

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II



SCUOLA POLITECNICA E DELLE SCIENZE DI BASE, AREA DIDATTICA
SCIENZE MATEMATICHE, FISICHE E NATURALI

TESI DI DOTTORATO

DOTTORATO DI RICERCA IN BIOLOGIA AVANZATA

XXVI CICLO

***EFFETTI DEL NONILFENOLO SU LINEE CELLULARI DI
PROSTATA UMANA: PATHWAY MOLECOLARI COINVOLTI***

COORDINATORE DEL CORSO

Ch. Mo Prof.

LUCIANO GAUDIO

TUTOR: :

Ch. Ma Prof. ssa

VINCENZA LAFORGIA

DOTTORANDO:

Dott.

MAURIZIO FORTE

COTUTOR:

Ch. Ma Prof. ssa

MARIA DE FALCO

ANNO ACCADEMICO 2012-2013

ABSTRACT

Nonylphenol (NP) is an industrial chemical with estrogenic activity both *in vivo* and *in vitro*; estrogens play a critical role in the development of prostate and may be the cause of some pathological states, including cancer. Despite this relationship, little is known about molecular pathways involved on the action of estrogens and xenoestrogens in prostate models. Thus, in this study we examined the effects of NP and 17 β -estradiol (E2) in human non tumorigenic prostate cells (PNT1A) and in adenocarcinoma prostate cells (LNCaP). In particular way, we studied their effects on cellular proliferation and their interactions with estrogen receptors (ERs: ER α and ER β). In LNCaP cells, we also analyzed the expression of cyclin D1, a cell cycle key regulator involved in prostate carcinogenesis, and non genomic responses as cAMP and Ca⁺⁺ levels. Furthermore, the treatment was performed also in presence of selective estrogen antagonist ICI 182,780 (ICI). We found that NP affects cell proliferation in a cell-specific manner: dose- dependent and non- monotonic way for PNT1A and LNCaP, respectively. Interestingly, in LNCaP the most notable effect was reached at low NP concentration (10⁻¹⁰ M). Immunofluorescence and western blot analyses revealed that NP promotes a nuclear localization of ER α , and not ER β . However, this action was more slow compared to E2. Co-exposure with ICI annulled all the effects observed after the treatment. In LNCaP, real time experiments showed that cyclin D1 expression was lightly up-regulated after treatment. ELISA and spectrofluorimetric assays also revealed an increase in c-AMP and Ca⁺⁺ levels, respectively. These results confirm the estrogenic activity of NP and suggest that endocrine disrupting chemicals (EDCs) can interfere with molecular pathways involved in prostate growth through ER α . Moreover, non genomic responses suggest alternative ways of action for xenoestrogenic molecules.

Key words: xenoestrogens, prostate cells, nonylphenol

RIASSUNTO

Il nonilfenolo (NP) è una molecola di origine industriale con attività estrogenica dimostrata sia *in vivo* che *in vitro*; gli estrogeni giocano un ruolo critico nello sviluppo della prostata e potrebbero essere la causa di alcuni stati patologici, cancro incluso. Nonostante questa relazione, sono ancora poco chiari i pathway molecolari coinvolti nell'azione degli estrogeni e xenoestrogeni su modelli di prostata. Quindi, in questo studio abbiamo esaminato gli effetti del NP e del 17 β - estradiolo (E2) su linee cellulari di prostata umana non tumorali (PNT1A) e di adenocarcinoma prostatico (LNCaP). Nello specifico, abbiamo studiato i loro effetti sulla proliferazione cellulare e la loro interazione con i recettori degli estrogeni (ERs: ER α e ER β). Nelle LNCaP, è stata valutata anche l'espressione della ciclina D1, un regolatore del ciclo cellulare coinvolto nella carcinogenesi della prostata, e il coinvolgimento di risposte non genomiche, come la variazione dei livelli di AMP ciclico e di Ca⁺⁺ intracellulare. Inoltre, il trattamento è stato effettuato anche in presenza dell'inibitore selettivo per gli estrogeni ICI 182,780 (ICI). Abbiamo osservato che il NP influenza la proliferazione cellulare in maniera cellulo-specifico: di tipo dose-dipendente per le PNT1A e di tipo non monotonic per le LNCaP. Interessante è che nelle LNCaP l'effetto più evidente si è avuto ad una concentrazione notevolmente bassa di NP (10⁻¹⁰ M). Le analisi di immunofluorescenza e di western blot mostrano che il NP promuove una traslocazione nucleare di ER α e non di ER β . Tuttavia, questo avviene in maniera più lenta rispetto all'E2. La co-esposizione con ICI annulla tutti gli effetti osservati dopo il trattamento. Nelle LNCaP, gli esperimenti di Real Time PCR mostrano una lieve up-regolazione della ciclina D1. I saggi ELISA e spettrofluorimetrici rivelano anche un aumento dei livelli di cAMP e di Ca⁺⁺, rispettivamente. Questi risultati confermano l'attività estrogenica del NP e suggeriscono che i distruttori endocrini (EDCs) possono interferire con i pathway molecolari coinvolti nella crescita della prostata. Inoltre, le risposte non genomiche osservate suggeriscono modalità alternative di azione per gli xenoestrogeni.

Parole chiave: xenoestrogeni, prostata, nonilfenolo.

INDICE

Introduzione	6
CAPITOLO I.....	7
DISTRUTTORI ENDOCRINI (EDCs).....	7
1.1 Definizioni e aspetti generali	7
1.2 Categorie di EDCs	11
1.3 Distribuzione ambientale degli EDCs.....	15
1.4 Esposizione degli uomini agli EDCs.....	16
CAPITOLO II.....	18
EFFETTI DEGLI EDCs.....	18
2.1 EDCs e sistema riproduttivo femminile e maschile	18
2.1.1. Sistema riproduttivo femminile	18
2.1.2. Sistema riproduttivo maschile.....	20
2.2 EDCs e cancro collegato agli ormoni.....	21
2.2.1. Cancro al seno	22
2.2.2. Cancro all'endometrio	23
2.2.3. Cancro all'ovaio	23
2.2.4. Cancro alla tiroide.....	23
2.3 EDCs e altri disordini.....	24
2.3.1. Disfunzioni della tiroide.....	24
2.3.2. Disordini metabolici.....	25
2.3.3. EDCs e sviluppo nervoso	26
2.3.4. Disfunzioni della ghiandola adrenale	27
2.3.5. EDCs e sviluppo osseo	28
2.3.6. EDCs e malattie del sistema immunitario.....	29
CAPITOLO III.....	30
IL NONILFENOLO	30
3.1 I fenoli	30
3.2 Il bisfenolo A	30
3.3 Il nonilfenolo.....	32
3.3.1. Storia e utilizzo.....	32
3.3.2. Struttura chimica.....	33
3.3.3. Fonti ed esposizione umana	34
3.4 Effetti del nonilfenolo	37
3.4.1. Effetti in vivo del nonilfenolo	38

3.4.2. Evidenze epidemiologiche.....	42
3.4.3. Effetti in vitro del nonilfenolo	43
CAPITOLO IV.....	47
GLI ESTROGENI.....	47
4.1 Gli ormoni steroidei	47
4.2 Pathway molecolari degli estrogeni	49
4.2.1. Meccanismo di azione “classico”.....	50
4.2.3. Meccanismo di azione “non classico”.....	51
CAPITOLO V	53
PROSTATA ED EDCs	53
5.1 Breve cenni di anatomia e istologia della prostata.....	53
5.2 Cancro alla prostata.....	55
5.2.1. Ruolo degli estrogeni su cancro e patologie prostatiche.....	56
5.2.1. Evidenze epidemiologiche tra EDCs e cancro alla prostata	58
5.2.2. Studi in vivo e in vitro su relazione tra EDCs e cancro alla prostata	59
CAPITOLO VI.....	61
SCOPO DELLA RICERCA.....	61
CAPITOLO VII	63
MATERIALI E METODI.....	63
7.1 Colture cellulari.....	63
7.2 Sostanze chimiche.....	63
7.3 Saggi MTT	64
7.4 Immunofluorescenze.....	64
7.5 Estrazione proteica.....	65
7.6 SDS-PAGE e western blot per ER α , ER β	66
7.7 Real Time PCR (qPCR).....	67
7.8 Misure di Ca ²⁺ intracellulare	68
7.9 Valutazione dei livelli di AMP ciclico (c-AMP)	69
7.11 Analisi statistica dei dati	69
CAPITOLO VIII.....	70
RISULTATI.....	70
8.1 Trattamento PNT1A.....	70
8.1.1. Saggi MTT.....	70
8.1.2. Immunofluorescenza per ER α	70
8.1.3. Immunofluorescenza per ER β	71
8.1.4. Western blot per ER α e per ER β	71

8.2 Trattamento LNCaP	81
8.2.1. Saggi MTT.....	81
8.2.2. Immunofluorescenza per ER α	81
8.2.3. Immunofluorescenza per ER β	82
8.2.4. Espressione della ciclina D1.....	82
8.2.5. Livelli di Calcio (Ca ²⁺) e di AMP ciclico (cAMP).....	82
CAPITOLO IX.....	92
DISCUSSIONI.....	92
Bibliografia	95
RINGRAZIAMENTI:	113

Introduzione

Negli anni recenti è cresciuto sempre di più l'interesse della comunità scientifica, delle associazioni ambientaliste e della politica sulle tematiche di inquinamento, tutela ambientale e salvaguardia della salute degli organismi viventi. E' evidente che la sfrenata industrializzazione, cieca sui rischi e sui danni in grado di provocare all'intero pianeta, in quanto maggiormente preoccupata da interessi di tipo capitalistico-economico, se da un lato ha portato enormi benefici per le popolazioni (tecnologia, trasporti, comfort), dall'altro ha introdotto nell'ambiente molteplici sostanze chimiche dannose. Il risultato di tutto questo si è tradotto in modo particolare nell'alterazione degli ecosistemi, con danni agli organismi acquatici e terrestri, e nell'aumento delle patologie, soprattutto quelle a carico degli apparati riproduttivi maschili e femminili. Il libro "Our Stolen Future - How we are threatening our fertility, intelligence and survival" (Colborn, 1996) può essere considerato come il prototipo del reale interesse del mondo intero ad una particolare classe di inquinanti ambientali, quella dei Distruttori Endocrini (EDCs – Endocrine Disrupting Chemicals). Gli autori, infatti, sono stati i primi a raccogliere in un unico testo i risultati di una serie di osservazioni e di esperimenti, focalizzandosi principalmente sulle molecole in grado di interferire con i messaggi ormonali coinvolti nella crescita e nello sviluppo del feto, oppure sottolineando i casi reali di esposizione agli EDCs ed i danni da essi causati, come ad esempio quelli dell'ormone sintetico dietilstibestolo (DES), al quale sono state esposte milioni di donne negli anni '50, '60 e '70 del secolo scorso, perché utilizzato per portare a termine gravidanze difficili, prevenendo aborti. A distanza di quasi venti anni dalla pubblicazione del libro, sono aumentate in modo vertiginoso le molecole classificabili come EDCs, che oramai ci circondano e ci "accompagnano" in ogni gesto quotidiano, ad esempio durante un semplice shampoo o durante un pasto; tuttavia, i ricercatori sono sempre più impegnati, attraverso studi epidemiologici, esperimenti su modelli animali e cellulari, a caratterizzare gli effetti biologici e le modalità di azione dei distruttori endocrini, allo scopo di valutare quali sono i rischi reali, in termine di esposizione, e le patologie in grado di provocare sull'uomo.

CAPITOLO I

DISTRUTTORI ENDOCRINI (EDCs)

1.1 Definizioni e aspetti generali

La definizione attribuita al termine Distruttore Endocrino (EDCs – Endocrine disrupting chemicals) ha subito continui aggiornamenti nel corso degli anni, in modo particolare quando è stato caratterizzato ed è emerso un aspetto nuovo di tali sostanze che era assente nelle definizioni precedenti. Nel 1997, in un rapporto speciale, l'EPA (Environmental Protection Agency) definisce un EDC come *“...una qualsiasi sostanza esogena che è in grado di interferire con la produzione, il rilascio, il trasporto, il metabolismo, il legame, l'azione o l'eliminazione degli ormoni naturali di un organismo, responsabili del mantenimento dell'omeostasi e della regolazione dei processi di sviluppo”* (Menditto et al., 1997). Tale definizione è stata poi modificata e ampliata nel documento dell'IPCS (International Programme on Chemical Safety) redatto nel 2002 dalla WHO (World Health Organization), in collaborazione con l'UNEP (United Nations Environment Programme) e con l'ILO (International Labour Organization) che definisce un distruttore endocrino come *“...una sostanza esogena o una miscela di sostanze che altera le funzioni del sistema endocrino causando come conseguenza effetti avversi sulla salute di un organismo intatto, o nella sua progenie o nelle sub – popolazioni”*. Nello stesso documento, è stata data la definizione anche di sostanza considerata come potenziale distruttore endocrino e cioè *“...una sostanza esogena o una miscela di sostanze che potrebbero essere collegate a distruzione endocrina in un organismo intatto, nella sua progenie o nelle sub-popolazioni”* (IPCS, 2002). Queste definizioni, senza subire modifiche, sono state usate anche nell'ultimo documento della WHO e UNEP del 2012, che rappresenta un update di quello del 2002 sul tema dei distruttori endocrini (State of Science of Endocrine Disrupting Chemicals, 2012). Spesso, come avviene in Italia, si utilizza anche il termine *“interferente endocrino”* come sinonimo di EDC, di conseguenza in questo testo i termini distruttori endocrini (EDCs) e interferenti endocrini (IE) verranno impiegati nella

stessa maniera. Risultano evidenti, da queste definizioni, gli aspetti generali degli EDCs, e cioè che si tratta di molecole in grado di interferire con l'azione degli ormoni, causando effetti avversi sulla salute dell'uomo e delle altre specie. I sistemi fisiologici influenzati dalla "distruzione" sono molteplici ed includono tutti i sistemi ormonali, da quelli che interessano lo sviluppo e la funzione riproduttiva a quelli che regolano il metabolismo. La maggioranza degli studi sui distruttori endocrini riguarda principalmente le molecole che interferiscono con gli ormoni tiroidei e gli ormoni sessuali (estrogeni ed androgeni); tuttavia, un crescente numero di studi indica che diversi EDCs possono interferire con altri sistemi endocrini, ad esempio possono essere collegati allo sviluppo dell'obesità, interferendo con i meccanismi di sensibilità all'insulina e di tolleranza al glucosio (Casals – Casals e Desvergne, 2011). Per meglio comprendere le modalità di azione degli EDCs, è importante ricordare alcune caratteristiche della segnalazione ormonale endogena; gli ormoni interagiscono con due diversi tipi di recettori (**Fig. 1**): recettori nucleari (es. ormoni steroidei e ormoni tiroidei), dove il complesso recettore – ormone va a legarsi a specifiche sequenze sul DNA andando a regolare il processo della trascrizione genica, con conseguente formazione di nuove proteine, e recettori di membrana (es. recettore per l'insulina), dove gli effetti biologici sono innescati da un sistema di secondi messaggeri. In entrambe le modalità, sono coinvolte numerose proteine coregolatrici. Per quanto concerne le concentrazioni alle quali gli ormoni esplicano i loro effetti biologici, si parla di un'azione a bassa concentrazione, con una risposta di tipo sigmoidale e di un'azione non lineare di tipo non-monotonica (Li et al., 2007); quest'ultima può presentare un andamento a forma di U – dove si osserva la massima risposta a basse e ad alte concentrazioni – e un andamento a forma di U invertita – con la massima risposta osservata a concentrazioni intermedie. La risposta di tipo non monotonica spesso è il risultato di una down regolazione recettoriale. Quando gli ormoni sono presenti in alte quantità, si legano ai loro recettori causando una down regolazione del numero dei loro stessi recettori (State of the Science of Endocrine disrupting Chemicals, 2012). Oltre a questo meccanismo, la risposta di tipo non monotonica può essere causata da un aumento di tossicità dell'ormone, quando presente ad alte dosi. Inoltre, gli ormoni possono presentare delle differenti affinità recettoriali quando presenti ad alte dosi o a basse dosi. Ad esempio, è stato visto che a basse dosi gli estrogeni si legano

esclusivamente ai recettori degli estrogeni, mentre ad alte concentrazioni possono interagire debolmente con altri recettori ormonali, come quelli per gli androgeni o per gli ormoni tiroidei (State of the Science of Endocrine disrupting Chemicals, 2012).

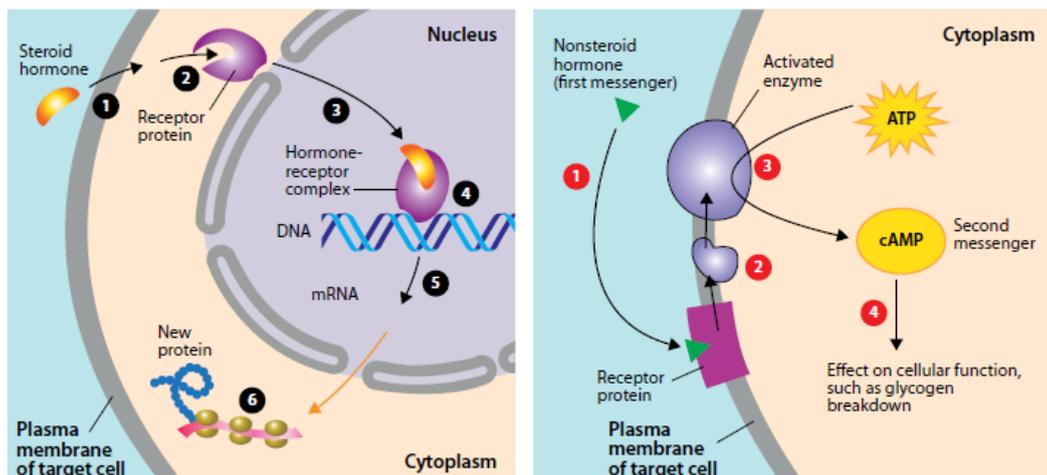


Fig. 1 (State of the Science of Endocrine disrupting Chemical, 2012) Gli ormoni endogeni possono agire attraverso recettori presenti nel citoplasma e nel nucleo (sinistra), andando ad attivare la trascrizione genica oppure mediante recettori di membrana (destra), che evocano risposte mediante la formazione di secondi messaggeri.

Sono due i meccanismi con i quali una sostanza chimica esogena può interferire con la segnalazione ormonale: un'azione diretta sul recettore dell'ormone endogeno (agonismo o antagonismo), sia nucleare che di membrana, oppure un'azione su una proteina che controlla il destino di un ormone sulle sue normali cellule bersaglio, durante la sua sintesi (es. aromatasi), durante il suo trasporto (es. proteina carrier del cortisolo) o durante la sua degradazione. I recettori ormonali presentano un'alta affinità per i loro ligandi naturali che è notevolmente maggiore a quella che possiedono per i distruttori endocrini. Tuttavia, è importante non confondere l'*affinità* (abilità di legare) per il recettore con la *potenza* (abilità di causare effetti) di azione (Ruenitz et al., 1996). Su questo punto, è ormai accettato dalla maggior parte degli autori, che per molteplici EDCs è impossibile stabilire una *threshold* (soglia) alla quale si manifesta un effetto biologico massimo e che spesso questo effetto presenta, allo stesso modo degli ormoni endogeni, una dose-risposta non lineare e non monotonica; sono riportati, infatti, più di 50 esempi per il Bisfenolo A (Richter et al., 2007; Wetherill et al., 2007; Cabaton et al., 2011) e

studi su circa 60 tipi di distruttori endocrini che presentano questa caratteristica (Vandenberg et al., 2012). Tuttavia, altri autori negano l'assenza di una *threshold* per gli EDCs e sono contrari ad alcuni principi emersi nel documento redatto dalla WHO e UNEP nel 2012 (Dietrich et al., 2013), quindi il dibattito scientifico sul tema “dose – risposta” rimane ancora aperto (Bergman et al., 2013). Gli EDCs possono influenzare tutte le fasi della vita di un organismo, allo stesso modo di come fa un ormone endogeno, interagendo e attivando i suoi stessi pathway molecolari. Se presente durante le fasi di sviluppo di un individuo, ad esempio, il distruttore endocrino interferirà con le fasi di differenziamento cellulare, influenzando di conseguenza lo sviluppo di un tessuto o di un organo, con effetti che potranno manifestarsi nell'individuo adulto. Sono proprio la fase gestazionale e i primi anni di vita di un organismo ad essere i periodi critici nei quali l'esposizione agli interferenti endocrini andrebbe evitata e ai quali il mondo scientifico rivolge le sue maggiori attenzioni. Un'altra caratteristica fondamentale degli EDCs è l'effetto che essi possono provocare a basse concentrazioni e a tal proposito in **Tabella 1** sono riportati alcuni esempi di distruttori endocrini per i quali è certa questa modalità di azione, attraverso studi condotti su diversi modelli animali.

Tabella 1 (Vandenberg et al., 2012)

Insetticidi/ fungicidi	Industriali/Generali
Chlordane	Arachlor 1221
Chlorothalonil	Bisphenol A/Genistein/DES
Chlorpyrifos	Dioxin
DDT	4-methylbenzylidene
Heptachlor	Methylparaben
Hexachlorobenzene	Nicotin
Maneb	Nonylphenol
Parathion	Octyphenol
Methoxychlor	Sodium Fluoride
Tributyltin oxide	PBDEs/PCBs
Vinclozolin	Perchlorate

Esempi di EDC i che provocano effetti a basse concentrazioni

Inoltre, gli EDCs presentano anche il cosiddetto “*effetto cocktail*”; molte sostanze, infatti, esplicano i loro effetti biologici soltanto se addizionate ad altre sostanze oppure gli effetti sono spesso di tipo additivo; in uno studio condotto su pesci, è stato visto, ad esempio, che una miscela di estrogeni e xenoestrogeni induce un aumento di vitellogenina che può essere predetto analizzando gli effetti delle sostanze prese singolarmente (Brian et al., 2005); allo stesso modo, tali effetti additivi sono stati riportati, in ratti, per miscele di antiandrogeni e di mimetici degli ormoni tiroidei, usati a basse concentrazioni (Christiansen et al., 2009; Crofton et al., 2005). Un altro aspetto emergente degli EDCs è che sono in grado di causare alterazioni epigenetiche, che possono manifestarsi in modo trans-generazionale. Ad esempio, è stato visto che un pesticida anti-androgenico, la vinczolina, è in grado di influenzare lo sviluppo del testicolo in tre generazioni successive di topi, causate da alterazioni epigenetiche trasmesse da una generazione all'altra attraverso le cellule germinali (Skinner e Guerrero – Bosagna, 2009).

