

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI  
"FEDERICO II"**

**Dottorato di Ricerca in  
"Riproduzione, Sviluppo ed Accrescimento  
dell'Uomo"**

**Coordinatore: Prof. Claudio Pignata**

**Tesi di Dottorato**

***" Impatto di inquinanti ambientali sulla funzione  
riproduttiva dei gameti umani"***

**Tutore  
Dott. Alviggi Carlo**

**Candidato  
Dott.ssa Bianco Cristina**

**Anno Accademico 2008/2009**

## INDICE

**Background e Progetto dell'Attività di Ricerca.....pag.4**

### **Capitolo 1: Correlazione tra variabili ambientali e livelli di benzene**

Introduzione.....	pag.6
Materiali e Metodi.....	pag.14
Risultati.....	pag.22
Discussione.....	pag.26

### **Capitolo 2: Impatto dei livelli di benzene sulla qualità ovocitaria, sui tassi di fertilizzazione, sulla qualità embrionaria e sull'outcome in termini di gravidanza**

Introduzione.....	pag.27
Materiali e Metodi.....	pag.31
Risultati.....	pag.38
Discussione.....	pag.41

### **Capitolo 3: Ruolo dei livelli di benzene sui parametri endocrini endogeni**

Introduzione.....	pag.43
Materiali e Metodi.....	pag.44
Risultati.....	pag.45
Discussione.....	pag.47

## **Capitolo 4: Impatto dei livelli di benzene sulla qualità del liquido seminale**

Introduzione.....	pag.50
Materiali e Metodi.....	pag.51
Risultati.....	pag.53
Discussione.....	pag.56
<b>Bibliografia.....</b>	<b>pag.58</b>

## **Background e Progetto dell'Attività di Ricerca**

Nella specie umana la capacità riproduttiva e la conseguente fertilità di coppia tendono progressivamente a decrescere, soprattutto a causa dei numerosi cambiamenti socio-antropologici ed ambientali che si stanno imponendo negli ultimi anni. Numerose stime individuano nel 12–15% delle coppie in età fertile una condizione di sterilità, definita, dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (O.M.S.) e dall'American Society for Reproductive Medicine (A.S.R.M.), come l'incapacità di concepire dopo 12 mesi o più di rapporti sessuali non protetti, o dopo 6 mesi in caso di donne di età superiore ai 35 anni.

Il “*fattore ambientale*” ha avuto un ruolo decisivo nell'incremento di tale percentuale. È ormai chiaro come l'aumento dell'industrializzazione ed il conseguente inquinamento ambientale, il sempre maggior utilizzo di prodotti chimici di sintesi, l'esposizione ripetuta a fattori di rischio (piombo, mercurio, solventi, eteri glicolici, pesticidi, cadmio, manganese, stirene, ecc), tanto nell'ambiente di lavoro quanto nell'ambiente domestico, incidano negativamente sulle capacità riproduttive (Bhatt, 2000).

In particolare, l'esposizione al benzene in ambiente lavorativo è stato associato ad aumentata incidenza di menorragia, oligomenorrea, sterilità, ipoplasia e degenerazione ovarica (Vara e Kinnunen, 1946); a maggiori tassi di interruzione prematura di gravidanza, rottura di placenta e asfissia intrauterina del feto

(Mukhametova e Vozovaya, 1972); ad un aumento dei tassi di disordini mestruali, aborti spontanei e gestosi (Huang, 1991).

Inoltre, diversi autori hanno rivolto la loro attenzione all'associazione tra inquinamento ambientale e caratteristiche del seme maschile. Carlsen *et al.* hanno pubblicato nel 1992 un meta-analisi di tutti i lavori prodotti negli ultimi cinquanta anni.

Obiettivo del Dottorato di Ricerca in “Accrescimento, Sviluppo e Riproduzione dell’Uomo” è definire i livelli di benzene nei liquidi follicolari e nei liquidi seminali. Nei liquidi follicolari, per valutare l’impatto delle variabili ambientali-comportamentali sulla funzione riproduttiva della donna mediante il modello di Procreazione Medicalmente Assistita.

Si indagherà in parallelo su tre linee di ricerca:

- Se esiste una correlazione tra variabili ambientali, con particolare riferimento ai dati demografici e alle abitudini comportamentali, e livelli di benzene intrafollicolare.
- Il ruolo dei livelli di benzene sui parametri endocrini endogeni che esprimono una corretta funzionalità ovarica.
- L’impatto dei livelli di benzene sulla qualità ovocitaria, sui tassi di fertilizzazione, sulla qualità embrionaria e sull’outcome in termini di gravidanza.

Nei liquidi seminali, per valutare l’impatto delle variabili ambientali-comportamentali sui parametri morfo-funzionali che caratterizzano il seme mediante la valutazione del liquido seminale.

## CAPITOLO 1

### CORRELAZIONE TRA VARIABILI AMBIENTALI E LIVELLI DI BENZENE INTRAFOLLICOLARE

Il benzene presente nell'ambiente deriva sia da processi naturali che da attività umane. Le fonti naturali forniscono un contributo relativamente esiguo rispetto a quelle antropogeniche e sono dovute essenzialmente alle emissioni vulcaniche e agli incendi boschivi. La maggior parte del benzene presente nell'aria è invece un sottoprodotto delle attività umane.

Le sorgenti maggiori di benzene sono rappresentate dall'industria petrolchimica, le raffinerie ed i gas di scarico. Negli ambienti chiusi, invece, il contributo maggiore all'esposizione è attribuibile al fumo di tabacco. (Powell and Tucker, 1986; USEPA, 1987; Shah and Singh, 1988; ATSDR, 1996). Il fumo di tabacco è un aerosol complesso. In esso è possibile individuare due componenti: il *mainstream smoke* e il *sidestream smoke*. Il *sidestream smoke* è generato a temperature più basse rispetto alla componente *mainstream smoke* (600 °C vs 900 °C); è prodotto in un ambiente deficitario di ossigeno ed è rapidamente diluito. A ciò corrisponde la presenza nel *sidestream smoke* di particelle di minori dimensioni (0.01-0.1 µm) rispetto a quelle presenti nel *mainstream smoke* (0.1-1 µm). Il *sidestream smoke* contiene, inoltre, maggiori concentrazioni di ammoniaca, ossido nitrico e

carcinogeni chimici (benzene, aniline, N-nitrosamine) rispetto al mainstream smoke (IARC 1986). Nel mainstream smoke sono state individuate circa 4000 sostanze chimiche. Una metanalisi condotta da Smith *et al.*, nel 1997, rivela come nove delle 44 sostanze classificate dall'IARC come "cancerogeni umani di Gruppo 1" siano presenti nel mainstream sigarette smoke. Tale lista comprende **benzene**, cadmio, arsenico, nickel, chromium, 2-naphthyl-amine, vinyl chloride, 4-aminobiphenyl e berillio.

Da non sottovalutare è la possibile esposizione al benzene in seguito all'assunzione di cibi o bevande contaminate (Powell and Tucker, 1986; Lee *et al.*, 1983; Marcus, 1987; Thomas, 1986). Negli ultimi anni si è assistito ad una riduzione nel consumo di sigarette nei paesi più sviluppati, a fronte di un incremento nelle donne e nei paesi in via di sviluppo (IARC, 2002)

Il benzene è rapidamente assorbito attraverso l'apparato respiratorio e gastrointestinale. Anche l'assorbimento attraverso la cute è rapido, sebbene quantitativamente inferiore a causa della rapida evaporazione.

L'inalazione di una dose di 160-320 mg/m<sup>3</sup> (50-100 ppm) determina un assorbimento del 50% ed una ritenzione della dose inalata del 30%. L'assorbimento respiratorio, corrispondente circa al 50% della dose, è massimo nei primi 5 minuti d'esposizione (70-80%), per poi declinare nei successivi 15 minuti e variare tra il 20 e il 60% dopo 1 ora e tra il 20 ed il 50% dopo 2 ore di esposizione (Srbova *et al.*, 1950). La riduzione dell'assorbimento registrato all'aumentare del tempo di esposizione è dovuto all'escrezione di benzene non metabolizzato attraverso l'aria espirata: ciò sta ad indicare come il metabolismo del benzene sia saturato a concentrazioni superiori alle 10ppm (32 mg/m<sup>3</sup>)

(Nomiyama e Nomiyama, 1974; Pekari *et al.*, 1992; Yu e Weisel, 1998).

Il benzene è quasi completamente assorbito attraverso il tratto gastrointestinale: l'assorbimento orale del benzene a partire da soluzioni acquose è quasi vicino al 100% anche se la presenza di cibo nello stomaco potrebbe ridurre tale percentuale. Il benzene è, infatti, rapidamente e completamente assorbito da soluzioni acquose in misura tale da raggiungere il picco di concentrazione nel sangue dopo circa 1 ora (Morgan *et al.*, 1991).

La percentuale di assorbimento in seguito ad esposizione cutanea è inferiore al 1% della dose applicata, valore sicuramente sottostimato nelle situazioni di contatto di lunga durata. Tale percentuale aumenta linearmente all'incrementare della dose.

Low *et al.* (1989, 1995) hanno individuato le concentrazioni più alte di benzene, in seguito ad esposizione orale, nel fegato e nei reni; concentrazioni intermedie nel sangue; concentrazioni più basse nelle cavità nasali, nella cavità orale, nella ghiandola mammaria e nel midollo osseo. Schrenk *et al.*, nel 1941 hanno dimostrato in studi su test animali come la concentrazione del benzene individuata negli eritrociti è risultata essere quasi il doppio di quella riscontrata nel plasma. Studi su topi hanno inoltre evidenziato come il benzene possa superare la barriera placentare raggiungendo il feto già dopo un'ora dall'avvenuta esposizione (Ghantous e Danielsson, 1986). È infatti chiaro che gli effetti tossici del benzene sono collegati ai suoi metabolici e alle interazioni che tra questi si vengono a creare (ATSDR, 1997; Snyder *et al.*, 1993b; Snyder e Hedii, 1996; Ross, 1996; Witz *et al.*, 1996).

Il primo passaggio nel metabolismo del benzene è rappresentato dalla formazione di *eossido* e *ossido di benzene*, reazioni



catalizzate dal citocromo P450 2E1 (CYP2E1). L'ossido di benzene è successivamente convertito, attraverso una reazione non enzimatica, in *fenolo*, principale prodotto del metabolismo iniziale del benzene. In alternativa, l'ossido di benzene può reagire con il glutatione (GSH) per formare l'*acido fenilmercapturico*; può subire conversione enzimatica ad opera dell'eossido idrolisi con formazione di *catecolo*; può subire una reazione catalizzata dal ferro con la formazione prima di *trans, trans-muconaldeide*, in un processo saturabile, e poi di *acido trans, trans-muconico* (MA).

Il fenolo è quindi successivamente ossidato a *idrochinone* ad opera del CYP2E1. La successiva ossidazione dell'idrochinone a *p-benzoquinone* è catalizzata dalla mieloperossidasi (MPO) attraverso una reazione saturabile (Smith *et al.*, 1989).

Tutti i composti fenolici possono essere coniugati con acido solfato o acido glucuronico. I prodotti di coniugazione del fenolo e dell'idrochinone rappresentano la maggior parte dei metaboliti eliminati con le urine (Sabourin *et al.*, 1989; Wells e Nerland, 1991). L'eliminazione del benzene è caratterizzata dall'escrezione di composti non metabolizzati attraverso l'aria espirata, e di metaboliti attraverso le urine. L'escrezione urinaria è quantitativamente più significativa rispetto alle altre comuni vie di eliminazione (Sherwood, 1988). L'eliminazione attraverso le feci, che ammonta allo 0,5-3% della dose assorbita, è minore sebbene costante e indipendente dalla dose assorbita (McMahon e Birnbaum, 1991).

