25-1,11 mg/kg) sono state ritrovate in campioni casuali di pesce fresco proveniente da un'area del Sud Italia, probabilmente derivanti dalle plastiche dei tubi di irrigazione (Vivacqua et al., 2003). Esiste un'ampia letteratura sugli effetti dell'esposizione a BPA, soprattutto durante le fasi critiche dello sviluppo. L'esposizione di femmine gravide, a basse dosi di BPA, induce, nei topi, alterazioni nel tasso di crescita corporea della prole maschile e femminile, accelera la pubertà nelle femmine e riduce la spermatogenesi nei maschi, mentre nei ratti altera il comportamento esploratorio, sessuale e di gioco, in età successive all'esposizione. Gli studi condotti all'interno del progetto italiano

“PREVIENI” (condotto dal 2008 al 2010 dall’Istituto Superiore di Sanità) in alcune aree “pilota” hanno, inoltre, evidenziato che nelle donne sterili che abitano in grandi centri urbani si riscontrano livelli elevati di BPA. Ulteriori indagini dell’Istituto Superiore di Sanità (ISTISAN) sul comportamento materno, hanno rilevato degli effetti del BPA nella vita adulta, in fasi sensibili agli equilibri ormonali, come la gravidanza e l’allattamento (Della Seta et al., 2005). In diversi studi è stato osservato che, nei ratti e in coltura cellulare il BPA (μM) può aumentare l’indice di massa corporea, distruggere la normale fisiologia cardiovascolare, ed interferire con l’attività degli ormoni fisiologici. Gli effetti del BPA dipendono, principalmente, da differenti meccanismi in grado di alterare l’omeostasi riproduttiva, sebbene non sia chiaro se tutti o solo una parte contribuiscano al potenziale distruttivo della molecola, principalmente alle basse dosi (Acconcia et al., 2015). A gennaio del 2015, tuttavia, l’EFSA (European Food Safety Authority) ha pubblicato una nuova valutazione sull’esposizione dei consumatori al BPA e sulla tossicità della sostanza, concludendo che, ai livelli attuali di esposizione, il BPA non rappresenti un rischio per la salute della popolazione di alcuna fascia di età (inclusi feti, neonati e adolescenti). Benché sia stato considerevolmente ridotto il livello di sicurezza del BPA da 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ di pc/giorno (microgrammi per chilogrammo di peso corporeo al giorno) a 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ di pc/giorno, la stima dell’esposizione alimentare unita a quella legata ad un insieme di altre fonti (dieta, polvere, cosmetici e carta termica), ha rilevato livelli di esposizione da 3 a 5 volte più bassi rispetto alla nuova dose giornaliera tollerabile. Nonostante questi esiti rassicuranti, la Francia ha bandito il BPA nei materiali a contatto con gli alimenti e nelle plastiche mentre la comunità scientifica continua a rilevare potenziali rischi per la salute umana e la fauna selvatica.

Per mettere in luce la complessità insita nelle interazioni tra le molecole xenoestrogeniche ed i propri bersagli saranno di seguito riportati i principali meccanismi di azione molecolari del BPA.

Interazione con il recettore per gli estrogeni (Estrogen Receptor, ER)

La molecola di BPA, in virtù delle sue caratteristiche strutturali, possiede la capacità di interagire con i due subtipi recettoriali per gli estrogeni ($\text{ER}\alpha$ e $\text{ER}\beta$), pur presentando un’affinità di legame più ridotta, da 1000 a 2000 volte, rispetto ad E2 (Bolli et al., 2008, 2010). Il BPA agisce come agonista di $\text{ER}\alpha$, permettendo il corretto spostamento dell’ α -elica dal sito di legame per gli estrogeni (LBD, ligand binding domain); viceversa, si comporta da antagonista per $\text{ER}\beta$, impedendo al LBD di assumere la conformazione corretta. Fino a poco

tempo fa, la maggior parte degli studi sul BPA si concentravano esclusivamente sui meccanismi nucleari di risposta agli estrogeni, che hanno permesso di rilevare un'attività debolmente estrogenica della molecola (McLachlan et al., 1984). Come già anticipato nel paragrafo 1.4.2, gli estrogeni fisiologici, attraverso meccanismi di risposta extra-nucleari, possono però indurre anche rapidi segnali, grazie alla presenza di un pool di ER localizzati a livello della membrana cellulare. Alcune osservazioni sostengono che l'attività estrogenica del BPA sia legata all'attivazione di questi segnali mediati da ER α , che possono risultare sia nella fosforilazione di ERK/MAPK e AKT che nel rilascio di Ca²⁺ (effetto agonista) (Wonzniak et al., 2005).

Il BPA può, tuttavia, agire anche da antagonista di E2, interferendo sulla normale via di trasduzione del segnale mediata da ER β (es p38/MAPK) (Bolli et al., 2010; Marino et al., 2012). La molecola di BPA sarebbe, pertanto, in grado di alterare l'equilibrio di proliferazione-morte cellulare regolato da E2, promuovendo la proliferazione cellulare attivata dal complesso E2-ER α e bloccando gli effetti antiproliferativi mediati dal complesso E2-ER β . Il silenziamento selettivo delle attività di ER β , potrebbe determinare effetti avversi soprattutto in quei tessuti in cui il complesso E2-ER β svolge un ruolo protettivo, come il sistema nervoso e il colon (Bolli et al., Dipartimento di Biologia, Università "Roma TRE", PROGETTO PREVIENI). Il BPA ed altri distruttori endocrini ad attività estrogenica, inoltre, mostrano un'elevata affinità per la proteina GPR30 di recente scoperta in un'ampia varietà di tessuti, avendo, pertanto, la potenzialità di attivare anche altri segnali in tutti questi bersagli (Thomas e Dong, 2006).

Il BPA è ritenuto, tra gli interferenti endocrini, il capostipite degli obesogeni, ma non è il solo, poiché anche altri xenoestrogeni, come i PCB e gli ftalati, mimando l'azione di E2, possono essere coinvolti negli stessi meccanismi. Nell'ambito del metabolismo lipidico il legame del BPA ai recettori di membrana di E2 nelle cellule pancreatiche beta può causare un rilascio incontrollato di insulina. Le cellule bersaglio, essendo esposte a livelli troppo alti di insulina per un tempo prolungato, diventano insulino-resistenti, risultando un eccesso di glucosio ematico tipico del diabete di tipo 2. Il BPA è in grado di legarsi anche ai recettori degli estrogeni delle cellule pancreatiche alfa, interferendo direttamente con i livelli di glucosio nel sangue, attraverso il rilascio di glucagone. Questo, a propria volta, stimola la demolizione delle riserve di glicogeno e quindi il rilascio di glucosio, a cui l'organismo risponde con una produzione maggiore di insulina, aggravando ulteriormente il fenomeno.

Interazione con il recettore per gli androgeni (Androgen Receptor, AR)

L'esposizione al BPA è stata associata, in un certo numero di Paesi, sia alla diminuzione del numero di nascite maschili nella popolazione che ad un aumento dei casi di criptorchidismo ed isospadia oltre che ad una riduzione della qualità del seme (Kortenkamp et al., 2011). Sulla base di queste considerazioni, il BPA sarebbe in grado di interferire anche sugli equilibri fisiologici del sistema riproduttivo maschile. Il recettore per gli androgeni (Androgen Receptor, AR), gli ormoni sessuali maschili, è espresso sia negli organi maschili che in quelli femminili, ma non si hanno, ad oggi, sufficienti conoscenze, sulla capacità del BPA di interferire con i segnali extra-nucleari, mediati dagli androgeni (Acconcia et al., 2015; Sohoni e Sumpter 1998; Bulzoni e Marino 2011). Pellegrini e collaboratori hanno osservato che il BPA, in condizioni fisiologiche, non interferisce sull'attività androgenica, ma si comporta da antagonista in cellule tumorali, dove sono presenti isoforme di splicing di AR. Questi dati sono stati di recente confermati in cellule tumorali HeLa (Marino M, dati non pubblicati) e sono stati dimostrati anche da altri autori, in presenza di diversi mutanti AR (Wetherill et al., 2005). Bisogna considerare, tuttavia, la possibilità che gli effetti sopracitati non siano da attribuire all'effettiva androgenicità del BPA quanto, piuttosto, alla sua capacità di interferire con l'azione dei recettori per gli estrogeni, tenendo presente che, principalmente l'isoforma ER β , sia espressa anche nel sistema riproduttivo maschile (Acconcia et al., 2015, Sohoni e Sumpter 1998; Pellegrini et al., 2013).

Interazione con il recettore correlato agli estrogeni (Estrogen Related Receptor, ERRs)

I recettori correlati agli estrogeni (Estrogen Related Receptors, ERRs) sono una subfamiglia di recettori nucleari orfani intimamente correlati a ER α e ER β , di cui si conoscono tre isoforme ERR α , ERR β , ERR γ . Sebbene gli estrogeni non siano dei ligandi naturali di questi recettori, esiste un'incredibile omologia con ERs, tanto che gli ERRs possono legarsi agli elementi responsivi agli estrogeni sul DNA (Acconcia et al., 2015) I ERRs possiedono un'attività trascrizionale costitutiva, la quale può essere repressa da alcune sostanze chimiche tra cui il DES e il 4-idrossitamoxifene (4-OHT). Il BPA presenta un'elevata affinità di legame con ERR, tanto da preservare l'attività trascrizionale di ERR γ , anche in presenza di 4-OHT (Takayanagi et al., 2006). Questo recettore è altamente espresso sia nel cervello dei mammiferi durante lo sviluppo, che nel cervello, nel polmone e in altri tessuti dell'adulto. Pertanto, gli effetti alle basse dosi di BPA, potrebbero essere mediati dalle complesse interazioni tra i recettori nucleari ERs e ERRs.

Interazione con il recettore tiroideo (Thyroid Hormone Receptor, TR)

Di recente, è stata scoperta la potenzialità di diversi interferenti endocrini di interagire con il recettore degli ormoni tiroidei (TR, Thyroid Receptor). Tra questi, il BPA sembra avere un effetto antagonista sull'attività trascrizionale dei geni per gli ormoni tiroidei che regolano, ad esempio, lo sviluppo del cervello in fase prenatale (Acconcia et al., 2015).

Interazione con il recettore X del pregnano (Pregnane X Receptor, PXR)

Alcuni composti ambientali, tra cui il BPA in concentrazioni elevate, sono in grado di attivare il recettore X del pregnano, coinvolto nell'eliminazione di composti tossici endogeni o di metaboliti esogeni (Acconcia et al., 2015).

Interazione con i recettori attivati dai proliferatori dei perossisomi (peroxisome proliferator-activated receptors, PPAR)

Il BPA è in grado di indurre l'espressione del recettore nucleare PPAR γ (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma), appartenente alla famiglia dei recettori nucleari per gli ormoni che regolano l'espressione di molti geni coinvolti nel metabolismo dei lipidi e degli zuccheri. Questo recettore è particolarmente espresso nel tessuto adiposo, nel fegato e nella muscolatura scheletrica. Negli adipociti PPAR γ -2 promuove l'immagazzinamento degli acidi grassi e dei trigliceridi, inibendo l'espressione dei geni che inducono la lipolisi e favorisce, l'espressione di alcuni geni implicati nella regolazione della sensibilità all'insulina (Bishop-Bailey et al., 2000; Kwintkiewicz et al., 2010).

Interazione con il recettore arilico (Aryl hydrocarbon receptor, AhR)

Il recettore arilico per gli idrocarburi (AhR) è un membro della famiglia delle proteine bHLH/PAS (basic Helix-Loop-Helix/ PerArnt-Sim), noti regolatori trascrizionali ed è coinvolto nella detossificazione degli xenobiotici, di cui la 2,3,7,8-tetraclorodibenzodiossina (TCDD) risulta essere il ligando più potente. Il recettore AhR, a seguito del legame con la diossina, entra nel nucleo e forma un eterodimero con una proteina strutturalmente simile, conosciuta come translocatore nucleare di AhR (ARNT). Il complesso AhR/ARNT, associandosi a sua volta al recettore ER libero e al coattivatore p300, riconosce una sequenza specifica di DNA nota come HRE (Hormone Response Elements), corrispondente alla regione enhancer/promoter per un gene ormone-dipendente. L'attivazione di ER indotta dal complesso AhR, sembra essere dipendente dalla struttura del ligando di AhR e, sulla base di quanto descritto finora, non necessariamente avviene per opera del BPA. L'esposizione del

BPA in utero (da 0,02 a 20 µg/kg/giorno), ad ogni modo, aumenta l'espressione di AhRR (AhR repressor) alterando, a livello embrionale, l'espressione e le funzioni di AhR (Nishizawa et al., 2005; Acconcia et al., 2015).

Interazione con meccanismi che coinvolgono il metabolismo ormonale

L'esposizione al BPA è stata associata ad una diminuzione significativa dell'espressione di Cyp11a1 e StAR, due proteine coinvolte nel metabolismo del colesterolo, che regolano i livelli di concentrazione di androstendione, testosterone e estradiolo. Il BPA, inoltre, potrebbe avere un ruolo anche nel catabolismo degli steroidi, contribuendo ulteriormente all'alterazione del normale equilibrio ormonale.

Interazione con meccanismi che riguardano la regolazione genetica ed epigenetica

L'errata o la mancata attivazione fisiologica dei recettori nucleari durante lo sviluppo, è un meccanismo di alterazione epigenetica molto importante, che può portare l'organismo a sviluppare patologie e disfunzioni in età adulta. Le fasi precoci dello sviluppo sono probabilmente le più vulnerabili alle alterazioni epigenetiche poiché, proprio durante questo periodo, viene definito il pattern di metilazione e di organizzazione della cromatina, indispensabile per il normale sviluppo tissutale. L'esposizione al BPA, così come ad altri contaminanti ambientali, in fasi precoci, può alterare la programmazione epigenetica, determinando differenze fenotipiche inter-individuali e modificando la suscettibilità individuale a specifiche patologie, in conseguenza di modificazioni epigenetiche di metilazione al DNA (Ho et al., 2006), modificazioni istoniche ed espressione di RNA non codificanti (Singh et Li, 2012). Il BPA potrebbe avere, quindi, un ruolo cruciale nell'eziologia di numerose patologie umane, contribuendo al rischio di tumori, problemi di sviluppo, diabete, obesità, sindromi metaboliche e probabilmente anche infertilità. L'esposizione in fase pre- e post- natale al BPA, infatti, può alterare l'espressione di alcuni geni, attraverso meccanismi genetici ed epigenetici, con conseguente trasferimento di questi effetti alle generazioni future. Dolinoy e collaboratori (2007) hanno fornito i primi esiti sperimentali sulla capacità del BPA di interferire con i meccanismi di metilazione del DNA che regolano l'accensione e lo spegnimento di alcuni geni. Molte proteine a valle della via del segnale mediata dai recettori per gli ormoni steroidei, hanno la capacità di modificare gli istoni e rimodellare la cromatina, apportando dei cambiamenti significativi nella struttura cromatinica, con conseguente sovra/sotto-regolazione dell'espressione di geni responsivi agli ormoni steroidei (Biddie, 2011). Alcuni studi sostengono che gli estrogeni siano in grado di modificare in maniera dinamica lo stato di metilazione dei proprio geni bersaglio

(Kundakovic et Champagne, 2011). La demetilazione in una certa regione del DNA, permette la distensione della cromatina, e l'accessibilità, oltre che la potenziale attivazione, di specifici geni bersaglio. Bromer e collaboratori (2010) hanno dimostrato il coinvolgimento del BPA nella demetilazione degli elementi responsivi agli estrogeni (EREs) nel gene *Hoxa10*, che risulta in un aumento significativo dei livelli di ER α legati al DNA e in un ampliamento della responsività agli estrogeni. Il BPA potrebbe aumentare, in tessuti bersaglio, l'attività estrogenica attraverso la sovraregolazione dei recettori per gli estrogeni ERs, mediante modificazioni epigenetiche, tenendo conto che il promotore del gene che codifica ER α è regolato da meccanismi di metilazione-demetilazione del DNA.

Ulteriori indagini sono, tuttavia, necessarie per comprendere i meccanismi molecolari alla base dei fenomeni epigenetici, allo scopo di intervenire prontamente sulle condizioni ambientali che possono favorire l'insorgenza di eventuali disfunzioni e patologie in età adulta. Una migliore conoscenza di questi effetti è importante soprattutto per la comprensione degli effetti biologici transgenerazionali, compresa l'interazione con modulatori epigenetici fisiologici (ad es., ormoni steroidei).

1.6 LA QUALITÀ DELL'ACQUA DA DESTINARE A CONSUMO UMANO

Un' enorme varietà di contaminanti chimici viene ritrovata, anche in concentrazioni relativamente elevate, nelle acque fognarie depurate, nelle acque superficiali di fiumi e laghi, e nelle acque di falda e potabili. Le acque reflue urbane, che in passato contenevano quasi esclusivamente sostanze biodegradabili, presentano, attualmente, maggiori problemi di smaltimento, a causa della presenza sempre più ampia di composti chimici di origine sintetica, cosicché gli ambienti marini, fluviali e lacustri non sono in grado di ricevere una tale quantità di sostanze inquinanti, decisamente superiore alla propria capacità auto-depurativa, senza vedere compromessa la qualità delle proprie acque ed i normali equilibri dell'ecosistema.

I depuratori urbani sono un punto di raccordo molto importante nella via di controllo della contaminazione ambientale da queste sostanze ed assicurano la qualità delle acque in uscita dagli impianti di potabilizzazione, sebbene, talvolta, non siano in grado di rimuovere in maniera del tutto efficace, i contaminanti di nuova generazione.

Gli impianti di depurazione, infatti, non sono progettati per rimuovere sostanze tanto complesse, così diverse tra loro (farmaci, prodotti per la cura e l'igiene personale, antibiotici,

interferenti endocrini, droghe illecite) e a concentrazioni tanto basse (ng/L- μ g/L), tali da permanere, di conseguenza, anche nelle acque reflue trattate, riversandosi e accumulandosi in ambiente. Sulla base di questi presupposti e di fronte alle evidenti difficoltà di ridurre il tasso di consumo delle sostanze chimiche prioritarie, appare evidente la necessità di migliorare i sistemi di trattamento già esistenti negli impianti o di implementare gli stessi con nuove tecnologie, allo scopo di garantire una maggior efficacia nella rimozione di sostanze indesiderate, nelle acque da destinare a consumo umano. L'innovazione tecnologica unita alla corretta gestione degli impianti di depurazione risultano, pertanto, necessarie per garantire la qualità delle acque di potabilizzazione. Per fornire qualche cenno storico sulla rete di distribuzione di acqua potabile del territorio di Ravenna, area territoriale principale della presente ricerca, bisogna tornare indietro fino agli anni '30 del secolo scorso, quando fu realizzato l'acquedotto di "Torre Pedrera", costituito da un campo pozzi alimentato dal subalveo del Fiume Marecchia, e da una condotta che trasportava l'acqua prodotta, fino al comune della città. Il quantitativo di acqua non era, allora, sufficiente a soddisfare il fabbisogno della popolazione locale, oltre che le esigenze delle attività agricole ed industriali, cosicché negli anni '50, attivando migliaia di pozzi artesiani, iniziarono massicci prelievi dalle falde acquifere, che innescarono il fenomeno della subsidenza, conosciuta come il progressivo abbassamento del suolo. Per interrompere i prelievi dal sottosuolo e fornire acqua alle popolazioni romagnole fu realizzato nel 1983 l'invaso di Ridracoli, allo scopo di arrestare il grave depauperamento delle risorse idriche ed assicurare un approvvigionamento sufficiente di acqua di buona qualità, erogata presso l'impianto di Capaccio. Pochi anni dopo, nel 1986, fu costruito l'Impianto di Potabilizzazione di Ravenna, denominato NIP 1 (Nuovo Impianto di Potabilizzazione), per produrre un ulteriore quantitativo di acqua potabile, utilizzando l'acqua grezza fornita dai fiumi Reno e Lamone. Nel 1990 è entrato in funzione l'Acquedotto della Romagna che attualmente può fornire circa metà dell'acqua potabile consumata nel comune ravennate. Inoltre, per ottemperare al crescente fabbisogno idropotabile, è stato inaugurato, nel settembre di quest'anno, il nuovo impianto di potabilizzazione NIP 2, opera estremamente importante costruita a Ravenna, che testimonia l'impegno di Romagna Acque - Società delle Fonti S.p.A, nel consentire, ad una consistente parte del territorio, di disporre di una garanzia ulteriore di approvvigionamento.

1.6.1 Trattamento delle acque reflue e rimozione dei contaminanti negli impianti di depurazione

In questo paragrafo verranno descritti, brevemente, i principali processi che permettono la trasformazione e la manipolazione degli scarichi reflui all'interno dei potabilizzatori, operazioni indispensabili per una corretta gestione della risorsa idrica.

Negli impianti di trattamento delle acque reflue, infatti, viene attuata la depurazione degli scarichi sia di origine civile che industriale, attraverso due linee specifiche:

- La linea acque, finalizzata alla rimozione di contaminanti organici e inorganici prima della re-immissione dell'effluente nel corpo idrico ricettore o nel suolo;
- La linea fanghi, destinata al trattamento di stabilizzazione biologica dei fanghi, originatisi per sedimentazione e ricchi di contenuto organico, potenzialmente tossico.

In generale, i trattamenti di depurazione delle acque si distinguono in preliminari, primari, secondari e terziari.

- I trattamenti *preliminari* sono essenzialmente di tipo meccanico e la loro funzione principale è quella di eliminare i materiali di dimensioni grossolane, come le sabbie e gli oli che non sono sottoposti a processi di depurazione, ma che potrebbero comportare problemi di funzionamento negli organi meccanici, sedimentazioni non desiderate nei reattori o riduzione di efficienza dei processi di trattamento (es grigliatura, dissabbiatura);

- I trattamenti *primari* hanno lo scopo principale di rimuovere le sostanze sedimentabili, solidi organici e inorganici, oltre all'eventuale materiale flottante come schiume, oli e grassi. Il processo può essere agevolato attraverso l'impiego di particolari sostanze flocculanti che aumentano il grado di aggregazione delle particelle e quindi la loro sedimentabilità;

- I trattamenti *secondari* possono essere di tipo biologico e di tipo chimico. I primi interessano prevalentemente la frazione disciolta e colloidale delle sostanze organiche, i secondi le sostanze colloidali e le sostanze inorganiche che possono essere rimosse per precipitazione;

- I trattamenti *terziari* hanno lo scopo di perfezionare la depurazione riducendo il carico di elementi nutrienti (fosforo e azoto) presenti nell'effluente secondario. In certi casi il trattamento terziario elimina sostanze poco biodegradabili che non sono state eliminate attraverso il metabolismo batterico. La disinfezione è un processo terziario essenziale per l'abbattimento della carica microbica dell'acqua, in uscita dall'impianto, riducendola a valori

di concentrazione residua accettabili, dal punto di vista sanitario e ambientale.

La sequenza delle fasi di trattamento di ogni impianto di depurazione delle acque e la complessità di ciascuna di queste fasi, possono variare a seconda dei casi, tenendo conto che l'acqua destinata ad un riciclo industriale subirà trattamenti meno rigorosi rispetto a quella che sarà utilizzata come acqua potabile a livello urbano. Verranno, di seguito, elencati i principali sistemi di trattamento convenzionali che trovano applicazione negli impianti di trattamento delle acque reflue (Figura 1.17).

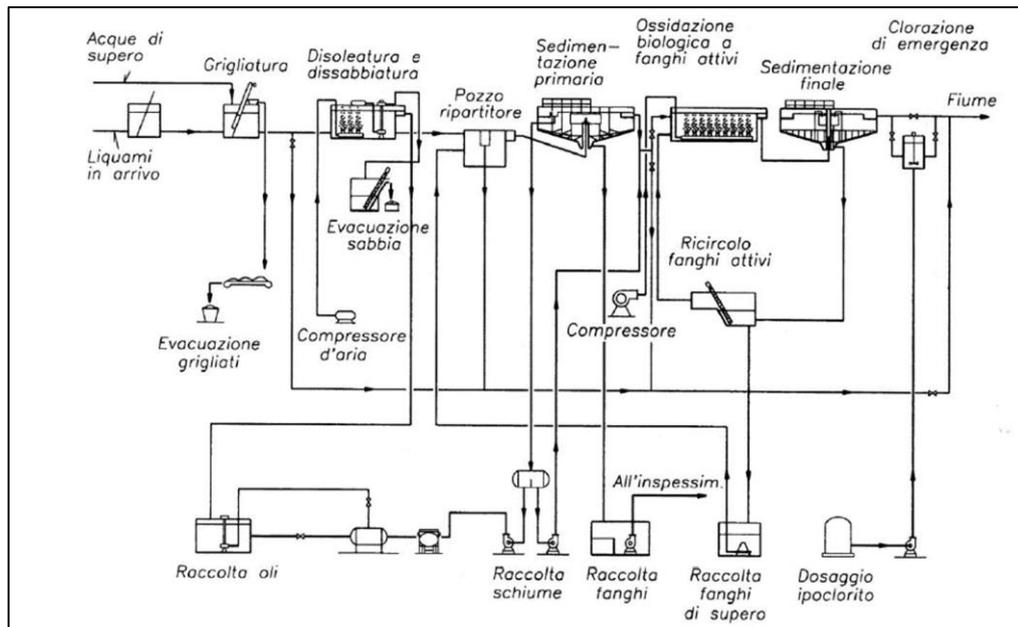


Figura 1.17. Schema tipico di un processo di trattamento di acque di scarico.

I processi depurativi di più ampia diffusione sono essenzialmente di tipo biologico e prevedono, attraverso l'utilizzo di microrganismi, la coagulazione e la rimozione dei solidi non sedimentabili (colloidali e disciolti) nella linea acque, mentre, nelle linea fanghi, la stabilizzazione della materia organica.

Esistono anche dei processi di depurazione chimico-fisici che, facendo ricorso a dei reagenti chimici, favoriscono l'aggregazione degli inquinanti presenti sotto forma di particelle sospese e colloidali, che saranno separati attraverso la sedimentazione dall'effluente.

I principali trattamenti, illustrati sinteticamente, in ordine di sequenza, sono i seguenti:

Grigliatura

Serve per rimuovere corpi grossolani che potrebbero danneggiare le pompe e/o accumularsi nelle tubazioni e nei reattori a valle.

Disabbiatura/disoleatura

Necessaria per rimuovere solidi inerti (usura parti meccaniche, accumulo inerti sezione fanghi), oli e grassi (diminuzione efficienza ossigenazione, accumulo di schiume).

Sedimentazione

Processo fisico che consente di rimuovere le sostanze solide sedimentabili presenti nell'acqua dalla quale si separano, generalmente, per gravità; si distingue in *primaria* quando avviene a valle di dissabbiatura/disoleatura e a monte del trattamento biologico e in *secondaria* quando avviene a valle di del trattamento biologico.

Chiariflocculazione

Consiste nell'addizione all'acqua di alcuni composti chimici (es. sali d'alluminio) che favoriscono l'aggregazione di piccole particelle, non altrimenti sedimentabili, in aggregati più voluminosi, favorendone la rimozione nella fase di filtrazione.

Coagulazione

Serve per favorire la sedimentazione di solidi colloidali. I più usati sono cationi trivalenti (Al^{3+} , Fe^{3+}), che neutralizzano la superficie negativa del colloide e formano precipitati sui quali si adsorbono i solidi.