1.2 Categorie di EDCs

Gli EDCs rappresentano un insieme eterogeneo di sostanze e possono essere classificati in diversi modi. Tali classificazioni, sono state pubblicate su differenti e autorevoli riviste; gli EDCs possono essere classificati esclusivamente in antropogenici e non, oppure suddivisi in base alla struttura chimica oppure in base all'origine e alle applicazioni (US EPA 2009; 2010; Kortenkamp et al., 2011; Ryu, Yoon e Oh, 2011; McKinlay et al., 2008; EEA, 2012; Pongratz e Vikström Bergander, 2011; ChemSec 2011; TEDX, 2011; Lintelmann et al., 2003). In **Tabella 2** è riportata la classificazione degli EDCs secondo il documento del 2012 della WHO e UNEP (State of the Science of Endocrine disrupting Chemicals, 2012) menzionato in precedenza; tale classificazione, suddivide i distruttori endocrini in quattro grandi classi, che a loro volta racchiudono undici sottoclassi, basandosi principalmente sulle caratteristiche chimico fisiche di tali composti e sulle loro aree e origini di applicazione. Da tener presente che molti degli effetti di numerosi EDCs sono attribuibili anche ai loro metaboliti, che possono di conseguenza essere o meno inclusi nelle diverse classificazioni. Alla prima classe

appartengono le sostanze chimiche alogenate persistenti nell'ambiente e con alto potenziale di bioaccumulazione, il cui impiego è stato bandito in molte nazioni. Tali sostanze si ritrovano in alte concentrazioni soprattutto nei tessuti animali ricchi di grasso; il diclorodifeniltricloroetano (DDT) e i bifenili policlorinati (PCB) sono gli esempi più illustri appartenenti a questa categoria e usati, rispettivamente, come insetticidi e sigillanti per costruzioni (Stemmler e Lammel, 2009; Hansen e Robertson, 2001). Nella seconda classe rientrano le sostanze meno persistenti e meno bioaccumulabili delle precedenti, principalmente di origine industriale e utilizzati per differenti fini, ad esempio come pesticidi oppure per la produzione di plastica (bottiglie, giocattoli, utensili, prodotti per uso cosmetico, sacchetti per la spazzatura), allo scopo di migliorarne la flessibilità e la lavorabilità. Tale classe può essere ulteriormente suddivisa in quattro sottoclassi: plastificanti e additivi di materiali (es. Di-2-etilexilftalato DEHP), composti chimici policiclici aromatici (es. benzopirene), composti fenolici alogenati (es. triclosan) e composti fenolici non alogenati (es. bisfenolo A, octilfenolo, nonilfenolo) (Lyche et al., 2009; Dann e Hontela, 2011; Kang, Aasi e Katayama, 2007). La terza classe di EDCs comprende, invece, i pesticidi comunemente in uso (es. atrazina, vinclozolina) (Giddings et al., 2005), caratterizzati da una breve emivita nell'ambiente, che non permette loro di bioaccumularsi nei sedimenti e nell'ambiente, i farmaci, utilizzati come contraccettivi (es. levonorgestrel) (Besse e Garric, 2009) e nelle terapie ormonali (es. estrogeni sintetici: dietilstibestrol, etinilestradiolo), che si ritrovano nell'ambiente in quanto non completamente rimossi dai trattamenti dei liquami (Monteiro e Boxall, 2010) e gli ingredienti per prodotti per la cura personale (metil-ciclo-silossano) (Genualdi et al., 2011). Nell'ultima classe rientrano metalli e sostanze chimiche organo-metalliche (es. cadmio, metilmercurio) (Pacyna et al., 2010), ritrovate nelle rocce e nel suolo, oppure utilizzati in prodotti commerciali come in termometri e in batterie, ormoni naturali (17β -estradiolo; testosterone), escreti dagli animali, e fitoestrogeni (es. genistein), contenuti in legumi e cereali (Thompson et al., 2006). Aldilà delle classificazioni, alcune caratteristiche strutturali degli EDCs possono fornire degli indizi sull'attività esplicata in un organismo; ad esempio, i composti ad attività estrogenica, chiamati xenoestrogeni, presentano spesso un anello fenolico, simile agli estrogeni endogeni e sono privi degli alogeni (**Fig. 2**). Allo stesso modo, gli EDCs con attività tiroidogenica, presentano degli anelli fenolici con atomi di

bromo o di cloro che rende le strutture simili all'ormone endogeno tiroxina (T4)
(Fig. 3)

Tabella 2 Classificazione degli EDC e relativi esempi

<p><u>Persistent and bioaccumulative halogenated chemicals</u></p> <p>Persistent Organic Pollutants (POPs) (Stockholm Convention) [PCDDs/PCDFs, PCBs, HCB, PFOS, PBDEs, PBBs, Chlordane, Mirex, Toxaphene, DDT/DDE, Lindane, Endosulfan]</p> <p>Other Persistent and Bioaccumulative Chemicals [HBCDD, SCCP, PFCAs (e.g. PFOA), Octachlorostyrene, PCB methyl sulfones]</p>
<p><u>Less persistent and less bioaccumulative chemicals</u></p> <p>Plasticizers and Other Additives in Materials and Goods [Phthalate esters (DEHP, BBP, DBP, DiNP), Triphenyl phosphate, Bis(2-ethylhexyl) adipate, n-Butylbenzene, Triclocarban, Butylated hydroxyanisole]</p> <p>Polycyclic Aromatic Chemicals (PACs) including PAHs [Benzo(a)pyrene, Anthracene Benzo(a)anthracene, Pyrene]</p> <p>Halogenated Phenolic Chemicals (HPCs) [2,4-Dichlorophenol, Pentachlorophenol, Hydroxy-PCBs, Hydroxy-PBDEs, Tetrabromobisphenol A, 2,4,6-Tribromophenol, Triclosan]</p> <p>Non-halogenated Phenolic Chemicals (Non-HPCs) [Bisphenol A, Bisphenol F, Bisphenol S, Nonylphenol, Octylphenol, Resorcinol]</p>
<p><u>Pesticides, pharmaceuticals and personal care product ingredients</u></p> <p>Current-use Pesticides [2,4-D, Atrazine, Carbaryl, Malathion, Mancozeb, Vinclozolin, Prochloraz, Procymidone, Chlorpyrifos, Fenitrothion, Linuron]</p> <p>Pharmaceuticals, Growth Promoters, and Personal Care Product Ingredients [Endocrine active (Diethylstilbestrol, Ethinylestradiol, Tamoxifen, Levonorgestrel), Selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs; e.g. Fluoxetine), Flutamide, Octylmethoxycinnamate, Parabens, Cyclic methyl siloxanes (D4, D5, D6), Galaxolide, 3-Benzylidene camphor]</p>
<p><u>Other chemicals</u></p> <p>Metals and Organometallic Chemicals [Arsenic, Cadmium, Lead, Mercury, Methylmercury Tributyltin, Triphenyltin]</p> <p>Natural Hormones [17β-Estradiol, Estrone, Testosterone]</p> <p>Phytoestrogens [Isoflavones (e.g. Genistein, Daidzein), Coumestans (e.g. Coumestrol), Mycotoxins (e.g. Zearalenone), Prenylflavonoids (e.g. 8-prenylnaringenin)]</p>

(Classificazione secondo State of the Science of Endocrine disrupting Chemical, 2012)

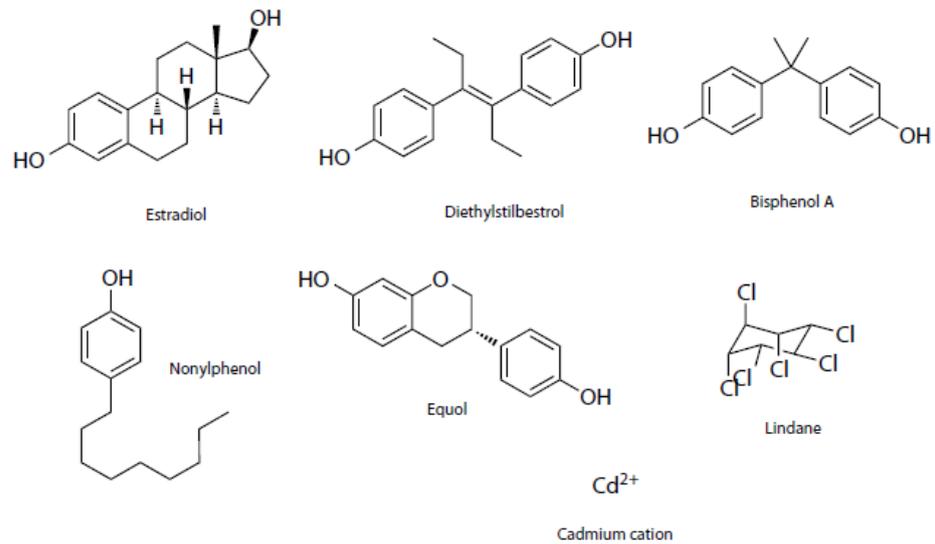


Fig. 2 Strutture chimiche di xenoestrogeni più diffusi. Notare la presenza di un gruppo fenolico simile a quello dell'ormone naturale 17 β -estradiolo (State of the Science of Endocrine disrupting Chemical, 2012).

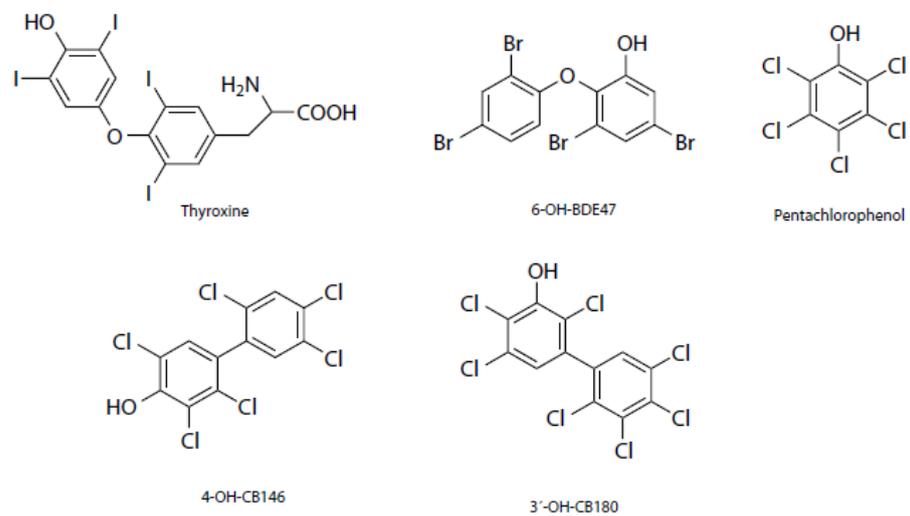


Fig. 3 EDCs con struttura chimica simile agli ormoni tiroidei. Si noti la presenza di atomi di cloro e di bromo e la somiglianza strutturale con l'ormone endogeno tiroxina (State of the Science of Endocrine disrupting Chemical, 2012).

1.3 Distribuzione ambientale degli EDCs

Gli EDCs si accumulano nell'ambiente durante la loro produzione, il loro uso e il loro smaltimento. Le acque degli effluenti fognari, che possono derivare dalle case, dalle industrie e dalle compagnie farmaceutiche sono considerate una delle principali fonti di EDCs. Sono stati ritrovati, infatti, molteplici degli EDCs sopra elencati, con concentrazioni che variano da ng/L a $\mu\text{g/L}$ (Monteiro e Boxall, 2010); il bisfenolo A, ad esempio, è presente nelle acque reflue municipali ed industriali. Esso, infatti, non è completamente smaltito dai trattamenti delle acque (37-94%) e si ritrova negli effluenti e nei fanghi di depurazione (Kang e Katayama, 2007), nel suolo e nelle acque superficiali (più di $20\mu\text{g/L}$), nel percolato delle discariche e nei sedimenti fluviali (più di $1,63\text{ mg/Kg}$ di peso secco) (Focazio et al., 2008); analogamente, il levonorgestrel è stato ritrovato negli effluenti municipali a concentrazioni di ng/L (Fick et al., 2010). Il deflusso a causa di intense piogge dai campi agricoli può essere considerato come un'altra sorgente di EDCs (pesticidi, ormoni, farmaci) responsabile dell'accumulo di inquinanti nell'ambiente acquatico. I pesticidi utilizzati per scopi agricoli, vengono infatti ritrovati nei torrenti e nel suolo di queste regioni, soprattutto dopo intense precipitazioni. Allo stesso modo, le aree urbane rappresentano una grande fonte di emissione nell'ambiente di vari EDCs, come i PCB (policlorobifenili) contenuto in vernici e colle, il PCDD (dovresti mettere il significato) emesso dagli inceneritori municipali oppure il PAH (dovresti mettere il significato) derivante dalla combustione di combustibili fossili dei veicoli. Molti distruttori endocrini sono trasportati in ambienti distanti attraverso l'aria o le correnti acquatiche. Ad esempio, alte concentrazioni di isomeri dell'HCH (esaclorocicloesano) sono stati ritrovati nell'oceano artico, a distanze notevoli da dove essi sono originati (deWit et al., 2004). Il percorso atmosferico è particolarmente importante per pesticidi, PCB, DDT, mentre le correnti oceaniche sembrano essere le principali vie attraverso i quali i perfluorooottano sulfonati (PFOS) e gli acidi perfluorooottano (PFOA) si distribuiscono nell'ambiente (Armitage et al., 2009).

1.4 Esposizione degli uomini agli EDCs

L'uomo è esposto agli EDCs principalmente attraverso il cibo e l'acqua potabile; tuttavia, anche la polvere degli ambienti interni come le case o gli uffici rappresenta un'importante fonte di esposizione. Allo stesso modo, la spazzatura può essere considerata una sorgente di esposizione. Un distruttore endocrino può quindi essere introdotto in un organismo attraverso l'inalazione di aria e di particelle, il consumo di cibo e di acqua contaminati e attraverso il contatto dermico, come ad esempio si verifica per i prodotti cosmetici. Ovviamente, l'esposizione umana varia a seconda dello stile di vita dell'individuo, del suo lavoro e dal posto in cui esso vive. Per i metalli e per gli idrocarburi policiclici aromatici, il cibo e l'acqua rappresentano le maggiori fonti di esposizione per gli adulti; per i bambini, invece, il portarsi le mani alla bocca e il giocare sul pavimento sono considerati come un forte rischio di esposizione agli EDCs (es. ritardanti di fiamma); inoltre, essi sono ancora più esposti a sostanze chimiche dannose dal momento che, rispetto agli adulti, presentano un'unica dieta mangiando costantemente gli stessi cibi (che potrebbero risultare contaminati) (WHO, 2007). L'esposizione agli EDCs con anello fenolico alogenato e non, avviene attraverso l'ingestione di cibo nei quali queste sostanze vengono aggiunte come antiossidanti, ad esempio l'idrossianisole butilato (BHA) o attraverso il cibo contaminato con i fenoli (bisfenolo A, PCP). Tuttavia, l'uptake dei fenoli può avvenire anche attraverso la pelle, quando essi sono presenti nei prodotti per la cura personale. Ancora, il consumo di cibi grassi è un ulteriore fonte di esposizione agli EDCs altamente persistenti e bioaccumulabili nei tessuti animali. Da sottolineare che esistono categorie di persone a rischio, come ad esempio gli agricoltori, che inalano o assorbono attraverso la pelle i pesticidi durante le loro applicazioni. Per quanto riguarda l'esposizione interna degli uomini agli EDCs, è stata riscontrata la presenza di alcuni di essi nel tessuto adiposo e nei muscoli, di altri nel sangue, nei polmoni e nelle ghiandole surrenali (Letcher, Klasson – Wehler e Bergman, 2000). Livelli di EDCs sono stati ritrovati anche nel sangue di cordone ombelicale, sangue materno e latte materno (Needham et al., 2011; Karmann et al., 2007; Thomsen et al., 2010), e per alcuni di essi (fenoli non alogenati) è stato visto che sono in grado di attraversare efficientemente la

placenta (Wan et al., 2010). Le vie di escrezione degli EDCs dipendono dal loro accumulo e dalla loro persistenza nei tessuti. I meno persistenti e i meno bioaccumulabili vengono rapidamente metabolizzati nel fegato ed ecreti con le urine e feci (Preau et al., 2010). Il passaggio di EDCs dalla mamma al neonato attraverso il latte materno può essere considerata un'altra via di escrezione degli EDCs dall'organismo.

CAPITOLO II

EFFETTI DEGLI EDCs

In questo capitolo verranno analizzati gli effetti di vari distruttori endocrini sul sistema riproduttivo e su altri organi. La categoria a cui appartiene il nonilfenolo e gli effetti dei distruttori endocrini sulla prostata (cancro incluso) verranno trattati in maggior dettaglio in capitoli separati.

2.1 EDCs e sistema riproduttivo femminile e maschile

2.1.1. Sistema riproduttivo femminile

Gli EDCs sono in grado di agire sia sul sistema riproduttivo maschile sia su quello femminile. E' stato dimostrato, attraverso studi epidemiologici che il dietilstibestolo (DES), somministrato alle donne in gravidanza dagli anni '50 e '70 del secolo scorso, per prevenire aborti e complicazioni, ha causato nelle figlie esposte *in utero* alterazioni nei geni responsabili del differenziamento del tratto riproduttivo (Pavlova et al., 2004), patologie benigne al sistema riproduttivo, adenocarcinomi della vagina e della cervice uterina, infertilità (Schrager e Potter, 2004), endometriosi (Missmer et al., 2004) e cancro al seno (Palmer et al., 2006); tuttavia, altri effetti sono stati osservati anche nei figli maschi esposti *in utero* (cisti epididimali, anomalie all'uretra e ai testicoli) (Titus – Ernstoff et al., 2010). Tali osservazioni sugli uomini, sono state poi confermate su modelli animali (Cook et al., 2005; Blatt et al., 2003). Diversi studi hanno dimostrato che alcuni EDCs (diossine, pesticidi, estrogeni sintetici) sono causa di pubertà precoce in ratti (Navarro et al., 2009); anche negli uomini esiste una relazione tra EDCs e pubertà precoce; ad esempio, in molte ragazze affette da pubertà precoce, provenienti soprattutto da paesi industrializzati sono state ritrovati, in campioni di sangue e di urine, alti livelli di alcuni distruttori endocrini ad azione xenoestrogenica (Krstevska- Konstantinova et al., 2001; Henley et al., 2007); si è visto ad esempio, che i bifenili polibrominati (PBB), allo stesso modo dei pesticidi clorinati (DTT), anticipano la comparsa del menarca e lo sviluppo dei peli pubici

(Vasiliu, Muttineni e Karmans, 2004; Blanck et al., 2000). Gli EDCs possono anche interferire con la fertilità; a tal proposito, somministrando atrazina ai ratti si osserva un' interruzione del ciclo degli estrogeni mentre alcuni pesticidi causano una diminuzione del numero di follicoli in salute, facendo aumentare quelli atrofici (Rubi et al., 2001; Nikaido et al., 2004); in mammiferi di laboratorio, alcuni EDCs, come il clordecone, sono in grado di interferire con lo sviluppo del sistema genitale urinario (Silbergeld e Patrick, 2005), altri, come il cadmio, sono in grado di influenzare l'apertura vaginale (Johnson et al., 2003). Alcuni autori sottolineano che anche il ciclo mestruale può essere influenzato dall'esposizione agli interferenti endocrini; sono stati osservati cicli mestruali più corti in donne esposte al cloro-dibromo-metano, ritrovato nell'acqua potabile (Windham et al., 2003), e cicli mestruali più lunghi associati all'esposizione alle diossine (Eskenazi et al., 2007). Alcuni studi epidemiologici hanno evidenziato che l'esposizione ad alcuni EDCs può avere influenza sull'età della menopausa, con comparsa anticipata o posticipata (Farr et al., 2006; Cooper et al., 2005); sia studi epidemiologici sia esperimenti su animali, suggeriscono, invece, una relazione tra gli EDCs con la comparsa della sindrome dell'ovaio policistico (Fernandez et al., 2010; Kandaraki et al., 2011) e con l'endometriosi (Guo 2009; Cakmak e Taylor, 2010). L'effetto dei distruttori endocrini sul sistema riproduttivo femminile è stato anche studiato in altri mammiferi, in vertebrati non mammiferi e in non vertebrati; ad esempio, è stato osservato un nesso tra EDCs e il fallimento riproduttivo di alcune specie, come le foche e i delfini (Murphy et al., 2010; Alava et al., 2009); la femminilizzazione dei pesci maschi è un altro tipico esempio di contaminazione da EDCs (Tyler e Jobling, 2008; Auger et al., 2013; Krurger et al., 2013) e si ritiene abbia contribuito significativamente ai diffusi cambiamenti nello sviluppo sessuale e nella fertilità dei pesci in alcuni fiumi del Regno Unito (Jobling et al., 2002). Per quanto riguarda gli effetti osservati su organismi invertebrati, interessante è lo studio condotto da Oehlmann et al. (2000) nel quale lumache esposte al bisfenolo A presentano il fenomeno della "super-femminilizzazione", cioè la presenza di organi sessuali aggiuntivi e ghiandole sessuali accessorie e produzione aumentata di uova fuori stagione (Oehlmann et al., 2000)

2.1.2. Sistema riproduttivo maschile

Come il sistema riproduttivo femminile, anche quello maschile può essere influenzato e soggetto a patologie e anomalie a causa dell'esposizione ai distruttori endocrini, che si manifestano principalmente quando un organismo è esposto durante le fasi iniziali della propria vita. Esistono evidenze epidemiologiche che alcuni EDCs aumentano l'incidenza del rischio di cancro ai testicoli; è stato osservato, infatti, che questo rischio aumenta significativamente nei figli di donne esposte al DES durante la gravidanza (Strohsnitter et al., 2001); allo stesso modo, l'esposizione *in utero* ai distruttori endocrini altamente persistenti e bioaccumulabili è un fattore di rischio per il cancro al testicolo, sebbene non vi sia una relazione con l'esposizione post-natale (Hardell et al., 2006). Il criptorchidismo e l'ipospadia sono altre patologie collegate agli EDCs; è stato visto nei ratti che gli estrogeni causano criptorchidismo downregolando l'espressione del peptide INSL3, proteina coinvolta insieme al testosterone nel corretto posizionamento dei testicoli, che possono di conseguenza ritrovarsi nella cavità addominale (Emmen et al., 2000); negli uomini, il criptorchidismo e l'ipospadia sono collegati spesso con l'esposizione a diversi pesticidi (Damgaard et al., 2006; Rocheleau, Romitti e Dennis, 2009) o difenili polibrominati (Carmichael et al., 2010). Hosie et al. hanno ritrovato, invece, concentrazioni significative di eptacloro-eossidi e di esaclorobenzene nei tessuti adiposi di ragazzi affetti da criptorchidismo rispetto a ragazzi controllo (Hosie et al., 2000). Studi recenti, condotti su ratto, hanno dimostrato come l'assunzione di fitoestrogeni da parte della madre durante la gestazione possa essere causa di ipospadia (Carmichael et al., 2013). Anche la qualità del liquido seminale è associata all'esposizione agli EDCs (Hampl et al. 2013). E' stata analizzata la qualità del liquido seminale in ragazzi del Taiwan, le cui madri consumavano olio contaminato da policloruri bifenili durante la gravidanza osservando che gli spermatozoi presentavano una motilità ridotta e una morfologia anomala (Guo et al., 2000); gli stessi effetti sono stati osservati in adulti che consumavano lo stesso olio (Hsu et al., 2003). L'esposizione di ratti a ftalati o altre sostanze anti-androgeniche sono causa di un'ampia varietà di sintomi, come testicoli non discesi e malformazioni dei genitali esterni, malformazioni di altri organi sessuali e anomalie nella qualità del liquido seminale (Foster 2005; Foster 2006). Alcuni

EDCs sono in grado anche di alterare la distanza ano-genitale; Swan et al. (Swan et al., 2005) hanno visto che tale distanza è notevolmente ridotta nei bambini di madri con livelli urinari di ftalati alti. La somministrazione di una miscela di 12 fitoestrogeni, ad alte dosi, su ratti Sprague- Dawley in epoca prenatale ha fatto rilevare, allo stesso modo, nei ratti maschi della generazione F1, una ridotta distanza anogenitale, risultato di un'azione anti androgenica (Boberg et al., 2013). Oltre ad anomalie morfologiche e funzionali a carico degli apparati riproduttivi è stato speculato che alcuni distruttori endocrini possono influenzare anche il comportamento sessuale, andando ad agire, in modo principale, sui circuiti neuronali che sono responsabili della sua regolazione (Martini et al., 2010). Sono documentate anomalie dell'apparato riproduttivo riconducibili agli EDCs anche in altre specie animali, come negli orsi polari maschi, probabilmente dovute alle alte concentrazioni di PCB (Sonne et al., 2006), nei mammiferi marini (Murphy et al., 2010), continuamente esposti a plastificanti, oppure in vertebrati non mammiferi come gli uccelli (Hart et al., 2003). Nei pesci, come menzionato nel sottoparagrafo precedente, si assiste al fenomeno della “femminilizzazione”, con l'induzione di geni estrogeno responsivi, come la vitellogenina (VTG) oppure con l'inibizione dell'espressione di enzimi coinvolti nella biosintesi degli androgeni (CYP17, 11 beta-HSD e 17 β -idrossisteroide deidrogenasi [17 beta-HSD]) o nel differenziamento del testicolo (ormone anti – Muller: AMH) (Jobing et al., 2002). Per gli effetti degli EDCs sugli invertebrati, interessanti sono stati i fenomeni di intersesso riportati nei mitili nelle aree in cui affondò la petroliera *Prestige* nel 2002 (Ortiz-Zarragoitia e Cajaraville, 2010).