L'emivita del benzene nell'uomo è di circa 48 ore sebbene vi siano differenze interindividuali correlate all'età. Vi sono, inoltre, differenze nelle cinetiche di eliminazioni tra il sesso maschile e quello femminile: appare evidente come nelle donne la cinetica di

eliminazione sia più lenta a causa di una maggiore composizione in tessuto adiposo del peso corporeo (Sato *et al.*, 1975). A causa della accertata cancerogenicità di questo composto, lo IARC (International agency for research on cancer) lo ha classificato nel gruppo 1 dei cancerogeni per l'uomo e pertanto non è possibile raccomandare una soglia di sicurezza per la sua concentrazione in aria. L'esposizione a questa sostanza deve essere ridotta al massimo. A tal proposito il legislatore italiano ha introdotto severi limiti attraverso il DM 60 del 2 aprile 2002. Il D.M. 60/2002 stabilisce un limite annuo, che diminuirà progressivamente fino al 2010, per la media registrata nell'arco dei dodici mesi. Gli effetti tossici che compaiono in seguito all'esposizione al benzene non sono attribuibili tanto all'idrocarburo aromatico in sé, quanto ai suoi metaboliti ed in particolare a catecolo, idroquinone, *p*-benzoquinone, MA ed epossido di benzene. I metaboliti del benzene formano addotti covalenti con proteine e DNA (Lutz e Schlatter, 1997): tale processo segue una cinetica lineare a basse dosi di benzene, processo che va incontro a saturazione ad alte concentrazioni (Mazzullo *et al.*, 1989). In particolare il legame dell'idroquinone o del *p*-benzoquinone ai gruppi solfidrici dei siti attivi delle proteine potrebbe essere responsabile degli effetti genotossici del benzene. L'idroquinone e il *p*-benzoquinone interferiscono con il legame della guanosina trifosfato (GTP) alla tubulina attraverso l'alchilazione dei gruppi solfidrici nucleofili, processo richiesto per la stabilizzazione della polimerizzazione della tubulina durante la formazione dei microtubuli in mitosi (Iron e Neptun, 1980; Pfeifer e Irons, 1983). L'associazione tra esposizione al benzene e la comparsa di aberrazioni cromosomiche strutturali e numerarie in linfociti umani suggeriscono come il

benzene possa essere considerato un agente clastogenico. Numerosi metaboliti del benzene hanno mostrato di inibire l'attività della topoisomerasi II, azione responsabile della comparsa di effetti clastogenici osservati durante l'esposizione al benzene (Frantz *et al.*, 1996). In particolar modo il *p*-benzoquinone e la muconaldeide (MUC) inibiscono direttamente la topoisomerasi II a concentrazioni inferiori ai 10 $\mu$ M. Anche i fenoli, i catecoli, l'idroquinone ed il 1,2,4-benzenetriolo hanno mostrato di inibire questo enzima fondamentale per il processo di replicazione del DNA.

I metaboliti del benzene sono inoltre responsabili degli effetti genotossici attribuiti a tale sostanza, effetti che si manifestano attraverso l'alterazione della progressione del ciclo cellulare e della sintesi di RNA e DNA (Forni e Moreo, 1967).

Il benzene può inoltre produrre stress ossidativi nei tessuti bersaglio. Il *p*-benzoquinone è altamente reattivo e può determinare deplezione dei livelli cellulari di GSH (Brunmark e Cadenas, 1988). I metaboliti del benzene sono anche coinvolti in cicli redox, che determinano la produzione di specie reattive dell'ossigeno che possono, a loro volta, reagire con componenti macromolecolari (Rao e Snyder, 1995).

Il benzene ed i suoi metaboliti sono responsabili di alterazioni nella sintesi di IL-1, citochina fondamentale nel processo di ematopoiesi (Renz and Kalf, 1991). L'IL-1 attiva, infatti, la produzione da parte dei fibroblasti stromali di CSF (colony-stimulating factor), citochina coinvolta nella differenziazione delle cellule staminali. La riduzione della cellularità midollare, caratteristica dell'esposizione al benzene, potrebbe infatti dipendere dall'incapacità dei macrofagi stromali di processare la pre-IL-1 $\alpha$  ad IL-1 $\alpha$  matura. Il *p*-benzoquinone determina un'inibizione concentrazione-dipendente

della CALPAIN piastrinica, proteasi calcio-attivata, cisteina-dipendente, che catalizza la processazione della pre-IL-1 $\alpha$  nella forma matura. Il *p*-benzoquinone inibisce, inoltre, la processazione dell'IL-1 $\beta$  a IL-1 ad opera dell'IL-1 $\beta$  convertasi, proteasi solfidrico-dipendente (Niculescu *et al.*, 1995, 1996).

Numerose evidenze circa l'azione ematotossica esercitata dal benzene individuano nell'esposizione a questo idrocarburo l'eziologia dell'anemia aplastica e della pancitopenia riscontrata in numerosi soggetti esposti in ambiente di lavoro ai vapori del gasolio, al fumo di tabacco o alle emissioni di automobili (Goldstein, 1988).

Appare ormai chiaro come, in seguito all'esposizione al benzene, siano a maggior rischio di alterazioni le cellule staminali rapidamente proliferanti. Per tale motivo il benzene esercita la propria azione tossica soprattutto sul midollo osseo (OMS, 1993).

È stata inoltre osservata la riduzione della resistenza osmotica nei leucociti, della funzione fagocitaria dei neutrofili, delle riserve di glicogeno, dell'attività delle perossidasi neutrofile; aumento dell'attività dell'acido delta-aminolevulinico negli eritrociti e delle coproporfirine nelle urine (Aksoy, 1991).

L'esposizione a benzene, toluene e xylene è stata associata alla riduzione dei livelli di agglutinine e delle immunoglobuline IgG e IgA e ad un aumento dei livelli di IgM. È stata inoltre osservata in lavoratori esposti ad alte dosi di benzene una riduzione del numero dei leucociti e dei linfociti T (OMS, 1993). Numerose metanalisi hanno mostrato un significativo incremento di mortalità per leucemia nei soggetti addetti alla guida di autocisterne (Rushton, 1993), e nei lavoratori dell'industria petrolifera (Schwartz, 1987). Non è stata invece individuato un aumento di rischio di leucemia

nei lavoratori impegnati nella produzione del benzene o dei suoi sottoprodotti (Hurley *et al.*, 1991; Swaen *et al.*, 1991).

L'inalazione acuta di alte dosi di benzene può essere responsabile della comparsa di sintomi di neurotossicità (Snyder, 1987). Il benzene può determinare la comparsa di sintomi generici come senso di vertigine, mal di testa e vertigine alla dose di 799–9.584 mg/m<sup>3</sup> (250–3.000 ppm) (Brief *et al.*, 1980); sonnolenza, tremori, delirio e perdita di coscienza alla dose di 2.236–9.583 mg/m<sup>3</sup> (700–3.000 pm) (ATSDR, 1997). L'esposizione prolungata per 5-10 minuti alla dose di 63.894 mg/m<sup>3</sup> (20.000 ppm) può determinare l'exitus (Sandmeyer, 1981). Questi sintomi sono tutti reversibili attraverso l'allontanamento dalla fonte di esposizione (Kraut *et al.*, 1988).

## MATERIALI E METODI

### *Questionario*

A tutte le pazienti è stato sottoposto un questionario teso alla raccolta di dati anamnestici riguardanti la professione, le abitudini al fumo ed alla guida di automobili, allo scopo di identificare possibili “comportamenti a rischio” suscettibili di maggiore esposizione al benzene

### *Definizione dei livelli di benzene nei liquidi follicolari*

Si è proceduto alla determinazione dei livelli di benzene nei liquidi follicolari adoperando come tecniche di estrazione lo *spazio di testa* e la *microestrazione in fase solida* (*Head Space/Solid Phase Microextraction, HS/SPME*) e rivelando e quantificando l'analita mediante *gas cromatografia* accoppiata a *spettrometria di massa* (*GC/MS*). L'analisi è effettuata dal Laboratorio Chimico-Tossicologico diretto dal Prof. Antonio Acampora - *Dipartimento di Medicina Pubblica e della Sicurezza Sociale dell'Azienda Ospedaliera “Federico II” di Napoli.*

### *Preparazione del campione*

Ogni campione è preparato ponendo la matrice biologica in vials a tenuta, addizionate precedentemente di 1 g di cloruro di sodio (NaCl) al fine di aumentare la forza ionica della soluzione e favorire il passaggio del benzene, sostanza lipofila, nello spazio di testa. Ad ogni vials sono stati aggiunti 50 µl di una soluzione 29.6 ng/ml di standard interno, il *benzene esadeuterato* ( $C_6D_6$ ),

ottenendo una quantità nota e costante di 1.48 ng di benzene esadeuterato per ogni campione. La necessità di utilizzare uno *standard interno* (IS), da aggiungere in quantità nota ai campioni incogniti, è al fine di rendere i risultati di analisi, condotte in più stadi (estrazione degli analiti mediante spazio di testa/microestrazione in fase solida e rilevazione GC/MS-SIM), indipendenti da eventuali errori di diluizione, da variazioni del volume di campione introdotto nello strumento di analisi, dal recupero di estrazione o da eventuali perdite di campione durante le varie fasi analitiche.

L'indipendenza da tutti questi fattori deriva dal fatto che la quantificazione si basa su misure relative e cioè sulla misura del rapporto tra l'area dell'analita e quella dello standard interno.

Sostanze deuterate, con caratteristiche chimico-fisiche identiche a quelle degli analiti di interesse (temperatura di ebollizione, coefficienti di ripartizione, lipofilia, risposta all'analisi GC/MS ecc.) rappresentano gli standard interni ideali in quanto vengono estratti, purificati e rivelati in modo del tutto analogo alle molecole in esame, garantendo così un'estrema riproducibilità analitica.

#### *Spazio di testa e microestrazione in fase solida*

La HS/SPME si basa sulla capacità dell'analita di passare dalla fase liquida alla fase vapore e di concentrarsi, quindi, nello spazio di testa sovrastante il campione da analizzare. Tale tecnica è stata scelta come procedura di estrazione ottimale tenendo conto delle proprietà chimico-fisiche dell'analita stesso: il benzene, infatti, è un composto volatile, con temperatura di ebollizione pari a 80.1°C. Pertanto ponendo il fluido biologico in un flacone sigillato (vial) a tenuta e scaldando quest'ultimo mediante un bagno termostatico, la

concentrazione dell'analita nella fase vapore aumenta a seguito dell'equilibrio di ripartizione dell'analita stesso tra la fase liquida e la fase vapore (*legge di Henry*).

Successivamente l'analita viene estratto, dalla fase vapore dello spazio di testa sovrastante il campione, mediante una fibra rivestita chimicamente la cui funzione è di concentrare i composti volatili inizialmente contenuti nel liquido. In condizioni controllate (tempo e temperatura di contatto fra la fibra e la fase vapore) i composti chimici presenti nel campione vengono estratti mediante adsorbimento sul rivestimento della fibra stessa.

La fase di estrazione degli analiti dalla matrice biologica coincide con la purificazione del campione da analizzare, in quanto solo le sostanze volatili arricchiscono lo spazio di testa. Inoltre, nel caso di sostanze lipofile come il benzene, a parità di temperatura del bagno termostatico (temperatura di equilibrio), un aumento della polarità della soluzione biologica iniziale, ad esempio mediante l'aggiunta di sale, sposta l'equilibrio a favore della fase vapore (*effetto sale*).

Le condizioni operative relative alla procedura di estrazione del benzene dalla matrice in esame sono di seguito riportate:

Fibra	PDMS/Carboxen 85µm
Temperatura del bagno termostatico	55 °C
Tempo di permanenza della vial nel bagno termostatico	30 min
Tempo di contatto della fibra con la fase vapore	15 min



### *Gas cromatografia e la spettrometria di massa*

Il benzene estratto dai liquidi follicolari e concentrato sulla fibra è successivamente rivelato e quantificato mediante GC/MS. A tale scopo è utilizzato un gas cromatografo HRGC MEGA series 2 della Fisons Instruments ed uno spettrometro di massa QMD 1000 della CE Instruments

La gas cromatografia (GC) è una tecnica ad alto potere risolutivo che consente la separazione delle sostanze in base a proprietà chimico-fisiche quali temperatura di ebollizione, polarità e dimensioni delle molecole.

L'analisi gas cromatografica è condotta utilizzando una fase stazionaria solida o liquida (adsorbita su un supporto siliceo) e un gas inerte (generalmente elio o azoto) quale gas di trasporto. In presenza di una miscela di sostanze, variando la temperatura, ogni componente si ripartisce in maniera differente tra la fase stazionaria e la fase vapore e viene, quindi, eluito in tempi diversi. Il tempo che intercorre tra l'introduzione del campione in colonna e la massima risposta del rivelatore viene definito tempo di ritenzione ( $t_r$ ) ed è caratteristico di ogni sostanza.