Ossidazione

Trattamento più importante dell'intero ciclo di depurazione che consiste nella biodegradazione da parte di microrganismi, di tutte le sostanze organiche presenti nelle acque reflue, fino a trasformarle in composti molto semplici ed innocui dal punto di vista ambientale. I sistemi di ossidazione biologica a fanghi attivi, riproducendo gli stessi meccanismi biologici di demolizione della sostanza organica che avvengono in natura, ad opera di agenti microbici, sono i più diffusi, nei tradizionali impianti di trattamento delle acque reflue. L'ossidazione può essere effettuata anche per via chimica, con idonei agenti chimici (es. permanganato di potassio, ozono) che interagiscono con i contaminanti disciolti (sostanze organiche e inorganiche), facilitandone la rimozione.

Filtrazione

Serve a eliminare le particelle ancora presenti dopo i precedenti processi. La filtrazione su sabbia è un processo fisico che consente di separare dall'acqua le particelle sfuggite dai comparti di sedimentazione e di chiariflocculazione; la filtrazione su carbone attivo rimuove

microinquinanti prevalentemente organici, grazie all'elevata capacità di adsorbimento del materiale, estremamente poroso.

Disinfezione

Stadio di trattamento finale che agisce sulla componente microbiologica residua ed assicura l'assenza di microrganismi patogeni; è effettuata, usualmente, con prodotti a base di cloro (ipoclorito di sodio, biossido di cloro) che consentono di mantenere un residuo di disinfettante lungo tutta la fase di distribuzione. Il biossido di cloro viene prodotto in soluzione liquida per reazione tra acido cloridrico e clorito sodico presso l'impianto, producendo cloriti come sottoprodotti di disinfezione. All'ipoclorito di sodio, già pronto per l'utilizzo, più economico e meno persistente, si associano come sottoprodotti della disinfezione i trialometani, composti alogenati nocivi. Per entrambi i sottoprodotti l'Allegato B del *D.lgs 31/2001* (nell'allegato B) fissa dei valori parametrici da rispettare.

Parallelamente, anche la stabilizzazione dei fanghi può avvenire sia per via biologica (digestione aerobica ed anaerobica) che per via chimica ed è necessaria per ridurre la carica patogena, in seguito all'accumularsi nel fango di microrganismi che utilizzano la materia organica. La linea fanghi ha un ruolo fondamentale per quanto riguarda la corretta gestione dei contaminanti inorganici ed organici rimossi dall'effluente nelle fasi di depurazione, i quali, se non opportunamente trattati, potrebbero comportare un notevole impatto ambientale. Questi sistemi di depurazione tradizionale, purtroppo, non risultano, spesso, abbastanza efficienti nella rimozione di moderne molecole sintetiche che possono essere ritrovate a diverse concentrazioni, nelle differenti fasi di trattamento delle acque ad uso potabile, come sarà descritto nel paragrafo successivo nel paragrafo successivo.

1.6.2 Presenza di xenoestrogeni nel ciclo integrato dell'acqua

Gli xenoestrogeni sono praticamente ubiquitari in ambiente acquatico, principale ricettacolo per molte sostanze che derivano dal trattamento delle acque reflue, oltre che dai percolati delle discariche di rifiuti solidi e dalle acque di scorrimento di aree agricole o dove sono presenti allevamenti di bestiame. Normalmente, una donna in età fertile può eliminare, in quantità variabili in funzione del ciclo mestruale, da 10 a 100 µg pro die di estrone, estradiolo, estriolo ed etinilestradiolo e fino a 30 mg pro die, soprattutto di estriolo, durante la gravidanza. Gli estrogeni vengono escreti, attraverso le urine, mediante coniugazione con acido solforico e glucuronico, ma possono ritornare allo stato libero ad opera di enzimi

batterici presenti nell'ambiente, riacquistando la potenza ormonale primitiva. Spesso, come anticipato nel paragrafo precedente, i metodi tradizionali usati per la depurazione idrica non riescono ad eliminare completamente queste sostanze, che, anche in concentrazioni molto basse (ng/L), possono indurre una risposta estrogenica in molte specie marine, sebbene i livelli di abbattimento siano, generalmente, piuttosto alti. Dai dati di letteratura (Pryor et al., 2000; Oikawa et Matsumoto, 2003; Heemken et al., 2001; Xiao et al., 2001) e dal rapporto europeo del 2003 (Wenzel et al., 2003) risulta che, nelle acque superficiali, l'estrone sia il composto più frequentemente rilevato e a concentrazioni maggiori, rispetto agli altri estrogeni. La scarsa presenza di estrone e di estradiolo nelle acque potrebbe, probabilmente, essere spiegata dalla parziale ossidazione biochimica dell'estradiolo e dalla rottura dei legami dei composti coniugati di questi composti. Una raccolta esaustiva della bibliografia, ad oggi, esistente, sulle concentrazioni di sostanze estrogeniche in acque superficiali è stata fornita dal Rapporto Istisan 11/18 " *Interferenti endocrini nelle acque da destinare al consumo umano in Italia: strumenti metodologici per un'indagine conoscitiva estesa a diversi sistemi idrici*", nell'ambito di un progetto coordinato dalla Fondazione AMGA di Genova, che verrà, di seguito, riproposta.

In Belgio, Olanda, Germania e Regno Unito la concentrazione di estrogeni valutata nelle acque superficiali destinate al consumo umano, è stata misurata, generalmente, al di sotto di 5 ng/L, con occasionali valori di 20 ng/L dei livelli di estrone (Kuch et Ballschmitter, 2001; Adler et al., 2001; Belfroid et al., 1999). In un'indagine condotta in Pensilvania (USA) su acque superficiali presenti in aree suburbane, agricole e a tipologia mista, l'estrone è stato rilevato nel 90% dei casi con concentrazioni che variano tra 0,8 a 19 ng/L (Velicu et Suri, 2009). Nel fiume Tevere, in Italia, ad 1 km dalla foce, a valle di piccoli agglomerati urbani (senza o con modesti impianti di trattamento dei liquami) sono stati riscontrati livelli di estriolo pari a 0,33 ng/L, a 0,11 ng/L di estradiolo, a 1,5 ng/L di estrone e a 0,04 ng/L di etinilestradiolo (Baronti et al., 2000). In Giappone è stata condotta un'indagine estesa (Tabata et al., 2001) sulla presenza di ormoni steroidei in 109 fiumi, rilevando la presenza di 17 β -estradiolo in 222 dei 256 campioni esaminati in estate ad una concentrazione media di 2,1 ng/L e in 189 dei 261 campioni prelevati in autunno con una concentrazione media di 1,8 ng/L. Nelle acque del Tamigi l'estrone è stato rilevato a livelli compresi tra 0,2 e 17 ng/L (Xiao et al., 2001) e in 15 corsi d'acqua in Germania (Ternes et al., 1999) le concentrazioni di estrone variavano tra 0,7 e 1,6 ng/L. Dei vari estrogeni ricercati nelle acque del fiume Llobregat in Spagna (Rodriguez-Mozaz et al., 2004) è stata evidenziata soltanto la presenza di estrone e del suo composto coniugato estrone-3-solfato, a livelli variabili, con un massimo

di 21,7 ng/L per il primo e di 6 ng/L costante per il secondo. Uno studio pubblicato nel 2008 sulla qualità delle acque del medesimo fiume indica concentrazioni di estrone-3-solfato, estrone ed estriolo a livelli di pochi ng/L per tutti gli analiti (Kuster et al., 2008). Nel biennio 1999-2000, l'*US Geological Survey* ha condotto un'indagine sistematica sulla presenza di interferenti endocrini, residui di farmaci ed altri microinquinanti organici in 139 corsi d'acqua di 30 Stati USA, ricercando una serie di sostanze, scelte fra quelle più diffuse e di largo consumo, farmaci, ormoni, ecc. Dai dati raccolti, emergono, in particolare il:

- 17 α -etinil estradiolo ad una concentrazione mediana di 73 ng/L (massima 831 ng/L);
- 17 α -estradiolo ad una concentrazione mediana di 30 ng/L (massima 74 ng/L);
- 17 β -estradiolo ad una concentrazione mediana di 9 ng/L (massima 93 ng/L);
- Estriolo ad una concentrazione mediana di 19 ng/L (massima 51 ng/L);
- Estrone ad una concentrazione mediana di 27 ng/L (massima di 112 ng/L);
- Progesterone ad una concentrazione mediana di 110 ng/L (massima 199 ng/L);

La presenza contemporanea nelle acque americane di diversi ormoni, deve far riflettere sugli eventuali effetti additivi che essi potrebbero esercitare.

Per quanto riguarda le acque profonde, gli estrogeni sintetici e naturali vengono adsorbiti su particelle del suolo e biodegradati (Colucci et al., 2001) e questo spiegherebbe la loro assenza in questa tipologia di acque. Infatti, anche dopo lunghi periodi di spargimento di liquami su terreni, le acque profonde della stessa area sono risultate prive di tali sostanze; in caso di rilevamento positivo le concentrazioni sono state sempre inferiori a 1 ng/L. Shore e collaboratori (1995) ritengono che una costante presenza di 17 α -estradiolo, in acque di sorgente, a concentrazioni di circa 5 ng/L a causa dell'infiltrazione di acque di scarico contaminate nel terreno, in grado di raggiungere le acque profonde. La difficoltà che emerge da questo tipo di indagini sulla qualità dell'acqua destinata al consumo umano è legata, soprattutto alla raccolta di informazioni sulla che risultano, ad oggi, ancora in parte frammentarie. Uno studio estensivo condotto negli Stati Uniti (Benotti et al., 2009) su acque grezze, acque trattate e acque distribuite al rubinetto ha evidenziato la presenza di 17 β -estradiolo, estrone e 17 α -etinilestradiolo nelle acque in entrata agli impianti di potabilizzazione in concentrazioni medie rispettivamente pari a 17 ng/L, 0,30 ng/L e 1,4 ng/L, e la totale assenza di tali sostanze all'uscita degli impianti dopo il trattamento con ozono e nei campioni prelevati al rubinetto. Per quanto riguarda i quattro acquedotti europei scelti come casi studio, estrogeni naturali sono stati trovati solo nelle acque grezze di un acquedotto (concentrazione media 0,38 ng/L per il 17 β -estradiolo e 3,0 ng/L per l'estrone), probabilmente derivanti dal dilavamento di aree adibite a pascolo di bestiame. Tali composti

risultavano assenti dopo trattamento di flocculazione, permanenza in un lago per 3 mesi e filtrazione rapida su sabbia. Di recente, diversi autori hanno pubblicato degli studi sull'effetto della clorazione, valutando la potenziale attività estrogenica dei sottoprodotti clorurati e confrontandola con quella dei prodotti di origine. Nakamura e collaboratori (2006) hanno dimostrato che l'ipoclorito di sodio reagisce facilmente con l'estrone per formare derivati clorurati, la cui attività estrogenica può essere in alcuni casi maggiore di quella del composto precursore; anche l'attività estrogenica dei derivati clorurati del 17 β -estradiolo, dell'estriolo e del 17 β -etinilestradiolo mostra una tendenza simile a quella dell'estrone. Il 17 β -estradiolo reagisce rapidamente con l'acido ipocloroso, formando prodotti clorurati dopo solo dieci minuti di contatto. Test *in vitro* hanno dimostrato che l'attività estrogenica esplicita dalla soluzione clorurata dopo tempi di contatto pari a 10, 30 e 60 minuti è simile o di poco inferiore a quella della soluzione prima della clorazione. Una riduzione del 40% dell'attività estrogenica viene osservata dopo 120 e 180 minuti di contatto (Hu et al., 2003). Sulla base dei dati disponibili può essere rappresentato uno scenario della possibile entità di assunzione di ormoni steroidei, attraverso l'acqua destinata al consumo umano, confrontandola con la produzione endogena umana. Assumendo che il consumo di acqua da parte di un uomo adulto sia di 2 litri al giorno, l'acqua destinata al consumo umano non trattata può fornire fino ad un massimo di 40 ng di estradiolo, o estrogeni equivalenti, al giorno, gli effluenti trattati ne possono fornire una quantità pari alla metà o meno, le acque dei fiumi contribuiscono per 10 ng di estrogeni e l'acqua destinata al consumo umano per 4 ng al giorno o meno. Questi valori confrontati con la secrezione endogena giornaliera di estrogeni (0,05-0,60 x10³ μ g/die di estrogeni) appaiono sicuramente trascurabili (Kuster et al., 2007; Fondazione AMGA, 2011). Tuttavia, la presenza di interferenti endocrini ad attività estrogenica di diversa origine nei comparti acquatici ha portato negli ultimi decenni ad approfondire le conoscenze sui livelli ambientali di tali sostanze e sul loro possibile impatto per la salute umana e le popolazioni selvatiche.

1.6.3 Composti ad attività genotossica nelle acque

Molti dei composti rilasciati nell'ambiente acquatico sono potenzialmente genotossici, in grado, cioè, di interagire con il materiale genetico, direttamente o a seguito di attivazione metabolica, modificandolo. La mancanza di una detossicazione completa può portare alla formazione di metaboliti elettrofilo altamente reattivi, che possono attaccare i centri nucleofili in macromolecole come DNA, lipidi, proteine. L'interazione con il DNA può

manifestarsi sotto forma di alterazione chimica delle basi azotate, di addotti, di legami crociati o di rotture a livello di singolo e doppio filamento che, solitamente, vengono prontamente corrette da meccanismi cellulari di riparazione, senza conseguenze dannose per l'organismo. Tuttavia, le lesioni che non vengono riparate o sono processate in modo improprio, possono portare alla fissazione di anomalie del materiale genetico come aberrazioni cromosomiche, mutazioni geniche ed altri effetti a lungo termine come il cancro nei vertebrati, uomo compreso.

La contaminazione degli ambienti acquatici costituisce un problema complesso, pertanto, nel presente lavoro di tesi, le indagini che riguardano la presenza di sostanze ad attività estrogenica non possono essere disgiunte da quelle relative alla presenza di agenti e di effetti genotossici nei campioni sperimentali. Un recente studio ha dimostrato, oltretutto, che il Bisfenolo A è in grado, in seguito ad attivazione metabolica, di indurre la formazione di addotti al DNA (Tiwari et al., 2012). In aggiunta, è noto, ormai da tempo, che gli stessi processi di potabilizzazione delle acque possono portare alla formazione di sottoprodotti ad attività genotossica, sviluppatisi per reazione con il cloro, sia gassoso che rilasciato dall'ipoclorito, impiegato nella disinfezione. Tra questi vanno menzionati i trialometani (THM, quali cloroformio, bromoformio, clorodibromo metano, bromodichlorometano), gli acidi aloacetici, gli aloacetoniitrili, gli alochetoni e i furanoni clorurati, molti dei quali sono tossici. Questo aspetto è estremamente rilevante per il monitoraggio dello stato di qualità delle acque se si pensa che, in Italia, la clorazione è attualmente il trattamento più utilizzato per eliminare dall'acqua gli organismi patogeni.

Inoltre, durante il trasferimento dell'acqua all'utenza, possono formarsi sostanze mutagene per reazione con composti biologicamente attivi, rilasciati dai materiali che costituiscono le condutture, o con composti del metabolismo del biofilm microbico, che può contaminare alcuni tratti del percorso distributivo, trasformando composti inattivi in composti mutageni o formando prodotti di reazione tra sostanze organiche e cloro residuo (Arpa ER).

Nelle attività di monitoraggio di qualità delle acque potabili, l'utilizzo e lo sviluppo di biomarker della contaminazione da agenti genotossici risulta, perciò, un elemento essenziale, che va di pari passo e con la valutazione degli effetti eco-tossicologici complessivi per la valutazione del rischio.

1.7 VALUTAZIONE DEL RISCHIO PER L'AMBIENTE E LA SALUTE UMANA

Nella metà degli anni '80, sono state osservate le prime evidenze macroscopiche nel mondo animale, specialmente acquatico, sugli effetti dell'esposizione alle condizioni di contaminazione chimica nei corsi d'acqua. A causa della natura lipofila e semi-persistente della maggior parte degli IE e dei loro metaboliti, molti di essi bioaccumulano e biomagnificano in diversi comparti ambientali, compreso il biota marino. La maggior parte dei dati sugli effetti biologici e sui meccanismi d'azione degli IE negli organismi marini proviene da studi sui vertebrati, in particolare sui pesci, mentre la comprensione dei meccanismi di azione degli IE negli invertebrati è stata ostacolata a lungo dalla mancanza di una conoscenza dettagliata della loro endocrinologia (Rotchelle e Ostrander, 2003). Tra gli effetti osservati negli invertebrati, uno degli esempi più esplicativi di interferenza endocrina, causata da un contaminante ambientale, è documentato nei molluschi esposti a tributilstagno (TBT), un composto utilizzato nelle vernici antivegetative applicate sugli scafi delle navi (Terlizzi et al., 2004). È stato dimostrato che i composti organostannici possono interferire con numerosi processi biologici, causando in particolare il fenomeno dell'IMPOSEX (sviluppo di caratteri sessuali maschili nelle femmine) nei gasteropodi e il danneggiamento del citoscheletro in altre specie, tra cui i molluschi. Per quanto riguarda gli effetti sulla salute umana, si sono registrati negli ultimi anni aumenti considerevoli di patologie endocrine, legate all'apparato riproduttivo, alla tiroide, e non solo. Gli effetti tossicologici associati dall'esposizione prenatale a composti ad interferenza endocrina, possono manifestarsi in maniera permanente a livello embrionale o fetale, alterando il normale sviluppo della progenie; le conseguenze avverse e l'entità del danno variano con lo stadio di sviluppo dell'embrione al momento dell'esposizione, e talvolta, fino a quando la prole non raggiunge la maturità, non risultano alterazioni evidenti.

Gli ormoni steroidei giocano un ruolo importante nella regolazione dei processi di sviluppo in molti tessuti (Vom Saal et al., 1992). L'organogenesi, una fase particolarmente critica dello sviluppo, comincia, nell'uomo, alla fine del secondo mese di gestazione. In questa fase cruciale, lo sviluppo di molti tessuti è regolato da ormoni steroidei endogeni insieme ad altri fattori endocrini e paracrini. Esperimenti di laboratorio hanno dimostrato che l'esposizione fetale a agli xenoestrogeni può profondamente alterare la differenziazione degli organi (Gray et al., 1992), poiché questi possono agire come agonisti o antagonisti dell'attività ormonale. Gli organi che sembrano essere particolarmente a rischio di anomalie dello sviluppo nella prole, a causa di un'esposizione materna a queste sostanze chimiche sono quelli con i

recettori per gli ormoni steroidei: nei feti femminili questi includono, le ghiandole mammarie, le tube di Falloppio, l'utero, la cervice e la vagina, e nei feti maschi comprendono la prostata, le vescicole seminali, l'epididimo e i testicoli. In entrambi i sessi anche il cervello, lo scheletro, la tiroide, il fegato, il rene, ed il sistema immunitario sono dei bersagli per l'azione degli ormoni steroidei e appaiono, quindi, potenziali bersagli per le sostanze chimiche che interferiscono con il sistema endocrino, considerando che queste possano agire come agonisti e antagonisti ormonali, nei diversi tessuti bersaglio. Si ritiene generalmente che, dopo la maturità, l'esposizione ad interferenti endocrini non alteri in modo permanente il funzionamento dei tessuti ormono-sensibili. Studi sperimentali su animali, al contrario, hanno evidenziato modifiche permanenti nel cervello (Brawer et al., 1978) e nell'epitelio vaginale (Adler et Nelson, 1988) nelle donne e nella prostata nei maschi (DeKlerk et al., 1979), dopo la somministrazione di sostanze estrogeno-simili in età adulta. Esiste, dunque, la possibilità che, bassi livelli di esposizione cronica a sostanze chimiche estrogeniche dopo la maturità, possano avere effetti sugli esseri umani simili a quelli osservati negli animali di laboratorio, a cui sono stati somministrati gli estrogeni. Molti composti ad interferenza endocrina rilasciati nell'ambiente, inoltre, sono potenzialmente genotossici, in grado, cioè, di interagire con il materiale genetico, come il dietilstilbestrolo e il bisfenolo A, responsabili di danni al DNA osservati attraverso l'utilizzo di test *in vivo/vitro* (Iso et al., 2006).

Da alcuni anni i possibili effetti degli IE sull'organismo umano o sulla sua progenie sono oggetto di notevole attenzione da parte della comunità scientifica e politico-amministrativa. Fino ad oggi, in base alle osservazioni raccolte sull'uomo e negli animali, l'attenzione è particolarmente rivolta verso effetti degli IE sugli ormoni steroidei prodotti dalle gonadi (estrogeni ed androgeni) che agiscono insieme ad altri ormoni sulla riproduzione, sul comportamento sessuale, sulla differenziazione, sullo sviluppo e sulla maturazione fetale, oltre che sul sistema immunitario e sul metabolismo in generale. Recentemente è stato osservato che gli IE possono agire anche sulla funzione tiroidea, soprattutto per quanto riguarda il suo ruolo nei processi di sviluppo.

1.7.1 Effetti sull'apparato riproduttivo umano

Negli ultimi decenni si è assistito, in alcuni Paesi, ad un aumento dell'incidenza di tumori testicolari e di alcune anomalie del tratto genitale maschile, quali il criptorchidismo (mancata discesa di uno o entrambi i testicoli nella borsa scrotale) e l'ipospadia (anomalia congenita del pene dovuta ad un insufficiente sviluppo dell'uretra) (Sultan et al., 2001) e un declino

nella qualità dello sperma. Una metanalisi eseguita nel 1992 (Carlsen, 1992) relativa a 62 ricerche sulla qualità dello sperma ha, infatti, evidenziato un calo del 40% del conteggio degli spermatozoi dal 1940 al 1990. È stata avanzata l'ipotesi che questi cambiamenti possano essere stati causati da un aumento del livello di IE ad azione estrogeno-simile nell'ambiente, sebbene non sia stata confermata in tutte le aree indagate (Auger, 1995). Le basi biologiche per un possibile ruolo degli xenoestrogeni nelle disfunzioni del tratto genitale maschile risiedono nel fatto che il livello degli estrogeni regola la produzione dell'ormone FSH (follicolo-stimolante), il quale, a propria volta, controlla la proliferazione e la funzione delle cellule di Sertoli coinvolte nel processo di spermatogenesi e regola la secrezione dell'ormone antimulleriano, essenziale per lo sviluppo dell'organo sessuale maschile.

Un aumento del livello di estrogeni nel circolo materno-fetale provoca una diminuzione della secrezione di FSH e una conseguente riduzione nella produzione di androgeni.

Un'alterata secrezione dell'ormone antimulleriano, invece, è associata all'insorgenza di criptorchidismo e alla proliferazione di cellule germinali.

Alcune indagini (Garcia-Rodriguez, 1996; Weidner, 1998) hanno individuato una correlazione significativa tra l'insorgenza di criptorchidismo e l'esposizione materna ad antiparassitari, seppur non sempre confermata (Restrepo, 1990). Gli effetti sull'apparato riproduttivo femminile sono stati argomentati più volte nel corso della tesi; uno dei casi più famosi fa riferimento alle disfunzioni degli organi riproduttivi in conseguenza alla somministrazione di DES. Diversi studi, tuttavia, mettono in luce una possibile connessione tra l'esposizione ad alcuni IE ambientali e le alterazioni della funzione ovarica.

1.7.2 Effetti cancerogeni nell'uomo

Alcuni interferenti endocrini possono essere considerati potenziali composti ad attività genotossica, mutagena o cancerogena (DES, BPA, DDT) in quanto possono contribuire, nella donna, all'insorgenza di tumori mammari e dell'apparato riproduttivo, mentre nel maschio possono aumentare l'incidenza di forme tumorali al testicolo e alla prostata. Il tumore mammario, la più frequente neoplasia maligna nelle donne (Parkin et al. 2001), è causato dall'interazione di una serie numerosa di fattori endocrini. Gli estrogeni ed il progesterone, oltre ad influenzare la proliferazione cellulare nel tessuto mammario in condizioni fisiologiche, possiedono un ruolo primario anche nello sviluppo e nella progressione della neoplasia. Indagini condotte *in vitro* hanno rilevato che E2 stimola la

proliferazione di colture cellulari di adenocarcinoma mammario, particolarmente responsive agli estrogeni, in quanto esprimono il recettore ER α .

Negli anni 1992-1993, due studi effettuati in Connecticut e New York hanno riportato in pazienti con cancro mammario, concentrazioni elevate di PCB e DDE (Falck e Ricci, 1992; Wolff et al, 1993). Osservazioni simili hanno permesso ipotizzare una possibile correlazione tra l'esposizione ad alcuni xenoestrogeni, come i PCB e il DDE e l'insorgenza del tumore mammario (Davis et al, 1993). Sulla base di queste considerazioni, successive indagini condotte su cellule MCF-7 umane di adenocarcinoma mammario in coltura hanno contribuito a rilevare i potenziali effetti genotossici di diverse sostanze ad interferenza endocrina, tra cui esaclorobenzene, PCBs, BPA, cadmio, pesticidi organoclorurati (p,p - DDD p,p -DDE o,p -DDE aldrin dieldrin), ecc (Bradlow et al, 1995).

Studi condotti su animali *in vivo* hanno permesso di riconoscere anche una possibile associazione tra diversi IE, (PCB, cadmio, arsenico, BPA) e lo sviluppo del tumore alla prostata. In molti paesi occidentali il carcinoma prostatico rappresenta il secondo tumore più frequente tra gli uomini, ma le cause del tumore sono in gran parte sconosciute. Negli USA l'esposizione a diversi fattori ambientali, dal 1947 al 1981, è stata associata anche ad un aumento dell'incidenza del cancro dei testicoli (Brown, 1986). Anche nei Paesi del Nord Europa, dal 1940 al 1990, è stato rilevato un aumento significativo dei casi di tumore testicolare (Moller, 1993). Questo trend è stato messo in relazione con l'esposizione, durante fasi precoci dello sviluppo, ad estrogeni ambientali e/o antiandrogeni (Skakkebaek et al. 2001) come dimostrato da uno studio condotto su 3613 uomini, che ha individuato una correlazione tra l'esposizione prenatale al DES e l'insorgenza del cancro ai testicoli (Strohsnitter et al. 2001).

Una recente indagine ha, inoltre, dimostrato che E2 ha la capacità di alterare i profili di espressione genica nel testicolo di topo durante le fasi precoci dello sviluppo (Lopez-Casas et al., 2010).

1.7.3 Periodi critici di esposizione

Come è stato anticipato e documentato più volte all'interno della presente tesi, l'età e lo stadio di sviluppo di un organismo possono modificare in maniera significativa gli esiti tossicologici derivanti dall'esposizione ai diversi contaminanti chimici, risultando in effetti differenti a seconda del periodo di sviluppo in cui avviene l'esposizione. Esistono, infatti, dei periodi definiti "finestre critiche" in cui lo sviluppo del sistema riproduttivo è

maggiormente vulnerabile ad eventuali influssi di agenti esterni. Tali periodi corrispondono a degli intervalli di tempo limitati, caratterizzati da una serie di eventi particolarmente significativi per lo sviluppo morfologico e funzionale. Come è stato riportato nel paragrafo precedente, studi epidemiologici e test di laboratorio hanno comprovato che l'esposizione in utero ai contaminati ambientali sia correlata all'insorgenza di diverse forme di tumori ormono-dipendenti, durante l'infanzia e nel corso della vita adulta (Birnbaum e Fenton, 2002). Una spiegazione plausibile può essere che l'esposizione in fase adulta è compensata dai normali meccanismi omeostatici, al contrario, l'esposizione durante la fase di programmazione del sistema endocrino può causare danni irreversibili che si possono ripercuotere durante il corso della vita dell'individuo.