2.2 EDCs e cancro collegato agli ormoni

Alcune tipologie di cancro, come quello del seno, dell'endometrio, della tiroide, della prostata, dell'ovaio e del testicolo sembrano essere causate da ormoni, che possono agire a livello genico ed epigenetico, nell'organizzazione del tessuto e nel suo differenziamento durante lo sviluppo (Soto e Sonnenschein, 2010). Tuttavia, l'eziologia dei cancri collegati agli ormoni rimane sconosciuta. Ci sono evidenze epidemiologiche e sperimentali che diversi EDCs possono essere causa di cancro, in quanto vanno a mimare gli ormoni endogeni responsabili e specifici per

determinati organi. Un'altra osservazione è che l'incidenza di queste neoplasie è alta nei paesi industrializzati, dove è maggiore l'esposizione ai distruttori endocrini

2.2.1. Cancro al seno

La secrezione ciclica di estrogeni durante la vita di una donna è un fattore di rischio per il cancro al seno; sono state proposte due teorie per spiegare l'effetto degli estrogeni nello sviluppo di tale patologia; la prima parla degli estrogeni come causa di una proliferazione incontrollata delle cellule della mammella (Russo e Russo, 2006), mentre la seconda suggerisce un'azione genotossica diretta degli estrogeni sulle cellule, responsabile dell'induzione di aneuploidie e di un rimodellamento anomalo dei tessuti (Soto e Sonnenschein, 2010). Considerato il ruolo degli estrogeni sull'eziologia del cancro al seno, sono stati condotti diversi studi atti a trovare una relazione tra EDCs ad azione xenoestrogenica e cancro alla mammella. Molteplici studi epidemiologici hanno dimostrato che qualsiasi terapia basata su estrogeni da soli o insieme al progesterone aumentano notevolmente il rischio di cancro al seno (Banks et al., 2003; Li et al., 2008). Ci sono evidenze, inoltre, che l'esposizione al cadmio e a solventi organici ad azione xenoestrogenica possono aumentare il rischio di tale patologia (Kortenkamp, 2011), così come il bisfenolo A è responsabile, *in vitro*, dell'induzione di geni specifici del cancro al seno (Dairkee et al., 2008). Rudel et al. hanno identificato più di 200 sostanze chimiche in grado di indurre carcinogenesi alle ghiandole mammarie di ratti F344/N e di topi B6C3F1/N (Rudel et al., 2007); allo stesso modo il DES, l'estradiolo e altri estrogeni steroidei hanno indotto tumori alle mammelle in ratti ACI (Ravoori et al., 2007). E' stato visto che il cancro alle mammelle indotto da questi EDCs può essere completamente inibito dal co-trattamento con il tamoxifen, un antagonista dei recettori per gli estrogeni (Li et al., 2002). E' stato dimostrato che l'esposizione al bisfenolo A durante l'organogenesi è in grado di provocare profonde alterazioni della ghiandola mammaria che la rendono più suscettibile all'azione degli estrogeni e alla neoplasia (Vanderberg et al., 2008).

2.2.2. Cancro all'endometrio

Analogamente al cancro al seno, gli estrogeni possono essere la causa del cancro all'endometrio, sebbene esistano altri fattori responsabili della sua trasformazione neoplastica (prostaglandine, fattori di crescita) (Evans et al., 2011; Modugno et al., 2005). Studi epidemiologici suggeriscono che l'esposizione a lungo termine al cadmio è indice di alto rischio di cancro endometriale (Akesson, Julin e Wolk, 2008) e che esiste un'associazione tra livelli sierici di DDE (dicloro-difenil-dicloroetilene) e iperplasia all'endometrio (Hardell et al., 2004). Esperimenti su ratti hanno dimostrato che l'esposizione in utero al DES induce up-regolazione di molecole estrogeno responsive (Li et al., 2003) ed è causa di lesioni endometriali iperproliferative negli animali adulti, che precedono l'insorgenza del cancro all'endometrio (Cook et al., 2007). Allo stesso modo, l'esposizione in utero al bisfenolo A induce un fenotipo simil-endometriosi nelle femmine della generazione F1 (Signorile et al., 2010), mentre il genistein è causa di cancro all'endometrio in topi C57BL/6 (Kabbarah, 2005).

2.2.3. Cancro all'ovaio

Pochi studi sono stati condotti sulla relazione tra EDCs e cancro all'ovaio; i fattori di rischio sono analoghi a quelli visti per il cancro al seno e per il cancro all'endometrio. Le terapie ormonali sostitutive aumentano il rischio di sviluppare cancro ovarico (Beral et al., 2007) ed esiste soltanto un'evidenza epidemiologica tra alle atrazine e tale patologia (Young et al., 2005)

2.2.4. Cancro alla tiroide

Sebbene il cancro alla tiroide sia abbastanza raro in uomini e in donne, esso rappresenta il tumore solido in cui il numero di nuovi casi nelle ultime cinque decadi è in netto aumento rispetto agli altri tumori. Caratteristico delle zone industrializzate, il cancro alla tiroide deriva da cambiamenti multipli nel genoma di tireociti ben differenziati (Giusti et al., 2010) e le radiazioni ionizzanti e la

predisposizione genetica sono i maggiori fattori di rischio. Tuttavia, altre ipotesi, derivanti da studi su roditori, suggeriscono che una produzione continua dell'ormone stimolante la tiroide (TSH) ipofisario può provocare una divisione forzata delle cellule follicolari tiroidee, causando iperplasia e aumento del rischio del cancro alla tiroide (State of Science of Endocrine Disrupting Chemicals, 2012); inoltre, nonostante non sia stata ancora accertata la presenza dei recettori per gli estrogeni su tale ghiandola, sembra che gli estrogeni e le sostanze xenoestrogeniche possano essere coinvolte nel cancro alla tiroide, dal momento che l'incidenza aumenta nelle donne in età fertile (McTiernan, Weiss e Daling, 1984); nei ratti è stato visto che sia il TSH che gli estrogeni stimolano la proliferazione dei tireociti (Banu, Govindarajulu e Aruldas, 2002) mentre studi *in vitro* dimostrano che l'estradiolo aumenta la proliferazione di cellule della tiroide con caratteristiche di malignità ed invasività (Rajoria et al., 2010). Considerando queste ipotesi, è stato visto che esiste una relazione tra esposizione occupazionale ad alcuni solventi e cancro alla tiroide, soprattutto in donne impiegate nella fabbricazione di calzature e in assistenti di dentisti (Lope et al., 2005). Un elevato rischio di cancro alla tiroide è stato documentato anche in agricoltori svizzeri e americani esposti a pesticidi (Bouchardy et al., 2002; Blair et al., 2005); analogamente, Mastorakos e colleghi hanno identificato dieci EDCs in grado di causare un elevato rischio di neoplasia alla tiroide dei ratti (Mastorakos et al., 2007).

2.3 EDCs e altri disordini

Gli EDCs, oltre ad essere dannosi per il sistema riproduttivo e per lo sviluppo di alcune neoplasie, possono creare danni sul metabolismo energetico, sull'equilibrio ormonale degli ormoni tiroidei e della surrenale, sullo sviluppo osseo e sui circuiti neuronali.

2.3.1. Disfunzioni della tiroide

Esistono molteplici distruttori endocrini in grado di provocare una riduzione degli ormoni tiroidei circolanti (Howdeshell et al., 2002) in vari modelli sperimentali; alcuni vanno ad interferire con i recettori tiroidei (Zoeller, 2010), mentre altri

intervengono sui pathway che regolano la produzione e la degradazione degli ormoni tiroidei (Gilbert et al., 2012). E' stato visto, ad esempio, che i bifenili policlorinati sono in grado, nei ratti, di ridurre i livelli degli ormoni tiroidei T₄ e T₃ (Abdelouahab et al., 2008) e di up regolare o down regolare l'espressione dei recettori per gli ormoni tiroidei (Amano et al., 2010). Il perclorato, usato in molteplici applicazioni industriali, ad esempio nella fabbricazione degli airbag, è in grado di interagire con la pendrina, un trasportatore dello iodio (Attanasio et al., 2011) ed è stata dimostrata, su base epidemiologica, un'associazione inversa tra i livelli di perclorato ritrovato nelle urine e livelli sierici di ormoni tiroidei (Blount et al., 2006). La relazione tra EDCs e disfunzioni alla tiroide è stata studiata anche in vertebrati non mammiferi; ad esempio negli anfibi, nei quali gli ormoni tiroidei sono necessari per la metamorfosi, è stato visto che il bisfenolo A ha un effetto antagonista agli ormoni tiroidei, andando a bloccare questo processo (Iwamuro et al., 2003), mentre l'erbicida acetoclor accelera la metamorfosi indotta da T₃ in *Xenopus* (Crump et al., 2002). Nei rettili, in modo particolare nella lucertola *Podarcis sicula*, è stato riportato che il tiofanato metile è in grado di alterare la morfologia della tiroide, con retrazione della colloide, e di provocare una riduzione dei livelli plasmatici di TSH, T₃ e T₄ (Sciarrillo et al., 2008).

2.3.2. Disordini metabolici

I disordini metabolici, quali ad esempio il diabete e l'obesità, sono aumentati in maniera drammatica negli ultimi anni (OECD, 2010). Le cause sono imputabili, oltre ad una predisposizione genetica, ad un'alimentazione scorretta e ad uno stile di vita sedentario. Tuttavia, essendo questi disordini provocati da un'omeostasi ormonale alterata, è facile ipotizzare una relazione tra EDCs e queste patologie. Nei ratti, è stato visto, ad esempio che l'esposizione durante i primi anni di vita ad alcuni distruttori endocrini, quali la tributiltina, il bisfenolo A, il dietilstibestolo, pesticidi organo clorati e organo fosfati, può alterare il metabolismo del colesterolo causando guadagno di peso che è causa di obesità (Slotkin, 2011; Dirinck et al., 2011; Janesick e Blumberg, 2011). Sebbene esistano pochi studi epidemiologici a tal proposito, diversi studi *in vitro* hanno dimostrato che gli ftalati, il bisfenolo A e alcuni ritardanti di fiamma inducono differenziazione degli

adipociti e adipogenesi, oppure stimolano la produzione di acidi grassi (Janesick e Blumberg, 2011). Diversi dati indicano anche una relazione tra distruttori endocrini e diabete di tipo 1 e 2 (Howard e Lee, 2012; Alonso-Magdalena, Quesada e Nadal, 2011). Lee et al. (Lee et al., 2006), attraverso uno studio epidemiologico, hanno dimostrato che il rischio dell'insorgenza del diabete di tipo 2 è più alto nelle persone esposte ad alti livelli di diossine; in ratti esposti *in utero* al bisfenolo A è stata osservata un'intolleranza al glucosio e un'augmentata resistenza all'insulina (Alonso-Magdalena et al., 2010). Allo stesso modo, sono stati osservati gli stessi fenomeni in ratti adulti, dopo trattamento con le atrazine e col cadmio (Edwards e Prozialeck, 2009; Lim et al., 2009). In ratti, l'esposizione *in utero* con il carbenoxolone è causa di iperglicemia (Lindsay et al., 1996), mentre per altri EDCs, ad esempio quelli presenti nei prodotti per uso cosmetico, è stato visto che sono in grado di inibire l'11 β -HSD2, enzima coinvolto nel metabolismo dei glucorticoidi, la cui down regolazione è causa di disordini metabolici (Atanosov et al., 2003).

2.3.3. EDCs e sviluppo nervoso

Gli EDCs sono in grado anche di influenzare lo sviluppo del sistema nervoso. Diversi studi epidemiologici, condotti su ragazzi altamente esposti, hanno messo in evidenza che i bifenili sono in grado di provocare deficit cognitivi, difficoltà nel linguaggio, alterazione del comportamento sessuale, difficoltà nella memoria a breve termine e lentezza nei movimenti (Park et al., 2009; Stewart et al., 2008); nei ratti, allo stesso modo, è stato visto che i bifenili possono alterare lo sviluppo del sistema nervoso, probabilmente agendo sulla segnalazione degli ormoni tiroidei (Miyazaki et al., 2008). Essi inoltre, influenzano la neurogenesi, la proliferazione dei neuroni e il loro differenziamento (Fox et al., 2010) ed *in vivo* ed *in vitro* sono in grado di agire sul sistema dopaminergico (DiMaio, Grizenko e Joobar, 2003), cruciale per la patogenesi dell'Alzheimer. Yolton et al. hanno evidenziato che il bisfenolo A e gli ftalati, ritrovati ad alte concentrazioni nelle urine di madri in gravidanza, rendono iperattive e aggressive le figlie di due anni (Yolton et al., 2011), allo stesso modo di quello che si verifica nei ratti (Rubin et al., 2006); a tal riguardo, gli autori suggeriscono che gli effetti del bisfenolo A sul

comportamento sono mediati probabilmente dai recettori per gli estrogeni presenti nel cervello. Alcuni studi suggeriscono che alcuni ritardanti di fiamma sono in grado di attraversare la barriera ematoencefalica (Szabo et al., 2010) e causare disordini neurologici in differenti modelli animali come difficoltà motorie, nell'apprendimento e nella memoria (Viberg et al., 2006; Eriksson et al., 2002). Al-Mousa e colleghi hanno dimostrato che alcuni ritardanti di fiamma (l'exabromociclododecano, il tetrabrobisfenolo-A e il decabromodifenil etero), sono in grado di provocare morte cellulare in cellule di neuroblastoma umano SH-SY5Y, legato probabilmente all'aumento nella produzione di specie reattive dell'ossigeno e alla secrezione del peptide β -amiloide, un biomarker chiave di alcune patologie neurologiche come l'Alzheimer (Al-Mousa e Michelangeli, 2012). Altri studi *in vitro* hanno mostrato, invece, che gli stessi EDCs sono in grado di interferire con la produzione di neurotrasmettitori (Reistad et al., 2006). Sono stati osservati effetti di "distruzione neuroendocrina" anche in vertebrati non mammiferi: l'esposizione di *Xenopus tropicalis* all'etinilestradiolo, ad esempio, provoca una riduzione del recettore per gli estrogeni ER α nel cervello, lasciando ipotizzare alterazioni a carico dell'apparato riproduttivo attraverso una riorganizzazione del cervello (Pettersson et al., 2006); somministrando il fadrozolo ai pesci è stata dimostrata, invece, una riduzione dei livelli di aromatasi B nel telencefalo e nell'ipotalamo, enzima essenziale per la neurogenesi (Diotel et al., 2010). Analogamente, una deregolazione dell'attività o dell'espressione dei geni codificanti per l'aromatasi, come il gene *cyp19*, è stata riportata nel cervello dei teleostei esposti a fitoestrogeni e fungicidi (Cheshenko et al., 2008). Il ketoconazolo, largamente diffuso negli shampoo e bagnoschiuma, riduce i recettori per le gonadotropine nel cervello dei pesci medaka giapponesi (Zhang et al., 2008). Per altri distruttori endocrini di provenienza industriale, è stata vista la loro capacità di alterare *in vivo*, i circuiti dopaminergici e adrenergici; ad esempio, in *Rattus norvegicus* il cadmio e i bifenili policlorinati sono in grado di ridurre i livelli di dopamina e adrenalina cerebrale (Fonnum e Mariussen 2009; Lafuente et al., 2003).

2.3.4. Disfunzioni della ghiandola adrenale

Esistono evidenze sulla relazione tra distruttori endocrini e disfunzioni dell'asse ipotalamo-ipofisi-ghiandola adrenale (HPA), sebbene queste derivino soprattutto

da esperimenti condotti su vertebrati non mammiferi e su colture cellulari. E' stato dimostrato che alcuni distruttori endocrini, ritrovati nel latte umano e nel tessuto adiposo alterano la steroidogenesi e l'espressione genica in cellule adrenali umane H295R (He et al., 2008). Sulla stessa linea cellulare, i pesticidi organo alogenati decrementano la produzione di cortisolo (Oskarsson et al., 2006) mentre il MeSO₂-DDE fa decrescere la vitalità cellulare delle H295R (Asp et al., 2010). In un altro studio è stato visto che l'esposizione ad estratti di effluenti di scarichi fognari e di estratti di olio crudo di merluzzo up-regolano l'espressione del gene CYP11B2, che codifica per l'enzima che catalizza l'ultimo step della sintesi dell'aldosterone (Montano et al., 2011); è stato suggerito inoltre che la corticale del surrene potrebbe essere un potenziale bersaglio per l'acido perfluoronanoico (Kraugerud et al., 2011). Per quanto riguarda gli studi *in vivo*, Zimmer et al. hanno dimostrato che i policloruri bifenili, nelle pecore, interferiscono con lo sviluppo fetale della ghiandola surrenale e con la produzione di cortisolo (Zimmer et al., 2011); la presenza di elevati livelli di alcuni ritardanti di fiamma brominati, nel plasma di uccelli artici, è stata associata con alte concentrazioni di corticosterone e con una ridotta risposta allo stress (Verboven et al., 2010). De Falco et al. hanno studiato, invece, l'effetto del fungicida metiltiofanato sulla ghiandola adrenale della lucertola *Podarcis sicula* dimostrando che esso è in grado di aumentare i livelli plasmatici di corticosterone e di adrenalina e di far diminuire quelli dell'ACTH e della noradrenalina, con evidenti alterazioni nella morfologia tissutale, come ipertrofia del tessuto steroidogenico ed invasione di linfociti e macrofagi (De Falco et al., 2007).

2.3.5. EDCs e sviluppo osseo

E' stata ipotizzata una relazione tra interferenti endocrini e patologie scheletriche. Tale ipotesi si basa principalmente sull'osservazione che nei paesi industrializzati vi sono sempre più casi di fratture e lesioni dovute ad osteoporosi (Kanis et al., 2012) e che il tessuto osseo è un tessuto bersaglio per gli estrogeni. Tuttavia, poche sono le evidenze che accertano l'esistenza di questa relazione. Ad esempio, è stato visto che le mogli di pescatori Svedesi che si nutrivano di pesce ad alto contenuto grasso proveniente dal mar Baltico, presentavano una maggiore

predisposizione alle fratture ossee e all'osteoporosi rispetto alle mogli di pescatori che ingerivano pesce proveniente dalla costa ovest della Svezia (Wallin, Rylander e Hagmar, 2004), fatto causato probabilmente dall'alto contenuto di EDCs altamente persistenti presenti nel pesce del mar Baltico. E' stato speculato che anomalie ossee ritrovate in orsi polari della Groenlandia, in foche grigie del Baltico e in alligatori Americani sono attribuibili all'esposizione ai distruttori endocrini (Sonne et al., 2004; Lind et al., 2003).

2.3.6. EDCs e malattie del sistema immunitario

Gli EDCs possono essere collegati anche al sistema immunitario, dal momento che quest'ultimo interagisce con il sistema endocrino. Studi condotti su ratti suggeriscono che l'esposizione al dietilstibestolo e al genistein contribuisce a disordini immunitari come l'asma (Guo et al., 2006; Fenaux, Gogal e Ahmed, 2004); alcuni ftalati, presenti negli ambienti interni delle abitazioni, come nei giocattoli e nelle soluzioni per pulire, aumentano il rischio di ostruzioni ai bronchi nei ragazzi (Chalubinski e Kowalski, 2006); gli alchilfenoli (cfr. capitolo successivo) interferiscono con la produzione di citochine infiammatorie, con un meccanismo probabilmente mediato dai recettori degli estrogeni (Hung et al., 2010); altri EDCs, coinvolgono altre molecole responsabili dell'omeostasi del sistema immunitario, come STAT3, l'IL-6, le MAP chinasi e il fattore NF-kB (Sekine et al., 2004). Diversi studi hanno collegato l'esposizione ai pesticidi con l'insorgenza di leucemie giovanili (Birnbaum e Fenton, 2003). Il bisfenolo A, invece, è stato visto innescare processi pro-infiammatori. Nei ratti, infatti, è in grado di aumentare la produzione di IL-4, di cellule T helper Th2 e di immunoglobuline di tipo M (IgM) (Guo et al., 2000; Yurino et al., 2004). Nei roditori, è stato dimostrato che l'esposizione prenatale alle atrazine è causa di immunodepressione nella fase adulta e provoca una riduzione del numero dei linfociti T helper e dei linfociti T citotossici (Rowe, Brundage e Barnett, 2007). In uno studio separato, è stato riscontrato nei ratti esposti alle atrazine un aumento della risposta immunitaria di tipo umorale (Filipov et al., 2005).

CAPITOLO III

IL NONILFENOLO

3.1 I fenoli

Tra gli EDCs più diffusi in natura ritroviamo i fenoli. Tra i fenoli suscitano grande interesse nella comunità scientifica il bisfenolo A (BPA) e gli alchilfenoli (AP). A quest'ultima categoria appartengono il nonilfenolo (NP) e l'octilfenolo (OP), di largo impiego nel commercio industriale. I fenoli sono composti organici che presentano un gruppo ossidrilico direttamente legato ad un anello aromatico (**Fig. 4**). Essi sono considerati inquinanti ubiquitari, dal momento che si ritrovano in diverse matrici ambientali e fungono da intermedi nella sintesi industriale di prodotti altamente diversificati che vanno dai collanti agli antisettici. Risale al 1936 il primo studio che ha dimostrato come alcuni composti fenolici avessero attività estrogenica (Dodds et al., 1936).