La tecnica di introduzione di un campione in un gas cromatografo maggiormente utilizzata (*split/splitless*) prevede che il campione stesso venga iniettato attraverso un setto all'interno di un liner di quarzo posto ad una temperatura solitamente compresa fra 220 e 260 °C. Tale temperatura risulta necessaria per la vaporizzazione del campione stesso e, nel caso di microestrazione in fase solida, per il desorbimento dalla fibra. Dal liner la miscela arriva alla

colonna capillare, posta all'interno del forno, dove viene separata nei suoi componenti che eluiscono in tempi diversi.

I parametri che influenzano la separazione cromatografica dipendono (oltre che dalla natura chimico-fisica di ciascuna sostanza) dalla fase e dalle dimensioni della colonna capillare, dal flusso del gas di trasporto e dal gradiente di temperatura utilizzato.

Solitamente l'eluizione dalla colonna cromatografica viene monitorata mediante rivelatori a ionizzazione di fiamma e le sostanze eluenti vengono identificate unicamente in base ai relativi tempi di ritenzione. L'utilizzo, come sistema di rilevazione, di uno spettrometro di massa direttamente collegato ad un gas cromatografo, consente invece di identificare univocamente ciascuna sostanza, non solo in base al tempo di ritenzione ma anche mediante il relativo spettro di massa, che costituisce "l'impronta digitale" della sostanza stessa.

La Spettrometria di Massa (MS) consente di misurare il rapporto massa su carica ( $m/z$ ) dell'analita e, quindi, di ricavare informazioni riguardanti la composizione elementare e di determinare la struttura della sostanza in esame o procedere ad un'accurata analisi quantitativa. È una tecnica sensibile, specifica e di elevata riproducibilità e si basa sulla ionizzazione e successiva frammentazione delle molecole e sulla separazione degli ioni generati in fase gassosa mediante un opportuno analizzatore di massa. Il processo di ionizzazione avviene solitamente all'interno della sorgente dello spettrometro di massa e può essere realizzato mediante varie tecniche, tra cui la più comune e di facile utilizzo è la ionizzazione elettronica (EI). Le molecole vengono bombardate da un fascio di elettroni emessi da un filamento di tungsteno riscaldato; l'energia fornita dall'urto con gli elettroni causa la

ionizzazione e la frammentazione delle molecole, dando luogo alla formazione di ioni. Successivamente, gli ioni vengono focalizzati ed indirizzati verso una regione dello spettrometro di massa (analizzatore) a cui è applicato un campo magnetico. Date le condizioni di vuoto spinto dell'analizzatore, non vi sono forze di attrito e il moto degli ioni dipende unicamente delle forze elettromagnetiche, le quali influenzano ciascuno ione in maniera diversa secondo il rapporto  $m/z$ . Variando le forze che interagiscono sul sistema, è possibile dirigere il moto degli ioni in modo tale da farli fuoriuscire dall'analizzatore in tempi diversi, venendo, in tal modo separati. Ogni ione corrispondente ad un determinato valore di  $m/z$  genera una corrente ionica che viene acquisita e registrata, dando luogo allo spettro di massa. Ciascuna sostanza si ionizza e si frammenta secondo regole ben precise, che dipendono dalla struttura della molecola stessa. Pertanto, ciascuna sostanza mostra uno spettro di massa caratteristico definito "impronta digitale", in quanto, in base ai valori di  $m/z$  e alle intensità relative dei frammenti ionici che derivano dal processo di ionizzazione elettronica, identifica univocamente una sostanza. I metodi di acquisizione che si possono scegliere nella spettrometria di massa sono diversi. La scelta è legata a considerazioni che riguardano il tipo di analisi da effettuare (qualitativa o quantitativa), la specificità e la sensibilità. Indagini qualitative, tese all'identificazione e all'individuazione di sostanze incognite, rendono indispensabile la modalità di acquisizione *full scan*, al fine di ottenere l'intero spettro di massa, ovvero l'impronta digitale della molecola in esame, oppure una serie di informazioni strutturali relative ad una molecola incognita. I dati di uno spettro di massa *full scan* di una sostanza derivano dall'acquisizione del segnale relativo a tutti gli ioni

generati dalla camera di ionizzazione della sostanza nel range di valori di  $m/z$  selezionati per l'analisi. Nel caso in cui, invece, debbano essere effettuate analisi volte alla determinazione quantitativa di specifiche sostanze, risulta preferibile adoperare una diversa tecnica di acquisizione. È, infatti, possibile ottenere una maggiore sensibilità quando, nel corso dell'analisi, viene riportata in diagramma solo la corrente ionica dovuta agli ioni specifici che caratterizzano la sostanza in esame, operando, cioè, una Scansione di Ioni Selezionati (*Selected Ion Monitoring*, SIM). Si possono, cioè, selezionare ed acquisire soltanto pochi ioni rappresentativi dell'analita d'interesse: ciò comporta una diminuzione del segnale dovuto al rumore di fondo e, di conseguenza, un aumento del rapporto segnale/rumore e, quindi, una migliore sensibilità nella rivelazione degli analiti, specialmente nel caso di matrici complesse, senza tuttavia perdere in specificità.

La fase di separazione gas cromatografica è stata eseguita secondo le seguenti condizioni:

Iniezione	<i>Splitless</i>
Diametro interno del liner	0.75 mm
Temperatura dell'iniettore (desorbimento termico)	250 °C
Colonna cromatografia	ZB-624
Gradiente di temperatura	50 °C per 2 min 50-90 °C a 6°C/min 90 °C per 1 min
Gas di trasporto	He ad 1ml/min

I campioni sono stati analizzati mediante ionizzazione elettronica, adoperando le seguenti condizioni strumentali:

Temperatura della transfer line	230 °C
Energia degli elettroni	70eV
Temperatura della sorgente	200 °C
Acquisizione modalità SIM:	Ioni acquisiti ( <i>m/z</i> ):
Benzene	51.0–77.1–78.1
Benzene esadeuterato	82.2–84.2

*Valutazione della concentrazione di benzene nel liquido follicolare*  
 Data l'impossibilità di costruire una curva di calibrazione, a causa della mancanza di matrice biologica, la quantificazione del benzene è realizzata rapportando l'area del picco relativo all'analita con quella del picco relativo allo standard interno, che corrisponde alla quantità nota e costante di 1.48 ng. Ciò è stato possibile in quanto il benzene ed il benzene esadeuterato mostrano un analogo comportamento chimico-fisico durante le fasi di estrazione e rivelazione, fornendo, a parità di concentrazione, la medesima risposta analitica. Pertanto la quantità incognita di benzene, espressa in ng, è calcolata mediante la seguente formula:

$$X \text{ ng} = (\text{Area}_{\text{benzene}} \cdot 1.48 \text{ ng}) / A_{\text{benzene esadeuterato}}$$

Ogni valore ricavato è diviso per il volume del liquido follicolare analizzato ottenendo, così, la concentrazione di benzene, espresso in ng/ml, in ciascun liquido follicolare.

## RISULTATI



MT	0.24836742	SK	0.782982032
SA	0.041833529	FI	1.209801077
CL	0.197022693	PC	0.813604005
ZR	0.230988588	MR	1.750479033
DGA	0.038668312	WS	1.053259687
GF	0.061800627	GML	1.242022304
CF	0.270203859	IM	0.583041589
RA	0.032210279	VR	0.569970028
AMR	0.233095711	RS	0.90084983
AB	0.340030063	LA	0.762240489
BA	0.037402519	VP	1.866335069
GL	0.127485662	CP	5.064552519
ZD	0.031619605	LR	0.5476093
FC	0.52005813	LB	3.453028574
GS	0.477565771	IM	2.024359475
GG	0.027987425		
CM	0		
RL	0		
GG	0		

Le caratteristiche demografiche ed antropometriche dei due gruppi sono risultate sovrapponibili (tabella 2.)

**Tabella 2.** *Caratteristiche demografiche, antropometriche, ormonali ed esiti della tecnica di PMA nei due gruppi*

	<b>GRUPPO A</b>	<b>GRUPPO B</b>	<b>p</b>
	benzene <0.54ng/ml	benzene ≥0.54ng/ml	
<b>BMI</b>	24.04 ±3.53	25.32 ±2.2	0.85
<b>Età (anni)</b>	31 ±4.7	32 ±4.8	0.74
<b>Benzene (ng/ml)</b>	0.15 ±0.16	1.51 ±1.25	0.76

I risultati del questionario somministrato alle pazienti arruolate nello studio sono riportate nella tabella 3.

**Tabella 3.** *Risultati del questionario circa comportamenti a rischio di maggiore esposizione al benzene*

<b>COMPORAMENTO A</b>	<b>SI</b>	<b>NO</b>
<b>RISCHIO</b>		
ABITUDINE AL FUMO:	32.35%	67.65%
a) numero di sigarette		
✓ 5-9	11.76%	
✓ 10-20	17.65%	
✓ 21-30	2.94%	
b) durata in anni		
✓ 0-9	2.94%	
✓ 10-20	26.47%	
✓ 21-30	2.94%	
GUIDA DI AUTOMOBILI	58.82%	41.18%
PROFESSIONE A RISCHIO (industria petrolifera, tessile, ecc...)	0%	100%

*Tutti i valori sono riportati in (%)*

Delle 19 pazienti facenti parte del gruppo A, 5 erano fumatrici (26.31%): in particolare 3 pazienti (60%) riferivano di fumare tra le 5 e le 9 sigarette al giorno, contro le circa 20 sigarette al giorno delle restanti 2 pazienti (40%). Nello stesso gruppo una paziente (20%) riferiva una storia di tabagismo inferiore ai 5 anni, tre pazienti (60%) tra i 10 ed i 20 anni, ed infine una superiore ai 20 anni (20%).

Di contro nel gruppo B 6 pazienti su 15 (40%) riferivano storia di tabagismo: di queste solo una (16.6%) riferiva di fumare circa 5 sigarette al giorno contro le 10-20 sigarette al giorno di 4 pazienti



(66.6%), e le 20-30 sigarette al giorno di una paziente (16.6%). In tale gruppo tutte le pazienti riferivano una storia di tabagismo di durata compresa tra i 10 ed i 20 anni.

La differente distribuzione delle fumatrici tra i due gruppi non è apparsa statisticamente significativa ( $p < 0.63$ ).

In entrambi i gruppi non è stato possibile individuare una dominanza di pazienti con residenza in luoghi a maggior rischio di esposizione al benzene. Nello stesso modo in entrambi i gruppi non è apparsa nessuna evidenza circa un maggior rischio legato al tipo di attività lavorativa svolta.

È comunque da sottolineare come mentre nel gruppo A ben 13 pazienti (68.4%) guidassero autoveicoli, nel gruppo B solo 7 pazienti (46.6%) riferissero di guidare abitualmente. Tale differenza non è comunque apparsa statisticamente significativa ( $p < 0.35$ ).

## **DISCUSSIONE**

Dallo studio è emerso come i livelli intrafollicolari di benzene siano strettamente correlati ad abitudini di vita a rischio di maggiore esposizione all'idrocarburo, come il fumo di sigaretta. È stato infatti evidenziato come nel gruppo caratterizzato da maggiori livelli di benzene intrafollicolare vi fosse una maggiore prevalenza

di fumatrici (26.31% del gruppo A vs 40% del gruppo B). Non è apparsa, contrariamente, alcuna correlazione tra l'abitudine alla guida di autoveicoli, l'attività lavorativa svolta ed i valori intrafollicolari di benzene.

## **CAPITOLO 2**

### **L'IMPATTO DEI LIVELLI DI BENZENE SULLA QUALITÀ OVOCITARIA, SUI TASSI DI FERTILIZZAZIONE, SULLA QUALITÀ EMBRIONARIA E SULL'OUTOCOME IN TERMINI DI GRAVIDANZA**

Numerosi studi effettuati in lavoratori esposti al benzene hanno mostrato aberrazioni cromosomiche numeriche e strutturali (Ding *et al.*, 1983; Sasiadek *et al.*, 1989; Yardley-Jones *et al.*, 1990; Major *et al.*, 1992; Eastmond, 1993; Tompa *et al.*, 1994). Tali effetti si sono resi evidenti alla dose di 320 mg/m<sup>3</sup>(100 ppm) , sebbene in molti studi sono stati riportati alterazioni cromosomiche alla dose di 32 mg/m<sup>3</sup> (10 ppm) (OMS, 1993; Major *et al.*, 1994; Karacic *et al.*, 1995). I risultati dimostrano come il benzene possa indurre duplicazioni geniche attraverso meccanismi di ricombinazione ma non inattivazioni geniche come conseguenza di mutazioni o delezioni (Rothman *et al.*, 1995).