L'attenta valutazione dei rischi derivanti dall'esposizione a queste sostanze deve tenere conto di due ordini di problemi. Il primo è la messa a punto di sistemi sperimentali *in vitro* e *in vivo*, atti ad identificare con sufficiente sensibilità, oltre 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. Un altro problema da affrontare è quello di stabilire se nell'ambiente vi siano livelli di IE tali da esercitare effetti avversi sugli organismi esposti e sulla salute pubblica.

2 SCOPO DELLA RICERCA

Lo scopo del lavoro di tesi è quello di affrontare, in termini di ricerca e di analisi sperimentale, un problema ambientale emergente, quale la presenza di sostanze ad interferenza endocrina, nello specifico ad azione estrogeno-simile, in acque destinate al consumo umano, indagando, al contempo, i potenziali effetti precoci da esposizione a composti mutageno/cancerogeni, attraverso l'utilizzo di cellule MCF-7, linea cellulare epiteliale di adenocarcinoma mammario.

Presso i laboratori di fisiologia e biochimica ambientale della UOS di Ravenna del Dipartimento BiGeA, nell'ambito di un convenzione di ricerca con Romagna Acque-Società delle Fonti, sono state messe a punto due differenti tipologie di test biologici per valutare, da un lato, la presenza di xenoestrogeni (saggio E-Screen) e dall'altro di composti ad attività genotossica (test dei micronuclei) in acque prelevate prima e dopo i trattamenti di potabilizzazione. Le indagini biologiche permettono di rilevare degli effetti dati dall'esposizione ad una specifica sostanza o a una miscela ambientale.

Questa può essere costituita di sostanze non note e, quindi, non indagate dalle indagini chimiche, ma che esplicano tuttavia effetti significativi. Inoltre, in uno scenario ambientale reale, è necessario prendere in considerazione la molteplicità di interazioni e sinergismi tra composti chimici differenti, che le indagini chimiche di per sé non identificano. I test biologici non sono tuttavia in grado di fornire misure quantitative e informazioni sulle sostanze chimiche, ma nel caso di effetti significativi permettono di eseguire successivamente analisi chimiche in modo mirato.

3 METODICHE SPERIMENTALI

Il presente lavoro di tesi si basa sull'impiego delle cellule in coltura come modello biologico per valutare la qualità dell'acqua destinata al consumo umano.

Gli studi *in vitro* condotti su cellule in coltura, permettono di ridurre l'impiego di animali per studi *in vivo*. I vantaggi offerti dall'uso delle cellule in coltura sono la elevata capacità di riprodursi associata alla crescita pressoché indefinita, garantita dal mantenimento delle opportune condizioni di crescita.

3.1 LINEE CELLULARI MCF-7 DI ADENOCARCINOMA MAMMARIO

Le indagini biologiche sono state realizzate attraverso l'utilizzo di cellule MCF-7, impiegate presso il laboratorio di Fisiologia cellulare dell'Università degli Studi Roma Tre, diretto dalla professoressa Maria Marino, che ce ne ha gentilmente donata una parte.

La linea cellulare MCF-7 è una linea epiteliale di carcinoma mammario umano, isolata per la prima volta nel 1970, da una donna americana Caucasica di 69 anni.

MCF-7 è l'acronimo del Michigan Cancer Foundation - 7, istituto di Detroit (USA), dove la linea cellulare è stata coltivata e linearizzata nel 1973 da Herbert Soule e dai suoi collaboratori. Prima di allora, era cosa impensabile per un ricercatore nel campo della ricerca ottenere una linea di cellule mammarie, in grado di sopravvivere in coltura cellulare abbastanza a lungo, anche diversi mesi, da poter completare degli esperimenti di laboratorio *in vitro* (Soule et al., 1973).

Le caratteristiche principali delle MCF-7 sono quelle di avere le potenzialità di un carcinoma invasivo con:

- Presenza di recettori per gli estrogeni ER;
- Risposta proliferativa positiva agli estrogeni;
- Presenza di recettori progestinici;
- Potenziale tumorigenicità *in vivo* in presenza di estrogeni;
- Fenotipo di cellula epiteliale luminale (Lacroix et Leclercq, 2004).

Le cellule MCF-7 sono particolarmente responsive agli estrogeni, in quanto sovraesprimono entrambe le isoforme dei recettori per gli estrogeni.

La maggior parte delle linee contengono recettori α , alcune principalmente α e pochi β , pertanto, possono evidenziare, in maniera dose-dipendente, attività di tipo agonista cioè, induzione di proliferazione cellulare in risposta agli estrogeni, ma anche antagonista, quindi, antiproliferativa. L'esposizione di queste cellule ad estrogeni naturali come il 17β -estradiolo, ad estrogeni sintetici (17α -etinilestradiolo, estrone) oppure ad IE ad azione estrogenica come il Bisfenolo A induce, attraverso meccanismi sia genomici che non genomici, la proliferazione cellulare, che può essere facilmente misurata (Figura 3.1).

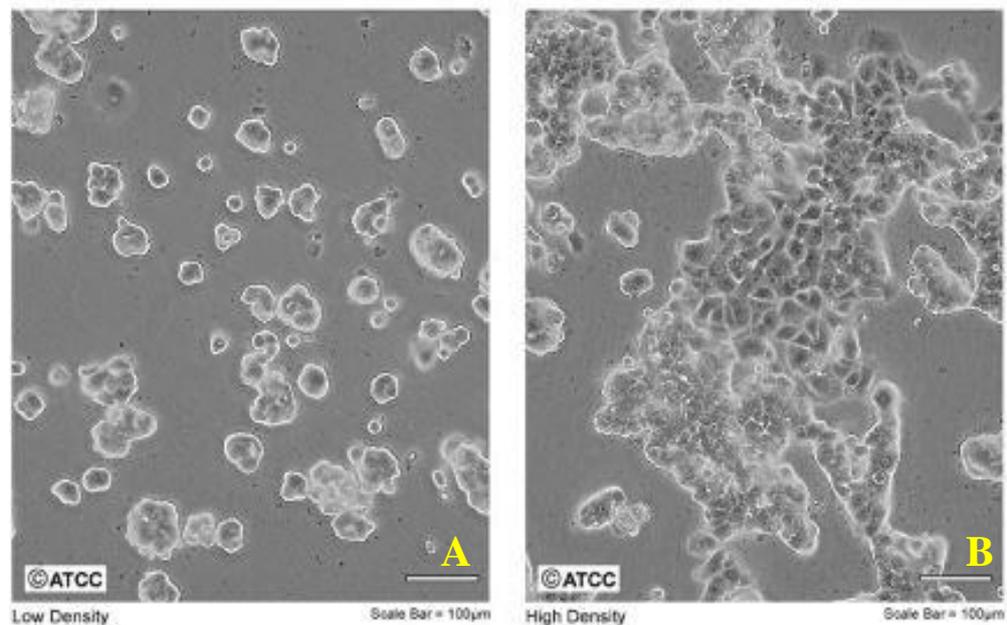


Figura 3.1. Cellule MCF-7 di controllo (A) e in presenza di estrogeni (B).

Le cellule MCF-7 sono, infatti, ritenute una linea cellulare di controllo positiva ai recettori per gli estrogeni (ER) (Levenson, 1997). La crescita delle cellule MCF-7 in coltura è inibita sia dal TNF alpha (Tumor necrosis factor), che da trattamenti con anti-estrogeni che modulano i fattori di crescita insulina-simili che legano le proteine. Per le caratteristiche sopracitate, la linea cellulare MCF-7 offre delle indiscusse potenzialità per indagare i complessi meccanismi che regolano le interazioni tra i recettori per gli estrogeni e le numerose molecole ad attività estrogenica, diffuse in ambiente a livello ubiquitario. L'elevata responsività agli estrogeni permette di valutare l'entità della proliferazione cellulare in relazione a concentrazioni diverse di una stessa molecola (E2, BPA), avendo la possibilità di ripetere più volte diverse condizioni sperimentali, che rispecchiano i possibili scenari di esposizione in ambiente. Le linee cellulari di adenocarcinoma mammario umano MCF-7 sono, probabilmente, il modello *in vitro* più diffusamente usato per valutare l'azione

estrogenica di farmaci e xenobiotici. Un potenziale vantaggio da valutare può essere costituito dal fatto che la linea MCF-7 esprime anche recettori nucleari per gli androgeni, progesterone, glucocorticoidi in aggiunta ai recettori estrogenici: pertanto, la possibilità di caratterizzare le attività di IE e loro miscele potrebbe essere più ampia, di quanto attualmente riconosciuto.

3.1.1 Congelamento e scongelamento delle linee cellulari

Il congelamento delle cellule è una fase molto delicata che permette di avere a disposizione uno stock di aliquote sempre pronte all'uso, preservando le caratteristiche cellulari originali che potrebbero altrimenti variare in seguito ad un mantenimento prolungato in coltura. Questa operazione, da eseguire periodicamente ogni due-tre mesi, permette di sostituire prontamente le cellule in uso, anche nel momento in cui le cellule venissero accidentalmente inquinate da un agente esterno. Le cellule vengono congelate in siero bovino fetale a cui è aggiunto DMSO al 10%, un agente crioprotettivo che impedisce alle cellule di subire danni da shock termico. Le provette crio-resistenti contenenti le cellule vengono trasferite in contenitori in polistirolo, allo scopo di garantire un congelamento graduale, e conservate a -80°C , per non oltre 6 mesi. Lo scongelamento delle cellule, al contrario del congelamento, è un'operazione che deve essere svolta molto rapidamente; le provette crio-resistenti contenenti le cellule vengono poste in bagno termostato a 37°C , per non più di 2 minuti. Si prelevano le cellule e si trasferiscono in una fiasca vuota a cui verranno aggiunti 20 mL di mezzo completo goccia a goccia per evitare che le cellule subiscano stress osmotico, muovendo continuamente la fiasca. Le cellule vengono lasciate crescere per 24 ore in un incubatore per permettere che aderiscano al fondo della fiasca, quindi il terreno di coltura viene eliminato e sostituito da quello fresco, al fine di eliminare completamente il DMSO che era stato aggiunto nella fase di congelamento, come agente crioprotettivo.

3.1.2 Condizioni colturali delle cellule MCF-7

Il terreno di coltura di base è una soluzione isotonica e tamponata in grado di fornire tutte le sostanze fondamentali per la sopravvivenza delle cellule.

Il pH del terreno deve essere compreso fra 7 e 7,4. Nel terreno è presente un indicatore di pH, il rosso fenolo, che in ambiente neutro è di colore rosso, in ambiente alcalino viola e giallo-arancio a pH acido. Con l'avanzare della proliferazione cellulare il terreno tende ad

acidificare perché al suo interno si accumulano ioni H^+ e cataboliti. Il terreno contiene un sistema tampone che in genere è quello carbonato/bicarbonato, in grado di garantire al pH condizioni di stabilità, in presenza di anidride carbonica 5%, almeno fino a quando non si verificano variazioni eccessive. Quando il terreno vira al giallo, l'acidità è troppo elevata e il terreno va sostituito. Le cellule MCF-7 sono state coltivate nel terreno di coltura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM-Sigma) con rosso fenolo 15 mg/L, addizionato di siero fetale bovino (FBS-Sigma) al 10%, amminoacidi non essenziali 1%, antibiotici streptomina/penicillina 1% e glutamina 1%, in un incubatore a 37°C in aria umida con il 5% di CO₂ in fiasche di plastica da 25 o 75 cm².

Nel termostato viene insufflata CO₂ fino al raggiungimento di una pressione parziale del 5% che viene impiegata per la regolazione del pH e una temperatura di 37°C in quanto ottimale per la crescita di cellule di mammifero. Per poter eseguire gli esperimenti di valutazione dell'attività estrogenica è necessario impiegare un terreno di coltura con due modifiche:

- Il siero deve aver subito un trattamento specifico (charcoal stripping, con carbone attivato) per ridurre la quantità di ormoni presenti;
- Il DMEM deve essere privo di rosso fenolo il quale possiede una debole attività estrogenica che potrebbe, pertanto, alterare l'attendibilità del segnale (Berthois et al., 1985).

Una delle necessità che presentano le cellule MCF-7, derivando da un tessuto solido, è di crescere aderendo ad un supporto. Per questo motivo tutti i supporti impiegati (fiasche, piastre e capsule di Petri) sono in polistirene, con una superficie trattata chimicamente, al fine di renderla idrofila e carica negativamente; su questa superficie si possono legare in modo assai stabile, anche se non covalente, fattori di adesione come la fibronectina e la vitronectina presenti nel siero bovino fetale. L'impiego di cellule aderenti richiede il periodico distacco delle cellule dalla fiasca di coltura, quando lo spazio loro a disposizione per crescere sia esaurito e le cellule si trovino così a confluenza, condizione nelle quale formano un monostrato che ricopre interamente la superficie di adesione. Dopo una prima fase di osservazione con il microscopio invertito per valutare se le cellule sono vicine alla confluenza, si esegue il distacco dalla fiasca con superficie di adesione di 75cm², tramite reazione con la tripsina, un enzima litico capace di degradare le proteine della matrice che mantiene le cellule aderenti, rompendo i legami tra le singole cellule e quelli che si formano tra la cellula e la parete trattata della fiasca. La prima operazione consiste, quindi, nello

svuotare la fiasca dai 20 mL di mezzo completo in cui le cellule sono cresciute fino a quel momento. La seconda operazione è il lavaggio delle cellule che si trovano adese sulla parete della fiasca con 10 mL di D-PBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline, soluzione tampone contenente KCl 2,67 mM, KH₂PO₄ 1,47 mM, NaCl 137,93 mM, Na₂HPO₄ 8,06 mM), allo scopo di allontanare ioni Ca²⁺ e Mg²⁺ contenuti nel mezzo completo, in quanto rappresentano due fattori indispensabili all'adesione, che inibiscono l'azione enzimatica della tripsina. La tripsinizzazione viene fatta con 2 mL di una soluzione di tripsina EDTA; per evitare danni alle cellule stesse la durata della reazione di tripsinizzazione non deve superare i 5-6 minuti, trascorsi i quali è possibile vedere le cellule ormai staccate scivolare lungo la parete della fiasca, quando questa viene mantenuta verticale. A questo punto è possibile scegliere la diluizione di semina opportuna, in base ai tempi previsti per i successivi esperimenti, avendo sempre cura di mantenere almeno una fiasca per il mantenimento della linea cellulare in coltura.

3.1.3 Semina per esperimenti

Per poter svolgere gli esperimenti sulle cellule in coltura, dopo la fase di tripsinizzazione dalle fiasche, una parte delle cellule viene seminata in piastre da 12 o 24 pozzetti, a seconda del quantitativo di cellule necessario per i saggi (Figura 3.2). In particolare, nel presente lavoro di tesi, nelle piastre da 24 pozzetti vengono seminate le cellule utilizzate per il saggio di proliferazione cellulare E-screen, mentre le piastre da 12 sono impiegate per il test dei micronuclei. Le piastre da 12 pozzetti vengono seminate aggiungendo 1 mL di cellule (ottenute dalla tripsinizzazione di una fiasca da 75cm², risospesa in 20 mL in mezzo completo) e 1mL di mezzo completo, mentre nelle piastre da 24 pozzetti si impiegano 500 µL di cellule e 500 µL di mezzo completo. Una volta seminate, si avvina per fare in modo che le cellule ricoprano l'intera superficie di adesione, e si pongono le piastre in incubatore (37°C, 5% CO₂) per uno o due giorni, così da permettere alle cellule di crescere nelle opportune condizioni.



Figura 3.2. Allestimento delle piastre cellulari.

3.2 E-SCREEN ASSAY O SAGGIO DI PROLIFERAZIONE CELLULARE

L'E-screen è un saggio biologico riconosciuto universalmente valido ed ampiamente utilizzato in diversi studi di letteratura (Korner et al., 1999; Bicchi et al., 2008), poiché permette di rilevare in tempi brevi e a costi ristretti la presenza di molecole estrogeniche in campioni sperimentali. Il test confronta la proliferazione delle cellule MCF-7 dopo cinque giorni di coltura in un mezzo deprivato di estrogeni, in presenza o assenza di diverse concentrazioni di E2 o dei campioni incogniti da testare (Soto et al., 1995). La proliferazione può essere valutata semplicemente mediante conta cellulare o, come nel presente lavoro, attraverso la determinazione della vitalità cellulare, mediante il test del MTT. Il saggio è estremamente sensibile anche a basse concentrazioni di E2 o di sostanze simil-estrogeniche ed è in grado di evidenziare l'attività estrogenica sia di un singolo composto che di miscele, richiedendo piccole quantità, e fornendo dei dati, il più delle volte, attendibili, accurati e ripetibili. Sebbene la semplicità di questo saggio biologico renda di relativa facilità la sua applicabilità, ci sono molti fattori, tuttavia, che possono interferire con il risultato. Fra questi, la differenza dei vari cloni di linee cellulari, le condizioni di coltura, le diverse modalità di valutazione della crescita cellulare, il lotto dei sieri utilizzati per le colture. Nello stesso siero fetale bovino utilizzato per la coltivazione delle cellule, sono stati identificati composti mitogeni capaci di incrementare la proliferazione cellulare e tutti questi elementi complicano la standardizzazione del test. L'applicabilità dell'E-screen a matrici complesse (ad esempio alimenti, campioni di tessuto) e/o a miscele presenti nell'ambiente e negli alimenti deve essere, comunque, ulteriormente elaborata per garantirne la ripetibilità.

L'attività sperimentale ha avuto come obiettivo iniziale quello di valutare la sensibilità e la specificità del saggio biologico, nel rilevare gli analiti scelti per la sperimentazione, anche in funzione del solvente (metanolo) adoperato per le soluzioni, mentre, in seconda battuta, l'applicabilità del test all'analisi dei campioni sperimentali di estratti di matrici acquose. Nello specifico, nel momento in cui le cellule vengono seminate nelle piastre è necessario stabilire, in base agli obiettivi della ricerca e al materiale biologico a disposizione, il numero di esperimenti da realizzare e le opportune condizioni sperimentali con cui si vogliono eseguire.

Un accurato disegno sperimentale risulta fondamentale in fase di messa a punto del metodo, per avere un'idea di quelli che potranno essere gli esiti sperimentali ed, inoltre, facilita, in fase di esperimento, le procedure e l'iter logico da seguire per completare i trattamenti. A partire dalla soluzione stock madre (E2, tamoxifene, BPA), vengono preparate delle

diluizioni seriali, scelte *ad hoc*, in base ai livelli di concentrazione di interesse. Come precedentemente accennato, le indagini preliminari sono servite per valutare il livello di sensibilità del nostro test, che ha portato alla costruzione di una curva standard di 17- β estradiolo in un intervallo di sette concentrazioni diverse (da 10^{-15} a 10^{-8} M) (Rapporti ISTISAN 11/18). L'estradiolo è la molecola di riferimento per quantificare le potenzialità estrogeniche/ antiestrogeniche dei diversi contaminanti ambientali. La valutazione di un campione, infatti, viene espressa in termini di Effetto proliferativo (Proliferative Effect, PE), ovvero il rapporto tra l'effetto massimo indotto dalla sostanza test e il controllo in assenza di E2.

$$PE = (\text{Effetto massimo della sostanza test}) / (\text{Controllo in assenza di E2})$$

Ulteriori parametri che caratterizzano l'estrogenicità di una molecola sono il Relative Proliferative Effect

$$RPE = 100 \times [(\text{PE} - 1) \text{ sostanza test}] / [(\text{PE} - 1) \text{ estradiolo}]$$

ed il Relative Proliferative Potency, inteso come il rapporto tra le dosi di E2 e di sostanza test in grado di produrre il PE max x100.

Nell'E-screen assay è impiegato, come controllo positivo di attività anti-estrogenica, il tamoxifene (TAM), il principio attivo di un noto farmaco antitumorale, che agisce legandosi al recettore ER, inibendo, quindi, il legame degli estrogeni e la conseguente proliferazione cellulare.

3.2.1 Condizioni di esposizione delle cellule

L'esposizione al Bisfenolo A, uno degli interferenti endocrini ad attività estrogenica maggiormente studiato e scelto come controllo positivo in diversi studi sperimentali, o ai campioni ambientali di acqua oggetto di indagine, è stata effettuata come di seguito descritto. Dalle cellule in coltura è stato rimosso il mezzo di crescita e sostituito con l'opportuno trattamento. Gli estratti dei campioni di acqua sono stati utilizzati a due diverse concentrazioni, 20x e 200x, come indicato nei risultati. Gli effetti dell'estradiolo sulla crescita cellulare sono stati valutati ad una concentrazione di E2 10^{-9} M, mentre gli effetti inibitori del TAM sono stati indagati ad una concentrazione di 10^{-7} M. Le cellule in presenza di E2/campione da saggiare sono trasferite in incubatore per 5 giorni, tempo di esposizione necessario per rilevare gli effetti estrogenici.

3.2.2 Test di vitalità (MTT)

Il test di vitalità MTT è un test quantitativo colorimetrico che permette di stimare il numero di cellule aventi ancora attività mitocondriale, che quindi sono vitali. Si basa sull'impiego di un indicatore metabolico, l'MTT (3-(4,5-dimetiltiazolo-2-il)2-5-difeniltetrazolio bromuro), un sale solubile di tetrazolio che, nelle cellule vitali, è ridotto nel mitocondrio ad opera dell'enzima succinato deidrogenasi, a formare un cristallo insolubile (formazano) in acqua, di color viola; la quantità di formazano prodotta è proporzionale al numero di cellule vive presenti in coltura e viene quindi utilizzata come misura della vitalità cellulare.

I cristalli, solubilizzati in una soluzione di isopropanolo acidificato, sono quantificati con modo colorimetrico alla lunghezza d'onda di 570 nm (assorbanza del colorante ridotto) con correzione di background a 650 nm. La reazione può avvenire solo nelle cellule metabolicamente attive e il valore dell'assorbanza, ottenuta mediante lettura spettrofotometrica, può essere correlata al quantitativo di cellule vitali presenti, risultando quindi maggiormente informativa, attendibile e riproducibile rispetto alla semplice conta cellulare. Il protocollo prevede che i pozzetti in cui sono stati fatti crescere le cellule siano svuotati, in sterilità, dal mezzo di coltura e addizionati con 1 mL di una soluzione di MTT 0,5 mg/ml ottenuta diluendo 10 volte la soluzione madre di MTT, in DMEM senza rosso fenolo. Le piastre sono trasferite in incubatore a 37°C per 1,5 ore. Trascorso tale periodo, si rimuove la soluzione di lavoro e si aggiunge 1 mL per pozzetto di isopropanolo acidificato (HCl al 37% (Sigma) 332 µL e Isopropanolo (Sigma) 100 mL), allo scopo di rompere le membrane cellulari e solubilizzare il formazano (Figura 3.3). Le letture vengono effettuate a 570 nm contro bianco di HCl/isopropanolo utilizzando uno spettrofotometro multicuvetta (Beckman Coulter DU800). Prove preliminari sono state effettuate in cellule coltivate in piastre da 96 pozzetti, anche se in queste condizioni l'effetto proliferativo (PE) massimo indotto da E2 è risultato molto variabile rispetto a quello osservato nelle piastre da 24 pozzetti, scelte quindi come supporto per questo saggio.



Figura 3.3. Saggio MTT.

3.3 TEST DEI MICRONUCLEI

Le cellule MCF-7 sono state impiegate anche per la rilevazione degli effetti genotossici; sulla base di un protocollo sperimentale (Fenech, 2000), nel presente lavoro di tesi, è stato adattato e messo a punto il test dei micronuclei (MN) sulle cellule MCF-7, allo scopo di rilevare l'insorgenza di danni genetici, sotto forma di piccoli addotti di DNA, in seguito all'esposizione a composti genotossici. Questo test di mutagenesi permette di valutare, *in vitro*, la genotossicità di sostanze sia singole, che in miscela complessa. Per la gravità e irreversibilità degli effetti genetici, la verifica dell'attività genotossica è un elemento fondamentale nella valutazione del rischio delle sostanze chimiche. I MN sono piccoli nuclei addizionali che si formano durante l'anafase dalla condensazione di frammenti cromosomici acentrici o da cromosomi interi che non sono incorporati nei nuclei principali delle cellule figlie. Essi appaiono come dei piccoli nuclei accessori, morfologicamente identici a quelli normali (tondi), ma di dimensioni notevolmente ridotte (non devono superare un terzo delle dimensioni del nucleo principale). Responsabili della formazione di MN sono due diversi tipi di danno genetico:

- La frammentazione di cromosomi ad opera di agenti clastogeni;
- Il danneggiamento del fuso mitotico o del centromero di cromosomi interi da parte di agenti aneuploidizzanti.

I micronuclei contengono frammenti acentrici (meccanismo clastogeno) o interi cromosomi (meccanismo aneuploidogeno), in ritardo migratorio, durante l'anafase. La formazione di micronuclei avviene in seguito ad un danno al DNA a livello cromosomico e l'aumento della frequenza di micronuclei è ritenuto un biomarcatore per la valutazione degli effetti precoci da esposizione a composti mutageno/cancerogeni. La tecnica, messa a punto già nel 1975 (Schmid, 1975) nei linfociti di sangue periferico, presentava tuttavia una serie di limiti:

- Una cellula che ha subito un danno a carico del DNA può esprimere questa condizione sotto forma di micronucleo solo se ha completato un ciclo mitotico dopo l'insulto genotossico;
- Il livello di MN osservato in una popolazione in divisione dipende dalla proporzione di cellule che si dividono;
- La frequenza di MN diminuisce se la cellula va incontro a più divisioni mitotiche dopo l'insulto genotossico (Castello et Silvestri, 1999).

Di conseguenza, è possibile confrontare due popolazioni cellulari per la frequenza di micronuclei solo in cellule che si trovano alla prima/seconda divisione cellulare, cosa che fu resa possibile grazie all'introduzione della citocalasina B, una tossina inibitrice della citodieresi (Fenech, 2000). La citocalasina B consente una più accurata identificazione dei MN, in quanto permette di riconoscere le cellule che sono andate incontro ad una sola divisione, rispetto a quelle che non si sono divise affatto o si sono divise due o più volte. Essa, infatti, inibendo la formazione dell'anello di microfilamenti che separa il citoplasma tra i nuclei figli durante la citochinesi, permette l'accumulo di cellule binucleate. E' stato, pertanto, studiato se la citocalasina B potesse avere qualche effetto nell'influenzare la formazione di micronuclei, risultando, al contrario, perfettamente in linea con i controlli (Garriot et al., 2002; Lorge et al., 2006). Il test dei MN per la sua estrema semplicità, riproducibilità ed efficacia nel rilevare gli effetti genotossici nelle cellule esposte è stato inserito nelle linee guida OECD (Test del micronucleo in cellule di mammifero *OECD 487*). Per le acque potabili, tuttavia, non c'è un protocollo standardizzato da applicare sui sistemi biologici di interesse. Sulla base dei protocolli sperimentali precedentemente citati, nel presente lavoro di tesi è stato messo a punto un metodo che fosse applicabile per i campioni di acqua sperimentale, adattandolo alle cellule MCF-7. Il saggio prevede l'esposizione per 48 ore all'opportuno campione da saggiare quindi l'aggiunta, per ogni pozzetto, 2µg/mL di citocalasina B (Sigma), diluendo 1000 volte in mezzo di coltura una soluzione madre di citocalasina in DMSO. Dopo 24 ore è stato possibile procedere con l'allestimento dei vetrini, procedura che ha previsto:

- La rimozione del mezzo mediante pipetta Pasteur;
- Il lavaggio dei pozzetti con 1 mL di PBS;
- Il trattamento con 300 µL di tripsina (5 minuti), per staccare le cellule dalla superficie di adesione;
- L'aggiunta di 300 µL di mezzo completo, allo scopo di bloccare l'azione della tripsina;
- La semina dei vetrini con 300 µL di cellule in sospensione (in questo modo un singolo pozzetto possono essere allestiti due vetrini);
- Il posizionamento dei vetrini in camera umida al buio per 15 minuti, seguiti da ulteriori 10 minuti all'aria;
- L'aggiunta di 200 µL di soluzione Carnoy, un agente fissativo costituito da 3 parti di metanolo più una parte di acido acetico;
- Il congelamento in freezer a -20 °C fino ad analisi.