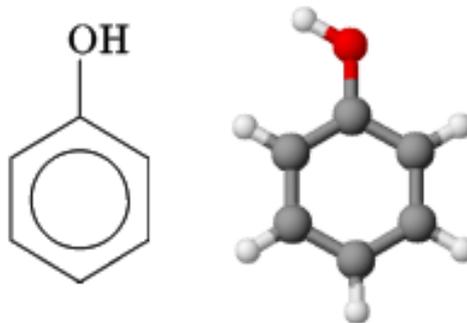


Fig. 4 Struttura chimica dei fenoli. Gruppo ossidrilico legato ad un anello aromatico.

3.2 Il bisfenolo A

Tra i fenoli di maggiore interesse va citato il Bisfenolo A (BPA), noto distruttore endocrino, responsabile di una serie di effetti tossici sulla salute umana, in parte già discussi nel capitolo precedente. La contaminazione dell'uomo è confermata

dal riscontro di tale composto chimico nelle urine, nel plasma, nel liquido amniotico, nella placenta, nel latte materno e nei vari tessuti corporei, in particolar modo in quello adiposo (Ferrara et al., 2011; Edlow et al., 2013; Wan et al., 2013). Da uno studio condotto da Li e colleghi negli Stati Uniti su ragazzi e ragazze di età compresa tra i 9- 12 anni è emerso che un livello di concentrazione urinaria in genere ≥ 2 $\mu\text{g/L}$ di BPA è associato ad un aumento del rischio di sovrappeso (≥ 90 Kg), con una relazione dose-dipendente (Li et al., 2013). A causa del gran numero di applicazioni del BPA, le vie di esposizione umana sono molteplici. Recenti studi, come quello condotto da Geens et al. nel 2012 hanno valutato l'esposizione al BPA per via alimentare (bevande rivestite con resine epossidiche, bottiglie in policarbonato, lattine, ed altre applicazioni come cartone e materiali in PVC). Dallo studio è stata individuata una certa discrepanza tra le valutazioni dell'esposizione in base ai dati di biomonitoraggio e quelle in base alle concentrazioni di cibo e bevande. Infatti dall'uso di concentrazioni urinarie per studi di biomonitoraggio sono state rilevate concentrazioni di BPA superiori a quelle attese sulla base delle concentrazioni di cibo e bevande. Da qui è emerso l'importanza dell'esposizione giornaliera al BPA anche per via non alimentare (esposizione attraverso la polvere, carta termica, materiali dentali e dispositivi medici), che se pure inferiore a quella da esposizione al cibo e bevande, sembra costituire un interessante argomento per studi futuri (Geens et al., 2012). Il BPA, tra i suoi vari impieghi, un tempo veniva utilizzato nella formulazione delle plastiche dei biberon fino alla metà degli anni 90. L'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA), valutando i preoccupanti risultati del mondo scientifico e i rischi dovuti alla sua esposizione per la fauna e per l'uomo, ha regolamentato, nel 2006, una quantità limite di esposizione giornaliera "sicura" nell'uomo, chiamata dose giornaliera tollerabile (TDI), fissata per 0,05 milligrammi per Kg di peso corporeo. Poiché da studi più recenti emergono insidiosi effetti del BPA anche a concentrazioni molto basse e minori della TDI indicata, permangono controversie nella comunità scientifica. Alla luce di tutto ciò, dal marzo 2011 è stato ufficialmente vietato l'uso del BPA nella produzione di biberon per bambini. Tuttavia, sia il materiale proveniente da paesi non europei (tra tutti USA e Cina), dove la produzione del BPA non è ancora regolamentata, sia le concentrazioni Europee ancora consentite, rendono il BPA un composto ancora pericoloso per gli ecosistemi e per l'uomo. L'esposizione al BPA inizia *in*

utero in quanto la sostanza in questione è in grado di attraversare la placenta, entrando così in contatto con il feto durante il suo sviluppo. Gli effetti avversi sono maggiori durante il periodo prenatale dal momento che il feto presenta una limitata capacità di metabolizzazione epatica che lo rende, dunque, maggiormente suscettibile. Si ritiene, infatti, che proprio l'esposizione prenatale al bisfenolo A, possa comportare la comparsa nell'utero di lesioni ovariche associate ad endometriosi, prima causa di infertilità tra le donne (Signorile et al., 2012). Inoltre poiché il bisfenolo A è una molecola in grado di mimare l'azione degli estrogeni, ormoni essenziali nello sviluppo neuronale, l'esposizione in epoca prenatale a dosi minime di tale sostanza può inibire l'azione degli estrogeni sulla crescita neuronale. Il BPA è anche in grado di attraversare la lamina basale dei tubuli seminiferi, alterare la barriera emato-testicolare ed innescare la desquamazione e l'apoptosi delle cellule germinali differenziate, interrompendo l'adesione e la comunicazione fra cellule del Sertoli e le cellule germinali (Mc Clusky et al., 2007). Vi sono crescenti evidenze che indicano come l'esposizione *in utero* al BPA sia implicata nella differenziazione e nel comportamento sessuale; tuttavia, i meccanismi alla base di questi effetti sono sconosciuti. Kundakovic e collaboratori hanno fornito la prova che l'esposizione materna durante la gravidanza a dosi ecologicamente rilevanti di BPA (2, 20, e 200 mg/Kg/d) induce nella prole di topi dei cambiamenti nell'espressione di geni codificanti i recettori degli estrogeni, e che tali cambiamenti sono sesso- specifici, dose- dipendenti, e diversi a seconda delle varie regioni del cervello (Kundakovic et al., 2013). È stato dimostrato, inoltre, che il BPA è coinvolto nell'insorgenza di tumori estrogeno-dipendenti negli esseri umani e in altre specie (Fucic et al. 2012) e che è in grado di promuovere un effetto mitogeno in cellule di seminoma testicolare JKT-1 (Bouskine et al., 2009; Chevalier et al., 2012).

3.3 Il nonilfenolo

3.3.1. Storia e utilizzo

Il nonilfenolo (NP) è un composto xenobiotico usato per la produzione di antiossidanti, additivi di oli lubrificanti e in larga misura (65%) per la

formulazione dei nonilfenoli etossilati (NPE). Questi ultimi, grazie alle loro grandi performance di surfattanti, sono utilizzati in applicazioni industriali, commerciali e casalinghe come detergenti, emulsificatori, disperdenti, agenti umidificanti, agenti antistatici e solubilizzatori (Langford e Lester, 2002; Lorenc et al., 2003). La loro non completa degradazione, fa sì che gli effluenti degli scarichi fognari rappresentino le maggiori sorgenti di nonilfenolo (Langford et al., 2005), che risulta essere più tossico rispetto ai NPE. Il nonilfenolo è stato sintetizzato per la prima volta nel 1940 e la sua produzione è aumentata in maniera esponenziale, raggiungendo, agli inizi del secolo, le 154,200 tonnellate negli USA, le 73,500 tonnellate in Europa, le 16,000 tonnellate in Cina e 16,000 in Giappone (Soares et al., 2008). Le prime evidenze della pericolosità del NP e dei NPE per l'ambiente risalgono al 1984, quando Giger et al. dimostrarono il loro effetto tossico per l'ambiente acquatico (Giger et al., 1984). Qualche anno dopo, Soto e collaboratori, in maniera fortuita, notarono che il nonilfenolo, era in grado di indurre la proliferazione in cellule di carcinoma mammario. I ricercatori stavano studiando l'effetto degli estrogeni sulla proliferazione cellulare e notarono che le cellule controllo rispondevano in maniera analoga alle cellule trattate. Tempo dopo, capirono che il responsabile di questo effetto proliferativo era il nonilfenolo, ritrovato come componente del materiale plastico che utilizzavano per i loro esperimenti *in vitro* (Soto et al., 1991). Ad esperimenti successivi (Lee e Lee, 1996; White et al., 1994) si deve la scoperta che il NP è in grado di mimare il 17 β - estradiolo, competendo per i siti di legame dei recettori degli estrogeni naturali. A causa di queste prime osservazioni, la Comunità Europea, nel 2000, ha iniziato a prendere provvedimenti contro il NP e i NPE, riducendone, attraverso una serie di direttive, le quantità di produzione e l'impiego (Directive 2000/60/EC, 2000; Directive 2003/53/EC, 2003). Molte industrie Europee, Canadesi e Giapponesi iniziano a rimpiazzare questi composti con gli alcool etossilati. Altri paesi, come la Cina, l'India, alcune nazioni del Sud America, e in un primo momento gli Stati Uniti, al contrario, non hanno preso alcuna misura contro l'utilizzo del nonilfenolo e quindi continuano a produrlo.

3.3.2. Struttura chimica

Il nonilfenolo è formato da un anello fenolico e una catena di nove atomi di carbonio legata in posizione *-para* (**Fig. 5**), che può essere più o meno ramificata.

In condizioni ambientali, si presenta come un liquido viscoso che è immiscibile con l'acqua. E' prodotto industrialmente dall'alchilazione del fenolo con il nonene, in condizioni di catalisi acida e la composizione finale è formata da più di 22 isomeri (Thiele et al., 2004). Come scritto in precedenza, la maggior fonte ambientale di nonilfenolo deriva dalla degradazione dei rispettivi nonilfenoli polietossilati. Nonostante esistano poche evidenze sul meccanismo che porta da NPE a NP è stato suggerito che questa biotrasformazione avviene in ambienti ben aerati ed è dieci volte più alta a 22,5 °C rispetto a temperature di 13 °C (Manzano et al., 1999). Inoltre, sembra che il NP sia il maggior prodotto di questa degradazione, dal momento che esso non subisce ulteriori modificazioni (Soares et al., 2005).

Molecular formula: C₁₅H₂₄O
Molecular weight: 220.34 g/mol
Density at 25°C: 0.952 g/cm³ ^(a)
Solubility in water: 4.9 mg/l ^(b)
Solubility in organic solvents: Soluble in most organic solvents
pka: 10.28 ^(c)
Partition coefficient (log K_{ow}): 4.48 ^(d)
Vapour pressure at 25°C: 2.07·10⁻² Pa ^(e)

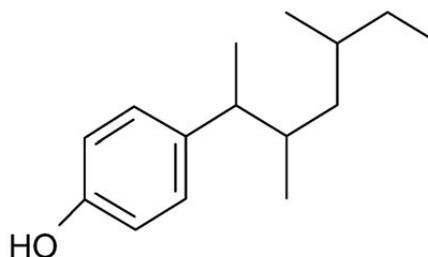


Fig. 5 Proprietà chimico- fisiche (sinistra) e struttura del nonilfenolo (destra). (Soares et al., 2008)

3.3.3. Fonti ed esposizione umana

Il nonilfenolo è stato ritrovato in diverse matrici ambientali (acque superficiali, sedimenti, suolo, acque sotterranee e aria). La sua bassa solubilità in acqua, la sua alta idrofobicità e la sua scarsa mobilità fanno sì che sia più presente nelle matrici organiche (Langford e Lester, 2002). Avendo un carattere lipofilico, tende inoltre ad accumularsi nei tessuti degli organismi, determinandone un accumulo nella catena alimentare. E' stato visto che la concentrazione di NP degli strati superficiali delle acque può decrescere in seguito alla fotolisi indotta dalla luce del sole (Ahel et al., 1994) e che anche alcuni microorganismi sono in grado di

biodegradarlo (Corvini et al., 2006), sebbene l'ossigeno sia un fattore limitante. L'emivita nei sedimenti è stata stimata essere maggiore di 60 anni (Shang et al., 1999). Le acque degli effluenti delle discariche di impianti industriali sono una delle maggiori fonti di nonilfenolo con quantità più elevate presenti in alcuni effluenti cinesi (Shao et al., 2003). Per quanto riguarda l'ambiente acquatico, la presenza del nonilfenolo è sicuramente imputabile all'attività dell'uomo. Nella **Tabella 3** sono mostrate le concentrazioni di nonilfenolo ritrovate nelle acque superficiali e pubblicate nell'ultima rivista dedicata al nonilfenolo (Soares et al., 2008). Come si può notare, la concentrazione di nonilfenolo, presente nelle acque dei fiumi, varia tra 0,7 ng/L a 15 µg/L (Bester et al., 2001; Petrovic et al., 2002) con differenze stagionali, in quanto le temperature calde dei periodi estivi aumentano l'attività dei microorganismi capaci di degradare i nonilfenoli polietossilati (Li et al., 2004). In un lavoro più recente, il NP è stato riscontrato in concentrazioni più elevate (136 ng/L), rispetto al bisfenolo A e all'octilfenolo in diversi fiumi dell'India (Selvaraj et al., 2014). Nei suoli esposti ai fanghi di depurazione, sono state ritrovate alte concentrazioni di NP (1,6 mg/Kg) se paragonati a suoli non esposti (0,98 µg/Kg) (Falkenberg et al., 2003) mentre nelle acque sotterranee, in modo particolare in quelle nelle vicinanze di sedi di attività industriali e di agricoltura, sono documentate quantità di 0,8 mg/L (Ahel et al., 1996), 1,2 g/L (Rudel et al., 1998), 0,38 µg/L (Latorre et al., 2003). Allo stesso modo, è stata valutata la concentrazione di NP nell'atmosfera (2,2–70 ng/m³), nonostante tale inquinante, una volta rilasciato nell'aria, ritorni facilmente nell'acqua e nel suolo ed è stato visto che la sua concentrazione è maggiore di quella dei policloro-bifenili e di quella degli idrocarburi polialogenati (Cincinelli et al., 2003). Fries e Puttmann hanno riscontrato la presenza di nonilfenolo in pioggia e neve raccolta in aree urbane (0,062 µg/dm³), suburbane (0,534 µg/dm³) e rurali (0,099 µg/dm³) del Belgio e della Germania (Fries e Puttmann, 2004). Sorprendentemente, il nonilfenolo è stato anche ritrovato negli ambienti interni, nell'aria e nella polvere casalinga, con livelli più elevati rispetto agli ambienti esterni e rispetto ad altre 89 sostanze monitorate (Rudel et al., 2003). L'acqua potabile e il cibo possono rappresentare altre sorgenti di nonilfenolo. Stando agli ultimi dati relativi a paesi Europei, sono state misurate concentrazioni di NP nell'acqua potabile di 85 ng/L in Spagna (Petkovic et al., 2003), di 15 ng/L in Germania (Kuch e Ballschmiter, 2001) e di 18,6 ng/L in Francia (Colin et al.,

2014). Tuttavia, queste concentrazioni sono relativamente più basse di quelle ritrovate nelle pellicole utilizzate per ricoprire i cibi (Guenther et al., 2002) e a quelle riscontrate nei cibi stessi, come in frutta e vegetali in Taiwan (Yang and Ding, 2005), nella carne e nel pesce in Cina e in Taiwan (Mao et al., 2006; Shao et al., 2007) o nei pesci e molluschi in Italia (Ferrara et al., 2005), con i valori più alti riportati per le ostriche in Taiwan (236 µg/Kg). La contaminazione del cibo col nonilfenolo può avvenire attraverso l'uso di agenti per la pulizia durante il processamento industriale degli alimenti, mediante l'applicazione di pesticidi sui vegetali oppure attraverso il deterioramento del materiale di imballaggio dei cibi (Guenther et al., 2002). Sono stati analizzati anche i cibi destinati ai bambini, riscontrando presenza di NP in prodotti provenienti dalla Germania (27,1 µg/Kg) (Guenther et al., 2002), dalla Spagna (Casajuana e Lacorte, 2004), dal Taiwan (21 µg/Kg) (Li et al., 2008) e il latte materno è stato considerato il cibo contaminato più pericoloso per i bambini (Ademollo et al., 2008; Lin et al., 2009). Raecker e colleghi, hanno stimato che in Germania, dove la presenza degli alchilfenoli è ubiquitaria nei prodotti alimentari destinati ai bambini, l'introito giornaliero degli alchilfenoli è di circa 0,23-0,65 µg/Kg corporei, suggerendo un alto rischio espositivo per questa categoria (Raecker et al., 2011). L'esposizione umana al nonilfenolo è difficile da stabilire ma, considerate le varie fonti di NP, si può dire che avviene soprattutto dopo l'ingestione di acqua e cibo contaminati (carne, latte, vegetali, pesci) o attraverso esposizione occupazionale (De Rosa et al., 2003; Swan et al., 2003). Il comportamento del nonilfenolo nell'organismo umano fu studiato in volontari dopo somministrazione orale e intravenosa con nonilfenolo marcato ¹³C₆-Nonilfenolo. Dopo l'esposizione, l'emivita nel sangue fu di 2- 3 ore; soltanto il 10% fu ritrovato in urine e feci, indicando che era assorbito dal tratto gastrointestinale (Muller et al., 1998).

Tabella 3 – Distribuzione del nonilfenolo in fiumi, estuari, oceani e sedimenti di differenti paesi

Country	Sample source and nonylphenol concentration
USA	River water: <1 µg/l River sediments: <3000 mg/kg
Switzerland	River water: 0.015–2.25 µg/l River sediments: 3520 mg/kg
Canada	Lake and river water: 0.01–0.92 µg/l River sediments: 0.17–72 mg/kg
Italy	River water (1994): 158 µg/l River water (1996): 8.8 µg/l
Canada	Lake sediments: <37 mg/kg
USA	
Portugal	River and ocean water: <10 µg/l
USA	River sediments: <1240 mg/kg
Germany	River water: 0.0007–0.0044 µg/l Estuaries: <0.03 µg/l Marina sediments: 0.01–0.153 mg/kg Sea sediments: <0.01–0.055 mg/kg
Germany	River water: 0.0006–0.135 µg/l
Japan	River water: 0.051–1.08 µg/l River sediments: 0.5–13.0 µg/l
USA	River sediments: 0.01–60 mg/kg
Spain	River water: 15 µg/l River sediments: 0.022–0.645 mg/kg
Spain	Ocean water: 0.15–4.1 µg/l Harbour sediments: 0.008–1.05 mg/kg
Germany	River water: 0.028–1.22 µg/l
Holland	Estuary water: 0.031–0.934 µg/l Estuary sediments: 0.0004–1.08 mg/kg
USA	River water: 0.1–0.5 µg/l River sediments: 0.075–0.340 mg/kg
Canada	River water: <0.092 µg/l River sediments: 0.0403–0.293 mg/kg
Korea	River water: 0.0232–0.1876 µg/l River sediments: 0.0254–0.932 mg/kg
China	Lake water: 1.9–32.8 µg/l Lake sediments: 3.5–32.4 mg/kg

(Soares et al., 2008)

3.4 Effetti del nonilfenolo

Ci sono evidenze scientifiche che il nonilfenolo agisce da distruttore endocrino, basate sia su dati epidemiologici sia su esperimenti *in vivo* ed *in vitro*. La capacità dell'NP di interferire col sistema endocrino risiede nel fatto che esso agisce da *xenoestrogeno* andando a mimare l'ormone endogeno 17β-estradiolo (E2), vista la somiglianza strutturale tra le due molecole, e compete per i siti di legame dei recettori degli estrogeni (Lee et al., 1996; White et al., 2004), sebbene con minore specificità (Bloom et al., 1998; Nagel et al., 1997; Bechi et al., 2010).

3.4.1. Effetti in vivo del nonilfenolo

Tra le classi maggiormente esposte all'azione tossica del nonilfenolo vi sono specie animali quali pesci ed anfibi, che, a causa del loro stile di vita acquatico, vivono in una matrice ambientale fortemente contaminata dagli alchilfenoli. I primi studi sull'azione xenoestrogenica del nonilfenolo riguardano la femminilizzazione nei pesci maschi, con induzioni di proteine "femminili" e le alterazioni a carico degli organi sessuali nei pesci femmina (Joblin et al., 1996; Tabata et al., 2001). El- Jawaher Abdulla ha valutato le alterazioni patologiche riscontrabili in fegati del pesce Tilapia (*Oreochromus spilurs*) in seguito all'esposizione a diverse concentrazioni di NP per un lungo periodo, ovvero a partire dalle fasi precoci della vita fino al periodo di maturità sessuale, confrontando le alterazioni riscontrate in pesci di madri trattate con NP alla concentrazione di 15 µg/L con quelle riscontrate in larve di madri esposte alla concentrazione di 30 µg/L. Le larve e le madri esposte a queste diverse concentrazioni di NP mostrano un maggiore accumulo di NP sia nel fegato che nei muscoli rispetto al gruppo di controllo. L'esame delle sezioni tissutali del gruppo trattato (15 µg NP/L) ha mostrato la presenza di discontinuità a carico dell'architettura del fegato, con lisi, perdita dei nuclei, necrosi e infiltrazione di grasso nel fegato. I cambiamenti sono risultati più marcati nei tessuti esposti ad una concentrazione di NP pari 30 µg/L (Abdulla Bin-Dohaish el-J, 2012). E' stato valutato se le concentrazioni ambientali di nonilfenolo potessero alterare l'equilibrio ormonale della ghiandola adrenale dell'anfibio *Triturus carnifex* (Capaldo et.al., 2012). I tritoni sono stati esposti all'azione del nonilfenolo durante i periodi di dicembre-gennaio e marzo-aprile, corrispondenti a diverse fasi del ciclo funzionale delle cellule cromaffini. Lo studio ha dimostrato che il nonilfenolo non influenzava i livelli sierici di ACTH ma al contrario provocava una diminuzione dei livelli sierici dei corticosteroidi. Il tessuto cromaffine, invece, reagiva diversamente al nonilfenolo somministrato nei due diversi periodi. Nel mese di dicembre-gennaio, il rapporto numerico tra i granuli di noradrenalina e quelli di adrenalina ed i livelli sierici di adrenalina aumentavano, suggerendo un effetto stimolante nel rilascio di adrenalina. Nei mesi di marzo-aprile, il rapporto numerico tra i granuli di noradrenalina e adrenalina, al contrario, non subiva modificazioni, ed i livelli di noradrenalina plasmatica si riducevano, andando a

suggerire un'azione inibitoria nel rilascio di noradrenalina. Dai dati emersi appare chiaro che il nonilfenolo è in grado di influenzare l'attività della ghiandola adrenale dell'anfibio *Triturus carnifex*, il cui corretto funzionamento è indispensabile per la sopravvivenza di questa specie (Capaldo et.al., 2012). L'azione del nonilfenolo sull'asse ipotalamo-ipofisi-ghiandola adrenale è stata valutata anche in uno studio recente di De Falco et al. sulla lucertola bioindicatrice *Podarcis sicula*; i risultati ottenuti mostrano evidenti alterazioni morfologiche della ghiandola e aumento dei livelli sierici di ACTH, corticosterone e adrenalina in maniera tempo-dipendente (De Falco et al., 2014). Sullo stesso modello sperimentale è stato visto che il nonilfenolo è in grado di indurre l'espressione della vitellogenina (una molecola indotta dagli estrogeni) nel fegato di esemplari maschi (Verderame et al., 2011). Un altro studio ha valutato, invece, i potenziali effetti di una singola esposizione acuta al nonilfenolo sull'asse ipotalamo-ipofisi-tiroide del pesce d'acqua dolce *Carassius auratus* osservando che l'azione del nonilfenolo comporta una diminuzione significativa dei livelli dell'ormone tiroxina (Zaccaroni et al., 2009). Sciarrillo e colleghi, hanno studiato, invece, l'effetto del nonilfenolo sull'asse ipotalamo-ipofisi-tiroide della lucertola *Podarcis sicula*. Il nonilfenolo ha indotto, anche in questa specie, la diminuzione dei livelli plasmatici di T4 e T3 e un'alterazione morfologica della ghiandola (Sciarrillo et al., 2010). Perturbazioni a carico della tiroide sono state riscontrate anche in ratti esposti a dosi crescenti di nonilfenolo (40, 80 e 220 mg/Kg/giorno) per 15 giorni (Xi et al., 2013). Degno di nota è anche un recente studio condotto su topi al fine di valutare l'effetto del NP sulla loro capacità antiossidante e cognitiva. I topi sono stati trattati per 90 giorni con concentrazioni crescenti di NP somministrato per via orale. In seguito al trattamento è stata registrata, nel cervello dei topi, un'importante riduzione dell'attività di enzimi antiossidanti quali la superossido dismutasi (SOD), la catalasi (CAT), la glutatione perossidasi (GPx) e la glutatione reduttasi (GR); parallelamente si è osservato anche un aumento della malonildialdeide (MDA) nello stesso distretto corporeo. E' stato inoltre dimostrato che i topi, trattati con NP, possono subire danni come diminuzione della memoria e della capacità di apprendimento. I risultati indicano, quindi, che il trattamento con dosi elevate di NP è in grado di indurre stress ossidativo, alterando l'equilibrio fra radicali liberi dell'ossigeno e antiossidanti, con conseguente deterioramento cognitivo nel cervello dei topi maschi (Mao et