Numerosi studi hanno indagato gli effetti tossici derivanti dall'esposizione al benzene sull'apparato riproduttivo umano. Già nel 1946 Vara e Kinnunen mostrarono come in 30 donne con sintomi da esposizione al benzene vi fosse un'augmentata incidenza di menorragia, oligomenorrea, sterilità, ipoplasia e degenerazione ovarica. Essi evidenziarono in oltre come tali alterazioni fossero più severe nelle pazienti prossime alla menopausa.

Successivamente Pushkina *et al.* (1968), valutando un gruppo di lavoratrice con ipofunzione ovarica correlata con l'esposizione al benzene, evidenziarono come tali donne mostrassero livelli di acido ascorbico nel sangue inferiori rispetto a lavoratrici in buono stato di salute ( $p < 0.001$ ).

Mukhametova e Vozovaya nel 1972 esaminando 360 donne esposte a concentrazioni di benzene  $< 5$  mg/m<sup>3</sup> notarono un aumento dei casi di disturbi funzionali del ciclo mestruale associati, nelle donne esposte a concentrazioni maggiori, a maggiori tassi di interruzione prematura di gravidanza, rottura di placenta e asfissia intrauterina del feto.

Yin et al. (1987) in uno studio condotto su 174 lavoratrici esposte a benzene, toluene o ad un mix delle due sostanze evidenziarono un aumento dei casi di menorragia, effetto non dose dipendente ( $p < 0.05$ ). Tale evidenza era associata ad un aumento dei casi di pancitopenia nelle stesse donne con menorragia.

Infine Huang nel 1991 evidenziò in 223 donne esposte a benzene e toluene, confrontandole con 327 donne non esposte, un aumento dei tassi di disordini mestruali (48.9% nelle esposte; 16.2% nelle non esposte), aborti spontanei (5.7% nelle esposte; 2.4% nelle non esposte) e gestosi (22.6% nelle esposte; 10.5% nelle non esposte). Uno studio successivo del 1994 condotto da Strucker *et al.*, non evidenziò tuttavia un incremento del rischio di aborto spontaneo in mogli di 834 lavoratori esposti a livelli di benzene  $\leq 15 \text{ mg/m}^3$ .

Nonostante non vi siano evidenze acclamate circa la capacità del benzene di produrre malformazioni, un limitato numero di studi hanno mostrato come tale sostanza sia capace di indurre alterazioni della sfera riproduttiva negli uomini e una ritardata crescita fetale nei test animali (Chatburn *et al.*, 1981; ATSDR, 1997).

Il benzene attraversa la placenta umana ed è presente nel sangue del cordone ombelicali in quantità uguali o superiori alla concentrazione nel sangue materno (Dowty *et al.*, 1976).

Axelsson *et al.* (1984), in uno studio condotto su 745 donne esposte a solventi organici, evidenziarono un aumento lieve ma non statisticamente significativo dei tassi di aborto spontaneo rispetto alle donne non esposte (tassi di aborti spontanei nelle esposte: 12.2%; tassi di aborti spontanei nelle non esposte: 10.1%) (RR = 1.31, 95% CI = 0.89-1.91).

Mukhametova e Vozovaya nel 1972 evidenziarono in donne esposte a benzene ed ad altri idroclorocarburi un'augmentata

incidenza di aborti spontanei e parti prematuri (17.2% vs 4.9% nelle non esposte), rottura tardiva di membrana ed asfissia intrauterina del feto.

Nel 1977 Funes-Craviolo *et al.*, mostrarono in 29 lavoratrici esposte al benzene ed ad altri solventi organici nel corso della gravidanza, un'aumentata incidenza di aberrazioni e rotture cromosomiche. I 14 figli di tali donne mostrarono, inoltre, un'aumentata incidenza di rotture cromatidiche, rotture isocromatidiche ( $p < 0.01$ ), e scambi tra cromatidi fratelli ( $p < 0.001$ ) nei linfociti.

Holmberg nel 1979 evidenziò in una lavoratrice esposta al benzene ed ad altri solventi organici (diclorometano, metanolo ed altri) in corso del primo trimestre di gravidanza la nascita di un feto nato morto a causa di anencefalia.

Infine Bordarier *et al.*, nel 1991 esaminando una donna a cui erano state praticate 21 iniezioni intramuscolari di benzene nel tentativo, poi fallito, di indurre l'aborto nel corso del primo trimestre di gravidanza, evidenziarono nel neonato lievi dismorfie, una moderata ipotonia assiale e movimenti oculari anomali. A 45 giorni di vita il bambino mostrava microcefalia, severa ipotonia assiale, severa ipertonica periferica, atrofia ottica bilaterale e la presenza di cavità encefalica che poneva in comunicazione bilateralmente lo spazio subaracnoideo con il ventricolo laterale. Il bambino morì a 2 mesi di vita per polmonite da aspirazione.

I dati derivanti da questi studi sono tuttavia inconcludenti a causa dell'esiguità del campione, dell'assenza di importanti dettagli circa la conduzione dell'esperimento e della presenza di numerose sostanze chimiche oltre al benzene che possono aver influito sul risultato dello studio stesso.

## **MATERIALI E METODI**

### *Selezione delle pazienti*

Sono incluse nel presente studio donne candidate a tecniche di *procreazione medicalmente assistita* (PMA) che afferiscono presso il “Centro di Sterilità ed Infertilità di Coppia” del *Dipartimento di*

*Emergenze Ostetriche e Ginecologiche e Medicina della Riproduzione dell’Azienda Ospedaliera “Federico II” di Napoli*, di età compresa tra i 20 e 37, eumenorroiche, normogonodotropiche con evidenza isteroscopica di cavità endometriale nella norma nell’arco di non oltre 6 mesi antecedenti all’arruolamento.

È effettuata una valutazione anatomica della cavità uterina mediante ecografia transvaginale, isterosalpingografia e/o isteroscopia, con l’obiettivo di evidenziare malformazioni mülleriane, e/o leiomiomi e/o polipi intracavitari.

Sono escluse, dal presente studio, pazienti affette da diabete mellito, distiroidismi, ipopituitarismo, iperprolattinemia, insufficienza luteale e sindrome dell’ovaio policistico (PCOS). Per l’identificazione di questa ultima condizione clinica sono stati adottati i Criteri di Rotterdam (*Rotterdam ESCHERE ASMR-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group, 2004*). Ulteriori criteri di esclusione sono rappresentati da patologie infiammatorie croniche, disordini autoimmunitari, anomalie cromosomiche e malattie genetiche.

#### *Prelievo ovocitario*

Per ciascuna paziente, è analizzato il liquido del primo follicolo aspirato per ciascuno ovaio. Inoltre, soltanto follicoli in cui è recuperato il corrispettivo ovocita sono stati valutati.

Il *pick-up* ovocitario è effettuato a circa 36 ore dalla somministrazione di una dose di gonadotropina corionica (hCG

10.000 UI), che ha lo scopo di indurre la maturazione finale degli ovociti. La paziente viene condotta in sala operatoria a vescica vuota dove viene sistemata in posizione litotomica ed in lieve Trendelenburg. In accordo con le linee guidam del Royal Collage of Obstetricians and Gynaecologists, il pick up viene eseguito per via transvaginale in sedazione conscia. Viene utilizzato un'apposito ago montato sulla sonda ecografica, mediante il quale vengono raggiunte le ovaie ed aspirato il contenuto dei follicoli con conseguente raccolta degli ovociti in essi contenuti in provette sterili mediante una pompa peristaltica. Non appena si visualizza la punta dell'ago all'interno del follicolo si può iniziare l'aspirazione e non va rimosso fin quando le pareti follicolari non appaiono completamente collabite. Una volta svuotato il follicolo, l'ago può essere mantenuto in situ per un eventuale lavaggio e solo dopo spinto all'interno del follicolo successivo. Terminata l'aspirazione dei follicoli presenti sul primo ovaio, l'ago viene rimosso e lavato con il mezzo di coltura per recuperare l'ovocita rimasto al suo interno e per rimuovere gli umori aspirati dalla vagina. L'aspirazione, controllata con un pedale, viene fornita mediante l'applicazione all'interno della provetta di una pressione negativa di 100-120 mm-Hg, per permettere un efficace svuotamento del follicolo riducendo al minimo i traumi a carico del complesso ovocita-cumulo ooforo. Terminata l'aspirazione di entrambe le ovaie le provette mantenute alla temperatura di 37° C, in un blocco termostato , vengono portate in laboratorio dove il biologo esamina il liquido follicolare alla ricerca degli ovociti, rispettando l'ordine cronologico di prelievo. Il contenuto di ciascuna provetta viene svuotato in una capsula petri ed esaminato allo stereomicroscopio. Con una pipetta pasteur, riempita con del mezzo di coltura,



l'ovocita viene prelevato, lavato e posto in una nuova capsula con del terreno pulito e la capsula posta in incubazione. In questa fase è importante operare in modo rapido per minimizzare l'esposizione degli ovociti a condizioni non ottimali (basse temperature e basse concentrazioni di CO<sub>2</sub>).

#### *Valutazione morfologica ovocitaria*

L'ovocita prima di essere inseminato viene denudato attraverso un processo enzimatico e meccanico. L'enzima utilizzato è l'acido ialuronico che ha la funzione di digerire le cellule del cumulo mimando ciò che avviene in vivo, durante il processo di fecondazione. L'azione meccanica, invece, allontana le cellule della corona attraverso l'utilizzo di pipette pasteur assottigliate alla fiamma e con diametro decrescente. In questo modo è possibile valutare non solo la maturità citoplasmatica, ma anche la presenza di difetti citoplasmatici ed extracitoplasmatici che possono essere considerati come criterio di selezione ovocitaria. L.Veeck (1991) ha stabilito uno score di qualità ovocitaria basato sul fatto che solo gli ovociti in metafase II caratterizzati da vescicola seminale non visibile e primo globulo polare visibile, possono essere utilizzati per la microiniezione.

- PROFASE I: vescicola germinale visibile, assenza di globulo polare
- METAFASE I: assenza di vescicola germinale, assenza di globulo polare
- METAFASE II: assenza di vescicola germinale, I globulo polare
- POST-MATURO: I globulo polare visibile, degenerazione del citoplasma, disomogeneo.

### *Strategie terapeutiche di P.M.A.*

Nel nostro studio sono state selezionate soltanto coppie sottoposte alle seguenti tecniche:

- ✓ *FIVET* - fecondazione “in vitro” con *embryo transfer*;
- ✓ *ICSI* - *intracytoplasmic sperm injection*.

Sia con la FIVET sia con la ICSI, la fertilizzazione degli ovociti, prelevati direttamente dall’ovaio, viene effettuata “in vitro”, ossia al di fuori della sede anatomica preposta (tratto terminale delle tube).

Nella FIVET, ovociti e spermatozoi vengono messi a contatto in capsule con terreno di coltura adatto alla fase di fecondazione e messi ad incubare. In genere la concentrazione di spermatozoi umani può variare da 80-100.000 /ml in base alla morfologia. Tale metodica presuppone, quindi, la presenza di un liquido seminale adeguato ed è principalmente indicata nei casi di impervietà tubarica bilaterale o nelle sterilità idiopatiche. La ICSI consiste, invece, nell’iniezione di un singolo spermatozoo nel citoplasma di ciascun ovocita. Le possibilità di applicazione della ICSI sono molteplici: dall’alterazione più o meno severa dei parametri seminali, al trattamento di pazienti con azoospermia escretoria mediante il recupero microchirurgico di spermatozoi dall’epididimo o dal testicolo, dai casi di pazienti con un numero esiguo di ovociti a quelli con ovociti congelati. La ICSI è inoltre usata in tutti i casi di diagnostica genetica pre-impianto, dall’analisi del primo e/o secondo globulo polare sugli ovociti a quella dei blastomeri sugli embrioni (Phillipson GTM *et al.*, 2000; De Sutter P *et al.*, 2003; Wong LJ *et al.*, 2004).