I vetrini che sono stati preparati, avendo l'accortezza di riportare su ciascuno di essi una sigla o un codice di riferimento che garantisca l'identificazione univoca del tipo di trattamento.

La colorazione viene effettuata con l'utilizzo di DAPI o 4',6-diamidin-2-fenilindolo, un colorante organico fluorescente che lega fortemente regioni del DNA ricche in sequenze A-T (Figura 3.4).

La fluorescenza emessa nel blu consente di evidenziare il nucleo delle cellule, grazie all'utilizzo di un microscopio a fluorescenza dotato di lampada a vapori di mercurio.

A partire da soluzioni madri conservate a -20°C , è stata preparata una soluzione d'uso alla concentrazione finale di 250 ng/ml da tenere in frigorifero, al buio. Per la colorazione di un singolo vetrino è necessario:

- Aggiungere 200 μL di soluzione di DAPI, avendo cura di coprire l'intera superficie del vetrino e lasciando al buio per 5 minuti;
- Sciacquare il vetrino in acqua da rubinetto e in acqua deionizzata;
- Lasciare asciugare il vetrino sotto cappa aspirante.

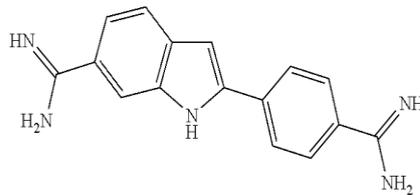


Figura 3.4 Molecola di DAPI.

L'analisi è stata realizzata grazie all'utilizzo di un microscopio a fluorescenza (NIKON "Eclipse" Mod. 80i) (Figura 3.5), sfruttando l'elevata capacità di risoluzione di un obiettivo ad immersione 100x (Figura 3.6). Il termine "ad immersione" è giustificato dal fatto che l'obiettivo progettato allo scopo, lavora correttamente quando è a contatto con una piccola goccia d'olio a immersione che è interposta tra l'obiettivo stesso ed il preparato da osservare. La goccia di olio crea un canale unico con lo stesso indice di rifrazione tra il vetrino e l'obiettivo, in cui la luce non viene dispersa per riflessioni indesiderate; in queste condizioni l'obiettivo rende al massimo in termini di risoluzione e nitidezza.



Figura 3.5. Microscopio a fluorescenza.

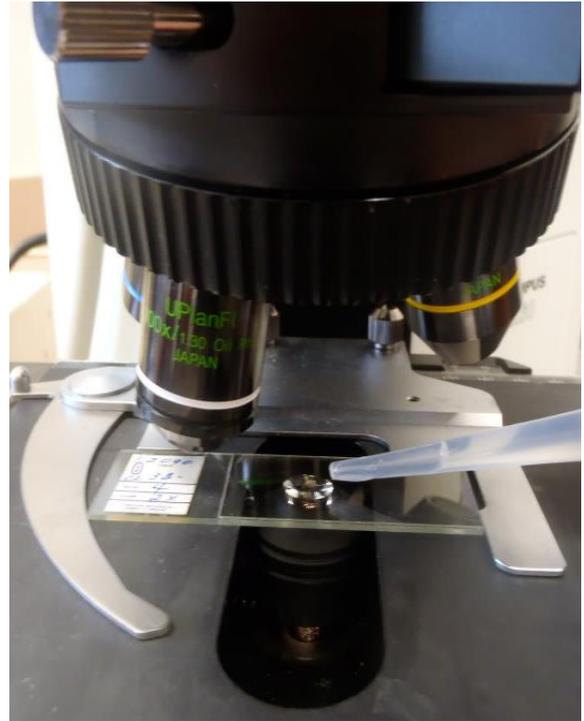


Figura 3.6. Obiettivo 100x a immersione.

Per entrare nel cuore dell'indagine genotossica, l'analisi ha previsto che, per ciascun campione, siano osservate almeno 1.000 cellule binucleate con citoplasma integro, utilizzando criteri standardizzati per il riconoscimento delle cellule binucleate e dei micronuclei, oltre che dei ponti nucleoplasmatici e delle cellule in fase di apoptosi e necrosi (Fenech M, 2000) (Figura 3.7) Per le cellule binucleate, in particolare, valgono i suddetti criteri:

- Le cellule devono avere due nuclei;
- I due nuclei devono avere membrane nucleari intatte e devono trovarsi all'interno della stessa membrana plasmatica;
- I due nuclei devono essere approssimativamente uguali in dimensioni, pattern di colorazione ed intensità di colorazione;
- I due nuclei possono toccarsi ma non sovrapporsi (a meno che non siano ben visibili i confini dei due nuclei);
- I due nuclei possono essere attaccati da un ponte citoplasmatico, non maggiore di $\frac{1}{4}$ del diametro del nucleo;
- La membrana citoplasmatica in cellule binucleate deve essere intatta e ben distinguibile da quella delle cellule adiacenti.

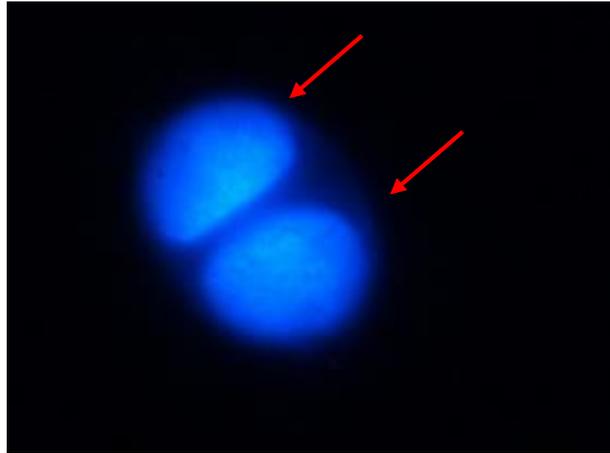


Figura 3.7. Cellula binucleata, le frecce rosse indicano i nuclei.

Nello specifico, esistono anche dei criteri piuttosto precisi per l'identificazione dei micronuclei:

- Il diametro dei micronuclei deve essere più piccolo di $1/3$ del diametro del nucleo principale;
- I micronuclei devono essere sullo stesso piano ottico del nucleo principale;
- I micronuclei possono essere tondi o ovali;
- I micronuclei non devono essere connessi al nucleo;
- I micronuclei possono toccarsi, ma non sovrapporsi, e devono avere confini bene definiti;
- La struttura della cromatina deve essere simile a quella del nucleo principale (Figura 3.8).

L'esistenza di queste regole, tuttavia, non esclude la possibilità di incorrere in errori di valutazione, considerato il fatto che, spesso, la lettura al microscopio risente di interpretazioni soggettive, le quali possono essere superate, o quanto meno, "normalizzate", con la maturata esperienza dell'operatore nella lettura dei vetrini. Operazione preliminare è stata quella di costruire una database di controllo costituito da un certo numero di repliche di vetrini non trattati, allo scopo di ottenere il dato di frequenza della comparsa spontanea di micronuclei in cellule non esposte ad agenti mutageni. Nel corso della nostra analisi, è stato inoltre utilizzato il bisfenolo A, allo scopo di avere un controllo positivo che desse effetti genotossici in misura rispetto alla condizione di non trattamento.

Ogni esperimento è stato effettuato in quadruplicato e all'interno di ogni esperimento sono state contate 1000 cellule binucleate.

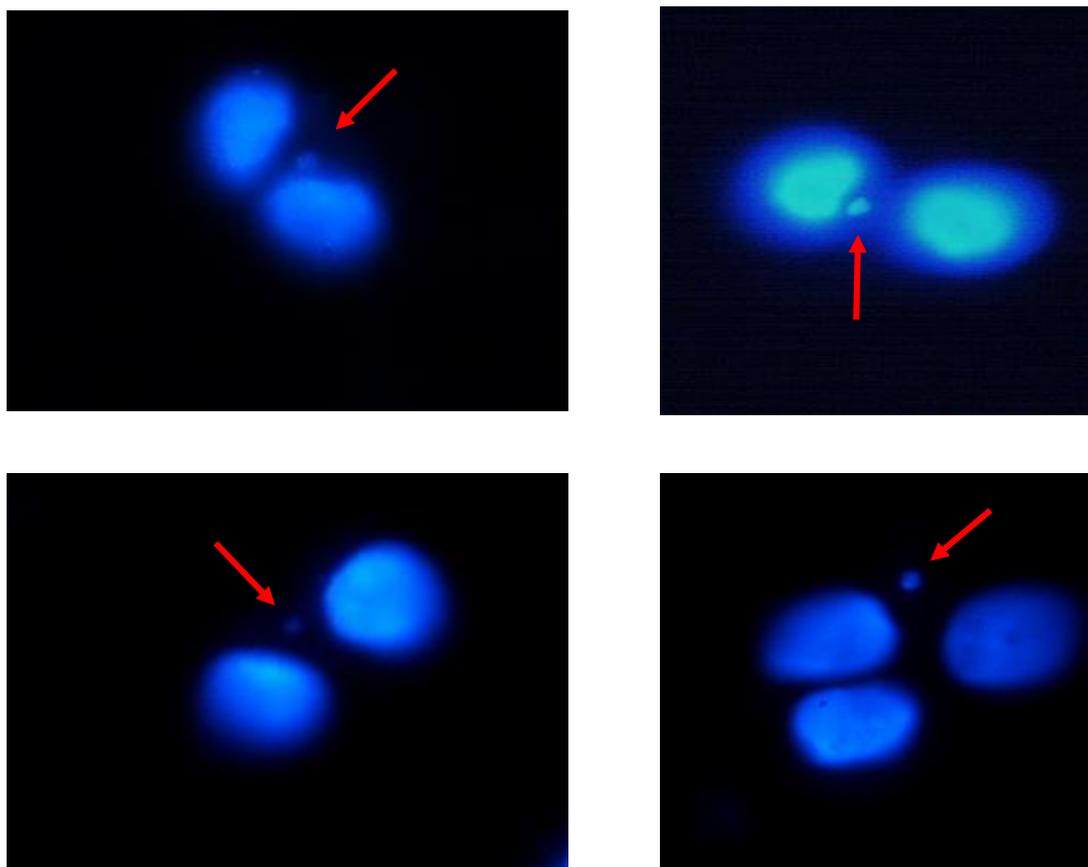


Figura 3.8. Cellule binucleate e micronuclei indicati mediante una freccia rossa.

3.4 ANALISI STATISTICA DEI DATI

Per ogni sito ambientale da saggiare sono stati analizzati due campioni da un litro di acqua, e dopo concentrazione opportuna, sono stati condotti due esperimenti indipendenti, impiegando ogni eluato. I dati sperimentali sono stati quindi ottenuti dalla replica di quattro esperimenti indipendenti (N=4). I dati degli esperimenti di E-screen sono espressi come media \pm errore standard (ES) e sono ricavati da almeno 4 esperimenti indipendenti, come indicato in legenda delle figure, ciascuno saggiato in triplicato. I dati degli esperimenti del test dei MN sono espressi come media \pm deviazione standard (DS) e sono ricavati da almeno 4 esperimenti indipendenti, come indicato in legenda dalle figure, contando 1000 cellule binucleate per ogni esperimento. La significatività dei risultati è stata valutata grazie al programma Sigma Plot (ver 13, Systat Software Inc.) mediante ANOVA ad una via, seguita da test di Dunnet. Le differenze tra i dati sono state considerate significative per valori di $p < 0,05$ e altamente significative per $p < 0,01$. La curva di attività estrogenica dell'estradiolo

è stata ottenuta interpolando i punti sperimentali con l'equazione di Hill a quattro parametri, presente nella libreria di funzioni presenti in Sigma Plot 13, grazie alla quale è stato ricavato il valore di EC50 (la concentrazione di estradiolo alla quale si ha metà del PE massimo).

3.5 DESCRIZIONE DEI SITI CAMPIONATI

Campionamento di Aprile

- Campioni di acqua grezza e in uscita dall'impianto di potabilizzazione di Capaccio;
- Campioni di acqua grezza e in uscita dal potabilizzatore NIP 1;
- Campioni di acqua provenienti dall'invaso di Ridracoli;
- Campioni di acqua di galleria di gronda del Fiumicello Bidente che sfocia a Ridracoli;
- Campioni di Controllo acqua oligominerale.

Campionamento di Luglio

- Campioni di acqua grezza in entrata dal potabilizzatore NIP2;
- Campioni di acqua dopo trattamento di ultrafiltrazione;
- Campioni di acqua dopo trattamento di perossidazione;
- Campioni di acqua in uscita dall'impianto NIP2;

Campionamento di Settembre

- Campioni di acqua grezza e in uscita dall'impianto di potabilizzazione di Capaccio;
- Campioni di acqua grezza e in uscita dal potabilizzatore NIP 1;

CAPACCIO

L'impianto di potabilizzazione di Capaccio è situato a pochi chilometri a valle del bacino di Ridracoli, ad appena 2 km da Santa Sofia. L'impianto è alimentata dall'acqua che viene da Ridracoli ed è in grado di garantire una portata nominale di 3.000 L/s.

RIDRACOLI

La diga di Ridracoli, che si trova all'interno del Parco delle Foreste Casentinesi fornisce una grande quantità di acqua di elevata qualità, producendo mediamente la metà del fabbisogno idropotabile complessivo della Romagna.

FIUME BIDENTE

Il fiume Bidente nasce dall'Appennino tosco-romagnolo nei pressi del Monte Falterona. Esso ha origine da tre corsi d'acqua: il Bidente di Corniolo, che nasce dalla confluenza di due rami provenienti da poggio Scali e dal Passo della Calla; il Bidente di Ridracoli (sito in cui è avvenuto il campionamento), che nasce dalla confluenza di diversi rami secondari e che si unisce al Bidente di Corniolo all'altezza di Isola; il Bidente di Pietrapazza che nasce dal Passo dei Mandrioli e si unisce agli altri due rami pochi chilometri a monte di Santa Sofia (Figura 3.9).

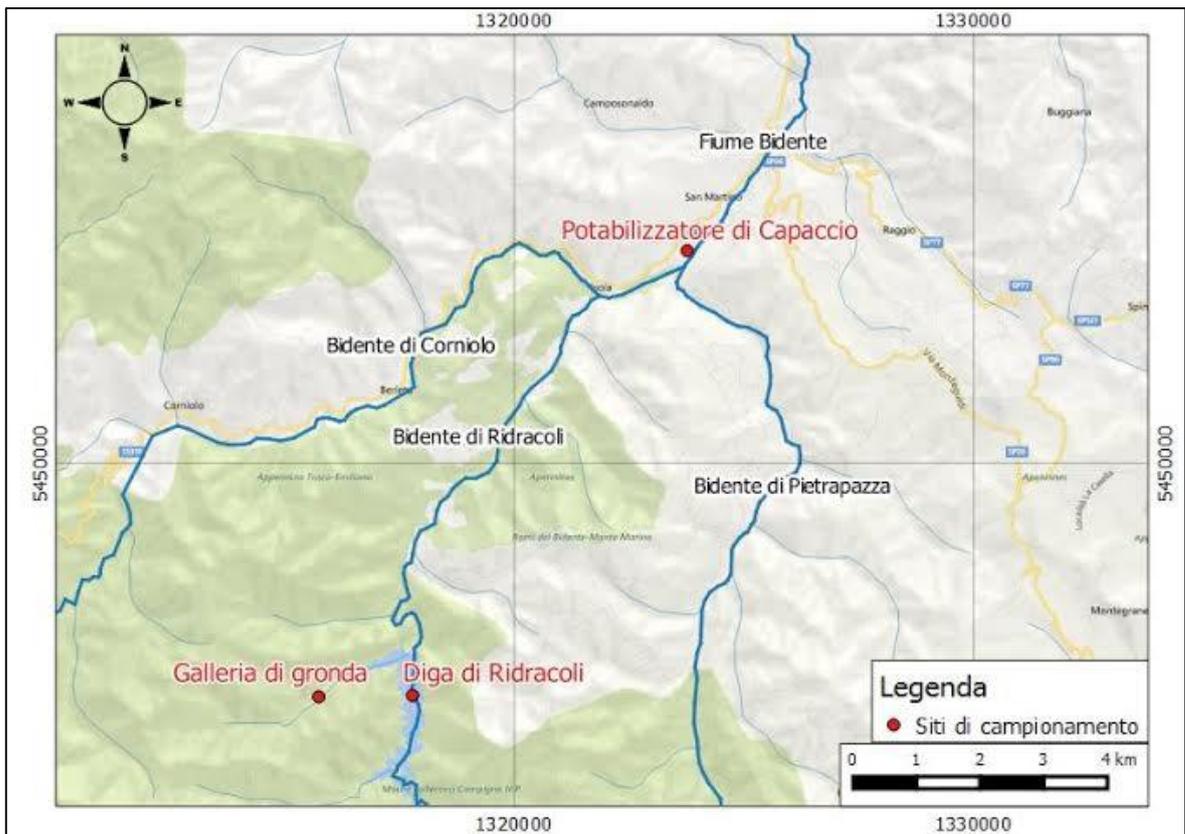


Figura 3.9. Siti di campionamento.

NIP1

L'impianto di potabilizzazione di Ravenna (NIP1) permette di alimentare in maniera autonoma, per quasi tutto l'arco dell'anno, la rete di distribuzione del Comune di Ravenna. Le possibili fonti di approvvigionamento di acqua grezza dell'impianto di potabilizzazione NIP1, situato in zona Bassette, sono il fiume Lamone, il fiume Reno e il fiume Po (mediante il CER - Canale Emiliano Romagnolo). Il ciclo di produzione dell'acquapotabile prevede il prelievo di acqua grezza dai fiumi Lamone, Reno e, all'occorrenza, dal Canale Emiliano Romagnolo, la sua potabilizzazione e la successiva immissione nella rete di distribuzione da Hera.

NIP 2

Inaugurato il 25 settembre 2015, il potabilizzatore NIP 2 rende disponibile alla Romagna una rilevante quantità di risorsa, per almeno 20 milioni di metri cubi annui potenziali. L'impianto è alimentato con acqua del Po proveniente da una derivazione del Canale Emiliano-Romagnolo (Figura 3.10).

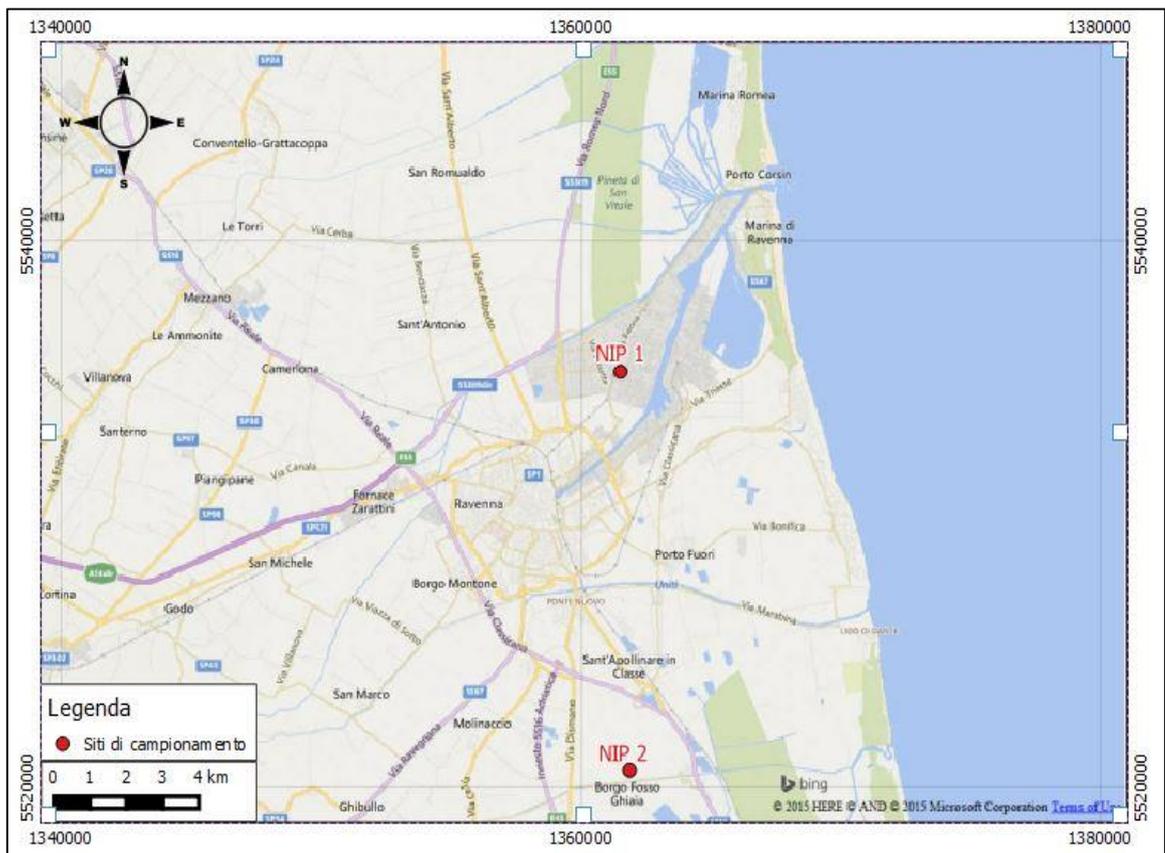


Figura 3.10. Siti di campionamento.

3.5.1 Procedura di campionamento

Elemento comune alle diverse tipologie di campionamento deve essere l' idoneità dei contenitori utilizzati per la raccolta e il trasporto dei campioni, i quali non devono alterare quei parametri di cui deve essere effettuata la determinazione, in particolare:

- Non devono cedere o adsorbire sostanze, alterando la composizione del campione;
- Devono essere resistenti ai vari costituenti presenti nel campione;
- Devono garantire la perfetta tenuta, anche per i gas disciolti e per i composti volatili, ove questi siano oggetto di determinazioni analitiche.

In funzione della natura dell'analita, della tipologia di analisi e della tecnica analitica adottata si dovrà, quindi, eseguire il prelievo utilizzando i contenitori di materiale adeguato, che saranno stati precedentemente sottoposti a pulizia ordinaria e/o seguendo, ove indicato, procedure specifiche richieste dal metodo analitico (Rapporti ISTISAN 07/31). Il materiale più usato per i contenitori è generalmente la plastica, che presenta il vantaggio di essere leggera, economica e resistente all'urto. Il polietilene, in particolare, presenta il vantaggio di essere più resistente agli agenti chimici ed alle variazioni termiche oltre che a possedere una buona resistenza all'urto. In base a quanto detto fino ad ora, è intuibile che la fase pre-analitica, raccolta del campione, trasporto e sua conservazione, incida, in misura non trascurabile, sull'incertezza totale del risultato dell'analisi, diventando quindi strumento indispensabile per ottenere risultati analitici attendibili e affidabili. La matrice acqua costituisce un elemento di relativa facile manipolazione a livello analitico, ma le sue caratteristiche chimico-fisiche-microbiologiche, specifiche per ogni tipologia, possono costituire fonte di instabilità quali-quantitativa dei suoi costituenti. All'interno di un programma di controllo di qualità, è importante che ogni singolo fattore che potenzialmente ha influenza sul processo di campionamento e, di conseguenza, sul risultato finale sia identificato e, coerentemente, vengano adottate le misure di controllo più idonee (ISTISAN 07/5). Il prelievo per l'analisi dei campioni sperimentali è stato eseguito utilizzando contenitori in polietilene, prelevando, per le analisi biologiche, 2 bottiglie da 1 L per sito di campionamento (Figura 3.11). Ogni campione deve riportare un'etichetta identificativa indelebile che lo renda univocamente identificabile, in modo da non incorrere in errori di identità del campione. I campioni sperimentali su cui sono state svolte le analisi riguardano le acque superficiali, in entrata e in uscita, da alcuni potabilizzatori dislocati nel territorio romagnolo (Ravenna, Forlì-Cesena), che sono stati raccolti nell'arco di cinque mesi, in aprile, luglio e settembre.



Figura 3.11. Bottiglia in PE.

3.5.2 Conservazione dei campioni

In laboratorio i campioni vanno conservati ad una temperatura di refrigerazione compresa nell'intervallo tra 1 °C e 10 °C ed è importante che, tra il prelievo e l'analisi del campione, intercorra il minor tempo possibile, tenendo conto che questi si mantengono stabili per almeno 15 giorni.

3.5.3 Filtrazione primaria

La prima procedura analitica, una volta raccolti i campioni, è la filtrazione, operazione che permette la separazione fisica dei materiali grossolani e l'eliminazione di impurezze solide che potrebbero falsare o comunque ostacolare l'analisi dai campioni di acqua sperimentale. Il sistema di filtrazione utilizzato in laboratorio è costituito da una serie di specifici elementi:

- Bicchiere graduato;
- Pinza bloccante;
- Porta Filtro;
- Imbutto Büchner;
- Tubo di aspirazione;
- Beuta da vuoto.

Tutti i materiali, prima del loro uso, devono essere accuratamente lavati e risciacquati in successione con acqua di rubinetto, acqua demineralizzata e metanolo, onde evitare possibili contaminazioni.

La filtrazione può essere effettuata sia per semplice gravità che, come nel nostro caso, operando sottovuoto per velocizzare il procedimento, mediante

una pompa meccanica e l'impiego di vetreria a tenuta, oltre che l'adattamento della carta da filtro e un sistema che generi un vuoto non troppo spinto (Figura 3.12). Il campione di acqua sperimentale di 1L, una volta attivata la pompa che genera il vuoto, viene gradualmente versato all'interno del bicchiere graduato e fatto passare attraverso una carta filtrante, posizionata e adesa alla parete di un imbuto Buchner. In questa operazione, bisogna fare attenzione a non perdere del materiale, allestendo accuratamente l'unità filtrante, per assicurare una corretta tenuta. Il filtro, scelto in funzione del tipo e della qualità di filtrazione richiesta, ha una porosità tale da trattenere sulla propria superficie le particelle più grossolane contenute nella miscela. Nel nostro caso, sono state effettuate due filtrazioni successive, utilizzando per primo un filtro in microfibra di vetro ($1,6 \mu\text{M}$) e, in seconda battuta, un filtro in acetato di cellulosa ($0,45 \mu\text{M}$), per trattenere e rimuovere particelle di diametro inferiore. La frazione liquida che vi passa attraverso viene raccolta in una beuta e recuperata in un apposito becker prima di essere sottoposta ad estrazione.



Figura 3.12. Sistema di filtrazione.