al., 2011). Un lavoro condotto su ratti femmine ha valutato, invece, l'effetto del NP sullo stress ossidativo del pancreas e sul metabolismo dei carboidrati. I ratti sono stati trattati, per sette giorni, mediante somministrazioni orali di NP a diverse dosi. Dai dati ottenuti si evince che il NP induce stress ossidativo nel pancreas ed alterazione dell'omeostasi del glucosio. È stata riscontrata, infatti, da una parte, la diminuzione dell'attività di enzimi come la superossido dismutasi e la catalasi pancreatica, in concomitanza all'aumento di H₂O₂ e delle reazioni di perossidazione lipidica, e dall'altra, l'incremento dei livelli plasmatici di insulina, con conseguente riduzione della concentrazione di glucosio in circolo (Jubendradass et al., 2012). Seike et al., hanno dimostrato, invece, un aumento dell'incidenza di adenomi e carcinomi nei polmoni di ratti esposti per 28 settimane al NP rispetto a ratti controllo, ed un incremento nella formazione del 8-idrossi-2'-deossiguanosina, un marker di danno al DNA mediato dall'azione dei radicali liberi dell'ossigeno (Seike et al., 2003). In relazione al metabolismo del NP e di altri alchilfenoli, sono stati condotti studi sul fegato di ratti Sprague-Dawley, particolarmente adoperati nell'industria farmaceutica per gli studi di tossicologia, mediante trattamento con perfusioni di tali composti chimici. Il NP veniva coniugato con l'acido glucuronico dall'UGT2B1, un'isoforma dell'UDP-glucosiltransferasi (espressa anche nelle cellule di lievito AH22). Dopo la perfusione, l'escrezione del nonilfenolo, sia libero che coniugato con acido-glucuronico, era minima e la maggior parte di esso permaneva nel tessuto epatico, a differenza degli altri AP somministrati che, dopo un'ora dalla perfusione, venivano escreti nella bile. Tali risultati dimostrano che il NP, coniugato con l'acido glucuronico, non riesce ad essere escreto nella bile in quanto, a causa della sua catena alchilica più lunga, non può essere trasportato dal trasportatore MRP2, mentre l'escrezione di altri alchilfenoli-glucuronidi è resa possibile proprio dalle loro brevi catene alchiliche (Daidoji et al., 2003; Nomura et al., 2008). Per analizzare l'effetto dell'esposizione gestazionale al NP sullo sviluppo e sulla fertilità della prole sono stati utilizzati topi ICR (Imprinting Control Region) di sesso femminile (Kimura et al., 2006). Tale studio è stato condotto *in utero* somministrando ai topi ICR, mediante iniezioni sottocutanee giornaliere, diverse concentrazioni di nonilfenolo in relazione alla dose letale media (LD50), precedentemente valutata. E' stato evidenziato che la somministrazione di NP alle madri durante il periodo compreso dagli undici ai diciotto giorni di gestazione,

provoca nella prole maschile una riduzione dose-dipendente del peso dell'epididimo destro (Hoissani et al., 2001) ed una conseguente diminuzione della densità dello sperma epididimale (De Jager et al., 1999; Chapin et al., 1999; Han et al., 2004). Il nonilfenolo, inoltre, induce il processo di apoptosi nei tubuli seminiferi dei ratti Sprague- Dawley e danni a carico dell'acrosoma negli spermatozoi di topo, delle cellule del Sertoli ed ispessimento dell'epitelio seminifero nella generazione F1 (Han et al., 2004). L'azione del NP, come dimostrato da studi sul ratto, non si limita soltanto agli organi riproduttivi, ma si estende anche ad organi non-riproduttivi come rene, fegato e cervello (Chapin et al., 1999; Nagao et al., 2001). In uno studio su più generazioni condotto sempre su ratti Sprague- Dawley si è evidenziato che in seguito all'esposizione attraverso la dieta di quantità di NP superiore a 200 ppm (approssimativamente 20 mg/Kg/dose), si inducono alterazioni a livello renale con conseguente aumento del peso dell'organo, dilatazione dei tubuli e formazione di cisti isolate (Chapin et.al., 1999). L'esposizione alimentare cronica a questa concentrazione di nonilfenolo dal settimo giorno di gestazione fino al cinquantesimo giorno postnatale, conduce allo sviluppo della malattia policistica renale (PDK). L'azione tossica delNP è confermata dal fatto che addirittura il 100% dei ratti appartenenti ad entrambi i sessi risulta affetto da tale patologia dopo esposizione a dosi elevate di NP (Latendresse et al., 2001). Gli estrogeni hanno anche proprietà immunomodulatorie fondamentali per il normale sviluppo del feto, per cui si è ipotizzato che l'esposizione degli adulti al NP potesse danneggiarne il sistema immunitario. Così, è stato eseguito uno studio su ratti di due generazioni per valutare la capacità del NP di modulare alcuni parametri immunitari. Esemplari gravidi di femmine di ratti Sprague- Dawley sono stati esposti, tramite il mangime, al NP per sessantacinque giorni, a partire dal settimo giorno di gestazione. La generazione F1 è stata esposta *in utero* agli stessi livelli di trattamento, dal settimo giorno di gestazione fino al sessantaquattresimo giorno d'età. I risultati di questo lavoro indicano che l'esposizione alimentare al NP può aumentare l'attività delle cellule NK (natural killer) e il numero di leucociti presenti nella milza della generazione F1 in maniera simile a quanto avviene nella generazione F0 (Karrow et al., 2004). Interessanti sono alcuni risultati relativi agli effetti del NP e dell'E2 su organi del sistema immunitario e organi del sistema endocrino di embrioni di quaglie (Razia et al., 2006). Nello specifico, le uova di

quaglia sono state trattate con iniezioni, dal terzo al quindicesimo giorno di incubazione, a concentrazioni diverse di E2 e NP. Il trattamento con E2 ha determinato a livello degli organi immunitari la scomparsa delle cellule linfoidi, l'appiattimento delle pliche della borsa di Fabrizio, mentre a livello del sistema endocrino è stata registrata una riduzione dell'area dei follicoli tiroidei e dell'altezza delle cellule dell'epitelio cubico semplice nella tiroide, un aumento follicolare a livello del timo e lo svilupparsi dell'ovotestis in embrioni maschili. Per quel che riguarda invece il trattamento con NP, quest'ultimo non ha indotto né l'appiattimento delle pliche della borsa di Fabrizio né lo svilupparsi dell'ovotestis in embrioni maschili, ma ha determinato invece la scomparsa delle cellule linfoidi e la riduzione dell'altezza delle cellule dell'epitelio cubico semplice nella tiroide. Recentemente, Zhang et al. hanno dimostrato che l'esposizione prenatale al nonilfenolo, nei ratti, è in grado di alterare l'adipogenesi della generazione F1 ed F2, sia di ratti maschi che di femmine, con cambiamenti nell'espressione genica di enzimi chiave coinvolti nell'adipogenesi e nella litogenesi, aumento di leptina e colesterolo totali e della quantità del numero delle cellule adipose (Zhang et al., 2014). Studi recenti hanno evidenziato anche un link tra esposizione al nonilfenolo e malattie cardiovascolari. In modo particolare, Wang et al. hanno dimostrato che il NP ha un effetto tossico in cuori isolati dei *guinea pig* ed interferisce con l'effetto cardio-protettivo del 17 β -estradiolo sul rischio ischemico (Wang et al., 2013).

3.4.2. Evidenze epidemiologiche

Esistono pochi studi epidemiologici che sottolineano una relazione dannosa tra esposizione al nonilfenolo e danni sulla salute umana. È stato visto che il nonilfenolo è in grado di attraversare la barriera materno-fetale, come si evince da un interessante lavoro condotto su circa 40 donne gravide del Taiwan esposte al NP sia per via alimentare che ambientale. I risultati ottenuti hanno rilevato, infatti, la presenza di elevate concentrazioni di NP non solo nel plasma materno, ma anche in quello fetale, indicando così che tale sostanza è in grado di attraversare la barriera materno-fetale. Tale dato è stato confermato dalla presenza di NP nel sangue arterioso e venoso del cordone ombelicale (Chen et al., 2010). Yum et al.

hanno dimostrato la relazione tra nonilfenolo e pubertà precoce essendo tale inquinante presente a concentrazioni più elevate nel plasma di pazienti con pubertà precoce rispetto a soggetti controllo (Yum et al., 2013); alti livelli plasmatici e urinari di NP sono stati ritrovati anche in pazienti maschi affetti da infertilità idiopatica e ipospadia, rispettivamente, se paragonati a soggetti controllo (Chen et al., 2013; Choi et al., 2012). Recentemente, Shen et al. hanno riscontrato concentrazioni elevate di nonilfenolo in campioni di urina di donne affette da leiomioma uterino rispetto a donne controllo; tali differenze, tuttavia, non sono state riscontrate nei campioni di plasma delle stesse pazienti (Shen et al., 2013).

3.4.3. Effetti in vitro del nonilfenolo

Si è visto che il NP, *in vitro*, si comporta da potente agente cancerogeno. Il cancro indotto dal nonilfenolo è attribuibile alla sua capacità di influenzare il ciclo cellulare. E' stato osservato, infatti, che il NP causa la proliferazione di cellule cancerogene della mammella MCF-7, avendo un effetto diretto sia sull'attivazione del recettore degli estrogeni (ER α) sia su quello del progesterone (PR) (Vivacqua et al., 2003; Recchia et al., 2004; Soto et al., 1991). Lo stesso effetto proliferativo, mediato dal recettore α degli estrogeni, è stato riscontrato anche su adipociti 3T3-L1 (Masuno et al. 2003). Al contrario, svolge un ruolo anti-proliferativo, dose e tempo dipendente, in cellule del Sertoli di ratto (TM4) (Choi et al., 2011), in cellule umane di cancro gastrico SCM1 (Kuo et al., 2010), in cellule di adenocarcinoma gastrico umano (AGS) (Manente et al., 2011), in cellule linfoblastoidi umane Raji (Yongmei et al., 2011) e in linee cellulari di epitelio bronchiale (Kuo et al., 2011). Il nonilfenolo è dunque coinvolto nella regolazione del ciclo cellulare; si è visto, infatti, che esso è in grado di agire sulla via delle caspasi ed alterare il ciclo cellulare di cellule staminali neuronali (Kudo et al., 2004). L'esposizione al NP di queste ultime provoca la condensazione e la frammentazione del DNA, cambi morfologici e apoptosi, aumento dei livelli di caspasi-3 e accumulo di cellule in fase G2/M del ciclo cellulare (Vazquez et al., 2005). Tutto ciò suggerisce che il NP potrebbe interferire con la neurogenesi del sistema nervoso centrale. Sono stati studiati gli effetti che il NP esercita sulla

formazione di specie reattive dell'ossigeno in cellule Raji, una linea cellulare linfoblastoide umana con caratteristiche di cellule B. I risultati suggeriscono che l'NP ha effetti citotossici sulle cellule Raji dal momento che la sua azione induce la formazione di ROS in modo dose-dipendente e altera il profilo del ciclo cellulare, portando all'accumulo di cellule nella fase G2/M (Yongmei et al., 2011). Lo scopo di un altro studio è stato invece quello di chiarire il ruolo che il nonilfenolo ha nell'indurre l'apoptosi in cellule umane di cancro gastrico (SCM1). E' stato osservato che il nonilfenolo è in grado di attivare la caspasi-3 e di indurre la fosforilazione della chinasi p38, coinvolta nel percorso apoptotico (Kuo et al., 2009). In un altro esperimento, sono stati analizzati gli effetti citotossici del NP sulla linea di cellule gastriche epiteliali (AGS). Attraverso la citofluorimetria è stato rilevato che il trattamento con il NP, alla concentrazione di 10^{-7} M e per un tempo di 48 h, determina un accumulo significativo delle cellule nella fase di transizione G2/M, aumentando la percentuale di cellule apoptotiche. Dallo studio è emerso anche un marcato aumento dell'espressione di Fas e Fas-L e l'attivazione delle caspasi 8 e 3, ma non della caspasi 9 (Manente et.al., 2011). Sono stati condotti studi anche su colture cellulari di timociti di topo ed è stato visto che diverse concentrazioni di NP sono in grado di provocare la frammentazione del DNA, caratteristica del processo di apoptosi. E' stata rivelata, inoltre, una perdita di potenziale di membrana mitocondriale ed un aumento dell'attività della caspasi-3, in concomitanza con l'inizio dell'apoptosi. Queste osservazioni suggeriscono che il nonilfenolo induce apoptosi dei timociti attraverso l'attivazione della caspasi-3 e la depolarizzazione mitocondriale (Yao et al., 2006). Un interessante lavoro di ricerca ha indagato *in vitro* l'azione del NP sulla placenta attraverso cellule di villi coriali (Bechi et al., 2006). Lo studio ha dimostrato che la placenta, durante il primo trimestre di gravidanza, esprime tre isoforme di 67, 46 e 39 kDa del recettore ER α e un isoforma di 55 kDa del recettore ER β . L'immunoistochimica ha rivelato l'espressione di ER α nel citotrofoblasto dei villi, mentre ER β è risultato espresso principalmente dal sinciziotrofoblasto. Il trattamento, per 72h, con NP, alla concentrazione di 10^{-9} M, ha significativamente indotto un aumento nella secrezione dell'ormone β -hCG (gonadotropina corionica umana) e ha indotto l'apoptosi delle cellule, ma non ha modificato l'espressione dei recettori per gli estrogeni. Analogamente, è stata valutata l'azione del NP sulla secrezione di citochine umane su cellule espianate

dai villi coriali durante il primo trimestre di gravidanza. Le cellule sono state trattate con concentrazioni di NP molto basse pari a 10^{-13} M, 10^{-11} M e 10^{-9} M ed è stato dimostrato un aumento dei livelli di GM-CSF, IFN- γ , IL-1, IL-4, IL-10, mentre i livelli di IL-6 ed IL-8 non sono stati influenzati dal trattamento. Dato interessante che solleva gravi preoccupazioni circa l'esposizione delle donne gravide al NP, in quanto esso potrebbe essere responsabile di problemi di impianto embrionale e di interruzioni improvvise di gravidanza, in netto aumento negli ultimi anni (Bechi et al., 2009). Da altri lavori di ricerca, è emerso che il trattamento con NP potrebbe causare drammatici cambiamenti morfologici risultanti in una diminuzione della vitalità di cellule del Sertoli nel testicolo (TM4), che svolgono un ruolo cruciale nel sostegno e nel nutrimento degli spermatozoi (Gong et al., 2009; Choi et al., 2011). Recenti studi hanno dimostrato che il NP può indurre una diminuzione della secrezione di insulina, provocando l'insorgenza del diabete di tipo 2, oltre a provocare una disfunzione mitocondriale responsabile del deterioramento delle cellule β pancreatiche (Song et al., 2012). L'azione di alcuni EDCs, incluso il nonilfenolo, può anche influenzare la sintesi di citochine, immunoglobuline e mediatori cellulari responsabili della sopravvivenza delle cellule immunitarie. La modulazione da parte di queste sostanze sulla produzione di interleuchina-4, di linfociti Th1/Th2 e di IgE, suggerisce il loro potenziale effetto nocivo sul sistema immunitario e sulle reazioni allergiche (Chalubinski e Kowalski, 2006). L'effetto tossico del nonilfenolo può essere associato alla comparsa di asma o alla manifestazione di reazioni allergiche. A tal proposito è stato condotto uno studio in cui si è analizzato l'effetto che il trattamento con il NP induce su linee cellulari epiteliali bronchiali umane. Da questo lavoro è emerso che il NP può indurre l'apoptosi delle cellule mediante attivazione della via apoptotica Fas/FasL. Inoltre, la sua azione tossica induce le cellule muscolari lisce a proliferare e a produrre citochine infiammatorie come IL-6 e di IL-8. La proliferazione delle cellule bronchiali è la principale caratteristica dell'asma, per cui risulta evidente che il NP può partecipare alla patogenesi di malattie allergiche attraverso la sua capacità di causare un danno all'epitelio bronchiale (Kuo et al., 2011). Un interessante lavoro di ricerca si è focalizzato, invece, sulla capacità che hanno diversi xenoestrogeni nell'attivare rapidamente le chinasi ERKs nella linea di cellulare ipofisaria GH3/B6/F10, che esprime alti livelli del recettore di membrana per ER α (m-ER).

Questi composti, tra cui il nonilfenolo, hanno indotto una rapida fosforilazione di ERK-1/2 (circa 3-30 minuti dopo l'applicazione), dipendente dalla concentrazione (10^{-14} , 10^{-8} M), ma con pattern di attivazione nettamente differenti. Per identificare le vie di segnalazione coinvolte nella attivazione di ERK, sono stati utilizzati inibitori specifici di ER, quali il recettore di crescita dell'epidermide (EGF), Src, la fosfoinositide 3-chinasi (PI3K), e un agente di rottura della membrana plasmatica. L'uso di inibitori multipli ha bloccato l'attivazione di ERK, suggerendo l'esistenza di complessi sistemi di segnalazione, dovuti all'azione dei distruttori endocrini (Bulayeva e Watson, 2004). Il NP inibisce la proliferazione di cellule ipofisarie GH3-TH singolarmente o in seguito al co-trattamento con l'ormone tiroideo T3 suggerendo una possibile relazione tra esposizione al NP e sviluppo fetale del cervello, con conseguenti disturbi cognitivi (Ghisari e Jorgensen, 2005). Wang et al. hanno valutato gli effetti del NP sugli osteoblasti mediante uno studio *in vitro* su cellule di osteosarcoma umano MG63. Da tale lavoro è emerso che il nonilfenolo, in tali cellule, è responsabile dell'aumento della concentrazione di Ca^{2+} intracellulare, in quanto oltre a promuovere il rilascio di Ca^{2+} dai depositi intracellulari, stimola anche l'influsso di Ca^{2+} dallo spazio extracellulare e può determinare citotossicità correlata al Ca^{2+} con modalità dose-dipendente (Wang et al. 2005). In osteoblasti di ratto, invece è stato dimostrato che l'NP è in grado di indurre l'apoptosi e di influenzare l'espressione dei recettori del 17β -estradiolo (Sabbieti et al., 2011). In uno studio recente, Lukac et al. hanno visto che il nonilfenolo è in grado di alterare la motilità di spermatozoi bovini *in vitro* (Lukac et al., 2013).

CAPITOLO IV

GLI ESTROGENI

4.1 Gli ormoni steroidei

Gli ormoni steroidei sono ormoni di natura lipidica derivanti da un precursore comune che è il colesterolo con cui condividono la struttura tetraciclica (ciclopentanperidrofenantrene). Tali ormoni, a differenza di quelli peptidici, sono sintetizzati solamente da pochi organi e non vengono immagazzinati in tessuti di riserva, ma vengono prodotti all'occorrenza e prontamente liberati nel plasma. Essi sono prodotti per metabolizzazione del colesterolo nella corteccia surrenale, nelle gonadi e nella placenta e possono essere classificati in corticosteroidi e ormoni sessuali. I corticosteroidi vengono biosintetizzati e secreti dalle ghiandole surrenali e comprendono i glucocorticoidi, che regolano il metabolismo dei carboidrati, dei lipidi e delle proteine e i mineralcorticoidi, che regolano il bilancio salino e la ritenzione idrica. Gli ormoni sessuali comprendono gli ormoni sessuali maschili (androgeni) e gli ormoni sessuali femminili (estrogeni e progestinici). Gli ormoni steroidei viaggiano nel flusso circolatorio trasportati da particolari proteine, le SBP (steroid binding protein) che prendono il nome di carrier e ciò consente all'ormone di raggiungere le cellule bersaglio senza essere facilmente degradato. Essendo di natura lipidica, gli ormoni steroidei entrano nella cellula e trovano i loro recettori specifici a livello citoplasmatico o a livello nucleare. Alcuni di questi ormoni possono avere il loro recettore anche sulla membrana esterna: qui il legame attiva la proteina G formata da tre subunità (α, β, γ). La subunità alfa dopo l'attacco si fosforila e si dissocia e va in circolo nel citoplasma dove viaggia e va ad attivare l'adenilato ciclasi (meccanismo identico agli ormoni progestinici). I complessi ormone-recettore esercitano la loro azione legando elementi responsivi all'ormone (Hormone Response Elements, HREs) sul DNA ed influenzando così la trascrizione dei geni bersaglio. Gli estrogeni nella donna sono sintetizzati dalle cellule della teca e dalla granulosa nei follicoli ovarici, dal corpo luteo e dall'unità feto-placentare durante la gravidanza e nell'uomo dai testicoli. Gli estrogeni naturali possono essere divisi in: 17β -

estradiolo (E2), il maggior prodotto della secrezione ovarica; l'estrone (12 volte meno potente), prodotto in piccole quantità sia nella donna che nell'uomo anche dalla corticale del surrene; l'estriolo (80 volte meno potente), derivato dall'ossidazione degli altri due, che si verifica principalmente a livello del fegato ed in minor misura in altri distretti dell'organismo. Il catabolismo degli estrogeni genera inoltre altre molecole dotate di attività estrogenica indicate come catecolestrogeni i quali sono generati per idrossilazione aromatica del 17 β -estradiolo e dell'estrone nella posizione C2 o C4 in vari tessuti. Tra i catecolestrogeni un ruolo di primo piano è svolto dal 4-idrossiestradiolo, considerato un estrogeno a lunga azione, per via dei lunghi tempi necessari per la sua dissociazione dal recettore. Gli estrogeni sono necessari per la maturazione dell'organismo femminile e per le funzioni riproduttive, ma hanno una serie di effetti anche sui tessuti non riproduttivi, ad esempio a livello osseo, cardiovascolare e cerebrale. La loro massiccia secrezione in età puberale, infatti, induce la chiusura delle cartilagini di coniugazione delle ossa lunghe terminando la fase di accrescimento staturale. Gli estrogeni stimolano lo sviluppo stromale della mammella ed il mantenimento delle caratteristiche femminili secondarie (crescita delle mammelle, distribuzione dei peli, voce, distribuzione del grasso) e permettono la fecondazione e la gravidanza, intervenendo nella regolazione del ciclo mestruale, mantengono, inoltre, il trofismo osseo ed hanno quindi azione protettiva nei confronti dell'osteoporosi. Stimolano la sintesi dei trigliceridi e l'aumento delle lipoproteine ad alta densità (HDL) proteggendo le pareti vasali dal danno arteriosclerotico e, dato che le donne possiedono molti più estrogeni degli uomini, fino alla menopausa il rischio di sviluppare malattie cardiovascolari è considerevolmente inferiore. Stimolano la lipolisi nel tessuto muscolare ed adiposo e regolano molte funzioni cerebrali fra cui l'attenzione e la memoria e stimolano anche la sintesi epatica di numerosi enzimi e proteine come ad esempio l'angiotensinogeno. La sintesi degli estrogeni dipende dalla compartecipazione delle cellule della teca e delle cellule della granulosa. Si parla di modello "due cellule-due gonadotropine". Le cellule della teca, stimulate dall'ormone luteinizzante (LH), producono androstenedione e testosterone, che diffondono nelle cellule della granulosa, dove sono convertiti rispettivamente in estrone e in estradiolo sotto l'azione dell'ormone follicolo stimolante (FSH). L'enzima coinvolto è l'aromatasi, localizzata a livello del reticolo endoplasmico, che tramite

idrossilazione e deidratazione determina l'aromatizzazione dell'anello A degli androgeni. L'attività aromatasica è indotta dall'ormone FSH.