Il sistema di micromanipolazione prevede l’utilizzo di un microscopio a luce invertita dotato di piastra riscaldante associato

ad un micromanipolatore idraulico. Si tratta di uno strumento estremamente preciso che consente di effettuare micromovimenti nelle tre dimensioni. Consta di due braccia microiniettrici a cui si applicano due micraghi: holding e injection. L'holding serve a bloccare l'ovocita in modo tale che il globulo polare sia posizionato alle ore sei. L'injection serve ad inserire lo spermatozoo, precedentemente capacitato ed immobilizzato a livello della coda, all'interno dell'ovocita. Le due pipette (holding e injection) sono inserite in due holders controllati da due microiniettori e posizionati in modo da presentare l'estremità distale (1mm) quasi parallela al fondo della piastra in modo da facilitare la procedura di immobilizzazione dello spermatozoo ed effettuare la microiniezione avendo le due micropipette e l'ovocita sullo stesso piano focale.

Tale procedura permette di ottenere alti tassi di fertilizzazione e di gravidanza, sovrapponibili a quelli osservati nella FIVET convenzionale, eseguita per fattore tubarico, indipendentemente dalle caratteristiche del liquido seminale. Il tasso di fertilizzazione degli ovociti iniettati con tale tecnica è di circa il 70-80% e la quota di gravidanza è del 25-30% per ciclo (Filicori *et al.*, 1996; De Placido *et al.*, 2001).

Gli ovociti da inseminare vengono messi in singole gocce di terreno tamponato, ricoperti da olio precedentemente riscaldato, mentre gli spermatozoi in un'unica goccia contenente un mezzo viscoso, polivinilpirrolidone (PVP), che ne rallenta il movimento facilitandone la selezione. La micropipetta da iniezione viene spinta contro la zona pellucida permettendo la penetrazione e il successivo rilascio dello spermatozoo nel citoplasma. Terminata la procedura di iniezione gli ovociti vengono messi in gocce di terreno non tamponato e posti in incubatore fino al controllo della

fertilizzazione. Un corretto pattern di fertilizzazione sembra essere con i due pronuclei ravvicinati al centro dell'ovocita separati da una sottile striscia ooplasmatica con all'interno i nucleoli in numero ridotto (4-5) di dimensioni più grandi e allineati vicino alla zona pellucida ed è possibile osservarlo dopo 16-18 ore dall'inseminazione (De Placido *et al.*, 2002).

La matrice extra cellulare del cumulo ooforo (ECM) è una formidabile barriera che lo spermatozoo deve attraversare prima di entrare in contatto con la zona pellucida. Naturalmente con la ICSI viene a mancare tutto quello che avviene fino alla fusione dello spermatozoo con l'ovocita. La ICSI, infatti, permette il superamento meccanico della zona pellucida e della membrana plasmatica dell'ovocita.

### *Transfer embrionario*

Dopo circa 48-72 ore dal prelievo ovocitario, si effettua il transfer intrauterino transcervicale degli embrioni. Il transfer segue una procedura standardizzata che comprende due fasi successive: una fase preliminare (eseguita non più di tre mesi prima dell'inizio della tecnica) e la fase corrispondente al transfer vero e proprio. La fase preliminare comporta lo studio della eso/endocervice (valutazione colposcopica); lo studio della cavità uterina (valutazione isteroscopica ed ecografia), l'isterometria e la prova catetere. Per quanto concerne la prova catetere ha lo scopo di identificare eventuali difficoltà determinate da angolazioni e/o stenosi del canale cervicale. Abitualmente abbiamo usato il catetere morbido Edwards-Wallace. Nei casi in cui la prova risulti difficile utilizziamo il catetere rigido (set TDT) e riserviamo a tali pazienti l'assunzione di farmaci ad azione ansiolitica o antiprostaglandinici,

per la loro attività analgesica. Tutti i cateteri per transfer sono di materiale plastico non tossico per gli embrioni. Differiscono tra loro per lunghezza e calibro, morbidezza e capacità di conservare la curvatura data manualmente.

La fase corrispondente al transfer vero e proprio consta nel trasferimento degli embrioni, mediante catetere, dalla piastra di coltura all' utero materno, dove avverrà l'impianto. Il catetere viene caricato con pochissimi microlitri di terreno contenenti gli embrioni senza bolle d'aria. Gli embrioni sono rilasciati ad 1cm dal fondo dell'utero. Terminato il transfer, il biologo controlla il catetere per verificare che nessun embrione sia rimasto all'interno, nel qual caso la procedura viene ripetuta.

Gli embrioni prima di essere caricati vengono osservati all'invertoscopio per valutare il grado di sviluppo (numero di cellule), la percentuale di frammenti e l'assenza di blastomeri multinucleati, indice di anomalia.

## **RISULTATI**

I risultati sono riportati in termini di deviazioni standard ( $\pm$  SD). I dati sono stati analizzati con il programma SPSS, versione 12,0 (SPSS Inc., USA). Un'ANOVA *one way* è stata utilizzata per determinare gli effetti dei protocolli di stimolazione sulle variabili continue. Il test Mann-Whitney *U* è stato applicato allo scopo di valutare le differenze tra i gruppi in riferimento a variabili continue

con distribuzione non parametrica. Il test  $\chi^2$  è stato usato per comparare i dati discontinui. Un'analisi di correlazione lineare (coefficiente di Pearson) è stata adottata per valutare la relazione tra singole variabili continue e livelli intrafollicolari di benzene. È stato altresì utilizzato il coefficiente di Spearman per valutare la relazione tra i livelli intrafollicolari di benzene e variabili non continue. L'analisi di regressione multipla è stata applicata per evidenziare, tra quelle correlate in maniera statisticamente significativa con le concentrazioni di benzene, la variabile continua più predittiva nei confronti dei livelli intrafollicolare dell'idrocarburo. Un valore di  $p < 0.05$  è stato considerato statisticamente significativo.

Le analisi di correlazione semplice hanno evidenziato nell'intera popolazione in studio, una correlazione positiva, statisticamente significativa tra livelli di benzene intrafollicolari e ciascuna delle seguenti variabili: numero medio di embrioni trasferiti ( $r = -0.374$ ;  $p = 0.029$ ) e numero medio di ovociti recuperati ( $r = -0.433$ ;  $p = 0.010$ ). A causa della presenza di sole due variabili che presentavano correlazione statisticamente significativa col benzene intrafollicolare, si è soprasseduto dall'eseguire l'analisi di regressione multipla.

**Tabella 4** . *Caratteristiche demografiche e distribuzione delle differenti indicazioni a tecniche di PMA dell'intera popolazione di studio*

	<b>POPOLAZIONE FEMMINILE</b>
<i>N</i>	34
<i>ETA' (anni)*</i>	33 ±4.67
<b>INDICAZIONE A PMA:</b>	
<i>a) fattore maschile**</i>	50%
✓ <i>OAT severa</i>	41.18%

✓ <i>OAT moderata</i>	8.82%
<i>b) fattore femminile**</i>	41.18%
✓ <i>fattore tuberico</i>	35.3%
✓ <i>abortività ripetuta</i>	2.94%
✓ <i>endometriosi</i>	2.94%
<i>c) fattore idiomatico**</i>	8.8%

\* I dati sono riportati come media  $\pm$  DS

\*\*I valori sono riportati in (%)

In questo studio è stata evidenziata una riduzione statisticamente significativa sia del numero di ovociti recuperati ( $p = 0.01$ ) sia del numero di embrioni impiantati nel gruppo B rispetto al gruppo A ( $p = 0.04$ ).

**Tabella 5 .** *Caratteristiche demografiche, antropometriche ed esiti della tecnica di PMA nei due gruppi*

	<b>GRUPPO A</b> benzene <0.54ng/ml	<b>GRUPPO B</b> benzene $\geq$ 0.54ng/ml	<i>p</i>
<b>BMI</b>	24.04 $\pm$ 3,53	25.32 $\pm$ 2,2	0.85
<b>Età (anni)</b>	31 $\pm$ 4.7	32 $\pm$ 4.8	0.74
<b>Benzene (ng/ml)</b>	0.15 $\pm$ 0.16	1.51 $\pm$ 1.25	0.76
<b>Ovociti recuperati (n.)</b>	7.42 $\pm$ 2.51	6.61 $\pm$ 2.85	0.01
<b>Embrioni impiantati (n.)</b>	2.64 $\pm$ 0.42	2.3 $\pm$ 0.63	0.04
<b>Tassi di gravidanza*</b>	21%	28%	0.89

*I valori sono riportati come media  $\pm$  DS*

\* I valori sono riportati in (%)

## **DISCUSSIONE**

Un aspetto di rilievo emerso dal presente studio è quello relativo all'impatto del benzene sulla risposta ovarica in corso di COS, nei protocolli di PMA. Anche in questo caso, l'analisi di regressione lineare ha evidenziato una correlazione inversa, statisticamente significativa, tra i livelli intrafollicolari di benzene ed il numero medio di ovociti recuperati. Analogamente, il numero medio di embrioni trasferiti ha presentato una correlazione inversa, statisticamente significativa, con le concentrazioni dell'idrocarburo. Tale osservazione lascia, anche in questo caso, ipotizzare che la relativa esiguità del campione abbia giocato un ruolo determinante. Le osservazioni relative alle analisi di regressione sembrano trovare conferma nella comparazione dei risultati delle procedure di PMA riportati nei due gruppi. Più specificamente, il gruppo A, contrassegnato da valori di benzene più bassi, ha mostrato valori di



E<sub>2</sub> al picco, un numero medio di ovociti recuperati ed un numero medio di embrioni trasferiti significativamente più elevati rispetto al gruppo B (tabella 5. ). Nell'insieme, queste evidenze supportano l'ipotesi secondo la quale il benzene possa determinare una condizione di resistenza ovarica alle gonadotropine esogene. Tale resistenza, tuttavia, non sembrerebbe tale da rendere necessario un incremento della dose giornaliera e, comunque, compatibile con un recupero ovocitario apparentemente soddisfacente. Soltanto la presenza della popolazione di controllo, infatti, ha consentito la messa in evidenza di differenze statisticamente significative. Anche in questo caso, i meccanismi patogenetici attraverso i quali il benzene possa compromettere l'esito della COS restano da definire. Il disegno sperimentale adottato nel presente studio si limita, infatti, ad una analisi preliminare di tipo quantitativo. La dimensione campionaria non è tale da consentire né una valutazione degli effetti del benzene sulla "qualità" degli ovociti e degli embrioni, né un'analisi relativa ai tassi di gravidanza. Tale valutazione sarebbe possibile solo tramite un'analisi di aspetti morfologici relativi a gameti ed embrioni stessi, nonché attraverso una comparazione dei tassi di gravidanza. Queste analisi richiedono, di fatto, popolazioni di studio particolarmente ampie.

I risultati della nostra sperimentazione sono in accordo con i dati emersi da precedenti studi osservazionali, condotti in ambienti lavorativi, che avevano evidenziato come l'esposizione al benzene possa riflettersi negativamente sulla funzione riproduttiva. In particolare, tali studi avevano evidenziato un possibile nesso causale tra l'idrocarburo e anomalie della sfera genitale, quali menorragia, oligomenorrea, sterilità, ipoplasia e degenerazione ovarica (Vara e Kinnunen, 1946); interruzione prematura di

gravidanza, rottura di placenta e asfissia intrauterina del feto (Mukhametova e Vozovaya, 1972); disordini mestruali, aborti spontanei e gestosi (Huang, 1991). Tuttavia, il nostro studio, utilizzando il modello della PMA, fornisce, per la prima volta, informazioni circa il nesso tra concentrazioni intra-ovariche di benzene e follicologenesi.

Nell'insieme, i risultati del presente studio, sebbene preliminari, forniscono importanti evidenze a favore dell'ipotesi di un nesso tra esposizione al benzene e ridotta capacità riproduttiva.

## **CAPITOLO 3**

### **Ruolo dei livelli di benzene sui parametri endocrini endogeni**

Numerose evidenze mostrano come il benzene, idrocarburo aromatico noto per le sue proprietà di cancerogeno chimico, sia associato, tanto negli animali quanto nell'uomo, ad una serie di condizioni cliniche che sembrano incidere sul processo riproduttivo. In particolare, l'esposizione al benzene in ambiente lavorativo è stato associato ad aumentata incidenza di menorragia, oligomenorrea, sterilità, ipoplasia e degenerazione ovarica (Vara e Kinnunen, 1946); a maggiori tassi di interruzione prematura di gravidanza, rottura di placenta e asfissia intrauterina del feto (Mukhametova e Vozovaya, 1972); ad un aumento dei tassi di disordini mestruali, aborti spontanei e gestosi (Huang, 1991).