3.5.4 Estrazione in fase solida - SPE (Solid phase extraction)

Le sostanze contaminanti oggetto di analisi chimiche sono, in genere, disperse in matrici complesse e sono presenti a livello di concentrazioni molto basse, quasi sempre nell'ordine di mg/L (ppm), µg/L (ppb) o addirittura valori inferiori. La manipolazione del campione diventa, pertanto, una necessità inderogabile, ai fini delle analisi, sebbene possieda il difetto di modificare il sistema, e di non avere, quindi, una perfetta rispondenza dei valori misurati ai valori reali. Per mantenere la fase di pre-concentrazione abbastanza attendibile, è necessario, innanzitutto, ridurre al minimo le perdite degli analiti nei passaggi del processo. La condizione ideale si otterrebbe qualora la quantità di sostanza recuperata fosse uguale alla quantità di partenza e, per fare questo, bisogna assicurarsi un'adeguata efficienza di concentrazione. Le tecniche preparative di estrazione in fase solida si stanno sempre più diffondendo in campo ambientale, in risposta alla crescente domanda di metodi pratici, riproducibili, veloci ed altamente selettivi. Nel meccanismo di una SPE, la fase solida viene in contatto diretto con la fase liquida e con i soluti in essa contenuti. Affinché si verifichi la separazione dell'analita dalla fase liquida, occorre che l'analita si leghi alla fase solida, o meglio al sito attivo della fase solida, occorre quindi che la forza di legame fra analita e sito dell'adsorbente sia più elevato di quello esistente fra analita e fase liquida. Le forze che si possono instaurare sono legami ionici, legami idrogeno, interazione dipolo-dipolo, interazione dipolo-dipolo indotto (o forze di Van Der Waals) e forze di dipolo-dipolo istantaneo (o di dispersione di London). Le fasi solide non modificate più utilizzate sono la silice, l'allumina e il florosil, poiché sono particolarmente adatte a separare composti polari (aldeidi, alcoli, alogenuri organici) da solventi non polari. L'estrazione in fase solida-SPE rappresenta, in sintesi, il passaggio del campione, precedentemente filtrato, attraverso una siringa in materiale plastico entro la quale è posta la cartuccia di estrazione, realizzata in materiale di caratteristiche e dimensioni tali da trattenere le specie chimiche di interesse e da lasciar passare la matrice acquosa, insieme al maggior quantitativo possibile di sostanze che non interessano l'analisi sperimentale. Questa procedura si basa sugli stessi principi della ritenzione in cromatografia liquida, potendo così analizzare grandi volumi di campione con quantità molto ridotte di fase solida limitando, inoltre, per il recupero, il consumo di solvente. L'estrazione in fase solida, prevenendo la maggior parte dei problemi riscontrati nell'estrazione liquido-liquido, migliora anche le rese di recupero degli analiti. Nel metodo in colonnine, un volume noto di soluzione (1L) viene fatto fluire per gravità o mediante l'ausilio di pompe, attraverso una colonna di polipropilene impaccata con la fase solida ad

una velocità costante (in genere 15 mL/min). L'analita viene trattenuto dalla fase solida, nel nostro caso, sono state utilizzate cartucce di estrazione del modello OASIS - HLB 6 cc, 200 mg (Waters SpA, Milano) realizzate in speciale materiale composito, nel quale, su una matrice di DVB (divinilbenzene) sono inseriti gruppi polari idrofilici e gruppi apolari lipofili. Successivamente l'eluizione con l'opportuna soluzione estraente, ha permesso di ottenere la preconcentrazione degli analiti di interesse (rapporto di concentrazione 2000:1). La fase di estrazione è un procedimento multistep che prevede, essenzialmente, cinque fasi successive: condizionamento, equilibratura, caricamento, lavaggio ed eluizione (Figura 3.13).

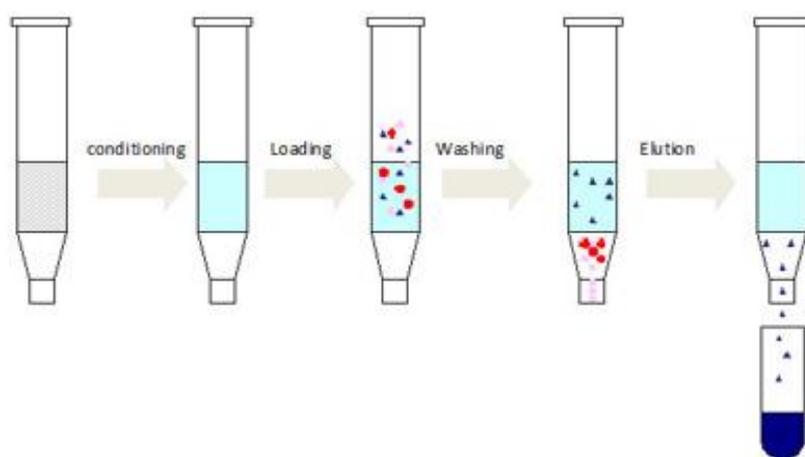


Figura 3.13. Estrazione in fase solida- SPE. Condizionamento, caricamento, lavaggio, eluizione.

Condizionamento Il condizionamento delle colonnine è un passaggio preliminare che ha lo scopo di attivare i siti attivi della cartuccia SPE, attraverso il passaggio di metanolo (6 mL), in quanto solvente scelto per la successiva eluizione; la superficie di scambio deve essere attivata, per far sì che l'analita venga correttamente trattenuto dalla fase solida.

Equilibratura A questo punto viene fatta fluire attraverso la cartuccia un'aliquota di acqua (6 mL), matrice in cui è presente il campione, così da asportare il solvente di condizionamento e permettere all'analita di interagire con i siti attivi della cartuccia. Di solito queste prime due fasi, estremamente importanti per l'attivazione del sistema, sono effettuate per caduta, goccia a goccia, dei solventi utilizzati, allo scopo di garantire l'efficacia delle operazioni.

Caricamento del campione La fase più sensibile e lunga (circa 2 ore) dell'intero processo è il passaggio del campione (1 L) attraverso la cartuccia; in questa fase, per far sì che le molecole abbiano il tempo per interagire con i siti attivi e legarsi alla fase solida, la velocità

di flusso, regolata da una pompa che genera il vuoto, deve essere mantenuta molto bassa (nell'ordine di 10-15 mL/min).

Risciacquo Una volta che tutto il campione è stato fatto passare attraverso la colonnina, viene caricata un'aliquota (6 mL) di acqua deionizzata allo scopo di rimuovere eventuali sostanze di non interesse, e trattenere le molecole di interesse.



Figura 3.14. Manifold per l'estrazione SPE.

Eluizione Quest'ultima fase estremamente delicata, permette, attraverso l'utilizzo di un opportuno solvente, di portare in soluzione gli analiti trattenuti dalla fase solida, raccogliendoli in provette di vetro. Il metanolo, scelto come solvente di eluizione, viene caricato sulla colonnina in 6 mL, allo scopo di raccogliere tutte le molecole trattenute dalla cartuccia SPE. In questa operazione è molto importante che il solvente fluisca goccia a goccia attraverso la cartuccia SPE senza l'applicazione del vuoto, in modo di avere il tempo necessario di interagire con le molecole presenti sulla superficie di estrazione e trascinarle in soluzione. In laboratorio, è stato possibile eseguire l'SPE attraverso l'utilizzo di un *vacuum manifold* che ha permesso di realizzare la contemporanea estrazione di quattro campioni per volta (Figura 3.14). A questo punto i campioni eluiti in metanolo possono essere conservati per qualche giorno a -20 °C, oppure è possibile procedere immediatamente alla fase successiva di evaporazione sotto flusso di azoto.

3.5.5 Evaporazione sotto flusso di azoto

L'evaporazione dell'eluato sotto flusso di azoto gassoso permette di ottenere la volatilizzazione del metanolo, impiegato nell'ultimo passaggio dell'estrazione SPE, sebbene il campione non venga portato completamente a secco, in quanto è preferibile lasciare circa 50 μL di metanolo per mantenere in soluzione le molecole di interesse. La procedura, è stata condotta in parallelo mediante raccordi a T e quattro tubi di polietilene alla cui estremità terminale sono collegate delle pipette Pasteur, che permettono di indirizzare il gas nella maniera più opportuna (Figura 3.15). Il flusso gassoso deve essere controllato accuratamente, onde evitare fuoriuscite e perdite delle specie chimiche desiderate; per questo motivo risulta una delle operazioni più impegnative in termini di tempo (da 3-4 ore). In seguito l'analita viene ricostituito (ossia riportato ad un volume di 250 μL) con una miscela di acqua: metanolo. I campioni sono mantenuti in provette di vetro a 4°C fino al momento dell'esposizione alle cellule. In questa sede il campione di acqua è stato portato ad un volume finale di 5 ml in mezzo di coltura, ottenendo una concentrazione finale di 200x, considerando che il volume di acqua iniziale era pari a 1 L. Inoltre prima dell'impiego sulle cellule in coltura, i campioni di acqua sono stati preventivamente sottoposti ad un ulteriore processo di filtrazione, impiegando filtri a siringa di porosità estremamente ridotta (diametro inferiore a 0,2 μM), per non esporre le cellule in coltura al rischio di inquinamento biologico.



Figura 3.15. Evaporazione sotto flusso di azoto.

4 RISULTATI

4.1 MESSA A PUNTO DEL SAGGIO E-SCREEN PER VALUTARE L'ATTIVITA' ESTROGENICA

Di seguito sono riportati i risultati preliminari, ottenuti dalle attività sperimentali in laboratorio, che hanno permesso di mettere a punto il test di proliferazione cellulare E-screen, utilizzando cellule MCF-7 di adenocarcinoma mammario.

4.1.1 Sensibilità e ripetibilità del saggio: Curva standard 17 β -estradiolo

Nel primo set di esperimenti è stata costruita una curva standard di estrogenicità, utilizzando sette concentrazioni diverse di 17 β -estradiolo (E2), in un intervallo di concentrazioni da 10⁻¹⁵ a 10⁻⁸ M (Figura 4.1). L'attività estrogenica dei campioni è espressa come Effetto Proliferativo (PE), calcolato come rapporto tra l'effetto massimo indotto dalla sostanza test (in questo caso E2) ed il controllo in assenza di E2 (PE =1).

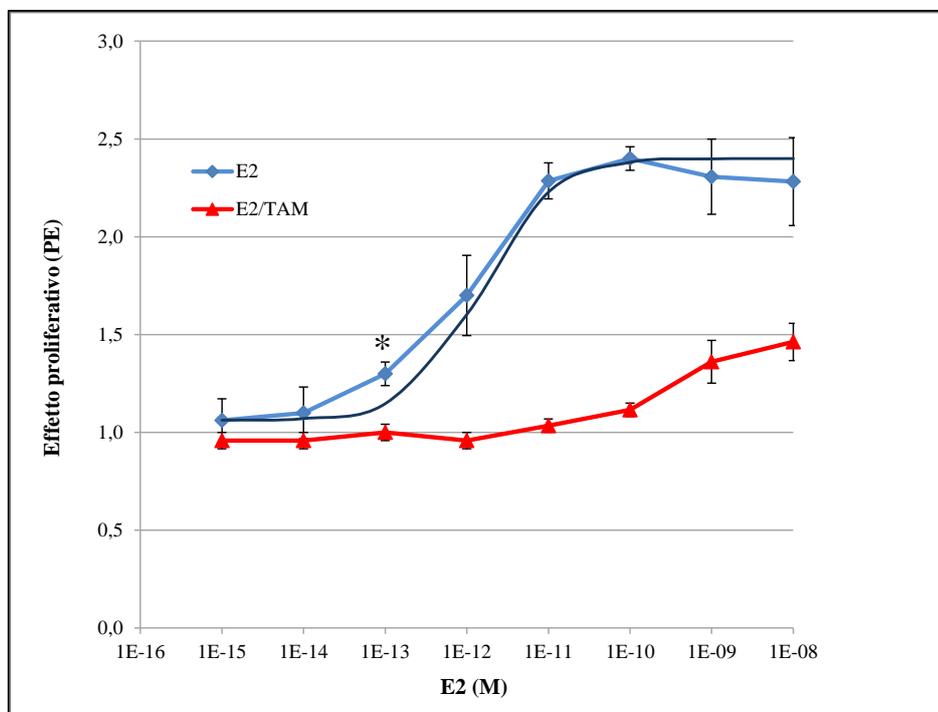


Figura 4.1. Curva dose-risposta del saggio di E-screen per E2 nelle cellule MCF-7. I dati sono espressi come media PE \pm ES di 10 esperimenti saggiati in triplicato. * P<0.05 prima dose significativamente diversa dal controllo.

Graficamente si può osservare che E2 determina una proliferazione cellulare dose-dipendente, con effetto proliferativo massimo a 10^{-10} M ed un plateau a concentrazioni crescenti. Gli effetti di E2 risultano, invece, inibiti in presenza dell'anti-estrogeno tamoxifene (TAM, 10^{-7} M), fino a dosi di E2 pari a 10^{-10} M. In concentrazioni più elevate di E2 (10^{-9} - 10^{-8} M), l'effetto anti-estrogenico del TAM pare essere ridotto, ma è pur vero che, in ambiente, difficilmente è possibile rilevare livelli di concentrazione di E2 così elevati (Figura 4.1). La curva dose-risposta del 17β -estradiolo è stata analizzata mediante regressione non lineare (equazione di Hill a 4 parametri, $r^2 = 0.987$, curva nera), allo scopo di caratterizzare la risposta ad E2 e ricavare il valore di EC50. Dall'analisi dei dati è stato ottenuto come valore di EC50 0,26 ng/L che rappresenta la concentrazione in grado di produrre il 50% dell'effetto proliferativo massimo. Nel presente lavoro di tesi, la concentrazione più bassa di 17β -estradiolo, alla quale si è prodotta una risposta valutabile come significativamente differente dal controllo in assenza di E2 è di 10^{-13} M (0,03 ng/L).

4.1.2 Sensibilità del metodo: Curva di Bisfenolo A

La sensibilità del metodo è stata ulteriormente testata, costruendo una curva di controllo positivo di Bisfenolo A (BPA), noto interferente endocrino ad attività estrogenica in un intervallo di concentrazioni da 10^{-10} a 10^{-5} M.

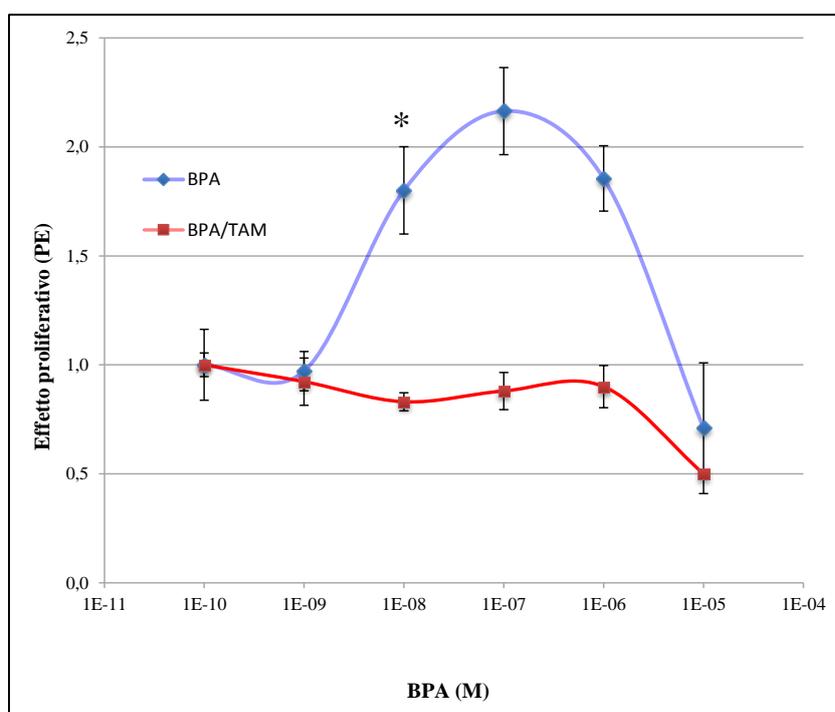


Figura 4.2. Curva dose-risposta del saggio di E-screen per il BPA nelle cellule MCF-7. I dati sono espressi come media $PE \pm ES$ di 4 esperimenti saggiati in triplicato. * $P < 0.05$ prima dose significativamente diversa dal controllo.

La risposta del BPA dà effetto dose-dipendente con PE max a 10^{-7} M e riduzione dell'effetto proliferativo in corrispondenza di BPA 10^{-5} M probabilmente a causa della tossicità della molecola, ad un livello di concentrazione così elevato.

Come mostrato in Figura 4.2, gli effetti del BPA sono inibiti in presenza di TAM 10^{-7} M. La concentrazione più bassa di BPA, valutata mediante analisi statistica, alla quale si è prodotta una risposta valutabile come positiva, è stata pari a $2 \mu\text{g/L}$ confermando l'elevata sensibilità del metodo impiegato. Si noti che, il massimo dell'attività proliferativa, confrontabile con quella di E2 10^{-10} M, si osserva per il BPA alla concentrazione 10^{-7} M; perciò, il BPA può riprodurre un effetto proliferativo simile a quello di E2 ad una concentrazione 1000 volte maggiore.

4.1.3 Valutazioni preliminari: effetto del solvente

L'eluizione dei campioni di acqua ambientale impiegati in questo lavoro di tesi richiedono la presenza di metanolo come solvente apolare. È stato valutato, pertanto, l'effetto di diverse concentrazioni del solvente, partendo dal 5%, impiegata nei protocolli di ISTISAN 11/18, fino ad arrivare a 1% sulla vitalità cellulare, allo scopo di escludere eventuali effetti di tossicità o di interferenze sperimentali, in presenza di E2 (Figura 4.3).

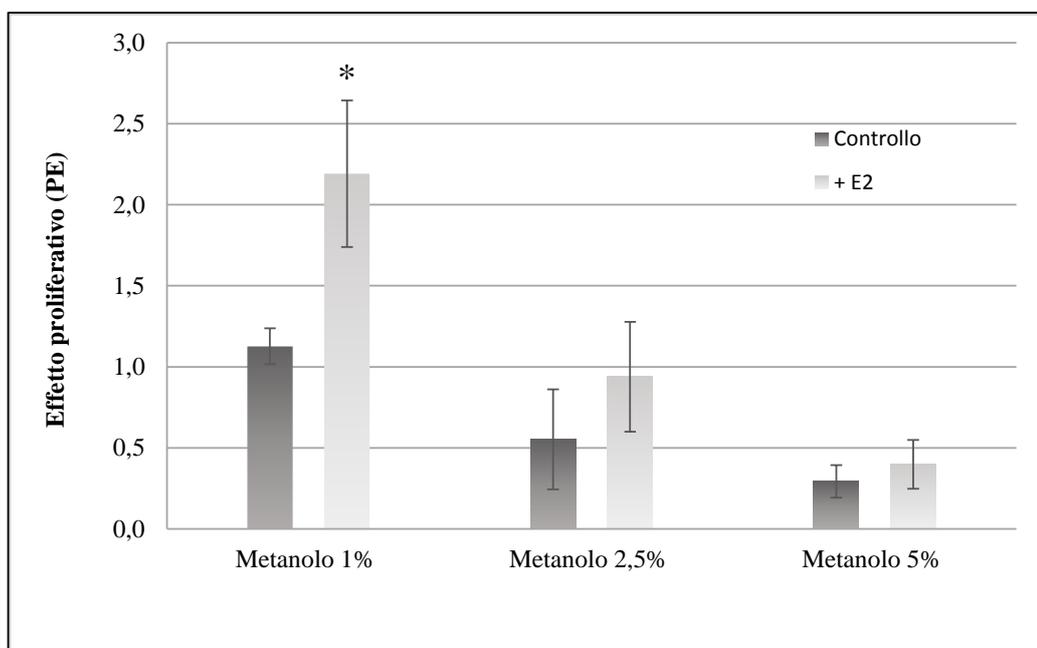


Figura 4.3. Effetto del metanolo sulla vitalità di cellule MCF-7 a diverse concentrazioni. I dati sono espressi come media $PE \pm ES$ di 4 esperimenti saggiati in triplicato. * $P < 0.05$.

Nei campioni trattati con metanolo all'1% la vitalità cellulare si avvicina a 1 (PE=1 corrisponde alla condizione di controllo in assenza di metanolo) e l'aumento della proliferazione cellulare, in risposta alla somministrazione di E2 risulta significativo.

Al contrario, i campioni saggiati rispettivamente, con metanolo 2.5% e 5%, presentano una diminuzione sia della vitalità che della proliferazione cellulare, probabilmente, in conseguenza alla possibile tossicità per le cellule esposte a queste concentrazioni (l'aumento della vitalità in seguito alla somministrazione di E2 non è significativo, in entrambi i casi).

4.2 VALUTAZIONE DELL'ATTIVITA' ESTROGENICA NEI CAMPIONI DI ACQUA SPERIMENTALE

La messa a punto del saggio biologico E-screen in condizioni standard ha permesso la sua applicabilità ai campioni di acqua sperimentale, oggetto di ricerca e di indagine del presente lavoro di tesi.

4.2.1 Saggio E-screen 1° campionamento: Attività agonista

I campioni di acqua sperimentale sono stati saggiati a due differenti concentrazioni, la 200x e 20x (Figura 4.4). Oltre ai campioni di acqua sperimentale è stato saggiato come ulteriore controllo, un campione di acqua oligominerale imbottigliata.

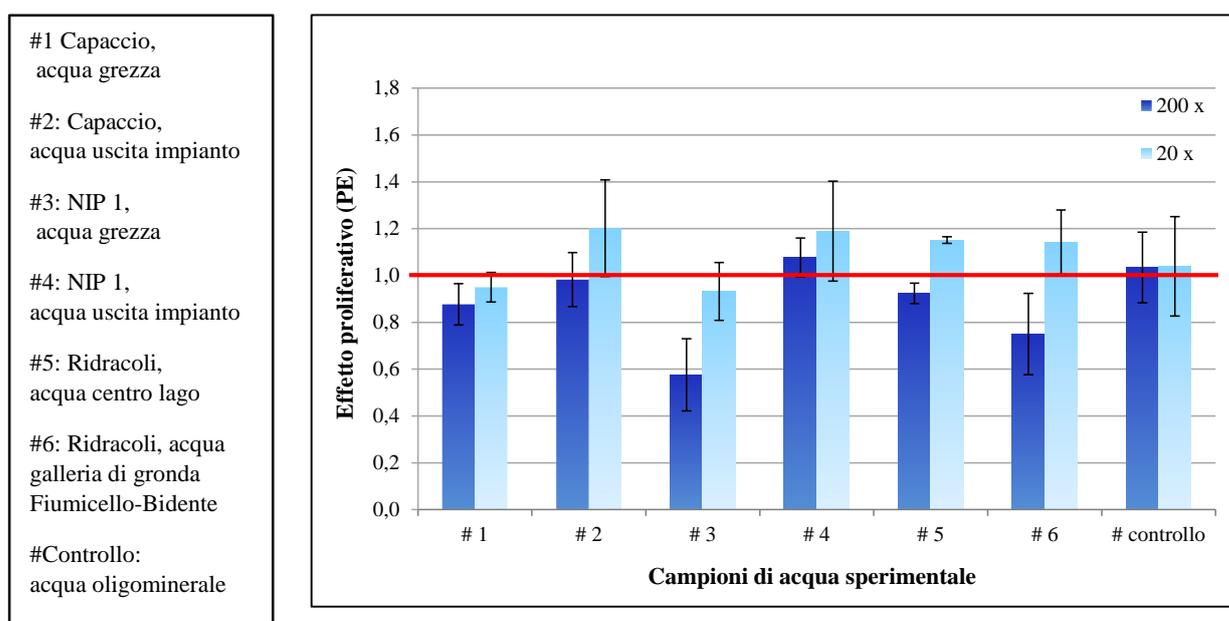


Figura 4.4. Saggio E-screen con i campioni sperimentali in cellule MCF-7 (1° campionamento). I dati sono espressi come media PE \pm ES di 4 esperimenti saggiati in triplicato (N=4).

Dall'osservazione grafica dei risultati è possibile affermare che non vi sia alcuna attività estrogenica significativa nei siti esaminati; in nessun campione di acqua sperimentale, infatti, è stato rilevato un PE significativamente superiore a 1 (condizione di controllo in assenza di E2). I campioni 200x mostrano, nel complesso, una ridotta vitalità cellulare, fatta eccezione per entrambi i campioni in uscita dai potabilizzatori (#2 e #4) e per il controllo. Diluendo di 10 volte la concentrazione degli estratti di acqua esaminati, la vitalità cellulare è aumentata in tutti i campioni sperimentali.

4.2.2 Saggio E-screen 2° campionamento: Attività agonista

I campioni dell'impianto di potabilizzazione NIP 2 sono stati saggiati ad una concentrazione 20x del campione (Figura 4.5). I campioni sperimentali rappresentano l'acqua all'ingresso, e dopo tre step successivi di trattamento di potabilizzazione.

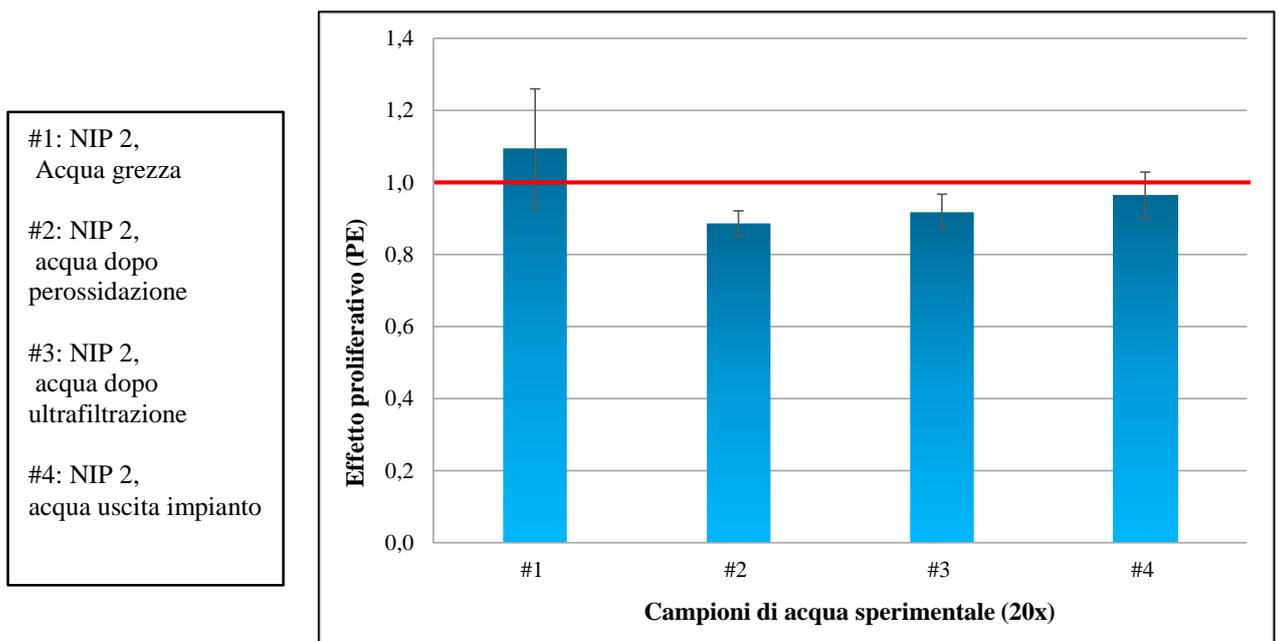


Figura 4.5. Saggio E-screen con i campioni sperimentali in cellule MCF-7 (2° campionamento). I dati sono espressi come media PE \pm ES di 4 esperimenti saggiati in triplicato (N=4).