4.2 Pathway molecolari degli estrogeni

Gli estrogeni giocano diversi ruoli nella crescita, sviluppo, riproduzione e mantenimento di un diverso range di tessuti nei mammiferi. Gli effetti fisiologici degli estrogeni sono mediati da recettori intracellulari ER (recettori per gli estrogeni), che regolano la trascrizione di geni target, attraverso il legame a specifiche sequenze sul DNA. Gli ER orchestrano sia risposte genomiche sia risposte non genomiche in risposta agli estrogeni, xenoestrogeni e segnali emanati dai pathway di segnalazione dei fattori di crescita (**Fig. 6**). Gli effetti pleiotropici e tessuto-specifici degli estrogeni sono mediati attraverso l'espressione differenziale di due distinte isoforme di ER: ER α e ER β e i loro coregolatori (Moggs e Orphanides, 2001); le attività di molteplici proteine di interazione con gli ER convergono e conferiscono distinte funzionalità agli ER, che includono l'attivazione e la repressione della trascrizione, l'integrazione di vie di trasduzione del segnale intracellulari e il controllo della progressione del ciclo cellulare. Tutte e due le isoforme di ER sono largamente espresse nell'organismo di entrambi i sessi. ER α predomina nell'utero e nella ghiandola mammaria mentre ER β svolge ruoli significanti nel sistema nervoso centrale, nel tratto urogenitale, sistema immunitario, tessuto osseo, reni e polmoni (Gustafsson, 2000). A livello cellulare, la maggior espressione di ER α ed ER β si ritrova nel nucleo e nel citoplasma. Tuttavia, piccole quantità (2%) possono ritrovarsi sulla membrana cellulare. Entrambi gli ER esibiscono strutture caratteristiche appartenenti alla superfamiglia dei recettori nucleari. Sono composti da tre domini funzionali: il dominio trascrizionale ligando indipendente AF-1 (Activation Function 1) nella regione NH₂ terminale, il dominio di legame al DNA e il dominio di legame al ligando che contiene un dominio trascrizionale AF-2 (Activation Function 2) dipendente da ligando (Mishra et al., 2003). Per svolgere le loro funzioni nel nucleo e nel citoplasma gli ER integrano segnali multipli sia dai ligandi che da pathway trasduzionali intracellulari. E' stato dimostrato che gli estrogeni, via ER, agiscono sulla vascolatura, così come sul tessuto osseo, sul sistema riproduttivo,

sul fegato e sul cervello attraverso risposte rapide non genomiche oppure mediante il pathway classico (effetti genomici) (Driggers e Segars, 2002). Quest'ultimo dipende sull'interazione diretta degli estrogeni con i suoi recettori. Non appena attivato, il complesso ormone- recettore è in grado di attivare direttamente la trascrizione genica oppure può interagire con fattori di trascrizione influenzandone la loro attività. Il percorso non classico lavora più rapidamente e dipende dall'abilità degli estrogeni di interagire sia con recettori per ormoni non steroidei sia con recettori per ormoni steroidei situati sulla membrana cellulare. In entrambi i modi vengono attivate proteine chinasi che in ultimo regolano la trascrizione di geni specifici (Lorenzo, 2003). In **tabella 4** sono riportate le proteine di interazione agli ER e i geni regolati dagli estrogeni.

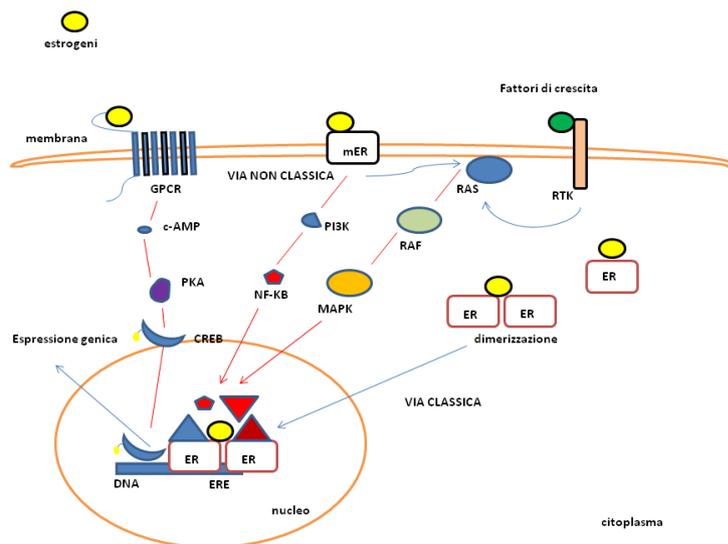


Fig. 6 Rappresentazione schematica della via di segnalazione degli estrogeni (vedi testo per i dettagli)

4.2.1. Meccanismo di azione "classico"

Il meccanismo classico dell'azione degli ormoni steroidei coinvolge l'interazione con i recettori intracellulari, che sono sia citoplasmatici che nucleari; il legame dell'ormone agli ER causa il rilascio del recettore da un complesso inibitorio

formato dalle HSP (Heat Shock Protein) che comporta cambi conformazionali che fanno sì che il complesso recettore-ligando vada a legarsi alla sequenza palindromica ERE (Estrogen responsive element), localizzata nei promotori dei geni target, con conseguente attivazione della trascrizione genica (Knoblauch e Garabedian, 1999). In presenza di un'esposizione acuta ai ligandi estrogenici, la trasduzione del segnale è mediata in parte attraverso il recettore ER α (Bjornstrom e Sjoberg, 2005) e una caratteristica di questa trasduzione è la traslocazione dell'ER α citoplasmatico nel nucleo (Hsu et al., 2009; Bjornstrom e Sjoberg, 2005; Okada et al., 2008). La massima attività trascrizionale richiede la partecipazione sia del dominio AF-1 sia di AF-2 ed è influenzata da molteplici cofattori come i complessi di rimodellamento della cromatina, coattivatori e corepressori. I coattivatori in genere non si legano al DNA ma sono reclutati sui promotori dei geni target attraverso le interazioni proteina-proteina che si stabiliscono con gli ER. Esempi di coattivatori degli ER includono membri della famiglia p160/SRC (Steroid Receptor Coactivator), NcoA2; NCOA3/AIB1/TRAM1/RAC3; i cointegratori: CBP (CREB- Binding Protein), p300 e membri della famiglia CITED. Esempi di corepressori implicati nel silenziamento genico sono NCoR (Co-repressori per recettori nucleari), la proteina MTA-1 (Metastasis Associated 1). Alcuni coregolatori, come PELP-1 (Proteine nucleari ricche in prolina e acido glutammico) agiscono sia da coattivatori che da repressori di ER. Un secondo meccanismo di azione del pathway classico coinvolge interazioni proteina-proteina: il complesso ER-ligando interagisce con fattori di trascrizione come NF-Kappa B (Nuclear Factor Kappa B), la proteina attivatrice 1 e la proteina SP-1 (Specific Protein 1) che influenzano la trascrizione genica (Moggs e Orphanides, 2001).

4.2.3. Meccanismo di azione “non classico”

I recettori degli estrogeni localizzati sulla membrana cellulare e nel citoplasma sono anche coinvolti con la trasduzione degli effetti non genomici degli estrogeni, che sono molto rapidi se paragonati con la trascrizione genica e la sintesi proteica (Simoncini et al., 2003). Tipicamente, questi effetti avvengono nel giro di secondi o minuti mediante il reclutamento di secondi messaggeri quali l'ossido nitrico

(NO), RTK (recettori tirosin chinasi), GPCR (recettori accoppiati a proteine G) e proteine chinasi che includono PI3K (fosfatidil inositolo 3 chinasi), serina-treonina chinasi Akt, membri della famiglia delle MAPK (proteina chinasi attivata da mitogeni), proteine chinasi A e C (PKA, PKC). Il ruolo anti apoptotico degli estrogeni avviene attraverso l'attivazione dei GPCR ed il pathway Akt. L'attivazione della cascata delle MAPK è legata all'attivazione di eventi citoplasmatici a valle o a eventi trascrizionali che coinvolgono il potenziamento dell'attività di AF-1 (Lorenzo, 2003). Dopo il legame al ligando, ER induce la fosforilazione di proteine adattatrici, Src e SHC (proteine con dominio SH2) che porta alla formazione di un complesso SHC-GRB2 (Growth Factor Receptor Binding Protein 2)-SOS con conseguente attivazione di Ras, Raf, Erk1/2 (Extracellular Signal regulated Kinases), JNK (c-Jun N-terminal kinase) e p38. Queste infine traslocano nel nucleo dove partecipano alla trascrizione genica. Le MAPK possono inoltre direttamente catalizzare la fosforilazione della serina 118 degli ER aumentandone la loro efficienza trascrizionale.

Tabella 4 – Sigle dei geni target dei recettori ER α ed ER β (ER) e relative funzioni

<p>Cofattori di ER e proteine di interazione: AHR, BCAR1, BRCA1, CAV1, CCND1, EFNA5, ESR1, ESR2, HSP90AA1, IGF1, MED1, MTA1, NCOA1, NCOA2, NCOA3, NCOR1, NCOR2, NR0B1, NR0B2, NRIP1, PELP1, PGR, PHB2, SAFB, TFF1 (PS2), VDR.</p>
<p>Geni target dei recettori degli estrogeni:</p> <p><u>Differenziamento sessuale femminile:</u> BCL2L1 (BCL-X), FST, NRIP1, PGR, VEGFA, WNT4, WNT5A.</p> <p><u>Differenziamento sessuale maschile:</u> BCL2L1 (BCL-X), CCND1, CYP19A1, WNT4, WNT5A.</p> <p><u>Ciclo ovarico:</u> BCL2L1 (BCL-X), BMP4, ERBB2 (HER2), FST, NRIP1, PGR, TGFB3, VEGFA, WNT5A.</p> <p><u>Gravidanza:</u> FOS, JUNB, PGR, PTGS2 (COX2), SNAI1 (Snail), SOCS3, SPP1 (Osteopontin), TGFB3, WNT4.</p> <p><u>Sviluppo ghiandola mammaria:</u> BMP4, CAV1, CCND1, ERBB2 (HER2), ERBB3, IGFBP5, IRS1, NR3C1 (GRL), PGR, PTCH1, TGFB3, VEGFA, WNT4, WNT5A.</p> <p><u>Sviluppo del sistema cardiovascolare:</u> C3, CAV1, CCL2 (MCP-1), EGR3, ERBB2 (HER2), ERBB3, JUNB, KLK3, MMP9 (Gelatinase B), NRP1, PTCH1, PTGS2 (COX2), RARA, SOCS3, TGFA, THBS1, VEGFA, WNT4, WNT5A.</p> <p><u>Sviluppo del sistema nervoso:</u> APBB1, BDNF, CCL2 (MCP-1), CITED2, CKB, CYP19A1, EGR3, ERBB2 (HER2), ERBB3, FOS, FOXA1, L1CAM, LGALS1, NAB2, NR2F6, NR3C1 (GRL), NRP1, PTCH1, S100A6, SPP1 (Osteopontin), VEGFA, WNT4, WNT5A.</p> <p><u>Sviluppo osseo:</u> BMP4, BMP7, IGF1, IGFBP5, JUNB, MMP9 (Gelatinase B), NAB2, PTGS2 (COX2), SNAI1 (SNAIL), SPP1 (Osteopontin), TGFB3, WNT4, WNT5A.</p> <p><u>Regolazione della crescita:</u> BMP7, CTGF, EBAG9, ERBB2 (HER2), IGFBP4, IGFBP5, NOV, NRP1, PTCH1, SOCS3, SPP1 (Osteopontin), WISP2, WNT5A.</p> <p><u>Trascrizione:</u> EGR3, FOS, FOXA1, JUNB, MAFF, MYC, NCOA1, NCOA3, NR3C1 (GRL), NR5A2, NRIP1, PGR, RARA, SNAI1 (Snail), XBP1.</p> <p><u>Altri geni:</u> AKAP1, CTSD, CYP1A1, G6PD, LPL, LTBP1, PDZK1, RALA, TFF1 (PS2).</p>

(fonte: Qiagen, sample and assay technologies)

CAPITOLO V

PROSTATA ED EDCs

5.1 Breve cenni di anatomia e istologia della prostata

La prostata, o ghiandola prostatica, è la più importante ghiandola accessoria dell'apparato riproduttivo maschile, la cui funzione è necessaria per la fertilità; la funzionalità spermatica, infatti, dipende dal contributo del fluido prostatico (Lorenzetti et al., 2010); questo rappresenta circa il 30% dell'eiaculato e fornisce proteine (es. antigene prostatico specifico), elementi in tracce (es. zinco) e altre molecole (es. citrato) essenziali per l'attivazione e la capacitazione degli spermatozoi (Jonsson et al., 2006; Veveris-Lowe et al., 2007). La crescita e lo sviluppo di questa ghiandola è controllata generalmente dagli androgeni; tuttavia, in letteratura è suggerito in questi processi un ruolo di uguale importanza svolto dagli estrogeni (Bostwick et al., 2004; Taplin e Ho, 2001; Prins e Korach, 2008). La prostata differisce considerevolmente tra le varie specie di mammiferi, per le caratteristiche anatomiche, chimiche e fisiologiche. Negli uomini, ha una struttura a forma di noce, circonda l'uretra ed è situata alla base della vescica (**Fig. 7a**). Ha un diametro trasversale medio di 4 cm alla base, verticalmente è lunga 3 cm e antero-posteriormente circa 2 cm; la prostata, il cui sviluppo embrionale è condizionato da vari fattori tra i quali l'indispensabile presenza di testosterone fetale, subisce un'evoluzione strutturale e ponderale dalla nascita all'età adulta per raggiungere un peso di circa 20 g all'età di 20-25 anni, che può notevolmente aumentare in condizioni patologiche. Sebbene nella prostata adulta e in condizioni fisiologiche non si riescano a distinguere strutture lobulari, secondo il modello proposto da Mc Neal (Mc Neal, 1969, 1981, 1989) è possibile suddividere tale ghiandola in tre zone: la zona centrale, la zona di transizione e la zona periferica, insieme ad uno stroma fibromuscolare anteriore e una regione periuretrale (Timms, 2008) (**Fig. 7b**). La zona periferica rappresenta la parte più estesa della prostata ed è il punto da dove origina la maggior parte dei carcinomi. Al contrario, l'iperplasia prostatica benigna, una condizione patologica non maligna presente negli anziani, origina dalla zona di transizione. A differenza della prostata umana,

la prostata di topo presenta lobature multiple con distinti pattern di ramificazioni, aspetto istologico, espressione genica e secrezione proteica (Cunha et al. 1987). Queste corrispondono ai lobi ventrali, laterali, dorsali e anteriori con i lobi dorsali e laterali spesso considerati insieme per le analisi. Sebbene alcuni autori ritengano che i lobi dorso- laterali della prostata di topo presentino analogie con la zona periferica dell'uomo, soprattutto nella patogenesi del cancro prostatico, la maggior parte dei patologici confuta e respinge questa conclusione (Shappell et al. 2004). Tuttavia, le analogie nei profili di espressione genica tra le due specie supportano l'idea che la zona dorso-laterale del topo è molto simile alla zona periferica umana (Berquin et al., 2005). A livello istologico, sia la prostata di uomo che quella di topo presentano un epitelio pseudostratificato con tre tipi differenti di cellule epiteliali: luminali, basali e neuroendocrine distribuite in uno stroma formato da fibrocellule muscolari lisce e tessuto connettivo fibroso (Foster et al., 2002; van Leenders e Schalken, 2003; Hudson, 2004; Shappell et al., 2004; Peehl, 2005). Le cellule dello strato luminale formano un continuo strato di cellule colonnari polarizzate responsabili della secrezione proteica, che presentano marker caratteristici, come la citocheratina 8 e 18 e alti livelli di recettore degli androgeni (AR). Le cellule basali, sottostanti a quelle luminali, esprimono il p63 e le citocheratine ad alto peso molecolare 5 e 14, con livelli bassissimi di AR. Infine, le cellule neuroendocrine, la cui funzione rimane sconosciuta, e presenti in misura minore, esprimono marker endocrini come la cromogranina A e la sinaptofisina e sono AR negative (Shen et al., 2010).

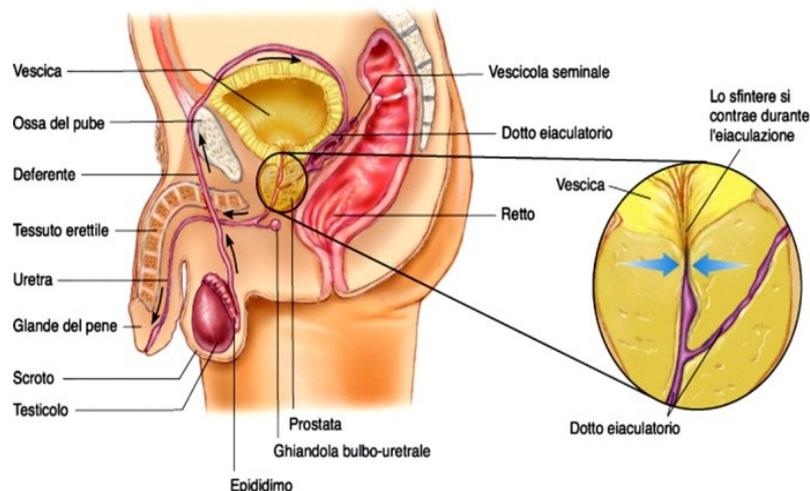


Fig. 7a Anatomia del tratto riproduttivo maschile. Si noti la posizione della prostata (web).

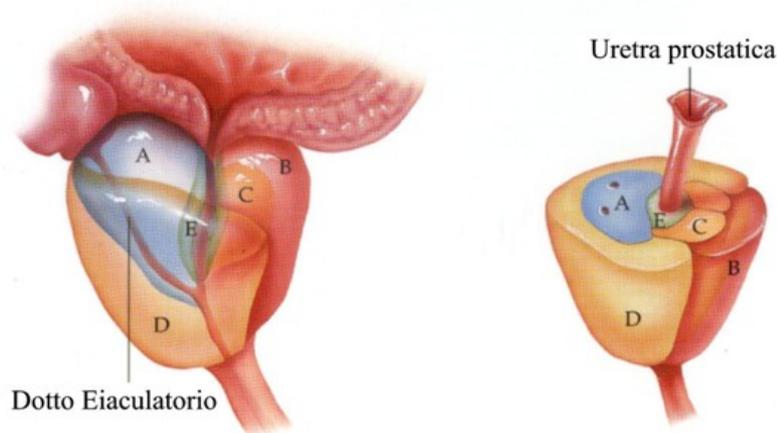


Fig. 7b Struttura della prostata umana secondo il modello di McNeal. A- zona centrale B- stroma fibromuscolare C- zona di transizione D- zona periferica E- regione della ghiandola periuretrale (web).

5.2 Cancro alla prostata

Il cancro alla prostata rappresenta uno dei tumori maschili maggiormente diagnosticati in Europa e negli Stati Uniti, con un forte incremento nel numero di casi nell'ultimo ventennio (**Fig. 7c**). La maggior parte dei tumori alla prostata deriva dalle cellule epiteliali della ghiandola e gli androgeni sono stati considerati per molto tempo come i principali responsabili nell'insorgenza di questa patologia (Huggins e Hodges, 2002). Il coinvolgimento degli estrogeni, invece, è stato riconosciuto soltanto più tardi. Sebbene questi ultimi, insieme agli androgeni, giochino un ruolo fondamentale nella normale crescita e nel normale sviluppo di tale ghiandola (Bostwick et al. 2004; Taplin e Ho, 2001; Prins e Korach, 2008), l'esposizione agli estrogeni durante la vita fetale può alterare lo sviluppo della prostata, portando all'iperplasia e al cancro nelle fasi successive della vita (Huang et al., 2004; Prins e Korach, 2008; Ellem e Risbridger, 2009).

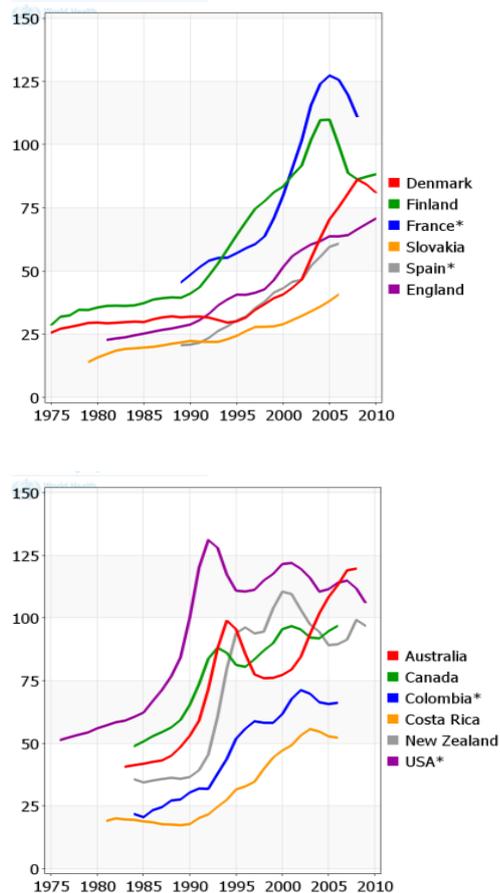


Fig. 7c Trend di incidenza del cancro alla prostata in paesi Europei (sopra) e non (sotto). Numero di casi/100 000 maschi (<http://globocan.iarc.fr/factsheets/cancers>).