Nel 1997 Smith et al. hanno dimostrato un incremento del rischio di sterilità in donne esposte a solventi organici volatili, polveri chimiche, pesticidi e radiazioni da schermi di pc. In particolare lo studio evidenziava un alto rischio di sterilità da causa tubarica e di endometriosi in associazione all'esposizione a solventi e polveri [solventi: *odds ratio* (OR), 1.95; limiti di confidenza (CI), 1.08-3.52; polveri: OR, 2.87; CI, 1.05-7.88]; un alto rischio di sterilità da causa ovulatoria in associazione all'esposizione a solventi (OR, 1.75; CI, 1.03-2.98), polveri (OR, 3.00; CI, 1.19-7.52) o pesticidi (OR, 3.82; 1.28-11.42).

## **Materiali e metodi**

### *Stimolazione*

Per tutte le pazienti è utilizzato un unico protocollo: “long-protocol” con agonisti del GnRH. Una volta ottenuta la soppressione dell'asse ipotalamo-ipofisario, la stimolazione vera e propria è realizzata mediante la somministrazione di gonadotropine esogene (FSH ricombinante in associazione o meno a LH ricombinante e/o *human Menopausal Gonadotrophin*).

La risposta ovarica è monitorata ad intervalli di 2-3 giorni, mediante indagini ecografiche e dosaggio dei livelli E<sub>2</sub>.

Ad uno stadio di crescita ottimale dei follicoli (presenza di almeno 3 follicoli con diametro medio >18 mm), è indotta la maturazione definitiva degli ovociti, con somministrazione di gonadotropina corionica umana (hCG), alla dose di 10.000 UI.

In tutte le pazienti è praticata una supplementazione della fase luteale con una dose giornaliera di progesterone i.m. di 50 mg, dal

giorno del prelievo degli ovociti (Prontogest, AMSA SRL, Roma, Italia). Le pazienti gravide continuano tale terapia fino al riscontro USG di uno o più sacchi gestazionali intrauterina e del battito cardiaco fetale (ecografia al 34°-36° giorno dopo hCG).

## **Risultati**

Le analisi di correlazione semplice hanno evidenziato nell'intera popolazione in studio, una correlazione positiva, statisticamente significativa tra livelli di benzene intrafollicolari e ciascuna delle seguenti variabili: FSH basale ( $r=0.38$ ;  $p=0.026$ ).

Al contrario, non è stata evidenziata alcuna correlazione statisticamente significativa tra i livelli di benzene e le seguenti variabili: E<sub>2</sub> basale ( $p=0.377$ ), LH basale ( $p=0.161$ ), E<sub>2</sub> al picco ( $p=0.086$ ), numero di fiale di gonadotropine esogene utilizzate ( $p=0.569$ ), numero di giorni di stimolazione ( $p=0.856$ ).

Non è emersa, inoltre, alcuna differenza statisticamente significativa tra i due gruppi nei livelli basali di LH ( $p=0.07$ ), nei livelli basali di E<sub>2</sub> ( $p=0.55$ ), nel numero di fiale di gonadotropine utilizzate durante la stimolazione ovarica controllata ( $p=0.59$ ) e nel numero di giorni di stimolazione a cui sono state sottoposte le pazienti ( $p=0.75$ ).

Al contrario è stato osservato un incremento statisticamente significativo dei valori di FSH basali nelle donne del gruppo B rispetto a quelle del gruppo A ( $p = 0.003$ ).

Il gruppo B presentava, durante la stimolazione ovarica controllata, valori di E<sub>2</sub> al picco inferiori rispetto a quelli riportati dal gruppo A. Tale differenza è apparsa essere statisticamente significativa ( $p = 0.008$ ).

**Tabella 6.** *Caratteristiche demografiche, antropometriche, ormonali ed esiti della tecnica di PMA nei due gruppi*

	<b>GRUPPO A</b> benzene <0.54ng/ml	<b>GRUPPO B</b> benzene ≥0.54ng/ml	<b>p</b>
<b>BMI</b>	24.04 ±3.53	25.32 ±2.2	0.85
<b>Età (anni)</b>	31 ±4.7	32 ±4.8	0.74
<b>Benzene (ng/ml)</b>	0.15 ±0.16	1.51 ±1.25	0.76
<b>FSH basale (UI/L)</b>	5.83 ±1.11	11.34 ±4.22	0.003
<b>LH basale (UI/L)</b>	3.88 ±1.57	8.22 ±2.48	0.07
<b>Estradiolo basale (pg/ml)</b>	38.87 ±16.13	38,4 ±18.26	0.55
<b>Estradiolo al picco (pg/ml)</b>	1836.65 ±661.94	1328.8 ±493.03	0.008
<b>Giorni di stimolazione (n.)</b>	13.21 ±2.71	13.38 ±2.56	0.75
<b>Fiale di gonadotropine (n.)</b>	33.31 ±15.20	32.65 ±13.78	0.59

*Tutti i valori sono riportati come media ± DS*

## **DISCUSSIONE**

I risultati delle analisi effettuate nel presente studio evidenziano in modo diretto e per la prima volta, come alte dosi di benzene possano impattare negativamente sulla funzionalità ovarica, ovvero sulla risposta ovarica alle gonadotropine sia endogene sia esogene. In particolare, la resistenza ovarica all'FSH endogeno sembra essere supportata dal riscontro, nell'intera popolazione di studio, di una correlazione positiva, statisticamente significativa, tra livelli intrafollicolari di benzene e livelli basali dell'ormone ipofisario. Tale osservazione sembra trovare conferma nell'analisi dei risultati effettuata sui due sottogruppi in cui è stata suddivisa la popolazione di studio: in particolare è stato osservato come il sottogruppo con valori di benzene intrafollicolare più elevati (gruppo B) presentasse un incremento statisticamente significativo delle concentrazioni di FSH basale. Va sottolineato come anche i livelli basali di LH sono risultati più elevati nel gruppo B, sebbene non si siano evidenziate differenze statisticamente significative tra i gruppi. Tale osservazione potrebbe essere riconducibile alla dimensione campionaria. In ogni caso, è noto come, nella pratica clinica, l'FSH basale rappresenti uno dei parametri più accurati nel definire la riserva follicolare. Resta da definire il meccanismo che è alla base del fenomeno della "resistenza ovarica" osservato nelle pazienti con benzene elevato. Sono prospettabili due ipotesi: in primo luogo

è possibile che, in presenza di una riserva follicolare intatta, l'idrocarburo interferisca soltanto sui meccanismi recettoriali pre- e post-trasduzionali. In alternativa, il benzene potrebbe direttamente mediare effetti degenerativi in grado di ridurre, anche sotto il profilo quantitativo, la riserva di follicoli reclutabili. Qualora le osservazioni riportate nel presente studio dovessero trovare conferma, lo *step* successivo sarebbe quello di stimare la riserva ovarica in pazienti con livelli intra-ovarici elevati di benzene. A tal fine sarebbe necessario un disegno sperimentale che preveda il dosaggio dei livelli circolanti di inibina B ed ormone anti-mülleriano (AMH), nonché l'esecuzione della conta dei follicoli antrali in fase follicolare precoce mediante ecotomografia trans-vaginale standard e 3D.

Da sottolineare che, sebbene la relazione inversa tra i valori di  $E_2$  al picco e concentrazioni di benzene non sia risultata statisticamente significativa, l'analisi di regressione ha evidenziato un valore di  $r = 0.3$  ed un valore di  $p = 0.08$ . Tale osservazione lascia, anche in questo caso, ipotizzare che la relativa esiguità del campione abbia giocato un ruolo determinante. Le osservazioni relative alle analisi di regressione sembrano trovare conferma nella comparazione dei risultati delle procedure di PMA riportati nei due gruppi. Più specificamente, il gruppo A, contrassegnato da valori di benzene più bassi, ha mostrato valori di  $E_2$  al picco, un numero medio di ovociti recuperati ed un numero medio di embrioni trasferiti significativamente più elevati rispetto al gruppo B (tabella 5.). È interessante sottolineare come, nei due gruppi, il consumo medio di gonadotropine e la durata media della stimolazione siano apparsi sovrapponibili. Nell'insieme, queste evidenze supportano l'ipotesi secondo la quale il benzene possa determinare una condizione di

resistenza ovarica alle gonadotropine esogene. Tale resistenza, tuttavia, non sembrerebbe tale da rendere necessario un incremento della dose giornaliera e, comunque, compatibile con un recupero ovocitario apparentemente soddisfacente. Soltanto la presenza della popolazione di controllo, infatti, ha consentito la messa in evidenza di differenze statisticamente significative.

Tuttavia, il nostro studio, utilizzando il modello della PMA, fornisce, per la prima volta, informazioni circa il nesso tra concentrazioni intra-ovariche di benzene e follicologenesi.

Qualora questi dati dovessero trovare conferma nell'ambito di una popolazione di studio più ampia, il passo successivo sarebbe quello di definire i meccanismi patogenetici che sottendono la resistenza ovarica alle gonadotropine endogene e la riduzione della risposta.



## CAPITOLO 4

### IMPATTO DEI LIVELLI DI BENZENE SULLA QUALITA' DEL LIQUIDO SEMINALE

Diversi autori hanno rivolto la loro attenzione all'associazione tra inquinamento ambientale e caratteristiche del seme maschile. Carlsen et al. hanno pubblicato nel 1992 un meta-analisi di tutti i lavori prodotti negli ultimi cinquanta anni: valutando circa 14.000 eiaculati di uomini in età fertile, sono giunti alla conclusione che la conta spermatica è diminuita da circa 113 milioni per cc nel 1938, a circa 66 milioni per cc nel 1990, in associazione alla diminuzione dell'intero eiaculato. Analoga analisi è stata condotta in Italia dove si è evidenziato una diminuzione della conta spermatica da 88 milioni per ml nel 1981, a 61 milioni per ml nel 1995 con una riduzione del 30.7%, associata ad una riduzione della motilità complessiva dal 74 al 66% e ad una riduzione della normale morfologia dal 76 al 63% (Bilotta *et al.*, 1999). Nonostante molti autori abbiano confermato queste osservazioni (Sharpe *et al.*, 1993; Cohen *et al.*, 1994, Joffe *et al.*, 1996), esistono in letteratura linee di evidenza controverse (Olson *et al.*, 1996; Fish *et al.*, 1996; Paulsen *et al.*, 1996; Handelsman et al., 1997).

## MATERIALI E METODI

### *Questionario*

A tutti i pazienti è stato sottoposto un questionario teso alla raccolta di dati anamnestici riguardanti la professione, le abitudini al fumo ed alla guida di automobili, allo scopo di identificare possibili “comportamenti a rischio” suscettibili di maggiore esposizione al benzene.

### *Definizione dei livelli di benzene nei liquidi seminali*

Si è proceduto alla determinazione dei livelli di benzene nei liquidi seminali adoperando come tecniche di estrazione lo *spazio di testa* e la *microestrazione in fase solida* (*Head Space/Solid Phase Microextraction, HS/SPME*). Il benzene estratto dal liquido seminale e concentrato sulla fibra è successivamente rivelato e quantificato mediante *gas cromatografia* accoppiata a *spettrometria di massa* (*GC/MS*). A tale scopo è utilizzato un gas cromatografo HRGC MEGA series 2 della Fisons Instruments ed uno spettrometro di massa QMD 1000 della CE Instruments. L'analisi è effettuata dal Laboratorio Chimico-Tossicologico diretto dal Prof. Antonio Acampora - *Dipartimento di Medicina Pubblica e della Sicurezza Sociale dell'Azienda Ospedaliera “Federico II” di Napoli*.

### *Preparazione del campione di seme*

Il liquido seminale è posto in un flacone sigillato (vial) a tenuta, addizionato precedentemente di 1 g di cloruro di sodio (NaCl). Ad ogni vial sono stati aggiunti 50 µl di una soluzione 29.6 ng/ml di standard interno, il *benzene esadeuterato* (C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>), ottenendo una quantità nota e costante di 1.48 ng di benzene esadeuterato per ogni campione.

#### *Valutazione della concentrazione di benzene nel liquido seminale*

La quantificazione del benzene è realizzata rapportando l'area del picco relativo all'analita con quella del picco relativo allo standard interno, che corrisponde alla quantità nota e costante di 1.48 ng. Ciò è stato possibile in quanto il benzene ed il benzene esadeuterato mostrano un analogo comportamento chimico-fisico durante le fasi di estrazione e rivelazione, fornendo, a parità di concentrazione, la medesima risposta analitica. Pertanto la quantità incognita di benzene, espressa in ng, è calcolata mediante la seguente formula:

$$X \text{ ng} = (\text{Area}_{\text{benzene}} \cdot 1.48 \text{ ng}) / A_{\text{benzene esadeuterato}}$$

Ogni valore ricavato è diviso per il volume del liquido seminale analizzato ottenendo, così, la concentrazione di benzene, espresso in ng/ml, in ciascun liquido seminale.