E' possibile osservare che in nessun campione di acqua sperimentale $PE > 1$, pertanto, si può ritenere che non vi sia alcuna attività estrogenica nei campioni sperimentali. La vitalità cellulare dei campioni in seguito a trattamenti di potabilizzazione (#2, #3) è leggermente ridotta rispetto alle condizioni di controllo ma torna ad aumentare nel campione in uscita dal potabilizzatore (#4).

4.2.3 Saggio E-screen 3° campionamento: Attività agonista

I campioni provenienti dalla terza campagna di monitoraggio sono stati saggiati ad una concentrazione 20x del campione (Figura 4.6).

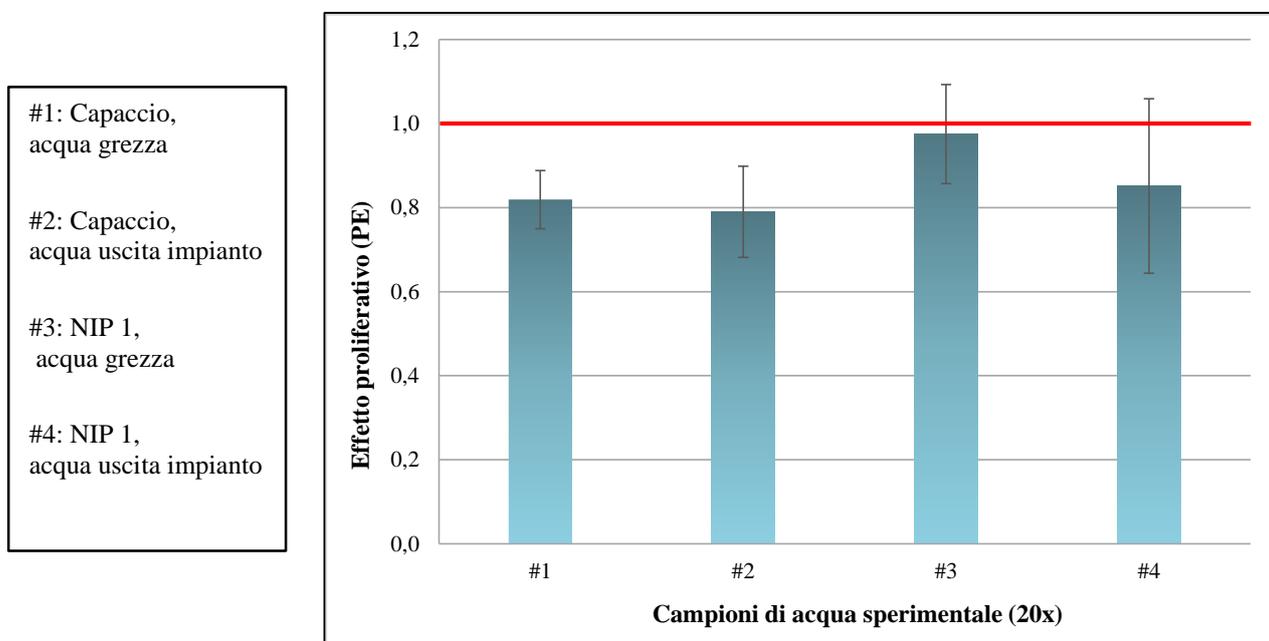


Figura 4.6. Saggio E-screen con i campioni sperimentali in cellule MCF-7. (3° campionamento). I dati sono espressi come media PE \pm ES di 4 esperimenti saggiati in triplicato (N=4).

Nei campioni saggiati non è stata rilevata alcuna attività estrogenica, non sono stati riscontrati, infatti, valori di $PE > 1$. Si nota che i campioni #1 #2 e #4 hanno una vitalità cellulare ridotta rispetto al controllo mostrando un certo grado di tossicità (inibizione della crescita cellulare, indicata da un $PE < 1$).

Questi stessi siti erano già stati esaminati durante il primo campionamento di Aprile, coerentemente con le richieste di Romagna Acque e saranno analizzati nuovamente almeno altre due volte nell'ambito di una campagna di monitoraggio completa che volgerà al termine nel corso del 2016 e che permetterà di valutare la variabilità dei risultati degli stessi siti di campionamento fra una campagna e l'altra.

4.2.4 Saggio E-screen: Attività antagonista

Il test di E-screen può essere utilizzato anche per valutare la presenza di molecole anti-estrogeniche in un campione sperimentale. Il saggio si effettua in presenza di E2 alla concentrazione in cui si ottiene il PE massimo (10^{-9} M) e del campione da testare

I risultati ottenuti (non mostrati) indicano attività proliferativa nelle cellule esposte all'acqua sperimentale in presenza di E2 10^{-9} M anche se in misura variabile da esperimento a esperimento ma è degno di nota che nei campioni di acqua in uscita dai potabilizzatori questa attività proliferativa avvenga in misura decisamente ridotta. Infatti il trattamento di potabilizzazione, in funzione dei processi attuati, può arricchire o privare la matrice idrica di contaminanti tecnologici attivi come antagonisti del 17β -estradiolo. A tale proposito bisogna considerare il possibile effetto di tale processo, tenendo conto che il trattamento di clorazione delle acque potrebbe determinare variazioni nell'estrogenicità dei campioni attraverso processi di ossidazione di diversi IE ad azione estrogenica/antiestrogenica.

4.3 MESSA A PUNTO DEL TEST DEI MICRONUCLEI PER VALUTARE L'ATTIVITA' GENOTOSSICA

Nell'ambito del lavoro di tesi è stato messo a punto il test dei micronuclei come potenziale strumento di rilevazione di effetti mutageni e/o genotossici in campioni di acqua ad uso potabile, in assenza di un protocollo standardizzato da applicare a questa matrice ambientale. Nei paragrafi seguenti saranno presentati i risultati preliminari che hanno permesso di condurre ed interpretare le successive analisi sperimentali.

4.3.1 Costruzione control database

Il primo passo per la messa a punto del metodo è stata la costruzione di un *control database* costituito valutando la presenza di MN di un numero elevato di campioni di controllo (N=20), cioè non esposti ai trattamenti di interesse. Il dato ottenuto rappresenta la frequenza della comparsa spontanea di micronuclei in cellule non esposte ad agenti mutageni. Lo scopo è quello di valutare la sensibilità del metodo da noi scelto e quindi di poter verificare se il numero di MN rilevato nei campioni sperimentali ricada nei valori di controllo oppure se è indice della presenza di agenti genotossici.

Nel presente lavoro, il database di controllo è risultato pari a:

$$22,6 \pm 11,5 \text{ (media } \pm \text{ DS) /1000 cellule binucleate osservate}$$

Esso rappresenta il valore di riferimento di frequenza di MN per le nostre cellule MCF-7, risultando dalla media di 20 repliche differenti.

4.3.2 Curva di Bisfenolo A: Controllo positivo

Una curva di Bisfenolo A (BPA) (da 10^{-7} M a 10^{-4} M) è stata costruita, come controllo positivo, allo scopo di valutare la frequenza di micronuclei nelle cellule MCF-7, in seguito all'esposizione ad una molecola ad attività genotossica (Figura 4.7).

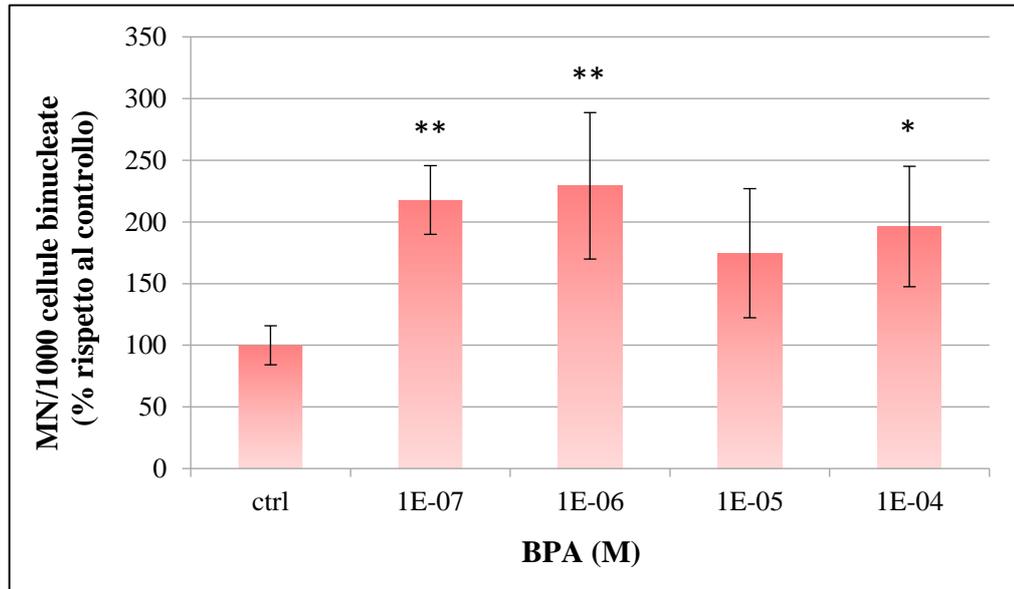


Figura 4.7. Frequenza di micronuclei (MN) su un totale di 1000 cellule binucleate in risposta all'esposizione (48h) di BPA. Dati espressi in % rispetto al controllo. Valore assoluto del controllo $17,1 \pm 6,3$. I dati sono espressi come media $MN \pm DS$ di 4 esperimenti. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

La risposta del Bisfenolo A dà effetto dose-dipendente con effetto massimo alla concentrazione 10^{-6} M. Il grafico mostra un calo della risposta alle concentrazioni di BPA 10^{-5} M e di BPA 10^{-4} M probabilmente a causa della tossicità della molecola in concentrazioni così elevate. Rispetto al valore di controllo, è stata rilevata una differenza altamente significativa per i trattamenti alle dosi 10^{-7} M e 10^{-6} M e una differenza significativa nei campioni esposti alla dose 10^{-4} M.

4.4 VALUTAZIONE DELL'ATTIVITA' GENOTOSSICA DEI CAMPIONI DI ACQUA SPERIMENTALE

La messa a punto del test dei MN, adattato alle cellule MCF-7 in uso nell'ambito del lavoro di tesi, ha consentito il suo utilizzo come biomarker per la valutazione degli effetti

genotossici nei campioni di acqua sperimentale, in assenza di un protocollo standardizzato per le acque potabili.

4.4.1 Test dei micronuclei 1° campionamento

Il test dei micronuclei è stato realizzato saggiando gli estratti di acqua campionati alle concentrazioni 200x e 20x. Gli effetti dell'esposizione ai campioni sperimentali sulla frequenza di micronuclei nelle nostre cellule MCF-7 sono indicati in Tabella 4.1.

Tabella 4.1. Insorgenza di micronuclei (MN) in cellule MCF-7 in seguito ad esposizione (48h) ai campioni sperimentali.

Campione di acqua	Concentrazione 200 X	Concentrazione 20 X
Controllo interno*	23,0 ± 8,0	18,0 ± 5,7
Capaccio acqua grezza	19,5 ± 6,4	10,0 ± 7,1
Capaccio acqua in uscita	21,0 ± 9,0	17,0 ± 2,8
NIP acqua grezza	14,0 ± 6,0	27,0 ± 4,0
NIP in uscita	19,0 ± 7,5	15,0 ± 1,4
Ridracoli centro lago	22,0 ± 5,5	17,0 ± 7,1
Galleria di gronda Fiumicello-Bidente	19,0 ± 3,0	11,0 ± 5,7
Controllo acqua oligominerale	17,0 ± 6,0	13,0 ± 1,4

MN micronuclei, DS deviazione standard. I risultati sono espressi come media di MN (n/1000 cellule binucleate) ± DS di 4 esperimenti (N=4). Controllo interno* in presenza di metanolo 1% come i campioni sperimentali.

I valori osservati per i campioni sperimentali ricadono all'interno del range dei valori di controllo, pertanto, non è stata rilevata alcuna attività mutagenica nei campioni di acqua esaminati.

4.4.2 Test dei micronuclei 2° campionamento

In seconda fase, i campioni di acqua sperimentale sono stati saggiati solo alla concentrazione 20x, considerata più adeguata per lo stato di salute delle colture cellulari.

In Tabella 4.2 sono presentati i valori di frequenza MN ottenuti in seguito ad esposizione agli estratti di acqua esaminati.

Tabella 4.2. Insorgenza di micronuclei (MN) in cellule MCF-7 in seguito ad esposizione (48h) ai campioni sperimentali (2° campionamento).

Campione di acqua	Concentrazione 20 X
Controllo interno*	18,0 ± 8,0
NIP 2 acqua grezza	23,8 ± 5,1
Acqua dopo perossidazione	12,5 ± 2,1
Acqua dopo ultrafiltrazione	15,0 ± 7,0
NIP 2 acqua in uscita	16,5 ± 2,1

MN micronuclei, DS deviazione standard. I risultati sono espressi come media di MN (n/1000 cellule binucleate) ± DS di 4 esperimenti (N=4). Controllo interno* in presenza di metanolo 1% come i campioni sperimentali.

Complessivamente, non sono stati misurati dei valori di frequenza di MN che si discostano in maniera significativa dal range dei valori di controllo, perciò, non è stata rilevata alcuna attività mutagenica nei campioni saggiati.

4.4.3 Test dei micronuclei 3° campionamento

Gli estratti di acqua processati nel terzo campionamento sono stati saggiati ad una concentrazione 20x (Tabella 4.3).

Tabella 4.3. Insorgenza di micronuclei (MN) in cellule MCF-7 in seguito ad esposizione (48h) ai campioni sperimentali (3° campionamento).

Campione di acqua	Concentrazione 20 X
Controllo interno*	18,0 ± 5,6
Capaccio acqua grezza	15,7 ± 2,1
Capaccio acqua in uscita	15,0 ± 1,0
NIP acqua in entrata	15,3 ± 3,5
NIP acqua in uscita	20,0 ± 1,4

MN micronuclei, DS deviazione standard. I risultati sono espressi come media di MN (n/1000 cellule binucleate) ± DS di 4 esperimenti (N=4). Controllo interno* in presenza di metanolo 1% come i campioni sperimentali.

Coerentemente con i risultati dei campionamenti precedenti, non è stata rilevata alcuna attività genotossica nei campioni di acqua sperimentale.

5 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Diversi contaminanti chimici emergenti presenti in ambiente, già a bassissime concentrazioni, possono influire notevolmente su una grande varietà di endpoint biologici. Nell'ambito del lavoro tesi, l'attenzione è stata focalizzata sulla valutazione della presenza di molecole estrogeniche e di composti genotossici in campioni di acqua in ingresso e in uscita da alcuni potabilizzatori, utilizzando, come modello sperimentale, colture cellulari MCF-7 di adenocarcinoma mammario.

Le acque superficiali di fiumi e laghi possono essere facilmente contaminate dalle acque reflue, dai percolati delle discariche dei rifiuti solidi e dalle acque di scorrimento di aree agricole o adibite ad allevamenti di bestiame e possono contenere diversi inquinanti tra cui xenoestrogeni e/o composti genotossici. Dal momento che dalle acque superficiali vengono attinte le acque destinate al consumo umano, è necessaria una loro rimozione durante il processo di potabilizzazione. È fondamentale, quindi, conoscere l'eventuale presenza dei suddetti contaminanti nelle acque grezze (all'ingresso dell'impianto di potabilizzazione) e successivamente in quelle trattate (dopo potabilizzazione) e distribuite in rete, valutando, in tal modo, l'efficacia degli impianti di potabilizzazione utilizzati dai gestori per una loro eventuale rimozione (Rapporti ISTISAN 11/18).

Nonostante i rischi connessi alla presenza di sostanze estrogeniche e mutageno/cancerogene nelle acque destinate al consumo umano, la normativa vigente non prevede valori di limite di legge per queste sostanze, né l'applicazione di specifici test standardizzati per la loro identificazione. Come ribadito più volte nel corso della tesi, la valutazione dello stato di qualità ambientale, nello specifico di acque destinate ad uso potabile, necessita di un approccio integrato tra le analisi chimiche, i saggi biologici ed i test di (geno)tossicità, i quali, prendendo in considerazione diversi aspetti dello stesso problema, si integrano a vicenda, contribuendo a fornire un quadro complessivo completo del sito in esame. L'obiettivo della presente tesi è stato, pertanto, l'utilizzo e la messa a punto di due test biologici *in vitro* per indagare la presenza di contaminanti emergenti ad attività estrogenica e genotossica nelle acque ad uso potabile pre- e post- trattamenti di potabilizzazione, nell'ambito di una convenzione di ricerca tra Scienze Ambientali e la società acquedottistica Romagna Acque. I test biologici *in vitro* impiegati nell'ambito del lavoro di tesi permettono di effettuare delle sperimentazioni "mirate" su linee cellulari tumorali che si replicano indefinitamente in coltura.

Nel corso delle attività sperimentali è stato necessario, innanzitutto, caratterizzare il nostro batch di cellule MCF-7, indagando le soglie di tossicità e i livelli minimi di effetto delle molecole di interesse. Esistono, infatti, diversi ceppi di cellule MCF-7 che possono essere riconosciuti in base alla loro risposta biologica in seguito a determinate condizioni di esposizione (presenza/assenza di estrogeni ecc.) (Villalobos et al., 1995).

Per il test di estrogenicità è stato applicato alle cellule MCF-7 un protocollo sviluppato presso il Reparto di Igiene delle Acque Interne del Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria (DAMPP) dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS), nell'ambito di un progetto di ricerca riguardante lo studio degli "Interferenti endocrini e le acque destinate al consumo umano", promosso e coordinato dalla Fondazione AMGA di Genova e dal Dipartimento di Scienze della Salute dell'Università di Genova. Il metodo proposto prevede il trattamento dei campioni di acqua sperimentale secondo una specifica procedura, volta a ridurre la complessità della matrice acquosa di partenza e a concentrare gli analiti di interesse, e la successiva esposizione delle cellule agli estratti di acqua, passaggio condiviso tra i due test biologici. Nel corso del lavoro di tesi, inizialmente, è stata valutata la sensibilità del nostro modello sperimentale, per valutare tramite E-screen la presenza degli analiti scelti per la sperimentazione. Per fare questo abbiamo costruito una curva standard di E2 in un intervallo di concentrazioni tra 10^{-15} a 10^{-8} M (Figura 4.1) in accordo con studi di letteratura (Soto et al., 1995). Il ceppo di cellule MCF-7, impiegato nel presente lavoro di tesi, ha dimostrato di essere un modello sperimentale di sensibilità estremamente elevata, in quanto la minima concentrazione che viene rilevata come significativamente diversa dal controllo risulta essere inferiore rispetto al protocollo fornito dall'ISTISAN 11/18 sopracitato ed altri livelli di sensibilità raggiunti in letteratura (Folmar et al., 2000). Anche il confronto dei valori di EC50 mostra che quello ottenuto nel presente sistema sperimentale è di oltre un ordine di grandezza inferiore rispetto ad ISTISAN 11/18 (0,26 ng/L rispetto a 4,37 ng/L).

L'elevato livello di sensibilità è stato confermato attraverso l'esposizione delle cellule a dosi crescenti di Bisfenolo A, noto interferente endocrino ad attività estrogenica, utilizzato come controllo positivo per prevedere l'entità della risposta proliferativa, in seguito alla presenza di molecole estrogeniche nei campioni sperimentali e rendere così immediata la possibilità di confronto con le indagini successive (Figura 4.2). I primi risultati preliminari hanno dato prova della robustezza del metodo impiegato, dimostrandosi in accordo con altri studi di letteratura (Ricupito et al., 2009). Anche in questo caso la sensibilità del presente sistema sperimentale si è rivelata superiore a quella indicata da ISTISAN. Nel presente lavoro di tesi, infatti, la dose minima che determina un effetto significativamente diverso dal controllo è

pari 10^{-8} M mentre negli esperimenti presentati nei Rapporti ISTISAN 11/18 è superiore di due ordini di grandezza e corrisponde a 10^{-6} M.

Un ulteriore passaggio fondamentale, ai fini della messa a punto del metodo, è stata la valutazione delle possibili interferenze sperimentali ad opera del metanolo, utilizzato per eluire gli estratti di acqua oggetto di analisi, indagando un opportuno intervallo di concentrazione che permettesse di individuare la diluizione più appropriata per preservare la vitalità delle cellule in coltura. Nel protocollo ISTISAN 11/18 è stato impiegato metanolo al 5%, il quale, testato sulle nostre colture cellulari, evidentemente più “sensibili”, ha mostrato un certo grado di tossicità, testimoniato da una riduzione del PE a valori inferiori a 0,5 e una mancata induzione della proliferazione in risposta a E2. Il nostro metodo, infatti, non ha rilevato la presenza di effetti tossici ad una concentrazione più bassa della molecola, pari all'1%, diluizione che è stata, pertanto, utilizzata sulle cellule per saggiare i campioni di acqua sperimentale (Figura 4.3).

Gli estratti di acqua sperimentale provenienti dal 1° campionamento di aprile, sono stati saggiati, in prima analisi, in concentrazione di 200x, la massima impiegata nel protocollo ISTISAN 11/18 che permetta di avere un effetto di tossicità sulle cellule abbastanza basso da poter avere un valore di PE vicino ad 1 e di poter, al tempo stesso, rilevare l'attività estrogenica quando venga aggiunto E2 10^{-9} M. Gli esiti da noi ottenuti, trattando le cellule in queste concentrazioni elevate, hanno mostrato una vitalità cellulare complessiva piuttosto ridotta, sia nei campioni di acqua in entrata e in uscita dai potabilizzatori che nei campioni di acqua provenienti dalla diga di Ridracoli. Inoltre, somministrando E2 10^{-9} M alle cellule, in presenza di campioni di acqua alla concentrazione di 200x, non è stato possibile evidenziare attività estrogenica nei campioni analizzati in modo significativo e ripetibile (dati non mostrati). Pertanto, si è ritenuto necessario saggiare l'acqua sperimentale in forma più diluita, per ovviare agli effetti tossici causati da un'eccessiva concentrazione delle molecole naturali in essa disciolte. Nel corso delle attività in laboratorio, gli estratti di acqua del primo campionamento, perciò, sono stati diluiti 10 volte e saggiati nuovamente sulle cellule, in concentrazione di 20x. Complessivamente, la vitalità cellulare è risultata maggiore in tutte le condizioni sperimentali ed, in seguito alla somministrazione di E2, è stato possibile rilevare un aumento della proliferazione cellulare nei campioni esaminati (dati non mostrati). Il calcolo dell'effetto proliferativo nei campioni sperimentali, comunque, non ha rilevato situazioni critiche di estrogenicità, né in campioni di acqua grezza né in quelli in uscita dai potabilizzatori Capaccio e NIP, dimostrando l'assenza di una potenziale contaminazione da parte di sostanze o miscele chimiche ad attività estrogenica nei siti oggetto di screening.

La concentrazione di esposizione di 20x dei campioni di acqua si è rivelata più opportuna per le colture cellulari a nostra disposizione, ed è stata, pertanto, impiegata anche nei successivi campionamenti di luglio e settembre.

La seconda attività di monitoraggio ha interessato la valutazione dell'attività estrogenica di campioni di acqua in ingresso, in uscita e post- trattamenti del potabilizzatore ravennate NIP 2, in occasione della sua inaugurazione. Anche in queste acque i risultati ottenuti hanno escluso la presenza di contaminanti simil-estrogeni, attestando una buona qualità dell'acqua erogata dal nuovo impianto. Gli esiti di analisi chimiche condotte attraverso spettrometria di massa accoppiata a cromatografia liquida hanno confermato l'assenza di agenti contaminanti ad attività estrogenica in questo sito (dati del laboratorio non riportati in questa tesi).

Considerazioni simili possono essere estese anche alle indagini condotte durante il terzo campionamento che hanno riguardato nuovamente, le acque in ingresso e in uscita dai potabilizzatori NIP e Capaccio.

A sostegno dei risultati ottenuti durante le prime analisi sperimentali, nessun attività estrogenica è stata rilevata nei siti esaminati, confermando l'assenza di contaminazione da parte di molecole estrogeniche in queste acque.

Ulteriori valutazioni saranno comunque condotte nei prossimi mesi, come previsto nell'ambito della convezione di ricerca definita con Romagna Acque che si completerà nel corso del 2016.

L'E-screen può essere utilizzato anche per valutare la presenza di molecole anti-estrogeniche all'interno dei campioni sperimentali. Alcuni estratti di acqua in uscita dai potabilizzatori hanno mostrato una inibizione della proliferazione cellulare indotta da E2. I nostri risultati sono apparsi completamente in linea con quelli rilevati dai Rapporti ISTISAN 11/18 (2011): «Per quanto riguarda l'attività antagonista rilevata negli estratti di campioni di acqua si può osservare che il trattamento di potabilizzazione, in funzione dei processi attuati, può arricchire la matrice idrica di contaminanti tecnologici attivi come antagonisti dell'E2. È stato osservato che il trattamento di clorazione delle acque può determinare variazione nell'estrogenicità, attraverso ossidazioni di diversi IE.».

Un' alternativa al test E-screen è il saggio biologico Yeast Estrogen Screen (Yeast Assay) che utilizza il lievito *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificato e contenente il recettore umano α (hER α) o β (hER β) per gli estrogeni ed un ERE legato ad un gene reporter che codifica per un enzima, la β -galattosidasi o la luciferasi. Questo test è estremamente sensibile, rapido ed economico ma presenta alcune criticità legate alla natura stessa del lievito. Ad esempio, la permeabilità della parete cellulare potrebbe essere ridotta per alcune

molecole e le capacità metaboliche possono essere notevolmente diverse dalle cellule di mammifero. Noi abbiamo pertanto preferito utilizzare il test E-screen, su cellule umane. Entrambi i test biologici, ad ogni modo, sono ampiamente utilizzati per valutare sia la presenza di molecole ad attività estrogenica quantificate in termini di estradiolo equivalente (*Estradiol Equivalent*, EEQ) nelle acque destinate al consumo umano in diversi Paesi (Tabella 5.1).

Tabella 5.1 Valori medi di EEQ in effluenti di diversi Paesi

Paese	EEQ (ng/L)	Test in vitro	Riferimento
Giappone	4-35	Yeast assay	Onda et al (2002)
Germania	2-25	E-screen	Körner et al. (1999)
Germania	<1-7,8	E-screen	Körner et al. (2001)
Italia	0.2-3,6	E-screen	Bicchi et al (2008)
Gran Bretagna	<3-13	Yeast assay	Kirk et al. (2002)
USA	1-15	Yeast assay	Huggett et al. (2003)
Australia	1-67,8	E-screen	Tan et al. (2007)
Finlandia	4,8-5,6	Yeast assay	Salste et al. (2007)
Canada	30-80	Yeast assay	Fernandez et al.(2007)

Il secondo metodo di indagine biologica che è stato messo a punto, nell'ambito della tesi, ha riguardato l'analisi degli eventuali effetti genotossici connessi alla presenza di contaminanti mutageni nel comparto idropotabile.

Di recente è stato dimostrato che le reazioni che intervengono tra i composti chimici, utilizzati come disinfettanti/ossidanti negli impianti di potabilizzazione, ed il materiale organico presente nell'acqua superficiale da trattare, inducono la produzione di composti mutageni/cancerogeni (Gilli et al., 1991). Nel testo redatto dalla Fondazione AMGA (2011) sul progetto di ricerca sulla qualità delle acque destinate a consumo umano, si cita l'impiego di un test di mutagenicità che rileva la presenza di addotti al DNA tramite tecnica di marcatura radioattiva con ³²P. Tale procedura, tuttavia, risulta abbastanza complessa e necessita di un laboratorio idoneo all'uso di beta emittenti ad alta energia di ionizzazione.