5.2.1. Ruolo degli estrogeni su cancro e patologie prostatiche

L'azione degli estrogeni sulla prostata può essere mediata attraverso due distinti recettori, il recettore per gli estrogeni ER α e il recettore ER β (Kuiper et al., 1997). Questi due recettori, sebbene presentino un'omologia strutturale e stessa specificità di legame al ligando (cfr. capitolo precedente), controllano pathways molecolari differenti nella prostata. ER α sembra essere coinvolto nella proliferazione cellulare, mentre ER β sembra essere implicato nel processo apoptotico e nel differenziamento cellulare (Ellem e Risbridger, 2009; Hartman et al., 2012). Questi due recettori sono inoltre espressi in maniera differente nel compartimento epiteliale e stromatico della prostata, con ER α localizzato principalmente nelle cellule mesenchimali ed ER β in quelle epiteliali (Kuiper et al., 1996; Cooke et al., 1991; Prins et al, 2001). Alcuni autori suggeriscono che

ER β possa proteggere la ghiandola dallo stress ossidativo; è stato dimostrato infatti, che tale recettore è più efficace di ER α nell'induzione di enzimi antiossidanti (Montano e Katzenellenbogen, 1997; Montano et al., 2004), sebbene questi risultati si riferiscano ad altre patologie, come malattie cardiovascolari, degenerazione neuronale e sviluppo del cancro al seno (Dimitrova et al., 2002; Gelinas et al., 2004; Treuter et al., 2000; Bianco et al., 2005). Un crescente numero di prove indica che la segnalazione operata dagli estrogeni è importante nella morfogenesi duttale della prostata (Chen et al., 2009) e nella composizione della matrice extracellulare (Chang et al., 1999), nonché nella carcinogenesi prostatica. In modo particolare, nelle cellule epiteliali prostatiche, durante la vecchiaia, si osserva una riduzione del 5 α -didrotestosterone e l'aumento degli estrogeni (Vermeulen et al., 1972; Krieg et al., 1993) che causano la stimolazione estrogenica dell'epitelio prostatico, con la riattivazione della crescita che porta alla trasformazione neoplastica. Esperimenti condotti su modelli animali, hanno stabilito, infatti, che gli estrogeni, da soli o in sinergia con gli androgeni, inducono un'aberrante crescita e trasformazione neoplastica della ghiandola (Bostwick et al., 2004; Ho, 2004; Taplin e Ho, 2001). E' stato dimostrato, in varie specie, che l'esposizione sia *in utero* sia nella fase adulta a dosi farmacologiche di estrogeni è in grado di provocare lesioni benigne che rientrano sotto il nome di metaplasia squamosa, derivanti dalla proliferazione aberrante delle cellule epiteliali dello strato basale (Adams et al., 2002). La somministrazione di 17 β -estradiolo, insieme al testosterone, nei ratti Noble, è causa di lesioni precancerose simili a quelle che si osservano nella neoplasia prostatica intraepiteliale umana (Ho et al., 1997; Ho et al., 1995; Leav et al., 1989). Nei ratti, l'esposizione *in utero* a bassi livelli di estrogeni è causa di fenotipi iperplastici in età adulta (vom Saal et al., 1997). Prins et al. (Prins et al., 2001) hanno dimostrato che i fenotipi iperplastici spesso non si riscontrano nei topi knockout (KO) per ER α nati da madri estrogenizzate. In topi knockout per ER β , al contrario, l'iperplasia è ancora rilevabile, confermando che ER α è il recettore principalmente coinvolto nella crescita cellulare aberrante. Da altri studi, condotti sempre in modelli di topi knockout per i recettori degli estrogeni è emerso però che l'alterazione di uno dei due recettori (ER α o ER β) o di entrambi, non influenza il fenotipo prostatico, suggerendo il possibile coinvolgimento di altri recettori chiamati "recettori correlati ai recettori degli estrogeni" (ERR; α , β , γ); si tratta di recettori nucleari orfani costitutivamente

attivi che non necessitano del legame con gli estrogeni. Numerose evidenze sperimentali suggeriscono che gli ERR possono interferire con i recettori degli estrogeni (ER) in diversi tipi di cellule attraverso la competizione per i loro siti di legame al DNA o ai loro coattivatori trascrizionali. A tal proposito, Cheung et al. hanno indagato sull'espressione dell'mRNA e delle proteine di tre ERR in cellule epiteliali di prostata umana, in linee cellulari stabilizzate, in xenotrapianti tumorali e in tessuti prostatici, evidenziando l'espressione dell'mRNA dell'ERR α in diverse linee cellulari tra cui la linea cellulare non tumorale umana PNT1A (Cheung et al., 2005). Nello stesso studio, gli autori hanno dimostrato che gli ERRs, che sono coespressi con i canonici ER in cellule prostatiche, sono in grado di regolare la crescita cellulare e modulare le vie di segnalazione dei recettori degli estrogeni, interferendo con la trascrizione di ER α nelle cellule prostatiche (Cheung et al., 2005).

5.2.1. Evidenze epidemiologiche tra EDCs e cancro alla prostata

Il grande aumento dei casi diagnosticati di cancro alla prostata in parte può essere attribuito al miglioramento delle metodiche analitiche, come l'introduzione e il dosaggio dell'antigene prostatico specifico (PSA). Tuttavia, esistono evidenze epidemiologiche che diversi fattori ambientali, quali la dieta e l'esposizione a sostanze chimiche, possono contribuire all'insorgenza del cancro alla prostata (Lichtenstein et al., 2000; Bostwick et al., 2004). Studi epidemiologici rivelano, infatti, che l'esposizione a diversi pesticidi usati in agricoltura, come il bromuro di metile, il clorofiros, il fonofos, il cumafos, il forato, la permetrina e il butilato, possono giocare un ruolo nell'insorgenza di questa patologia (Alavanja et al., 2003; Koutros et al., 2010; Fabry et al., 2006). In modo particolare, il clorofiros, il fonofos, il cumafos, il forato, e la permetrina sono tiofosfati che agiscono inibendo l'acetilcolina esterasi, ma sono anche inibitori degli enzimi P450. Clorofiros, fonofos e forato inibiscono fortemente CYP1A2 e CYP3A4, che sono i principali P450 che metabolizzano l'estradiolo (E2), l'estrone e il testosterone nel fegato (Usmani et al., 2006; Usmani et al., 2003). Ciò suggerisce che l'esposizione a questi composti può interferire con il metabolismo degli ormoni steroidei, disturbando l'equilibrio ormonale che a sua volta contribuisce ad un

rischio maggiore d'insorgenza di anomalie alla prostata. Anche altri pesticidi organoclorati, come l'oxiclordano, il transclordano e il clordecone sono stati associati con l'aumento del rischio del cancro alla prostata (Multigner et al., 2010; Hardell et al., 2006; Cockburn et al., 2011); al contrario, non sono state trovate associazioni con l'esposizione alle diossine e ad alcuni policloro-bifenili (Ritchie et al., 2003; Aronson et al., 2010). L'esposizione all'arsenico presenta una forte associazione con l'insorgenza del cancro alla prostata (Schuhmacher-Wolz et al., 2009), mentre ci sono dati discordanti sull'effetto del cadmio (Bostwick et al., 2004; Sahmoun et al., 2005); il meccanismo preciso con il quale questi EDCs inducono la carcinogenesi in tale ghiandola resta ancora sconosciuto; tuttavia, osservando le strutture chimiche dei composti in questione, si può notare che si comportano tutti da mimetici degli estrogeni naturali.

5.2.2. Studi in vivo e in vitro su relazione tra EDCs e cancro alla prostata

Esistono grosse difficoltà nel trovare validi modelli animali che presentino le stesse caratteristiche della prostata umana, soprattutto quelle che si evidenziano nelle varie patologie prostatiche; queste caratteristiche da tenere in considerazione includono l'androgeno dipendenza, lo sviluppo di un androgeno indipendenza in stadi più avanzati, una crescita lenta con periodi di lunga latenza e l'abilità di metastatizzare nei linfonodi, nelle ossa e in altri organi. I ceppi di roditori più utilizzati per tali scopi sono i ratti F344 e i ratti Noble; tuttavia, nei primi è impossibile indurre tumori mediante somministrazione di androgeni e in entrambi è difficile osservare metastasi. Per ovviare a ciò, sono stati ingegnerizzati ceppi di roditori modificati transgenicamente con ghiandola prostatica con caratteristiche patologiche simili a quella umana, come i topi TRAMP e i topi LADY (Grabowska et al., 2014). Pochi dati sono presenti in letteratura sull'effetto del nonilfenolo sulla prostata; è stato visto, ad esempio, che l'esposizione *in utero* al nonilfenolo causa alterazioni morfologiche e riduzione del peso della prostata in ratti di generazione F1 (Jie et al., 2010); analogamente, è stata ritrovata una riduzione del peso della prostata ventrale in ratti Sprague-Dawley dopo somministrazione orale con nonilfenolo (Who et al., 2007); al contrario, in un altro studio, condotto su ratti F344 è stato dimostrato che l'esposizione al

nonilfenolo durante il periodo di sviluppo degli organi sessuali, non produce alterazioni morfologiche significative della prostata rispetto al gruppo controllo (Inaguma et al., 2004). Più lavori si ritrovano, invece, sull'effetto del bisfenolo A (BPA) su ratti e su linee cellulari di prostata; diversi dati indicano che nei ratti, la somministrazione di basse dosi di BPA durante le fasi iniziali di vita, cioè quando i tessuti sono particolarmente sensibili a stimoli di natura endocrina, è in grado di influenzare diversi aspetti dello sviluppo della prostata (Welshons et al., 2006; Vandenberg et al., 2012). Chitra et al. hanno dimostrato che l'esposizione di basse dosi di BPA nei ratti adulti è in grado di incrementare il peso della prostata ventrale (Chitra et al., 2003), mentre altri autori hanno visto che l'esposizione ad alte dosi può indurre l'espressione della citocheratina 10 (una proteina collegata alla metaplasia squamosa) nell'epitelio prostatico di topo (Ogura et al., 2007). Recentemente, Castro et al. hanno studiato, nella prostata ventrale di ratti adulti, dopo iniezione col bisfenolo per quattro giorni, l'espressione di tre isoforme dell'enzima 5 α -reduttasi (5 α -R di tipo 1, 2, e 3) e dell'aromatasi, enzimi chiave coinvolti nella biosintesi del diidrotestosterone e dell'estradiolo, rispettivamente, mostrando una riduzione di 5 α -R1 e 5 α -R2 e un aumento di 5 α -R3 (marker di malignità) e dell'aromatasi (Castro et al., 2013); nello stesso studio, gli autori hanno riscontrato un alto rapporto estradiolo/testosterone, che è spesso associato con patologie prostatiche. Studi *in vitro*, invece, hanno dimostrato che il BPA si comporta come un potente mitogeno in differenti linee cellulari di prostata umana (LNCaP, PC3) attraverso un meccanismo che vede il coinvolgimento del recettore per gli androgeni (Wetherill et al. 2002; Wetherill et al. 2005; Wetherill et al. 2006).

CAPITOLO VI

SCOPO DELLA RICERCA

Le tematiche inerenti ai distruttori endocrini (EDCs) sono oggetto di numerosi e continui dibattiti, che coinvolgono, oltre ai ricercatori scientifici, associazioni ambientaliste e istituzioni politiche; si cerca di individuare le sostanze chimiche abili nell'interferire con il sistema endocrino e laddove individuate, caratterizzarne i meccanismi molecolari potenzialmente legati ad effetti dannosi per gli ecosistemi e per l'uomo. Gli xenoestrogeni, molecole in grado di mimare gli estrogeni naturali, rappresentano una delle categorie più interessanti di EDCs, visto che l'esposizione umana a tali sostanze potrebbe essere causa di molte patologie, in modo particolare alcuni tumori collegati agli ormoni (es. cancro al seno, all'endometrio, alla prostata). Evidenze epidemiologiche e dati ottenuti sia *in vivo* che *in vitro*, suggeriscono una possibile relazione tra xenoestrogeni e sviluppo di patologie prostatiche (Koutros et al., 2010; Alavanja et al., 2003). La prostata, ghiandola importante per la fertilità dei mammiferi, risponde sia a stimoli androgenici che estrogenici. Disequilibri ormonali tra androgeni ed estrogeni possono essere la causa di una crescita aberrante e di stati patologici della prostata, cancro incluso. Tuttavia, sono ancora poco noti gli esatti pathway molecolari con i quali la prostata risponde a estrogeni e xenoestrogeni. Le difficoltà risiedono soprattutto nell'impossibilità di trovare validi modelli sperimentali *in vivo* che presentino una ghiandola con caratteristiche simili a quella umana, fatta eccezione per alcuni topi transgenici (Grabowska et al., 2014). Considerato questo background e data l'esposizione umana agli EDCs, in questo lavoro ho studiato gli effetti del nonilfenolo, un noto inquinante ubiquitario ad azione estrogenica, su due linee cellulari di prostata umana, le PNT1A (non tumorigeniche) e le LNCaP (adenocarcinoma prostatico umano), andando a valutare gli effetti sulla proliferazione cellulare, l'interazione con i recettori per gli estrogeni (ER) e il possibile coinvolgimento di risposte non genomiche, come la variazione di messaggeri intracellulari come AMP ciclico (cAMP) e Calcio (Ca^{++}). Sulle LNCaP è stata studiata inoltre l'espressione della ciclina D1, un noto target di responsività agli estrogeni, coinvolto anche in patologie prostatiche.

Parallelamente, nei vari esperimenti, le cellule sono state trattate con l'ormone endogeno 17 β -estradiolo, al fine di verificare analogie o meno tra le due sostanze, e co-esposte con l'inibitore selettivo per gli estrogeni ICI 182,780. Il fine di questo studio è quello di aumentare le conoscenze sui meccanismi molecolari con i quali xenoestrogeni ed estrogeni esplicano i loro effetti biologici sulla prostata.

CAPITOLO VII

MATERIALI E METODI

7.1 Colture cellulari

Per la realizzazione degli studi *in vitro*, sono state allestite colture cellulari di cellule epiteliali di prostata umana (PNT1A) (ECACC Salisbury, UK) e di cellule di adenocarcinoma prostatico umano (LNCaP) (ATCC® CRL-1740™). Composizione dei terreni di coltura utilizzati: PNT1A: RPMI-1640 (Lonza), 10% FBS (siero fetale bovino) (Sigma Aldrich), 2 mM L-glutamina (Euroclone), 100 U/mL penicillina/streptomicina (Lonza), 40µg/mL gentamicina (Euroclone); LNCaP: RPMI-1640, 10% FBS, 2mM Sodio Piruvato (Euroclone), 2 mM L-glutamina, 1% aminoacidi non essenziali (NEA), 100 U/mL penicillina/streptomicina, 40µg/mL gentamicina. Le cellule crescono adese alla superficie (fenotipi epithelial like) di flask da 25cm² e 75 cm² (Sarstedt), capsule Petri da 100 mm (Sarstedt), il terreno di coltura cambiato ogni due giorni e sono tenute in un incubatore ad umidità controllata a 37 °C e con il 5% CO₂. Raggiunta la confluenza del 70%, le cellule sono state staccate enzimaticamente con 0,25% di tripsina/EDTA (Invitrogen) e fatte crescere nei supporti utilizzati per i vari esperimenti: multiwell da 96 pozzetti per i saggi MTT e per i saggi spettrofluorimetrici, multiwell da 24 pozzetti per i saggi del cAMP, chamber slide (Nunc, Labtek) per gli esperimenti di immunofluorescenza e capsule Petri da 100 mm per l'estrazione proteica e dell'RNA. Per gli esperimenti sono state utilizzate cellule che hanno subito da 6 a 15 e da 7 a 13 passaggi per le PNT1A e per le LNCaP, rispettivamente.

7.2 Sostanze chimiche

Il nonilfenolo (NP) (Sigma 290858), il 17β-estradiolo (E2) (sigma E8875), l'inibitore selettivo degli estrogeni ICI 182,780 (ICI) (SIGMA I4409) sono stati sciolti in DMSO (Sigma D8418) e poi diluiti nel terreno di coltura RPMI-1640

privo di FBS (RPMI-1640- serum free) e di rosso fenolo alle concentrazioni utilizzate nei vari esperimenti. Nel gruppo controllo, le cellule sono state trattate esclusivamente con 0,01 % DMSO in RPMI – serum free.

7.3 Saggi MTT

La citotossicità *in vitro* del NP e dell'E2 è stata valutata utilizzando il test (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro) MTT (Cayman Chemicals). Il saggio dipende dalla capacità riduttiva cellulare di metabolizzare l'MTT ad un prodotto di formazano altamente colorato. Le cellule sono state fatte crescere in piastre da 96 pozzetti (3×10^4 cellule/pozzetto) in 200 μ L di terreno di coltura completo. Ad adesione avvenuta, sono state ormonalmente deprivate (RPMI – serum free) per 24 h. Dopo, il NP e l'E2 sono stati diluiti a diverse concentrazioni (da 10^{-6} M a 10^{-12} M) con o senza l'aggiunta di ICI (10^{-7} M). Il tempo di esposizione alle sostanze è stato di 24 h. Dopo il periodo di incubazione, sono stati aggiunti 10 μ L di MTT ad ogni pozzetto e le cellule sono state incubate per 4h a 37 °C. Successivamente, il terreno di coltura è stato rimosso delicatamente e rimpiazzato da 100 μ L di Crystal Dissolving Solution (a base di isopropanolo acido) allo scopo di sciogliere i cristalli di formazano, producendo una soluzione di color viola. Per le misurazioni di assorbanza è stata effettuata una lettura spettrofotometrica a 570 nm utilizzando un lettore di piastre. L'assorbanza di tale composto solubilizzato è direttamente proporzionale all'attività metabolica ed alla vitalità cellulare. Sono stati eseguiti tre saggi e per ogni classe sperimentale il test è stato eseguito in triplicato.

7.4 Immunofluorescenze

Per la localizzazione dei recettori degli estrogeni ER α e ER β è stata effettuata un'immunofluorescenza indiretta. Le cellule sono state fatte crescere in chamber slide da quattro pozzetti (Nunc Lab-Tek Chamber slide) alla densità di 5×10^4 cellule/pozzetto. Ad adesione avvenuta, sono state deprivate di FBS per 24h. Il giorno successivo le cellule sono state trattate con NP ed E2 (PNT1A: 10^{-6} M NP

e 10^{-6} M E2) (LNCaP: 10^{-10} M NP e 10^{-9} M E2) e tale trattamento è stato effettuato sia in presenza che in assenza dell'inibitore ICI (10^{-7} M). Il trattamento è stato ripetuto per due differenti tempi di incubazione: 2h e 6h. Le cellule controllo, sono state trattate con DMSO allo 0,01% in terreno di coltura. A trattamento terminato, le cellule sono state fissate con metanolo freddo per 10 minuti a temperatura ambiente, permeabilizzate con Triton X-100 allo 0,4% in PBS per 10 minuti, lavate con 0,1% Triton X-100 in PBS (T-PBS) e trattate con normal goat serum (NGS) 5% per 30 minuti a temperatura ambiente, per il bloccaggio dei siti aspecifici. Successivamente, è avvenuta l'incubazione con l'anticorpo primario overnight a 4°C. Gli anticorpi primari utilizzati sono rabbit polyclonal anti-human ER α (Santa Cruz – sc544) e rabbit polyclonal anti-human ER β (Santa Cruz sc-8974), diluiti 1:200 in 1% NGS T-PBS. Nel controllo negativo è stato omesso l'anticorpo primario. Il giorno successivo, dopo tre lavaggi in T-PBS, le cellule sono state incubate con un anticorpo secondario anti-rabbit Alexa Fluor 488 (Invitrogen) per un'ora al buio. L'anticorpo secondario è stato diluito 1:400 in 1% NGS T-PBS. Rimossa la soluzione di anticorpo secondario, sono stati effettuati tre lavaggi in PBS ciascuno da cinque minuti, al buio, per eliminare l'anticorpo fluorescente che non si è legato; le cellule sono state poi trattate con 1 μ g/mL Hoechst (Invitrogen) per due minuti, al fine di evidenziare i nuclei in fluorescenza. Le osservazioni sono state eseguite con un microscopio Axioskop (Carl Zeiss) equipaggiato ad epifluorescenza, con l'obiettivo 40x, utilizzando due filtri differenti: quello per l'Hoechst 33258 e quello per l'Alexa Fluor 488, che emettono, rispettivamente, nel blu (eccitazione: 360 nm, emissione: 452 nm) e nel verde (eccitazione: 488 nm, emissione: 530 nm). Le immagini sono state acquisite mediante una videocamera AxioCam MRc5 (Carl Zeiss) ed il software Axiovision 4.7 (Carl Zeiss). Per i diversi gruppi sperimentali sono stati scelti campi simili per densità cellulare. Per ogni condizione sperimentale sono state ripetute tre immunofluorescenze e sono stati scelti a caso diversi campi per l'analisi dei dati. Successivamente le immagini acquisite sono state corrette per luminosità e contrasto e processate mediante il software Image J.

7.5 Estrazione proteica

Per l'isolamento delle proteine citoplasmatiche e nucleari sono stati preparati buffer differenti. All'Harvest buffer (10 mM HEPES a pH 7.9, 50 mM NaCl, 0,5

M saccarosio, 0,1 mM EDTA, 0,5% Triton X-100) sono stati aggiunti 1mM DTT, 10 mM pirofosfato di tetrasodio, 100 mM NaF, 1 mM PMSF, 4 mg/ml Aprotinina e 2 mg/ml Pepstatina A. Al tampone A (10 mM HEPES a pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1mM EDTA, 0.1 mM EGTA) sono stati aggiunti 1mM DTT, 1mM PMSF, 4mg/mL Aprotinina and 2mg/mL Pepstatina A. Al Buffer C (10mM HEPES pH 7,9, 500mM NaCl, 0.1mM EDTA, 0.1mM EGTA,0.1% NP-40) sono stati aggiunti 1mM DTT, 1mM PMSF, 4mg/mL Aprotinina e 2mg/mL Pepstatina A. Le capsule Petri con adese le PNT1A, per le classi sperimentali controllo e trattate con NP (10^{-6} M) ed E2 (10^{-6} M), dopo 2 e 6 ore di esposizione, sono state poste per 10 minuti in ghiaccio. Dopo due lavaggi in PBS freddo, sono stati aggiunti 100 μ l di PBS-EDTA 1 mM e le cellule sono staccate meccanicamente dal fondo delle dish, raccolte e centrifugate a 3000 rpm per 5 minuti a 4°C e poi risospese nell'harvest buffer freddo. Sono state poi incubate in ghiaccio per 5 minuti e sottoposte ad una centrifuga a 1000 rpm per 10 minuti, per far sedimentare i nuclei. Il surnatante ottenuto (estratto citoplasmatico) è stato poi centrifugato a 14000 rpm per 15 minuti, per purificarlo. Il pellet (estratto nucleare) è stato poi risospeso nel Buffer A e centrifugato a 1000 rpm. Al nuovo pellet, ottenuto nel passaggio precedente, è stato poi aggiunto il Buffer C per 15 minuti a 4°C. Tale soluzione è stata poi centrifugata a 14000 rpm per 10 minuti a 4°C. Il surnatante ottenuto, contenente l'estratto nucleare, è stato trasferito in una nuova provetta. La concentrazione proteica, degli estratti nucleari e citoplasmatici è stata determinata mediante lettura spettrofotometrica, utilizzando il metodo Pierce (Thermo). Tale valutazione è stata effettuata in triplicato.