## Risultati

La popolazione maschile di studio è di numero 70 pazienti con età  $35,3 \pm 7,62$  e BMI  $27 \pm 4,3$ . Le caratteristiche demografiche, antropometriche ed esiti della valutazione del liquido seminale sono riportati in termini di percentuale (tabella 7.).

Il test di t student è stata adottato per valutare la relazione tra due variabili indipendenti e livelli intrafollicolari di benzene. Un valore di  $p > 0.05$  è stato considerato statisticamente non significativo.

Le analisi di correlazione non hanno evidenziato nell'intera popolazione di studio alcuna correlazione statisticamente significativa tra i livelli di benzene intraseminali e ciascuna delle seguenti variabili: età, BMI, fumatori e professioni a rischio.

Non è emersa, inoltre, alcuna differenza statisticamente significativa, rispetto ai livelli di benzene, tra la popolazione maschile di studio divisa in due gruppi: semi con oligo-asteno-teratospermia (OAT) moderata-lieve e semi con oligo-asteno-teratospermia severa ( $p > 0.05$ ) (tabella 8.).

Inoltre, sono stati osservati, rispetto ai livelli di benzene, i seguenti semi: semi con parametri di concentrazione nella norma e semi con parametri di concentrazione alterata (tabella 9.); semi con parametri di motilità nella norma e semi con parametri di motilità alterata (tabella 10.); semi con parametri di morfologia nella norma e semi con parametri di morfologia alterata (tabella 11.) Da questo studio non è stata riscontrata alcuna correlazione statisticamente significativa ( $p > 0.05$ ).

**Tabella 7.** *Caratteristiche demografiche, antropometriche ed esiti della valutazione del liquido seminale nella popolazione maschile di studio*

	<b>POPOLAZIONE MASCHILE</b>
<i>N</i>	70
<i>ETA' (anni)*</i>	35.3 ±7.62
<i>BMI*</i>	27 ±4.3
<i>FUMATORI**</i>	37 %
<i>PROFESSIONI A RISCHIO**</i>	43 %
<b>VALUTAZIONE SEME**</b>	
<i>Oligospermia</i>	39 %
<i>Astenospermia</i>	88%
<i>Teratospermia</i>	90 %
<i>OAT moderata-lieve</i>	45%
<i>OAT severa</i>	55%

*\*I valori sono riportati come media ± DS*

*\*\*I valori sono riportati in (%)*

**Tabella 8.** Confronto tra semi con parametri di concentrazione, di motilità, di morfologia (OAT) moderata-lieve e severa nella popolazione maschile di studio

<b>Semi con OAT moderata-lieve</b> (n =32)	<b>Semi con OAT severa</b> (n =39)	<b>p</b>
96.01 ±175.4	153.0 ±556.3	>0.05

**Tabella 9.** Confronto tra semi con parametro di concentrazione nelle norma ed alterata nella popolazione maschile di studio

<b>Semi con parametro di concentrazione nella norma</b> (n=35)	<b>Semi con parametro di concentrazione alterata</b> (n=23)	<b>p</b>
857 ±178.4	63.4 ±93.8	>0.05

**Tabella 10.** Confronto tra semi con parametro di motilità nella norma ed alterata nella popolazione maschile di studi

<b>Semi con parametro di motilità nella norma</b> (n=7)	<b>Semi con parametro di motilità alterata</b> (n=51)	<b>p</b>
12.80 ±30.12	85.62 ±157.7	>0.05

**Tabella 11.** Confronto tra semi con parametro di morfologia nella norma ed alterata nella popolazione maschile di studio

<b>Semi con parametro di morfologia nella norma</b> (n =6)	<b>Semi con parametro di morfologia alterata</b> (n =52)	<b>p</b>
59.3 ±99.9	78.9 ±155.3	>0.05

## DISCUSSIONE

I risultati delle analisi effettuate nel presente studio evidenziano che non esiste una correlazione tra variabili ambientali-comportamentali e livelli di benzene intraseminale. Inoltre la molecola di benzene non impatta sui parametri morfo-funzionali del seme. Tali osservazioni non trovano riscontro nella letteratura scientifica in quanto un limitato numero di studi (Chatburn et al., 1981; ATSDR, 1997) hanno mostrato come tale sostanza sia capace di indurre alterazioni della sfera riproduttiva negli uomini ed i diversi autori (Carlsen et al, 1992) che hanno posto l'attenzione all'associazione tra inquinamento ambientale e caratteristiche del seme hanno indagato i livelli di benzene in altri liquidi biologici, e non nel liquido seminale.

Sono prospettabili tre ipotesi: in primo luogo è possibile che, i livelli di benzene nel liquido seminale sono quantitativamente meno significativi rispetto alle altre comuni vie di eliminazione, indipendentemente dalla dose assorbita. In secondo luogo è possibile che, il modello di P.M.A nell'uomo sia meno efficace rispetto al modello di PMA nella donna, per la valutazione della qualità dei gameti, in quanto le cinetiche di eliminazione di questa molecola sono più veloci a causa di una minore composizione in tessuto adiposo del peso corporeo (Sato et al., 1975). Infine è possibile che, sebbene il benzene possa non incidere sui parametri morfofunzionali del seme, esso possa impattare sui parametri ultrastrutturali spermatozoari.

A tal fine sarebbe necessario un disegno sperimentale che preveda il dosaggio dei livelli circolanti di benzene, nonché la stima di questa molecola nelle urine e nel liquido seminale, nell'ambito di una popolazione di studio più ampia, per poi definire se il benzene impatta sui parametri ultrastrutturali dello spermatozoo.



## BIBLIOGRAFIA

1. Aksoy, M. (1991) *Hematotoxicity, leukemogenicity and carcinogenicity of chronic exposure to benzene*. In: Molecular aspects of monooxygenases and bioactivation of toxic compounds. Arinc, E; Schenkman, JB; Hodgson, E, eds. New York: Plenum Press, pp. 415-434.
2. ALA. 2003. *Trends in Tobacco Use*. Epidemiology and Statistics Unit. American Lung Association. <http://www.lungusa.org/data> (Smoking (Narrative and Tables)).
3. Alviggi C., *Epidemiologia della sterilità*, 2007.
4. Andrews, LS; Lee, EW; Witmer, CM; et al. (1977) *Effects of toluene on the metabolism, disposition and hematopoietic toxicity of [<sup>3</sup>H]benzene*. *Biochem Pharmacol* 26:293-300.
5. APAT – Agenzia per la protezione dell’ambiente e per I servizi tecnici.
6. ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). (1997) *Toxicological profile for benzene (update)*. Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, GA.
7. Axelsson, G; Luetz, C; Rylander, R. (1984) *Exposure to solvents and outcome of pregnancy in university laboratory employees*. *Br J Ind Med* 41:305-312.
8. *Benzene*. Geneva, World Health Organization, 1993 (Environmental Health Criteria, No. 150).

9. Benzene. In: *Some industrial chemicals and dyestuffs*. Lyon, International Agency for Research on Cancer, 1982, pp. 93–148 (IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, Vol. 29).
10. Bhatt R.V. *Environmental influence on reproductive health*. International Journal of Gynecology & obstetrics. 01 July 2000;70(1):69-75.
11. Bilotta P, Guglielmo R, Steffe M. *Analysis of decline in seminal fluid in the italian population durign the past 15 years*. Minerva Ginecol. 1999 Jun;51(6):223-31.
12. Bordarier, C; Robain, O; Ponsot, G. (1991) *Bilateral porencephalic defect in a newborn after injection of benzol during pregnancy*. Brain Dev 13:126-129.
13. Brett, S.M., Rodricks, J.V. & Chinchilli, V.M. *Review and update of leukaemia risk potentially associated with occupational exposure to benzene*. Environmental health perspectives, 82: 267–281 (1989).
14. Brief, RS; Lynch, J; Bernath, T; et al. (1980) *Benzene in the workplace*. Am Ind Hyg Assoc J 41:616-623.
15. Brunmark, A; Cadenas, E. (1988) *Reductive addition of glutathione to p-benzoquinone, 2-hydroxy-p-benzoquinone, and p-benzoquinone epoxides. Effect of hydroxy- and glutathionyl substituents on p-benzoquinone autooxidation*. Chem Biol Interact 86:273-298.
16. Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek NE. *Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years*. BMJ. 1992 Sep 12;305(6854):609-13. Review.
17. Chatburn, G; Sharratt, M; Wickramaratne, GA. (1981) *Chemical Industries Association/Institute of Petroleum Joint*

- Committee on Benzene: reports of task forces on toxicology and teratology of benzene. II. Reproductive effects, embryotoxicity. Regul Toxicol Pharmacol 1:205-210.*
18. Chepiga, TA; Yang, CS; Snyder, R. (1990) *Benzene metabolism by two purified, reconstituted rat hepatic mixed function oxidase systems. Adv Exp Med Biol 283:261-265.*
  19. De Sutter P, Gerris J, Dhont M. *A health-economic decision-analytic model comparing double with single embryo transfer in IVF/ICSI: a sensitivity analysis. Hum Reprod, 2003; 18, 1361.*
  20. Ding, X-J; Li, Y; Ding Y; et al. (1983) *Chromosome changes in patients with chronic benzene poisoning. Chin Med J (Peking Engl. Ed.) 96:681-685.*
  21. Dowty, BJ; Laseter, JL; Storer, J. (1976) *The transplacental migration and accumulation in blood of volatile organic constituents. Pediatr Res 10:696-701.*
  22. Eastmond, DA. (1993) *Induction of micronuclei and aneuploidy by the quinone-forming agents benzene and ophenylphenol. Toxicol Lett 67(1-3):105-118.*
  23. EPA (U.S. Environmental Protection Agency). *Toxicological review of Benzene. October 2002.*
  24. Forni, A; Moreo, L. (1967) *Chromosome studies in a case of benzene-induced erythroleukaemia. Eur J Cancer 5:459-463.*
  25. Frantz, CE; Chen, H; Eastmond, DA. (1996) *Inhibition of human topoisomerase II in vitro by bioactive benzene metabolites. Environ Health Perspect 104 (suppl 6):1319-1323.*
  26. Funes-Cravioto, F; Zapata-Gayon, C; Kolmodin-Hedman, B; et al. (1977) *Chromosome aberrations and sister chromatid*

- exchange in workers in chemical laboratories and a rototyping factory and in children of women laboratory workers. Lancet 2:322-325.*
27. Ghantous, H; Danielsson, BRG. (1986) *Placental transfer and distribution of toluene, xylene, and benzene, and their metabolites during gestation in mice. Biol Res Pregnancy 7:98-105.*
  28. Goldstein, BD. (1988) *Benzene toxicity. State of the art reviews. Occup Med 3:541-554.*
  29. Holmberg, PC. (1979) *Central nervous system defects in children born to mothers exposed to organic solvents during pregnancy. Lancet 2:177-179.*
  30. Huang, X-Y. (1991) *Influence on benzene and toluene to reproductive function of female workers in leather shoe making industry. Chin J Prev Med 25:89-91. (In Chinese; Eng. abstr. TOXLINE).*
  31. Hurley, J.F., Cherrie, J.W. & Maclaren, W. *Exposure to benzene and mortality from leukaemia: results from coke oven and other coal product workers. British journal of industrial medicine, 48: 502–504 (1991).*
  32. IARC. 1986. *Tobacco Smoking. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, vol. 38. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. 421 pp.*
  33. IARC. 2002. *Tobacco Smoking and Involuntary Smoking. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, vol. 83. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer.*