Pertanto, pur essendo una tecnica estremamente sensibile, difficilmente può inserirsi all'interno di un metodo di analisi routinaria.

Nel corso del lavoro di tesi è stato scelto ed impiegato come test di mutagenesi il test dei micronuclei, mettendo a punto un metodo, assente nel protocollo ISTISAN 11/18, che permettesse il suo adattamento alla linea cellulare MCF-7 e la sua applicazione alle acque potabili. Il test dei micronuclei è in grado di misurare gli effetti mutageni che risultano dall'interazione dei contaminanti presenti in un ambiente a cui gli organismi sono esposti, rilevandone sia gli effetti clastogeni, cioè che producono rotture alla doppia elica di DNA, sia quelli aneugeni, che inducono una errata distribuzione cromosomica e aneuploidia.

Questo saggio, per la sua sensibilità ed affidabilità, oltre che per il suo basso costo e la semplicità di esecuzione, rappresenta uno dei metodi maggiormente impiegati negli studi di genotossicità ed è ampiamente utilizzato come biomarcatore per la valutazione degli effetti precoci da esposizione a composti mutageno/cancerogeni, infatti è presente in linee guida diramate dall'Istituto Superiore di Sanità da ISPRA e APAT.

La misura della frequenza di formazione dei micronuclei, come risultato del danno cromosomico, è un parametro sufficientemente sensibile, e con questo tipo di test è quindi possibile individuare cellule che hanno subito un danno a cui esse non sono in grado di porre rimedio con i sistemi di riparazione propri. Al contrario il test della cometa, anch'esso largamente utilizzato, rivela un danno solo potenziale, in quanto la cellula può andare ancora incontro ad apoptosi o può riparare in modo corretto il danno subito.

Diverse fonti bibliografiche hanno riportato l'utilizzo del test dei micronuclei per la valutazione della qualità delle acque destinate al consumo umano. Il test dei micronuclei su sistemi *in vitro* permette di rilevare l'assenza di composti ad attività mutagenica, nelle acque in ingresso e in uscita dagli impianti di trattamento (Buschini et al., 2004). Maffei e collaboratori (2009) hanno indagato i potenziali effetti genotossici nelle acque del fiume Po prima e dopo i processi di potabilizzazione, integrando gli esiti del test della cometa con quelli del test dei micronuclei e dimostrando che i diversi trattamenti contribuiscono alla rimozione dei composti genotossici nei campioni di acqua sperimentale.

Una recente indagine (Zeng et al., 2015) condotta in Cina sulla presenza di composti ad attività genotossica in acque destinate al consumo umano ha messo in luce, tuttavia, la necessità di integrare i diversi test biologici di mutagenesi esistenti, allo scopo di fornire delle informazioni il più possibile attendibili per valutare lo stato di qualità dell'acqua destinata ad uso potabile.

Sulla base di questi principi, le prime attività sperimentali in laboratorio sono state impiegate per la costruzione di un *control database*, allo scopo di fornire il dato di frequenza della comparsa spontanea di micronuclei in cellule non esposte ai trattamenti.

Nel presente lavoro di tesi, gli esperimenti indipendenti effettuati sono stati 20, in quanto valore ottimale per la costruzione di un control database affidabile (10 esperimenti corrispondono al requisito minimo) (Hayashi et al., 2011). Il valore di controllo negativo ottenuto per le cellule MCF-7 è risultato in accordo con dati di letteratura (Fischer et al., 2001; Hewitt et al., 2007).

Allo scopo di dimostrare l'effettiva sensibilità del sistema biologico agli agenti genotossici, è stata valutata l'insorgenza di micronuclei nelle colture cellulari a dosi crescenti di Bisfenolo A, selezionato come controllo positivo in quanto rappresenta un interferente endocrino con effetti mutageni e clastogeni ben documentati (Ben-Jonathan et Steinmetz.,1998; Johnson et Parry., 2008; Tiwari et al., 2012).

La nostra analisi sperimentale ha confermato il potenziale di mutagenicità del Bisfenolo A, anche se le concentrazioni più alte da noi saggiate hanno mostrato una riduzione nell'insorgenza di micronuclei nelle cellule, probabilmente a causa della tossicità della molecola stessa, in dosi così elevate (Figura 4.7).

I campioni di acqua sperimentale del primo campionamento sono stati saggiati sulle cellule in due differenti concentrazioni, la massima impiegata nei protocolli ISTISAN 11/18 (200x) e quella dieci volte inferiore (20x). La prima concentrazione, tuttavia, si è rilevata poco adatta per questo tipo di indagine biologica a causa delle difficoltà riscontrate nell'individuare, in un singolo campione, il quantitativo di cellule richiesto dal test, tanto da richiedere la lettura di almeno un ulteriore vetrino per completare il valore minimo di 1000 cellule binucleate. Questo suggerisce un cattivo stato di salute delle cellule esposte alla concentrazione 200x, confermato anche dai risultati dell'E-screen, che mostravano un Effetto Proliferativo (PE) ha queste concentrazioni al di sotto di 1 per molti campioni saggiati. Come era stato in precedenza rilevato durante la messa a punto dell'E-screen, il nostro modello biologico è più sensibile di quello impiegato dai protocolli ISTISAN11/18 ed è plausibile che la massima concentrazione utilizzata in ISTISAN11/18 sia tossica per il nostro ceppo di MCF-7. Sulla base di queste osservazioni, pertanto, le analisi di genotossicità del primo campionamento e di quelli successivi, sono state condotte ad una concentrazione di acqua sperimentale pari a 20x, che ha reso più agevole la lettura dei vetrini al microscopio, favorita da un aumento del numero di cellule vitali. L'indagine biologica, in entrambi i casi,

ha rivelato l'assenza di attività mutagenica nei campioni sperimentali, fornendo un'ulteriore prova sulla buona qualità dell'acqua erogata.

I campionamenti successivi di luglio e settembre sono stati condotti impiegando gli estratti di acqua campionati in concentrazione di 20x. Il secondo campionamento non ha rilevato la presenza di composti ad attività genotossica nelle acque di pertinenza del potabilizzatore NIP 2, mostrando dei valori di frequenza di insorgenza di micronuclei coerenti con quelli registrati per l'intervallo dei valori di controllo. Gli esiti del test dei micronuclei sono perfettamente in linea con i risultati del test di estrogenicità che comprovano il buono stato di qualità dei corpi idrici in ingresso e in uscita dal potabilizzatore.

Nel terzo ed ultimo test di mutagenesi che ha riguardato le acque in entrata e in uscita dai potabilizzatori NIP 1 e Capaccio sono state tratte le medesime conclusioni che hanno confermato l'assenza di composti genotossici nei siti esaminati.

Complessivamente è possibile affermare che i risultati ottenuti dal presente lavoro siano del tutto soddisfacenti in merito agli obiettivi preposti; attraverso l'utilizzo di un sistema biologico *in vitro*, infatti, è stato possibile mettere a punto e utilizzare due saggi biologici per valutare la presenza di molecole di interesse ambientale in acque ad uso potabile pre- e post- trattamenti, che hanno consentito di escludere la presenza di contaminanti ad attività estrogenica e/o genotossica nei campioni sperimentali. Sulla base della necessità di adoperare dei protocolli standardizzati di monitoraggio ambientale, il lavoro di tesi offre un valido strumento per l'impiego di test biologici di estrogenicità e di genotossicità in acque destinate al consumo umano, in virtù della crescente preoccupazione legata alla diffusione dei suddetti contaminanti in acque reflue e superficiali. Test biologici ad alta sensibilità come quelli condotti in questo lavoro di tesi informano della potenziale tossicità di una matrice ambientale nel suo complesso, fornendo informazioni anche quando non sono state condotte analisi chimiche oppure quando queste sono state mirate a composti noti. Anche se le analisi biologiche sono le uniche in grado di rispondere alla domanda se una matrice presenta o meno un potenziale estrogenico e/o genotossico, non sono, tuttavia, in grado di rilevare le sostanze chimiche responsabili o la loro concentrazione. Pertanto, le due analisi sono da ritenersi complementari e, per una valutazione del rischio più appropriata, i test biologici dovrebbero essere preliminari alle analisi chimiche, così da orientare le analisi chimiche in modo mirato.

6 RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- Acconcia, F., Ascenzi, P., Bocedi, A., Spisni, E., Tomasi, V., Trentalance, A., ... & Marino, M. (2005). Palmitoylation-dependent estrogen receptor α membrane localization: regulation by 17β -estradiol. *Molecular biology of the cell*, 16(1), 231-237.
- Acconcia, F., Pallottini, V., Marino, M. (2015). Molecular Mechanisms of Action of BPA. Dose-Response: An International Journal October-December 2015:1-9.
- Adler, A. J., & Nelson, J. F. (1988). Aging and chronic estradiol exposure impair estradiol-induced cornification but not proliferation of vaginal epithelium in C57BL/6J mice. *Biology of reproduction*, 38(1), 175-182.
- Alonso-Magdalena P., Ropero A.B., Soriano S., Quesada I., Nadal A. (2010). Bisphenol A: a new diabetogenic factor?. *Hormones*, 9: 118-126.
- Anway M. D., Cupp A. S., Uzumcu M., Skinner M. K. (2005). Epigenetic Transgenerational Actions of Endocrine Disruptors and Male Fertility, *Science* 3 June 2005: Vol. 308 no. 5727 pp. 1466-1469.
- Anway M. D. and Skinner M.K. (2006). Epigenetic Transgenerational Actions of Endocrine Disruptors. *Endocrinology* 147: S43-S49.
- Arnold, S. F., Klotz, D. M., Collins, B. M., Vonier, P. M., Guillette, L. J., & McLachlan, J. A. (1996). Synergistic activation of estrogen receptor with combinations of environmental chemicals. *Science*, 272(5267), 1489-1492.
- Ascenzi P, Bocedi A, and Marino M. (2006). Structure-function relationship of estrogen receptor α 380 and β : impact on human health. *Mol Aspects Med* 27: 299-402.
- Ashby, J., Lefevre, P. A., Odum, J., Harris, C. A., Routledge, E. J., & Sumpter, J. P. (1997). Synergy between synthetic oestrogens?. *Nature*, 385(6616), 494-494.
- Auger, J., Kunstmann, J. M., Czyglik, F., & Jouannet, P. (1995). Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. *New England Journal of Medicine*, 332(5), 281-285.
- Ayotte, P., Dewailly, E., Ryan, J. J., Bruneau, S., & Lebel, G. (1997). PCBs and dioxin-like compounds in plasma of adult Inuit living in Nunavik (Arctic Quebec). *Chemosphere*, 34(5), 1459-1468.
- Baronti, C., Curini, R., D'Ascenzo, G., Di Corcia, A., Gentili, A., & Samperi, R. (2000). Monitoring natural and synthetic estrogens at activated sludge sewage treatment plants and in a receiving river water. *Environmental Science & Technology*, 34(24), 5059-5066.
- Belfroid, A. C., Van der Horst, A., Vethaak, A. D., Schäfer, A. J., Rijs, G. B. J., Wegener, J., & Cofino, W. P. (1999). Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their

glucuronides in surface water and waste water in The Netherlands. *Science of the Total Environment*, 225(1), 101-108.

Ben-Jonathan, N., & Steinmetz, R. (1998). Xenoestrogens: the emerging story of bisphenol A. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 9(3), 124-128.

Benotti, M. J., Trenholm, R. A., Vanderford, B. J., Holady, J. C., Stanford, B. D., & Snyder, S. A. (2008). Pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in US drinking water. *Environmental Science & Technology*, 43(3), 597-603.

Berthois Y., Katzenellebogen J.A., Katzenellenbogen B.S. (1986). Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: Implications concerning the study of estrogen-responsive cells in culture, *Cell Biology Vol. 83*, pp. 2496-2500.

Bicchi, C., Schilirò, T., Pignata, C., Fea, E., Cordero, C., Canale, F., & Gilli, G. (2009). Analysis of environmental endocrine disrupting chemicals using the E-screen method and stir bar sorptive extraction in wastewater treatment plant effluents. *Science of the total environment*, 407(6), 1842-1851.

Biddie, S. C., John, S., Sabo, P. J., Thurman, R. E., Johnson, T. A., Schiltz, R. L., ... & Hager, G. L. (2011). Transcription factor AP1 potentiates chromatin accessibility and glucocorticoid receptor binding. *Molecular cell*, 43(1), 145-155.

Biedermann, S., Tschudin, P., & Grob, K. (2010). Transfer of bisphenol A from thermal printer paper to the skin. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 398(1), 571-576.

Bignert, A., Olsson, M., Persson, W., Jensen, S., Zakrisson, S., Litzén, K., ... & Alsberg, T. (1998). Temporal trends of organochlorines in Northern Europe, 1967–1995. Relation to global fractionation, leakage from sediments and international measures. *Environmental Pollution*, 99(2), 177-198.

Bigsby, R., Chapin, R. E., Daston, G. P., Davis, B. J., Gorski, J., Gray, L. E., ... & vom Saal, F. S. (1999). Evaluating the effects of endocrine disruptors on endocrine function during development. *Environmental Health Perspectives*, 107(Suppl 4), 613.

Bjerregaard, P., Dewailly, E., Ayotte, P., Pars, T., Ferron, L., & Mulvad, G. (2001). Exposure of Inuit in Greenland to organochlorines through the marine diet. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*, 62(2), 69-81.

Bolli, A., Galluzzo, P., Ascenzi, P., Del Pozzo, G., Manco, I., Vietri, M. T., ... & Marino, M. (2008). Laccase treatment impairs bisphenol A-induced cancer cell proliferation affecting estrogen receptor α -dependent rapid signals. *IUBMB life*, 60(12), 843-852.

Bolli, A., Bulzomi, P., Galluzzo, P., Acconcia, F., & Marino, M. (2010). Bisphenol A impairs estradiol-induced protective effects against DLD-1 colon cancer cell growth. *IUBMB life*, 62(9), 684-687.

Borrell, A., & Aguilar, A. (1993). DDT and PCB pollution in blubber and muscle of long-finned pilot whales from the Faroe Islands. *Biology of Northern hemisphere pilot whales*, 351-358.

- Bradlow HL, Davis DL, Lin G, Sepkovic D, Tiwari R. (1995). Effects of pesticides on the ratio of 16 α /2-hydroxyestrone: a biologic marker of breast cancer risk. *Environ Health Perspect* 103(suppl 7):147-150.
- Brawer, J. R., Naftolin, F., Martin, J., & Sonnenschein, C. (1978). Effects of a Single Injection of Estradiol Valerate on the Hypothalamic Arcuate Nucleus and on Reproductive Function in the Female Rat*. *Endocrinology*, 103(2), 501-512.
- Braun, J. M., Kalkbrenner, A. E., Calafat, A. M., Yolton, K., Ye, X., Dietrich, K. N., & Lanphear, B. P. (2011). Impact of early-life bisphenol A exposure on behavior and executive function in children. *Pediatrics*, 128(5), 873-882.
- Bromer, J. G., Zhou, Y., Taylor, M. B., Doherty, L., & Taylor, H. S. (2010). Bisphenol-A exposure in utero leads to epigenetic alterations in the developmental programming of uterine estrogen response. *The FASEB Journal*, 24(7), 2273-2280.
- Brown, L. M., Pottern, L. M., Hoover, R. N., Devesa, S. S., Aselton, P., & T Flannery, J. O. H. N. (1986). Testicular cancer in the United States: trends in incidence and mortality. *International journal of epidemiology*, 15(2), 164-170.
- Buschini, A., Carboni, P., Frigerio, S., Furlini, M., Marabini, L., Monarca, S., ... & Rossi, C. (2004). Genotoxicity and cytotoxicity assessment in lake drinking water produced in a treatment plant. *Mutagenesis*, 19(5), 341-347.
- Calafat, A. M., Ye, X., Jia, L. T., Hu, H., Huttner, K., Weuve, J. L., ... & Hauser, R. B. (2008). Exposure to bisphenol A and other phenols in neonatal intensive care unit premature infants.
- Calafat, A. M., Ye, X., Wong, L. Y., Reidy, J. A., & Needham, L. L. (2008). Exposure of the US population to Bisphenol A and 4-tertiary-Octylphenol: 2003-2004. *Environmental health perspectives*, 39-44.
- Capel, P. D., & Larson, S. J. (2001). Effect of scale on the behavior of atrazine in surface waters. *Environmental science & technology*, 35(4), 648-657.
- Carlsen, E., Giwercman, A., Keiding, N., & Skakkebaek, N. E. (1992). Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *Bmj*, 305(6854), 609-613.
- Carmeci, C., Thompson, D. A., Ring, H. Z., Francke, U., & Weigel, R. J. (1997). Identification of a gene (GPR30) with homology to the G-protein-coupled receptor superfamily associated with estrogen receptor expression in breast cancer. *Genomics*, 45(3), 607-617.
- Carson, R., (1962) *Silent Spring*. Edit Houghton Mifflin, Boston.
- Castello, G., & Silvestri, I. (1999). Il linfocita quale dosimetro biologico. *Caleidoscopio Italiano*, 130.
- Castles, C.G., Oesterreich, S., Hansen, R., and Fuqua, S.A. (1997). Auto-regulation of the estrogen receptor promoter. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 62 , 155–163.

- Charles, D.G., Gennings, C., Zacharewski, T.R., Gollapudi, B., Camey, E.W. (2002). An approach for assessing estrogen receptor-mediated interactions in mixture of three chemicals: a pilot study. *Toxic. Sciences*. 68, 349-360.
- Clarkson TW. Environmental contaminants in the food chain. (1995). *Am J Clin Nutr*.61, 682-6S.
- Colucci, M. S., Bork, H., & Topp, E. (2001). Persistence of estrogenic hormones in agricultural soils. *Journal of Environmental Quality*, 30(6), 2070-2076.
- Committee on Hormonally Active Agents in the Environment Board on Environmental Studies and Toxicology Commission on Life Sciences National Research Council
- Dalei, S. e Mitchell, A. L. (1999). Modulating nuclear receptor function: may the phos be with you. *J. Clin. Invest.*, 103 (12): 1617-1618.
- Daston GP, Cook JC, Kavlock RJ. (2003). Uncertainties for endocrine disrupters: our view on progress. *Toxicol Sci* 74:245–252.
- Daughton C.G (2004). Non-regulated water contaminants: emerging research. *Environmental Impact Assessment Review* 24: 711 – 732.
- Davis, D. L., Bradlow, H. L., Wolff, M., Woodruff, T., Hoel, D. G., & Anton-Culver, H. (1993). Medical hypothesis: xenoestrogens as preventable causes of breast cancer. *Environmental Health Perspectives*, 101(5), 372.
- Della Seta D, Minder I, Dessì-Fulgheri F, Farabollini F. (2005). Bisphenol A. exposure during pregnancy and lactation affects maternal behavior in rats. *Brain Research Bulletin*; 65:255-60.
- Deroo, B. J., & Korach, K. S. (2006). Estrogen receptors and human disease. *The Journal of clinical investigation*, 116(3), 561.
- Deklerk, D. P., Coffey, D. S., Ewing, L. L., McDermott, I. R., Reiner, W. G., Robinson, C. H., ... & Zirkin, B. R. (1979). Comparison of spontaneous and experimentally induced canine prostatic hyperplasia. *Journal of Clinical Investigation*, 64(3), 842.
- Dolinoy, D. C., Huang, D., & Jirtle, R. L. (2007). Maternal nutrient supplementation counteracts bisphenol A-induced DNA hypomethylation in early development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(32), 1305.
- EC. Report on Proceedings. European Workshop on the Impact of Endocrine Disruptors on Human Health and Wildlife. European Commission, DG XII, Environment and Climate Research Programme. EUR 17549, December 2-4 (Weybridge, UK) (1996).
- Eljarrat, E., & Barcelo, D. (2003). Priority lists for persistent organic pollutants and emerging contaminants based on their relative toxic potency in environmental samples. *Trac Trends in Analytical Chemistry*, 22(10), 655-665.
- Erler, C., & Novak, J. (2010). Bisphenol a exposure: human risk and health policy. *Journal of pediatric nursing*, 25(5), 400-407.

Ermawati, R., Morimura, S., Tang, Y., Liu, K., & Kida, K. (2007). Degradation and behavior of natural steroid hormones in cow manure waste during biological treatments and ozone oxidation. *Journal of bioscience and bioengineering*, 103(1), 27-31.

European Environment Agency, Europe's Environment - The Dobriš Assessment, Copenhagen 1995.

Evans, S. M., Leksono, T., & McKinnell, P. D. (1995). Tributyltin pollution: a diminishing problem following legislation limiting the use of TBT-based anti-fouling paints. *Marine Pollution Bulletin*, 30(1), 14-21.

Falck F, Ricci A, Wolff MS, Godbold J, Deckers P. (1992). Pesticides and polychlorinated biphenyl residues in human breast lipids and their relation to breast cancer. *Arch Environ Health* 47:143-146.

Fängström, B., Athanasiadou, M., Grandjean, P., Weihe, P., & Bergman, A. (2002). Hydroxylated PCB metabolites and PCBs in serum from pregnant Faroese women. *Environmental health perspectives*, 110(9), 895.

Fenech, M. (2000). The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 455(1), 81-95.

Fenech, M., Chang, W. P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S., & Zeiger, E. (2003). HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 534(1), 65-75

Fenton, S. E., Hamm, J. T., Birnbaum, L. S., & Youngblood, G. L. (2002). Persistent abnormalities in the rat mammary gland following gestational and lactational exposure to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *Toxicological Sciences*, 67(1), 63-74.

Fernandez, M. F., Arrebola, J. P., Taoufik, J., Navalón, A., Ballesteros, O., Pulgar, R., ... & Olea, N. (2007). Bisphenol-A and chlorinated derivatives in adipose tissue of women. *Reproductive toxicology*, 24(2), 259-264.

Fernandez, M. P., Ikonou, M. G., & Buchanan, I. (2007). An assessment of estrogenic organic contaminants in Canadian wastewaters. *Science of the Total Environment*, 373(1), 250-269.

Folmar, L. C., Hemmer, M. J., Denslow, N. D., Kroll, K., Chen, J., Cheek, A., ... & Grau, E. G. (2002). A comparison of the estrogenic potencies of estradiol, ethynylestradiol, diethylstilbestrol, nonylphenol and methoxychlor in vivo and in vitro. *Aquatic Toxicology*, 60(1), 101-110.

Fondazione AMGA. (2011). Interferenti endocrini nelle acque destinate al consumo umano. Approccio metodologico e valutazioni. Edit. FrancoAngeli.

Fossi M.C., Casini S., Marsili L. (1999). Nondestructive biomarkers of exposure to endocrine disrupting chemicals in endangered species of wildlife. *Cheraosphere*, Vol. 39, No. 8, pp. 1273-1285.

Fucic, A., Gamulin, M., Ferencic, Z., Katic, J., Kraymer von Krauss, M., Bartonova, A., & Merlo, D. F. (2012). Environmental exposure to xenoestrogens and oestrogen related cancers: reproductive system, breast, lung, kidney, pancreas, and brain. *Environ Health*, 11(Suppl 1), S8.

García-Rodríguez, J., García-Martín, M., Nogueras-Ocaña, M., de Dios Luna-del-Castillo, J., Garcia, M. E., Olea, N., & Lardelli-Claret, P. (1996). Exposure to pesticides and cryptorchidism: geographical evidence of a possible association. *Environmental Health Perspectives*, 104(10), 1090.

Garriott, M. L., Phelps, J. B., & Hoffman, W. P. (2002). A protocol for the in vitro micronucleus test: I. Contributions to the development of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 16 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 517(1), 123-134.

Geens, T., Aerts, D., Berthot, C., Bourguignon, J. P., Goeyens, L., Lecomte, P., ... & Covaci, A. (2012). A review of dietary and non-dietary exposure to bisphenol-A. *Food and chemical toxicology*, 50(10), 3725-3740.

Gibson, R., Durán-Álvarez, J. C., Estrada, K. L., Chávez, A., & Cisneros, B. J. (2010). Accumulation and leaching potential of some pharmaceuticals and potential endocrine disruptors in soils irrigated with wastewater in the Tula Valley, Mexico. *Chemosphere*, 81(11), 1437-1445.

Gorga, M., Martínez, E., Ginebreda, A., Eljarrat, E., & Barceló, D. (2013). Determination of PBDEs, HBB, PBEB, DBDPE, HBCD, TBBPA and related compounds in sewage sludge from Catalonia (Spain). *Science of the Total Environment*, 444, 51-59.

Gray, L. E. (1992). Chemical-induced alterations of sexual differentiation: a review of effects in humans and rodents. *Advances in Modern Environmental Toxicology* (Colborn T, Clement C, eds). Princeton, NJ: Princeton Scientific Publishing Co, 203, 230.

Gronemeyer, H. e Laudet, V. (1995). Transcription factors 3: nuclear receptors. *Prot. Profile*; 2: 1173 - 1308.

Gruppo Hera, (2010) “Gli interferenti endocrini nelle acque. I metodi di rilevazione e le ricerche per l’abbattimento dei nuovi inquinanti: dalle sostanze stupefacenti ai derivati dalla cosmesi.” Atti convegno -24 settembre 2010 Ferrara.
http://www.gruppohera.it/binary/hr_canale_acqua/interventi_endocrini/Report_Interferenti_Web.1316597614.pdf

Hanet N., Lanconb A., Delmas D., Janninb B., Chagnona M., Cherkaoui-Malki M., Latruffe N., Artur Y., Heyde J., (2008). Effects of endocrine disruptors on genes associated with 17-estradiol metabolism and excretion, *Steroids* 73, 1242–1251.

Hansen P-D, Dizer H, Hock B, Marx A, Sherry J, McMaster M, Blaise C. (1998). Vitellogenin- a biomarker for endocrine disruptors, *Trends Anal Chem* 17, 448-51.

- Hartig C., Storm T., Jekel M. (1999). Detection and identification of sulphonamide drugs in municipal wastewater by liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 854: 163-173.
- Hatch E.E, Nelson J.W., Stahlhut R.W., Webster T.F (2010). Association of endocrine disruptors and obesity: perspectives from epidemiological studies, *International Journal of Andrology*, 33: 324-332.
- Hayashi, M., Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H. J., & Thybaud, V. (2011). Compilation and use of genetic toxicity historical control data. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 723(2), 87-90.
- Heemken, O. P., Reincke, H., Stachel, B., & Theobald, N. (2001). The occurrence of xenoestrogens in the Elbe river and the North Sea. *Chemosphere*, 45(3), 245-259.
- Heneweer, M., Muusse, M., van den Berg, M., & Sanderson, J. T. (2005). Additive estrogenic effects of mixtures of frequently used UV filters on pS2-gene transcription in MCF-7 cells. *Toxicology and applied pharmacology*, 208(2), 170-177.
- Henny, C. J., Grove, R. A., & Hedstrom, O. R. (1996). A field evaluation of mink and river otter on the lower Columbia River and the influence of environmental contaminants. Final Report to the Lower Columbia River Bi-State Water Quality Program (Portland, OR). Corvallis, OR: National Biological Service, Forest and Rangeland Ecosystem Science Center.
- Henriksen, E. O., Wiig, Ø., Skaare, J. U., Gabrielsen, G. W., & Derocher, A. E. (2001). Monitoring PCBs in polar bears: lessons learned from Svalbard. *Journal of Environmental Monitoring*, 3(5), 493-498.
- Herbst, A. L., Ulfelder, H., & Poskanzer, D. C. (1971). Adenocarcinoma of the vagina: association of maternal stilbestrol therapy with tumor appearance in young women. *New England journal of medicine*, 284(16), 878-881.
- Hewitt, R., Forero, A., Luncsford, P. J., & Martin, F. L. (2007). Enhanced micronucleus formation and modulation of BCL-2: BAX in MCF-7 cells after exposure to binary mixtures. *Environmental health perspectives*, 115, 129.
- Ho, S. M., Tang, W. Y., de Frausto, J. B., & Prins, G. S. (2006). Developmental exposure to estradiol and bisphenol A increases susceptibility to prostate carcinogenesis and epigenetically regulates phosphodiesterase type 4 variant 4. *Cancer research*, 66(11), 5624-5632.
- Hoover, R. N., Hyer, M., Pfeiffer, R. M., Adam, E., Bond, B., Cheville, A. L., ... & Troisi, R. (2011). Adverse health outcomes in women exposed in utero to diethylstilbestrol. *New England Journal of Medicine*, 365(14), 1304-1314.
- Hu, J., Cheng, S., Aizawa, T., Terao, Y., & Kunikane, S. (2003). Products of aqueous chlorination of 17 β -estradiol and their estrogenic activities. *Environmental science & technology*, 37(24), 5665-5670.