34. Irons, RD; Neptun, DA. (1980) *Effects of principle hydroxy-metabolites of benzene on microtubule polymerization*. Arch Toxicol 45:297-305.
35. IST - Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro. Istituto Scientifico per lo Studio e la Cura dei Tumori. 16132 Genova - Largo Rosanna Benzi,10.
36. ITA. 2003. *Subheading 240220: Cigarettes Containing Tobacco*. International Trade Administration. U.S. Department of Commerce. <http://www.ita.doc.gov/td/industry/otea/Trade-Detail/>.
37. Karacic, V. et al., *Possible genotoxicity in low level benzene exposure*. American journal of industrial medicine, 27: 379–388 (1995).
38. Kraut, A; Lilis, R; Marcus, M; et al. (1988) *Neurotoxic effects of solvent exposure on sewage treatment workers*. Arch Environ Health 43:263-268.
39. Low, LK; Meeks, JR; Norris, KJ; et al. (1989) *Pharmacokinetics and metabolism of benzene in Zymbal gland and other key target tissues after oral administration in rats*. Environ Health Perspect 8:2:215-222.
40. Low, LK; Lambert, CD; Meeks, JR. (1995) *Tissue-specific metabolism of benzene in Zymbal gland and other solid tumor target tissues in rats*. J Am Coll Toxicol 14:40-60.
41. Lutz, WK; Schlatter, CH. (1977) *Mechanism of the carcinogenic action of benzene: Irreversible binding to rat liver DNA*. Chem Biol Interact 18:241-245.
42. Major, J; Kemeny, G; Tompa, A. *Genotoxic effects of occupational exposure in the peripheral blood lymphocytes*

- of pesticide preparing workers in Hungary. Acta Med Hung* 49(1-2):79-90 (1992).
43. Major, J. et al., *Chromosome aberration, sister-chromatid exchange, proliferative rate index, and serum thiocyanate concentration in smokers exposed to low-dose benzene. Environmental and molecular mutagenesis*, 23: 137–142 (1994).
44. McMahon, TF; Birnbaum, LS. (1991) *Age-related changes in disposition and metabolism of benzene in male C57BL/6N mice. Drug Metab Dispos* 19:1052-1057.
45. Marchei E., Pellegrini M., Pacifici R., Zuccaio PG., Simona Pichini. *Composizione Chimica Del Fumo Principale Di Sigaretta*. Istituto Superiore di Sanità, Dipartimento del Farmaco.
46. Morgan, DL; Cooper, SW; Carlock DL; et al. (1991) *Dermal absorption of neat and aqueous volatile organic chemicals in the Fischer 344 rat. Environ Res* 55:51-63.
47. Mukhametova, IM; Vozovaya, MA. (1972) *Reproductive power and the incidence of gynecological disorders in female workers exposed to the combined effect of benzene and chlorinated hydrocarbons. Gig Tr Prof Zabol* 16:6-9 (Russian).
48. Niculescu, R; Bradford, HN; Colman, RW; et al. (1995) *Inhibition of the conversion of pre-interleukins-1 $\alpha$  and 1 $\beta$  to mature cytokines by p-benzoquinone, a metabolite of benzene. Chem Biol Interact* 98:211-222.
49. Niculescu, R; Renz, RF; Kalf, GF. (1996) *Benzene-induced bone marrow cell depression caused by inhibition of the conversion of pre-interleukins-1 $\alpha$  and -1 $\beta$  to active cytokines*

- by hydroquinone, a biological reactive metabolite of benzene.*  
In: Biological reactive intermediates V. Snyder, R, ed. New York: Plenum Press.
50. Nomiyama, K; Nomiyama, H. (1974) *Respiratory retention, uptake, and excretion of organic solvents in man: Benzene, toluene, n-hexane, trichloroethylene, acetone, ethyl acetate and ethyl alcohol.* Int Arch Arbeitsmed 32:75-83.
  51. Parke, DV. (1989) *Introduction: session on metabolism.* Environ Health Perspect 82:7-8.
  52. Paxton, M.B. et al., *Leukaemia risk associated with benzene exposure in the pliofilm cohort: I. Mortality update and exposure distribution.* Risk analysis, 14: 147–154 (1994).
  53. Paxton, M.B. et al., *Leukaemia risk associated with benzene exposure in the pliofilm cohort. II. Risk estimates.* Risk analysis, 14: 155–161 (1994).
  54. Pescetto G., De Cecco L., Pecorari D., Ragni N. *Ginecologia e Ostetricia.* Società Editrice Universo, 2006.
  55. Pekari, K; Vainiotalo, S; Heikkila, P; et al. (1992) *Biological monitoring of occupational exposure to low levels of benzene.* Scand J Work Environ Health 18:317-322.
  56. Pfeifer, RW; Irons, RD. (1983) *Alteration of lymphocyte function by quinones through sulfhydryl-dependent disruption of microtubule assembly.* Int J Immunopharmacol 5:463-470.
  57. Phillipson GTM, Petrucco OM, Matthews CD. *Congenital bilateral absence of the vas deferens, cystic fibrosis mutation analysis and intracytoplasmic sperm injection.* Human Reprod, 2000; 15, 431-5.

58. Pushkina, NN; Gofmekler, VA; Klevtsova, GN. (1968) *Changes in content of ascorbic acid and nucleic acids produced by benzene and formaldehyde*. Bull Exp Biol Med 66:51-53.
59. Rao, NR; Snyder, R. (1995) *Oxidative modifications produced in HL-60 cells on exposure to benzene metabolites*. J Appl Toxicol 15:403-409.
60. Renz, JF; Kalf, GF. (1991) *Role for interleukin-1 (IL-1) in benzene-induced hematotoxicity: inhibition of conversion of pre-IL-1alpha to mature cytokine in murine macrophages by hydroquinone and prevention of benzene-induced hematotoxicity in mice by IL-1alpha*. Blood 78:938-944.
61. Rinsky, R.A. et al., *Benzene and leukaemia. An epidemiologic risk assessment*. New England journal of medicine, 316: 1044–1050 (1987).
62. Ross, D. (1996) *Metabolic basis of benzene toxicity*. Eur J Haematol 57:111-118.
63. Rothman, N. et al., *Benzene induce gene-duplicating but not gene-inactivating mutations at the glycophorin A locus in exposed humans*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 92: 4069–4073 (1995).
64. Rushton, L. *A 39-year follow-up of the U.K. oil refinery and distribution center studies: Results for kidney cancer and leukaemia*. Environmental health perspectives, 101: 77–84 (1993).
65. Sabourin, PJ; Bechtold, WE; Griffith, W; et al. (1989) *Effect of exposure concentration, exposure rate, and route of administration on metabolism of benzene by F344 rats and B6C3F<sub>1</sub> mice*. Toxicol Appl Pharmacol 99:421-444.



66. Sandmeyer, EE. (1981) *Aromatic hydrocarbons: benzene*. *Patty's Ind Hyg Toxicol* 3:3253-3283.
67. Sasiadek, M; Jagielski, J; Smolik, R. (1989) *Localization of breakpoints in the karyotypes of workers professionally exposed to benzene*. *Mutat Res* 224:235-240.
68. Sato, A., Nakajima, T; Fujiwara, Y; et al. (1975) *Kinetic studies on sex difference in susceptibility to chronic benzene intoxication - with special reference to body fat content*. *Br J Ind Med* 32:321-328.
69. Schrenk, HH; Yant, WP; Pearce, SJ; et al. (1941) *Absorption, distribution, and elimination of benzene by body tissues and fluids of dogs exposed to benzene vapor*. *J Ind Hyg Toxicol* 23:20-34.
70. Schwartz, E. *Proportionate mortality ratio analysis of automobile mechanics and gasoline service station workers in New Hampshire*. *American journal of industrial medicine*, 12: 91–99 (1987).
71. Sherwood, R.J. (1988) *Pharmacokinetics of benzene in a human after exposure at about the permissible limit*. *Ann NY Acad Sci* 534:635-647.
72. Smith CJ, Livingston SD, Doolittle DJ. *An international literature survey of "IARC Group I carcinogens" reported in mainstream cigarette smoke*. *Food Chem Toxicol*. 1997 Oct-Nov;35(10-11):1107-30. *Food Chem Toxicol*. 1997 Oct-Nov;35(10-11):1107-30.
73. Smith, E. M. PhD, MPH, MBA; Hammonds-Ehlers, M. MS; Clark, M. K. PhD; Kirchner, H. L. MS; Fuortes, L. MD *Occupational exposure and risk of female infertility*. *Journal*

- of Occupational & Environmental Medicine. 1997 February;39(2):138-147.
74. Smith, MT; Yager, JW; Steinmetz, K; et al. (1989) *Peroxidase-dependent metabolism of benzene's phenolic metabolites and its potential role in benzene toxicity and carcinogenicity*. Environ Health Perspect 82:23-29.
75. Snyder, CA. (1987) *Benzene*. Toxic Metab Ind Solv 2:3-37.
76. Snyder, R; Chepiga, T; Yang, CS. (1993a) *Benzene metabolism by reconstituted cytochromes P450, 2B1, and 2E1 and its modulation by cytochrome b5, microsomal epoxide hydrolase, and glutathione transferases: Evidence for an important role of microsomal epoxide hydrolase in the formation of hydroquinone*. Toxicol Appl Pharmacol 122:172-181.
77. Snyder, R; Witz, G; Goldstein, BD. (1993b) *The toxicology of benzene*. Environ Health Perspect 100:293-306.
78. Snyder, R; Hedli, CC. (1996) *An overview of benzene metabolism*. Environ Health Perspect 104 (suppl 6):1165-1171.
79. Srbova, J; Teisniger, J; Skramovsky, S. (1950) *Absorption and elimination of inhaled benzene in man*. Arch Ind Hyg Occup Med 2:1-8.
80. Strucker, I. et al., *Occupational paternal exposure to benzene and risk of spontaneous abortion*. Occupational and environmental medicine, 51: 475–478 (1994).
81. Swaen, G.M.H. et al., *Mortality of coke plant workers in the Netherlands*. British journal of industrial medicine, 48: 130–135 (1991).

82. Tompa, A; Major, J; Jakob, MG. (1994) *Monitoring of benzene-exposed workers for genotoxic effects of benzene; improved-working-condition-related decrease in the frequencies of chromosomal aberrations in peripheral blood lymphocytes*. *Mutat Res* 304(2):159-165.
83. U.S. Department of Health and Human Services. *The Health Consequences of Smoking: A Report of the Surgeon General*. U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Office on Smoking and Health, 2004 [cited 2006 Dec 5].
84. USDA. 1993. Field Crops. *Final estimates 1987-1992. Statistical Bulletin No. 896*. National Agriculture. Statistics Service. <http://usda.mannlib.cornell.edu/>.
85. USDA. 1998. Field Crops. *Final estimates 1992-1997. Statistical Bulletin No. 947*. National Agriculture. Statistics Service. <http://www.usda.gov/nass/pubs/histdata.htm>.
86. Valentine, RL; Lee, SS; Seaton, MJ; et al. (1996) *Reduction of benzene metabolism and toxicity in mice that lack CYP2E1 expression*. *Toxicol Appl Pharmacol* 141:205-213.
87. Vara, P; Kinnunen, O. (1946) *Benzene poisoning as a gynecological problem*. *Acta Obstet Gynecol Scand* 26:433-452. (OTS 8EHQ-0279-0244).
88. Wells, MS; Nerland, DE. (1991) *Hematotoxicity and concentration-dependent conjugation of phenol in mice following inhalation exposure to benzene*. *Toxicol Lett* 56:159-166.

89. WHO. *International Consultation on Environmental Tobacco Smoke (ETS) and Child Health. Consultation Report.* Geneva. World Health Organization. 1999.
90. Witz, G; Z. Zhang, Z; Goldstein, BD. (1996) *Reactive ring-opened aldehyde metabolites in benzene hematotoxicity.* Environ Health Perspect 104 (suppl 6):1195-1199.
91. Wong LJ, Alper OM, Hsu E, Woo MS, Margeits MF. *The necessity of complete CFTR mutational analysis of an infertile couple before in vitro fertilization.* Fertil Steril, 2004; 82, 947-9.
92. WR e Roberts JW 1998 – *Every day exposure to toxic pollutants,* Scientific American, 278, 86-91 Febbraio 1998.
93. [www.dada.net](http://www.dada.net)
94. [www.fumo.it](http://www.fumo.it)
95. [www.Wikipedia.org/wiki/Benzene.](http://www.Wikipedia.org/wiki/Benzene)
96. Yardley-Jones, A; Anderson, D; Lovell, DP; et al. (1990) *Analysis of chromosomal aberrations in workers exposed to low level benzene.* Br J Ind Med 47:48-51.
97. Yin, S; Li, G; Hu, Y; et al. (1987a) *Symptoms and signs of workers exposed to benzene, toluene or the combination.* Ind Health 25:113-130.
98. Yu, R; Weisel, CP. (1998) *Measurement of benzene in human breath associated with an environmental exposure.* J Expos Anal Environ Epidemiol 6:261-277.