Huggett, D. B., Foran, C. M., Brooks, B. W., Weston, J., Peterson, B., Marsh, K. E., ... & Schlenk, D. (2003). Comparison of in vitro and in vivo bioassays for estrogenicity in effluent from North American municipal wastewater facilities. *Toxicological Sciences*, 72(1), 77-83.

IPCS, W., & World Health Organization. (1999). International programme on chemical safety. *Environmental health criteria*, 217.

Iso, T., Watanabe, T., Iwamoto, T., Shimamoto, A., & Furuichi, Y. (2006). DNA damage caused by bisphenol A and estradiol through estrogenic activity. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29(2), 206-210.

Jeyakumar M, Webb P, Baxter JD, et al. (2008). Quantification of ligand-regulated nuclear receptor corepressor and coactivator binding, key interactions determining ligand potency and efficacy for the thyroid hormone receptor. *Biochemistry* 47: 7465–7476.

Johnson, G. E., & Parry, E. M. (2008). Mechanistic investigations of low dose exposures to the genotoxic compounds bisphenol-A and rotenone. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 651(1), 56-63.

Kang, J. H., Kondo, F., & Katayama, Y. (2006). Human exposure to bisphenol A. *Toxicology*, 226(2), 79-89.

Kasprzyk-Hordern B., Dinsdale R.M., Guwy A.J. (2007). Multi-residue method for the determination of basic/neutral pharmaceuticals and illicit drugs in surface water by solid-phase extraction and ultra performance liquid chromatography–positive electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1161: 132–145.

Kasprzyk-Hordern B., Dinsdale R.M., Guwy A.J. (2009). The removal of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs during wastewater treatment and its impact on the quality of receiving waters. *Water Research*, 43: 363-380.

Kavlock, R. J. (1999). Overview of endocrine disruptor research activity in the United States. *Chemosphere*, 39(8), 1227-1236.

Kim, S. D., Cho, J., Kim, I. S., Vanderford, B. J., & Snyder, S. A. (2007). Occurrence and removal of pharmaceuticals and endocrine disruptors in South Korean surface, drinking, and waste waters. *Water research*, 41(5), 1013-1021.

Kirk LA, Tyler CR, Lye C, Sumpter JP. Changes in estrogenic androgenic activities at different stages of treatment in wastewater treatment works. *Environ Toxicol Chem* 2002;21: 972–9.

Klein, G. P., Hodge, E. M., Diamond, M. L., Yip, A., Dann, T., Stern, G., ... & Harper, P. A. (2006). Gas-phase ambient air contaminants exhibit significant dioxin-like and estrogen-like activity in vitro. *Environmental health perspectives*, 697-703.

Kocan, A., Petrik, J., Jursa, S., Chovancova, J., & Drobna, B. (2001). Environmental contamination with polychlorinated biphenyls in the area of their former manufacture in Slovakia. *Chemosphere*, 43(4), 595-600.

- Kolpin D.W., Furlong E.T., Meyer M.T., Thurman E.M, Steven D.Z, Barber L.B. and Buxton H.T. (2002). Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in u.s streams, 1999-2000: a national reconnaissance. *Environ. Sci. Technol.*, 36: 1202-1211.
- Körner, W., Bolz, U., Süßmuth, W., Hiller, G., Schuller, W., Hanf, V., & Hagenmaier, H. (2000). Input/output balance of estrogenic active compounds in a major municipal sewage plant in Germany. *Chemosphere*, 40(9), 1131-1142.
- Körner, W., Hanf, V., Schuller, W., Kempfer, C., Metzger, J., & Hagenmaier, H. (1999). Development of a sensitive E-screen assay for quantitative analysis of estrogenic activity in municipal sewage plant effluents. *Science of the Total Environment*, 225(1), 33-48.
- Kortenkamp, A., Martin, O., Faust, M., Evans, R., McKinlay, R., Orton, F., & Rosivatz, E. (2011). State of the art assessment of endocrine disrupters. Final Report. [Online] Available at: [http://ec.europa.eu/environment/endocrine/documents/4_SOTA% 20EDC% 20Final% 20Report, 20, V3](http://ec.europa.eu/environment/endocrine/documents/4_SOTA%20EDC%20Final%20Report,20,V3).
- Kuch, H. M., & Ballschmiter, K. (2001). Determination of endocrine-disrupting phenolic compounds and estrogens in surface and drinking water by HRGC-(NCD)-MS in the picogram per liter range. *Environmental science & technology*, 35(15), 3201-3206.
- Kundakovic, M., & Champagne, F. A. (2011). Epigenetic perspective on the developmental effects of bisphenol A. *Brain, behavior, and immunity*, 25(6), 1084-1093.
- Kuster, M., de Alda, M. J. L., Hernando, M. D., Petrovic, M., Martín-Alonso, J., & Barceló, D. (2008). Analysis and occurrence of pharmaceuticals, estrogens, progestogens and polar pesticides in sewage treatment plant effluents, river water and drinking water in the Llobregat river basin (Barcelona, Spain). *Journal of Hydrology*, 358(1), 112-123.
- Kwintkiewicz, J., Nishi, Y., Yanase, T., & Giudice, L. C. (2010). Peroxisome proliferator-activated receptor- γ mediates bisphenol A inhibition of FSH-stimulated IGF-1, aromatase, and estradiol in human granulosa cells. *Environmental health perspectives (Online)*, 118(3), 400.
- Lacroix, M., & Leclercq, G. (2004). Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update. *Breast cancer research and treatment*, 83(3), 249-289.
- Laden, F., Schwartz, J., Speizer, F. E., & Dockery, D. W. (2006). Reduction in fine particulate air pollution and mortality: extended follow-up of the Harvard Six Cities study. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 173(6), 667-672.
- Larsson D.G.J, Adolfsson-Erici M., Parkkonen J., Pettersson M., Berg A.H, Olsson P.-E., Fořrlin L. (1999). Ethinyloestradiol — an undesired fish contraceptive?. *Aquatic Toxicology* 45, 91–97.
- Levenson A., Jordan V. (1997). MCF-7: The first hormone-responsive breast cancer cell line. *Cancer research*, 57(15), 3071-3078.
- Lindholm C., Pedersen K.L., Pedersen S.N. (2000). Estrogenic response of bisphenol A in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Aquatic Toxicology* 4887–94.

Lindström G, Wingfors H, Dam M, von Bavel B. Identification of 19 polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in long-finned pilot whale (*Globicephala melas*) from the atlantic. (1999). *Arch Environ Contam Toxicol*, 36, 355-63.

Loffredo, E., & Senesi, N. (2006). Fate of anthropogenic organic pollutants in soils with emphasis on adsorption/desorption processes of endocrine disruptor compounds. *Pure and applied chemistry*, 78(5), 947-961.

Lorge, E., Thybaud, V., Aardema, M. J., Oliver, J., Wakata, A., Lorenzon, G., & Marzin, D. (2006). SFTG international collaborative study on in vitro micronucleus test: I. General conditions and overall conclusions of the study. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 607(1), 13-36.

Lye C.M., Frid C. L. J., Gill M. E., Cooper D. W., and Jones D. M. (1999). Estrogenic Alkylphenols in Fish Tissues, Sediments, and Waters from the U.K. Tyne and Tees Estuaries, *Environ. Sci. Technol.*, 33, 1009-1014.

Mackay, D., & Fraser, A. (2000). Bioaccumulation of persistent organic chemicals: mechanisms and models. *Environmental pollution*, 110(3), 375-391.

MacLusky NJ, Hajszan T, Leranath C. (2005). The environmental estrogen bisphenol A inhibits estradiol induced hippocampal synaptogenesis. *Environ. Health Perspect*; 113:675-79.

Maffei, F., Carbone, F., Forti, G. C., Buschini, A., Poli, P., Rossi, C., ... & Hrelia, P. (2009). Drinking water quality: an in vitro approach for the assessment of cytotoxic and genotoxic load in water sampled along distribution system. *Environment international*, 35(7), 1053-1061.

Matsumoto, H., Adachi, S., & Suzuki, Y. (2005). Bisphenol A in Ambient Air Particulates Responsible for the Proliferation of MCF-7 Human Breast Cancer Cells and Its Concentration Changes over 6 Months. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 48(4), 459-466.

McLachlan, J. A., Korach, K. S., & Metzler, M. (1978). Bioavailability as a determinant in the transplacental toxicity of diethylstilbestrol. In *Role of Pharmacokinetics in Prenatal and Perinatal Toxicology* (pp. 147-155). Georg Thieme Publishers Stuttgart.

Menditto A and L. Turrio-Baidassarri (1999). Environmental and biological monitoring of endocrine disrupting chemicals. *Chemosphere*, Vol. 39, No. 8, pp. 130.

Metcalf, C. D., Metcalfe, T. L., Kiparissis, Y., Koenig, B. G., Khan, C., Hughes, R. J., ... & Potter, T. (2001). Estrogenic potency of chemicals detected in sewage treatment plant effluents as determined by in vivo assays with Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20(2), 297-308.

Metcalf & Eddy (2006). 4th ed. *Ingegneria delle acque reflue. Trattamento e riuso*. Milano: The McGraw-Hill Companies.

- Miyawaki, J., Sakayama, K., Kato, H., Yamamoto, H., & Masuno, H. (2007). Perinatal and postnatal exposure to bisphenol a increases adipose tissue mass and serum cholesterol level in mice. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*, 14(5), 245-252.
- Møller, H., Mellemegaard, A., Storm, H. H., Jacobsen, G. K., & Pedersen, D. (1993). Incidence of second primary cancer following testicular cancer. *European Journal of Cancer*, 29(5), 672-676.
- Morani A, Warner M, Gustafsson JA. (2008). Biological functions and clinical implications of oestrogen receptors alfa and beta in epithelial tissues. *J Intern Med* 264: 128–142.
- Mosselman, S., Polman, J., & Dijkema, R. (1996). ER β : identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS letters*, 392(1), 49-53.
- Nakamura, H., Shiozawa, T., Terao, Y., Shiraishi, F., & Fukazawa, H. (2006). By-products produced by the reaction of estrogens with hypochlorous acid and their estrogen activities. *Journal of health science*, 52(2), 124-131.
- Newbold R.R. (2010). Impact on environmental endocrine disrupting chemicals on the development of obesity”, *Hormones*, 9: 206-217.
- O'Dowd, B. F., Nguyen, T., Marchese, A., Cheng, R., Lynch, K. R., Heng, H. H., ... & George, S. R. (1998). Discovery of three novel G-protein-coupled receptor genes. *Genomics*, 47(2), 310-313.
- Oehlmann J., Schulte-Oehlmann U., Kloas W., Jagnytsch O., Lutz I., Kusk K.O., Wollenberger L., Santos E.M., Paull G.C., Van Look K.J., Tyler C.R., (2009). A critical analysis of the biological impacts of plasticizers on wildlife, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, vol. 364 (1526), pp. 2047-2062.
- Oikawa, S., & Matsumoto, M. (2003). Relevant activities for risk management of endocrine disruptors in Japanese government agencies. *Pure and applied chemistry*, 75(11-12), 2609-2611.
- Onda, K., Yang, S., Miya, A., & Tanaka, T. (2002). Evaluation of estrogen-like activity on sewage treatment processes using recombinant yeast. *Water Science & Technology*, 46(11-12), 367-373.
- Papaleo, B., Caporossi, L., De Rosa, M., Chiovato, L., Ferrari, M., Imbriani, M., ... & Pera, A. (2004). Esposizione professionale a distruttori endocrini: stato dell'arte. *Giornale Italiano di Medicina del Lavoro ed Ergonomia*, 26(3), 171-179.
- Park, S. Y., & Choi, J. (2007). Cytotoxicity, genotoxicity and ecotoxicity assay using human cell and environmental species for the screening of the risk from pollutant exposure. *Environment international*, 33(6), 817-822.
- Parkin, D. M., Bray, F., Ferlay, J., & Pisani, P. (2001). Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *International journal of cancer*, 94(2), 153-156.

- Pedram A., Razandi, M., & Levin, E. R. (2006). Nature of functional estrogen receptors at the plasma membrane. *Molecular Endocrinology*, 20(9), 1996-2009.
- Pellegrini, M., Acconcia, F., & Marino, M. Endocrine disruptors: a gender affair.
- Peterson, E. W., Davis, R. K., & Orndorff, H. A. (2000). 17 β -Estradiol as an indicator of animal waste contamination in mantled karst aquifers. *Journal of Environmental Quality*, 29(3), 826-834.
- Pinto P., Estêvão M.D and Power D.M (2014). Effects of Estrogens and Estrogenic Disrupting Compounds on Fish Mineralized Tissues *Mar. Drugs* 2014, 12(8), 4474-4494.
- Pryor, J. L., Hughes, C., Foster, W., Hales, B. F., & Robaire, B. (2000). Critical windows of exposure for children's health: the reproductive system in animals and humans. *Environmental Health Perspectives*, 108(Suppl 3), 491.
- Rajapakse, N., Silva, E., & Kortenkamp, A. (2002). Combining xenoestrogens at levels below individual no-observed-effect concentrations dramatically enhances steroid hormone action. *Environmental Health Perspectives*, 110(9), 917.
- Ramamoorthy, K., Wang, F., Chen, I. C., Norris, J. D., McDonnell, D. P., Leonard, L. S., ... & Safe, S. (1997). Estrogenic Activity of a Dieldrin/Toxaphene Mixture in the Mouse Uterus, MCF-7 Human Breast Cancer Cells, and Yeast-Based Estrogen Receptor Assays: No Apparent Synergism 1. *Endocrinology*, 138(4), 1520-1527.
- Rapporti ISTISAN 07/5. Bonadonna, L., Ottaviani, M. (2007). Metodi analitici di riferimento per le acque destinate al consumo umano ai sensi del DL.vo 31/2001. Metodi microbiologici. Istituto superiore di Sanità. <http://www.iss.it/binary/aqua/cont/RappIstisan%2007%205.1204715346.pdf>.
- Rapporti ISTISAN 07/31. Bonadonna, L., Ottaviani, M. (2007). Metodi analitici di riferimento per le acque destinate al consumo umano ai sensi del DL.vo 31/2001. Metodi chimici. Istituto superiore di Sanità. <http://www.iss.it/binary/aqua/cont/Rapp%20Ist%2007%2031.1193412143.pdf>.
- Rapporti ISTISAN 09/18. Calamandrei, G., La Rocca, C., Venerosi, A., Mantovani, A. (2009). Interferenti endocrini: valutazione e prevenzione dei possibili rischi per la salute umana. Istituto superiore di Sanità. <http://www.iss.it/binary/publ/cont/0918WEB.pdf>.
- Rapporti ISTISAN 11/18: Achene, L., Bogialli, S., Lucentini, L., Pettine, P., Ottaviani, M. (2011). Interferenti endocrini nelle acque da destinare al consumo umano in Italia: strumenti metodologici per un'indagine conoscitiva estesa a diversi sistemi idrici. Istituto superiore di Sanità. http://www.iss.it/binary/publ/cont/11_18_web.pdf.
- Ricupito, A., Del Pozzo, G., Diano, N., Grano, V., Portaccio, M., Marino, M., ... & Mita, D. G. (2009). Effect of bisphenol A with or without enzyme treatment on the proliferation and viability of MCF-7 cells. *Environment international*, 35(1), 21-26.
- Rotchell, J., & Ostrander, G. (2003). Molecular markers of endocrine disruption in aquatic organisms. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part B: Critical Reviews*, 6(5), 453-496.

- Rodriguez-Mozaz, S., de Alda, M. J. L., & Barceló, D. (2004). Monitoring of estrogens, pesticides and bisphenol A in natural waters and drinking water treatment plants by solid-phase extraction–liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1045(1), 85-92.
- Roman-Blas, J. A., Castañeda, S., Largo, R., & Herrero-Beaumont, G. (2009). Osteoarthritis associated with estrogen deficiency. *Arthritis Res Ther*, 11(5), 241.
- Rotchelle J.M, Ostrander G.K (2003). Molecular effects of endocrine disrupters in aquatic organisms, *J. Toxicol. Environ. Health B*, 6, pp. 453–495.
- Rudel, R. A., Camann, D. E., Spengler, J. D., Korn, L. R., & Brody, J. G. (2003). Phthalates, alkylphenols, pesticides, polybrominated diphenyl ethers, and other endocrine-disrupting compounds in indoor air and dust. *Environmental science & technology*, 37(20), 4543-4553.
- Salste, L., Leskinen, P., Virta, M., & Kronberg, L. (2007). Determination of estrogens and estrogenic activity in wastewater effluent by chemical analysis and the bioluminescent yeast assay. *Science of the total environment*, 378(3), 343-351.
- Sbraccia P., Guglielmi V. (2012). Endocrine disruptors e-diabete-tipo-2-, Dipartimento di Medicina dei Sistemi, Università di Roma “Tor Vergata”, il Diabete vol. 24 n. 3.
- Schmid, W. (1975). The micronucleus test. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 31(1), 9-15.
- Sellström, U., Kierkegaard, A., Alsberg, T., Jonsson, P., Wahlberg, C., & De Wit, C. (1999). Brominated Flame Retardants in Sediments from European Estuaries, the Baltic Sea and in Sewage Sludge. *Organohalogen compounds*, 40, 383-386.
- Shi YB. (2009). Dual functions of thyroid hormone receptors in vertebrate development: the roles of histone-modifying cofactor complexes. *Thyroid* 19: 987–999.
- Shore, L. S., Correll, D. L., & Chakraborty, P. K. (1995). Relationship of fertilization with chicken manure and concentrations of estrogens in small streams.
- Skakkebaek, N. E., Rajpert-De Meyts, E., & Main, K. M. (2001). Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects: Opinion. *Human reproduction*, 16(5), 972-978.
- Silva, E., Rajapakse, N., & Kortenkamp, A. (2002). Something from “nothing”-eight weak estrogenic chemicals combined at concentrations below NOECs produce significant mixture effects. *Environmental science & technology*, 36(8), 1751-1756.
- Singh, S., & Li, S. S. L. (2012). Epigenetic effects of environmental chemicals bisphenol a and phthalates. *International journal of molecular sciences*, 13(8), 10143-10153.
- Sohoni P, Sumpter JP. (1998). Several environmental oestrogens are also anti-androgens. *J Endocrinol* 158: 327—339.

- Sommer, S., & Fuqua, S. A. (2001, October). Estrogen receptor and breast cancer. In *Seminars in cancer biology* (Vol. 11, No. 5, pp. 339-352). Academic Press.
- Soto, A. M., Sonnenschein, C., Chung, K. L., Fernandez, M. F., Olea, N., & Serrano, F. O. (1995). The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environmental health perspectives*, 103(Suppl 7), 113.
- Soule, H. D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S., & Brennan, M. (1973). A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*, 51(5), 1409-1416.
- Strohsnitter, W. C., Noller, K. L., Hoover, R. N., Robboy, S. J., Palmer, J. R., Titus-Ernstoff, L., ... & Hatch, E. E. (2001). Cancer risk in men exposed in utero to diethylstilbestrol. *Journal of the National Cancer Institute*, 93(7), 545-551.
- Sultan C., Balaguer P., Terouanne B., Georget V., Paris P., Jeandel C., Lumbroso S, Nicolas J (2001). Environmental xenoestrogens, antiandrogens and disorder of male sexual differentiation, *Molecular and Cellular Endocrinology* 178 99-105.
- Sumpter J.P. and Jobling S.(1995). Vitellogenesis as a Biomarker for Estrogenic Contamination of the Aquatic Environment, *Environ Health Perspect* 103(Suppl 7):173-178.
- Suzuki, Y., Kubota, A., Furukawa, T., Sugamoto, K., Asano, Y., Takahashi, H., ... & Sugimoto, Y. (2009). Residual of 17 β -estradiol in digestion liquid generated from a biogas plant using livestock waste. *Journal of hazardous materials*, 165(1), 677-682.
- Tabata, A., Kashiwada, S., Ohnishi, Y., Ishikawa, H., Miyamoto, N., Itoh, M., & Magara, Y. (2001). Estrogenic influences of estradiol-17 β , p-nonylphenol and bis-phenol-A on Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) at detected environmental concentrations. *Water Science & Technology*, 43(2), 109-116.
- Takasugi, N. (1988). Introduction: Abnormal Genital Tract Development in Mammals Following Early Exposure to Sex Hormones. *Toxicity of Hormones in Prenatal Life*, 1-7.
- Takayanagi, S., Tokunaga, T., Liu, X., Okada, H., Matsushima, A., & Shimohigashi, Y. (2006). Endocrine disruptor bisphenol A strongly binds to human estrogen-related receptor γ (ERR γ) with high constitutive activity. *Toxicology letters*, 167(2), 95-105.
- Tan, B. L., Hawker, D. W., Müller, J. F., Leusch, F. D., Tremblay, L. A., & Chapman, H. F. (2007). Comprehensive study of endocrine disrupting compounds using grab and passive sampling at selected wastewater treatment plants in South East Queensland, Australia. *Environment international*, 33(5), 654-669.
- Ternes, T. A., Stumpf, M., Mueller, J., Haberer, K., Wilken, R. D., & Servos, M. (1999). Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants—I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. *Science of the Total Environment*, 225(1), 81-90.

Thomas P and Dong J. (2006). Binding and activation of the seven-transmembrane estrogen receptor 551 GPR30 by environmental estrogens: a potential novel mechanism of endocrine disruption. *J Steroid Biochem Mol Biol* 102: 175-179.

Tiwari, D., Kamble, J., Chilgunde, S., Patil, P., Maru, G., Kawle, D., ... & Vanage, G. (2012). Clastogenic and mutagenic effects of bisphenol A: an endocrine disruptor. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 743(1), 83-90

Uzumcu, M., & Zachow, R. (2007). Developmental exposure to environmental endocrine disruptors: consequences within the ovary and on female reproductive function. *Reproductive toxicology*, 23(3), 337-352.

Vandenberg, L. N., Colborn, T., Hayes, T. B., Heindel, J. J., Jacobs Jr, D. R., Lee, D. H., ... & Myers, J. P. (2012). Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocrine reviews*.

Velicu M, Suri R. (2009). Presence of steroid hormones and antibiotics in surface water of agricultural, suburban and mixed-use areas. *Environ Mon Assess* 154:349-59.

Verslycke, T. A., Vethaak, A. D., Arijs, K., & Janssen, C. R. (2005). Flame retardants, surfactants and organotins in sediment and mysid shrimp of the Scheldt estuary (The Netherlands). *Environmental pollution*, 136(1), 19-31.

Villalobos, M., Olea, N., Brotons, J. A., Olea-Serrano, M. F., Ruiz de Almodovar, J. M., & Pedraza, V. (1995). The E-screen assay: a comparison of different MCF7 cell stocks. *Environmental Health Perspectives*, 103(9), 844-850.

Vivacqua, A., Recchia, A. G., Fasanella, G., Gabriele, S., Carpino, A., Rago, V., ... & Maggiolini, M. (2003). The food contaminants bisphenol A and 4-nonylphenol act as agonists for estrogen receptor α in MCF7 breast cancer cells. *Endocrine*, 22(3), 275-284.

Vivacqua, A., Bonofiglio, D., Recchia, A. G., Musti, A. M., Picard, D., Andò, S., & Maggiolini, M. (2006). The G protein-coupled receptor GPR30 mediates the proliferative effects induced by 17 β -estradiol and hydroxytamoxifen in endometrial cancer cells. *Molecular endocrinology*, 20(3), 631-646.

Vogel S.A., (2009), *The Politics of Plastics: The Making and Unmaking of Bisphenol A* "Safety", *Am J Public Health*, vol 99, pp. 559-566.

Vom Saal FS, Montano MM, Wang HS (1992), Sexual differentiation in mammals. In: *Chemically induced alterations in sexual and functional development: the wildlife/human connection* (Colborn T, Clement C, eds). Princeton, NJ: Princeton Scientific Publishing, 17-83.

Weidner, I. S., Møller, H., Jensen, T. K., & Skakkebaek, N. E. (1998). Cryptorchidism and hypospadias in sons of gardeners and farmers. *Environmental Health Perspectives*, 106(12), 793.

Wenzel, A., Müller, J., & Ternes, T. (2003). Study on endocrine disrupters in drinking water. Final report ENV. D.

Wetherill, Y. B., Fisher, N. L., Staubach, A., Danielsen, M., de Vere White, R. W., & Knudsen, K. E. (2005). Xenoestrogen action in prostate cancer: pleiotropic effects dependent on androgen receptor status. *Cancer research*, 65(1), 54-65.

White DH, Hoffman DJ. (1995). Effects of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans on nesting wood ducks (*Aix sponsa*) at Bayou Meto, Arkansas. *Environ Health Perspect* 103, 37-9.

Wolff MS, Toniolo PG, Leel EW, Rivera M, Dubin N. (1993) Blood levels of organochlorine residues and risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 85:648-652.

Wozniak, A. L., Bulayeva, N. N., & Watson, C. S. (2005). Xenoestrogens at picomolar to nanomolar concentrations trigger membrane estrogen receptor- α -mediated Ca²⁺ fluxes and prolactin release in GH3/B6 pituitary tumor cells. *Environmental health perspectives*, 431-439.

Xiao, X. Y., McCalley, D. V., & McEvoy, J. (2001). Analysis of estrogens in river water and effluents using solid-phase extraction and gas chromatography–negative chemical ionisation mass spectrometry of the pentafluorobenzoyl derivatives. *Journal of Chromatography A*, 923(1), 195-204.

Yoshida, T., Horie, M., Hoshino, Y., Nakazawa, H., Horie, M., & Nakazawa, H. (2001). Determination of bisphenol A in canned vegetables and fruit by high performance liquid chromatography. *Food Additives & Contaminants*, 18(1), 69-75.

Zeise, L., Cardis, E., Hemminki, K., & Schwarz, M. (1999). Quantitative estimation and prediction of cancer risk: review of existing activities. *IARC scientific publications*, (131), 11.

Zeng, Q., Zhang, S. H., Liao, J., Miao, D. Y., Wang, X. Y., Yang, P., ... & Lu, W. Q. (2015). Evaluation of genotoxic effects caused by extracts of chlorinated drinking water using a combination of three different bioassays. *Journal of hazardous materials*, 296, 23-29.

SITI CONSULTATI

<http://www.arpa.emr.it>

<http://www.aster.it/tiki-index.php?page=HomePage>

<http://www.edenetwork.it/>

<http://www.iss.it/>

<http://www.minambiente.it/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>

<http://www.scopus.com/>