7.6 SDS-PAGE e western blot per ER α , ER β

Le proteine estratte (50 μ g totali per ogni classe sperimentale) sono state separate mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide (SDS-PAGE) al 10% in condizioni denaturanti e trasferiti su una membrana di nitrocellulosa. Proteine a peso molecolare noto sono state utilizzate come scala di riferimento (ProSieve™ QuadColor™ protein marker, che permette di discriminare proteine da 4.6 a 300 kDa). In seguito all'elettroforesi, un gel è stato colorato con Blu Coomassie (Biorad), l'altro è stato trasferito (Transfer Kit Biorad) su filtro di nitrocellulosa

(Schleicher e Schuell) a 400 mA per 2h a 4°C; le proteine trasferite sono state visualizzate mediante colorazione con Rosso Ponceau (Sigma-Aldrich), al fine di verificare possibili errori nel caricamento. Le membrane di nitrocellulosa sono state trattate con 5% di latte in TBS-Tween per 2 ore a temperatura ambiente, per bloccare i siti aspecifici. In seguito è stata effettuata un'incubazione con gli anticorpi primari anti-ER α (1:500), anti-ER β (1:500) e con anti- β -tubulina (1:2000) e anti-HDAC 2 (1:2000) in TBS-Tween e latte allo 0,25%, 4°C overnight. E' seguita poi la rilevazione mediante l'utilizzo di anticorpo secondario accoppiato a perossidasi di rafano e visualizzato con chemiluminescenza (Amersham). La purezza delle frazioni nucleari e citoplasmatiche è stata confermata utilizzando anti-HDAC 2 e anti- β -tubulina. I dati sono stati analizzati utilizzando il software ImageJ (sviluppato da Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA) per determinare la densità ottica (OD) delle bande. I valori di OD sono normalizzati sulla β -tubulina per le proteine citoplasmatiche e HDAC-2 per le proteine nucleari. I controlli negativi sono stati ottenuti attraverso l'omissione dell'anticorpo primario. Ogni western blotting è stato eseguito in duplicato, per tre trattamenti indipendenti.

7.7 Real Time PCR (qPCR)

E' stata valutata l'espressione del gene della ciclina D1 sulle cellule LNCaP in seguito al trattamento per 24h con E2 10^{-9} M e NP 10^{-10} M dopo che le cellule sono state deprivate di FBS per 24h. Il trattamento è stato eseguito in triplicato. L'mRNA totale è stato estratto utilizzando il Pure Link RNA mini kit (Catalog no. 12183020; Ambion Life Technologies) seguendo le indicazioni per cellule aderenti. Successivamente, l'RNA estratto è stato purificato con DNAsi (Catalog no. 1907, Ambion, turbo DNA-free) e quantizzato mediante lettura al nanodrop (letture 260 nm e 280 nm). Inoltre, al fine di verificare che l'RNA totale estratto fosse integro, è stata eseguita una migrazione elettroforetica dell'RNA totale su gel di agarosio in formaldeide. Per ogni classe sperimentale, è stato retotrascritto 1 μ g di RNA mediante il kit Invitrogen Super Script II Reverse Transcriptase. Le reazioni di Real Time PCR sono state eseguite utilizzando l'Applied Biosystem 7500 con il SYBR Green Master Mix PCR (Applied Biosystems) effettuando un

triplicato tecnico. I dati di qPCR sono stati normalizzati con il metodo del ΔCt (ΔCt è il Ct del gene target sottratto dal Ct del gene housekeeping) usando come gene housekeeping il gene HPRT1; l'analisi dell'espressione genica relativa è stata effettuata con il metodo $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak e Schmittgen, 2001). L'analisi statistica (Anova test con correzioni Bonferroni) è stata effettuata sulla media $\pm SEM$ del $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ottenuto nei tre differenti esperimenti e considerata significativa per $P < 0.05$. (coppie di primer utilizzate: ciclina D1: FW 5'-CGTGGCCTCTAAGATGAAGGA-3' REV 5'-CGGTGTAGATGCACAGCTTCTC-3'; HRPT1: FW 5'-CGTCTTGCTCGAGATGTGATG-3' REV 5'-GCACACAGAGGGCTACAATGTG-3').

7.8 Misure di Ca^{2+} intracellulare

Per la valutazione del Ca^{2+} intracellulare a seguito del trattamento delle LNCaP con NP (10^{-6} e 10^{-10} M) ed E2 (10^{-6} e 10^{-9} M), in presenza o in assenza di ICI (10^{-7} M) è stata utilizzata la sonda fluorescente Quest Fluo-8H (QF8) (Catalog No. 21091, AAT Bioquest), in grado di emettere nelle lunghezze d'onda del verde (Eccitazione: 450 nm; Emissione: 514 nm). Le LNCaP sono state fatte crescere in multiwell da 96 pozzetti a fondo bianco (3×10^4 cell/well). Ad adesione avvenuta, le cellule sono state incubate per 30 minuti a $37^\circ C$ con la sonda QF8 (3 μM), sciolta in PBS + Probenecid 0,2 mM (probenecid; Catalog No. 20060, AAT Bioquest). Dopo aver eliminato la sonda in eccesso, attraverso due lavaggi veloci in PBS, le LNCaP sono state trattate con 50 μL delle sostanze in esame, alle concentrazioni sopra riportate, sciolte in RPMI-serum free privo di rosso fenolo, e la piastra è stata immediatamente letta a 514 nm con lo strumento TECAN Infinite-Pro 200 e i dati relativi sono stati ottenuti mediante il software EVO logic. La calibrazione degli esperimenti di fluorescenza è stata effettuata secondo il metodo di Grynkiewicz et al. (1985) nel quale la concentrazione di calcio intracellulare, espressa in nM, è determinata dalla seguente equazione:

$$[Ca]_{free} = Kd[F - F_{min}] / [F_{max} - F]$$

dove Kd è la costante di dissociazione apparente della sonda per il Ca^{2+} (232nM), F è la fluorescenza del nostro campione con la sonda per il Ca^{2+} , Fmin è la fluorescenza in assenza di calcio, Fmax è la fluorescenza della sonda saturata con

il Ca^{2+} . Sono stati eseguiti tre saggi e per ogni classe sperimentale il test è stato eseguito in triplicato.

7.9 Valutazione dei livelli di AMP ciclico (c-AMP)

Le LNCaP sono state fatte crescere in piastre da 24 pozzetti (5×10^4) in terreno completo ed il rilascio di cAMP intracellulare è stato determinato utilizzando un kit Elisa competitivo, seguendo le istruzioni del produttore (Cayman Chemical Item Number 581001). Le LNCaP sono state incubate con NP (10^{-6} M; 10^{-10} M) ed E2 (10^{-6} M; 10^{-9} M) per 30 minuti ed 1 ora (37° C; 5% CO_2). Dopo l'incubazione è stato aggiunto 0,1 M di HCl, i lisati sono stati poi centrifugati a 600 g (a temperatura ambiente) e il surnatante è stato utilizzato per valutare il rilascio di cAMP, mediante una piastra da 96 pozzetti con anticorpi monoclonali di topo anti-IGg di coniglio pre-adsorbiti. I risultati sono stati ottenuti mediante lettura spettrofotometrica a 420 nm e le concentrazioni di cAMP, espresse come pmol/mL ricavate da una retta di taratura.

7.11 Analisi statistica dei dati

Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato. Tutti i dati riportati in grafico sono espressi come media \pm SEM dei tre esperimenti. L'analisi statistica per i saggi MTT, Western Blot, ELISA e Quest Fluor-8H è stata effettuata utilizzando il test non parametrico Mann-Whitney e le differenze sono state considerate significative per $P < 0,05$.

CAPITOLO VIII

RISULTATI

8.1 Trattamento PNT1A

8.1.1. Saggi MTT

Come primo passo è stata posta l'attenzione sulla variazione della vitalità cellulare delle PNT1A in seguito al trattamento per 24h con NP ed E2 (da 10^{-6} M a 10^{-12} M), sia in presenza che in assenza dell'inibitore ICI (10^{-7} M). Tale indagine condotta mediante saggio MTT ha evidenziato un effetto proliferativo del nonilfenolo (**Fig. 8a**) in maniera dose-dipendente. Il NP a tutte le concentrazioni utilizzate determina, infatti, uno stimolo proliferativo sulle PNT1A: tale azione raggiunge il suo massimo effetto alla concentrazione di 10^{-6} M, e continua anche a concentrazioni più basse della sostanza (10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M). Al contrario, le concentrazioni di NP 10^{-10} M, 10^{-11} M e 10^{-12} M non sembrano influenzare la vitalità cellulare; a tali concentrazioni, infatti, i valori di assorbanza sono paragonabili a quelli delle cellule controllo. Il trattamento con l'inibitore ICI riduce gli effetti proliferativi del NP. Anche il trattamento con l'E2 (**Fig. 8b**) influenza in maniera dose-dipendente la proliferazione cellulare. Tale effetto, come riscontrato per il NP, è massimo alla concentrazione di 10^{-6} M, ma si mantiene alto anche a concentrazioni più basse. Il trattamento con l'inibitore ICI provoca una drastica riduzione degli effetti proliferativi indotti dall'E2. Mettendo a confronto i grafici relativi agli esperimenti dei saggi MTT per NP ed E2 (**Fig. 8c**), si può notare come l'azione dell'E2 sulla proliferazione cellulare sia maggiore rispetto a quella dell'interferente endocrino, e persista anche a concentrazioni molto basse della sostanza, come a 10^{-11} M e a 10^{-12} M.

8.1.2. Immunofluorescenza per ER α

E' stato localizzato il recettore degli estrogeni ER α , in seguito al trattamento con NP (10^{-6} M) ed E2 (10^{-6} M) per 2h e 6h. Le immagini di fluorescenza delle cellule

controllo mostrano una localizzazione citoplasmatica del recettore, di preciso nella regione perinucleare, ad entrambi i tempi considerati (**Fig. 9a**; **Fig. 10a**); il trattamento con E2 induce una traslocazione nucleare di ER α sia dopo 2 che dopo 6 h di esposizione (**Fig. 9c**; **Fig. 10c**); nelle immagini relative al NP, invece, osserviamo una localizzazione citoplasmatica di ER α dopo 2h (**Fig. 9b**) e positività nucleare al tempo di 6h (**Fig. 10b**). La distribuzione di ER α nelle cellule trattate con NP ed E2 in presenza dell'antagonista ICI (10^{-7} M) è prevalentemente perinucleare (**Fig. 11**); i nuclei cellulari appaiono, infatti, senza alcun evidente segnale fluorescente nucleare.

8.1.3. Immunofluorescenza per ER β

Come descritto sopra, abbiamo localizzato il recettore degli estrogeni ER β sulle PNT1A in microscopia in fluorescenza dopo trattamento con NP ed E2. Le immagini relative al trattamento per 2h (**Fig. 12**) e 6h (**Fig. 13**) non mostrano nessuna differenza tra cellule controllo e cellule trattate. ER β si localizza infatti nel citoplasma, con scarso segnale fluorescente nei nuclei.

8.1.4. Western blot per ER α e per ER β

Sono state separate le proteine citoplasmatiche dalle proteine nucleari per la localizzazione di ER α ed ER β in seguito al trattamento con E2 (10^{-6} M) ed NP (10^{-6} M) a tempi differenti. Dopo 2 h di esposizione, abbiamo ritrovato ER α (peso molecolare: 66 KDa) espresso negli estratti citoplasmatici delle PNT1A trattate e non trattate, con valori di densità ottica (OD) più bassi nella classe sperimentale E2 (**Fig. 14a** in alto; **Fig. 14b**). Gli estratti nucleari, invece, presentano il segnale per ER α esclusivamente nelle PNT1A trattate con E2, con nessuna banda nelle lane controllo e in quella relativa al NP. L'analisi di western blot, relativa ad ER β (peso molecolare: 56 KDa), allo stesso tempo di esposizione, rileva un segnale soltanto nelle frazioni citoplasmatiche (**Fig. 14a** in basso); il grafico mostra valori più bassi di OD nel gruppo trattato con E2 (**Fig. 14c**). Nessun segnale ritrovato per HDAC2 (55 KDa) e per la β -tubulina (55 KDa) nelle proteine citoplasmatiche

e in quelle nucleari, rispettivamente, ci indica che la separazione proteica è avvenuta correttamente. Dopo 6h di esposizione ad NP e ad E2, osserviamo le bande relative ad ER α sia negli estratti citoplasmatici sia in quelli nucleari (**Fig. 14f** in alto) di tutte e tre le classi sperimentali. Tuttavia, i valori di densità ottica sono più alti nei gruppi trattati con E2 e NP (**Fig. 14d**). Allo stesso tempo, ER β è stato ritrovato soltanto nella frazione citoplasmatica (**Fig. 14f** basso; **Fig. 14e**). È stato effettuato anche un'analisi di western blot per ER α in presenza dell'inibitore ICI (10^{-7} M) (**Fig. 15**), essendo l'unico dei due recettori ritrovato nel nucleo dopo il trattamento con E2 (2h e 6h) ed NP (6h). Notare l'assenza del segnale nucleare nelle PNT1A trattate con E2 + ICI dopo 2h (**Fig. 15a**; **Fig. 15b**). Dopo sei ore di trattamento (**Fig. 15c**; **Fig. 15d**), si osserva, invece, un debole segnale negli estratti nucleari in tutti e tre i gruppi sperimentali, se lo si paragona alle rispettive frazioni citoplasmatiche.

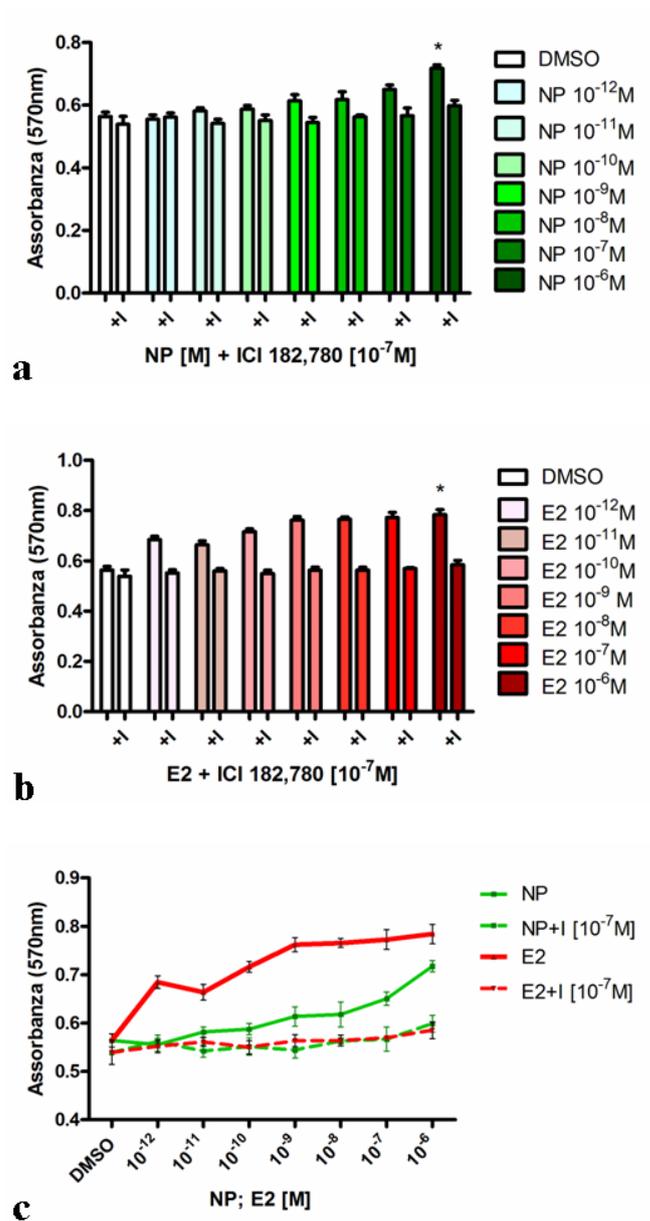


Fig 8 Saggi di proliferazione MTT sulle PNT1A: le cellule sono state esposte per 24 h a concentrazioni crescenti di nonilfenolo (NP) (a) e di 17 β -estradiolo (E2) (b), con o senza l'aggiunta dell'inibitore ICI 182,780 (I). (c): grafici messi a confronto. In grafico sono riportate le medie \pm SEM dei valori di assorbanza di tre esperimenti indipendenti. *P<0,05

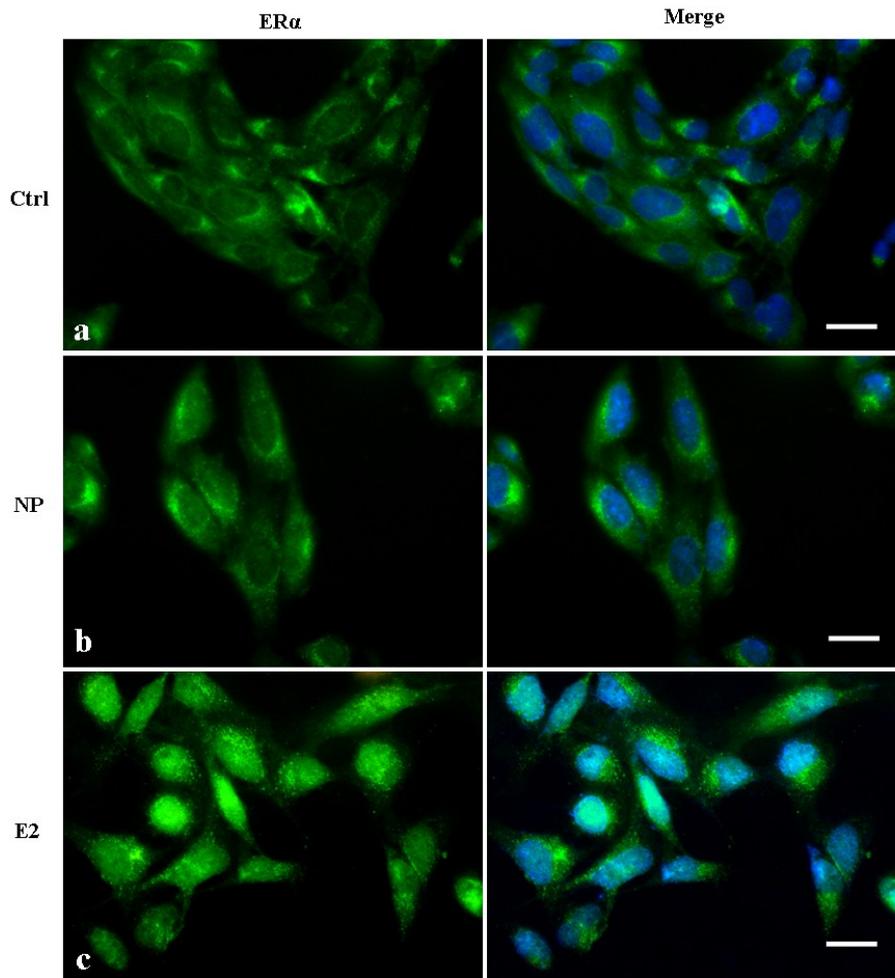


Fig 9 Localizzazione di ER α dopo 2h di esposizione al nonilfenolo (NP) e al 17 β -estradiolo (E2): E2 (c) promuove la traslocazione citoplasma-nucleo di ER α . Le PNT1A sono state fatte crescere in chamber slide e messe in condizioni serum-free. 24 ore dopo, le cellule sono state trattate con 10^{-6} M di NP (b) e 10^{-6} M di E2 (c). Le cellule controllo (a) sono state trattate con DMSO 0,01 %. ER α (Alexa Fluor 488) e i nuclei (Höchst) sono stati analizzati per immunofluorescenza; merge: sovrapposizione dei canali per Alexa Fluor 488 (verde) e Höchst (blu). Scale bar 10 μ m.

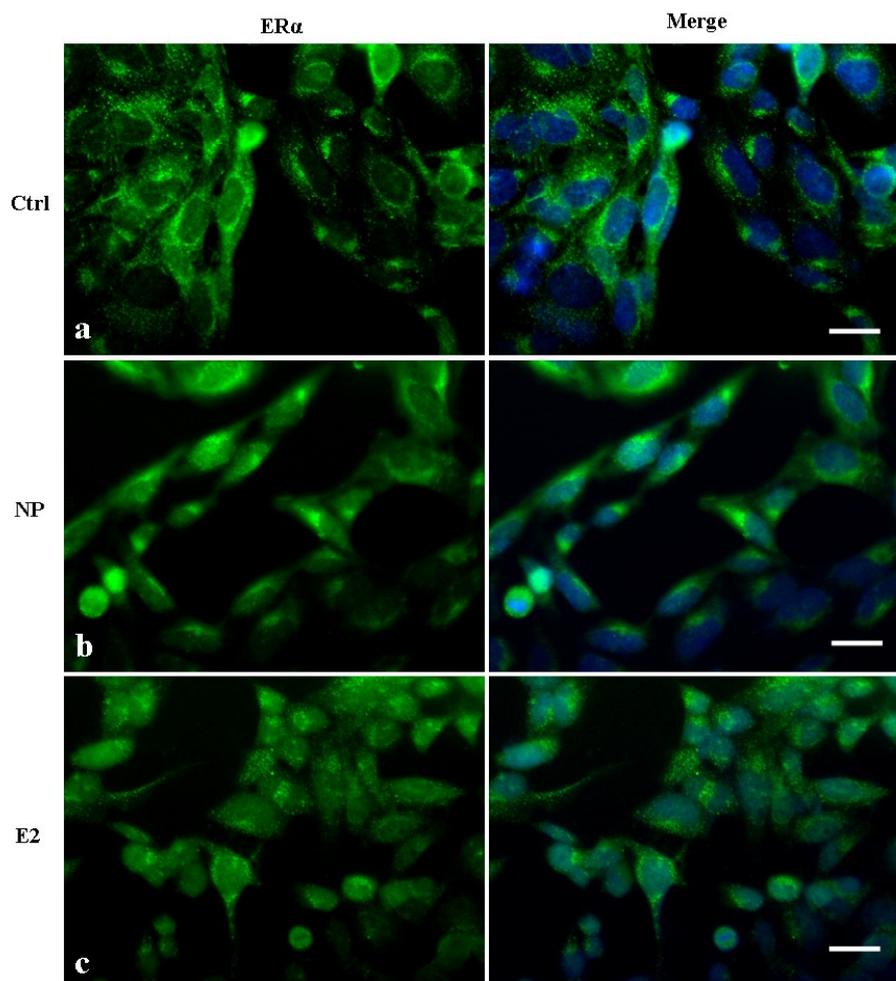


Fig 10 Localizzazione di ERα dopo 6h di esposizione al nonilfenolo (NP) e al 17β-estradiolo (E2): si noti la localizzazione nucleare di ERα a seguito del trattamento con NP (b) e con E2 (c). Le PNT1A sono state fatte crescere in chamber slide e messe in condizioni serum-free. 24 ore dopo, le cellule sono state trattate con 10^{-6} M di NP e 10^{-6} M di E2. Le PNT1A controllo (a) sono state trattate con DMSO 0,01 %. ERα (Alexa Fluor 488) e i nuclei (Höchst) sono stati analizzati per immunofluorescenza. Scale bar 10μm.

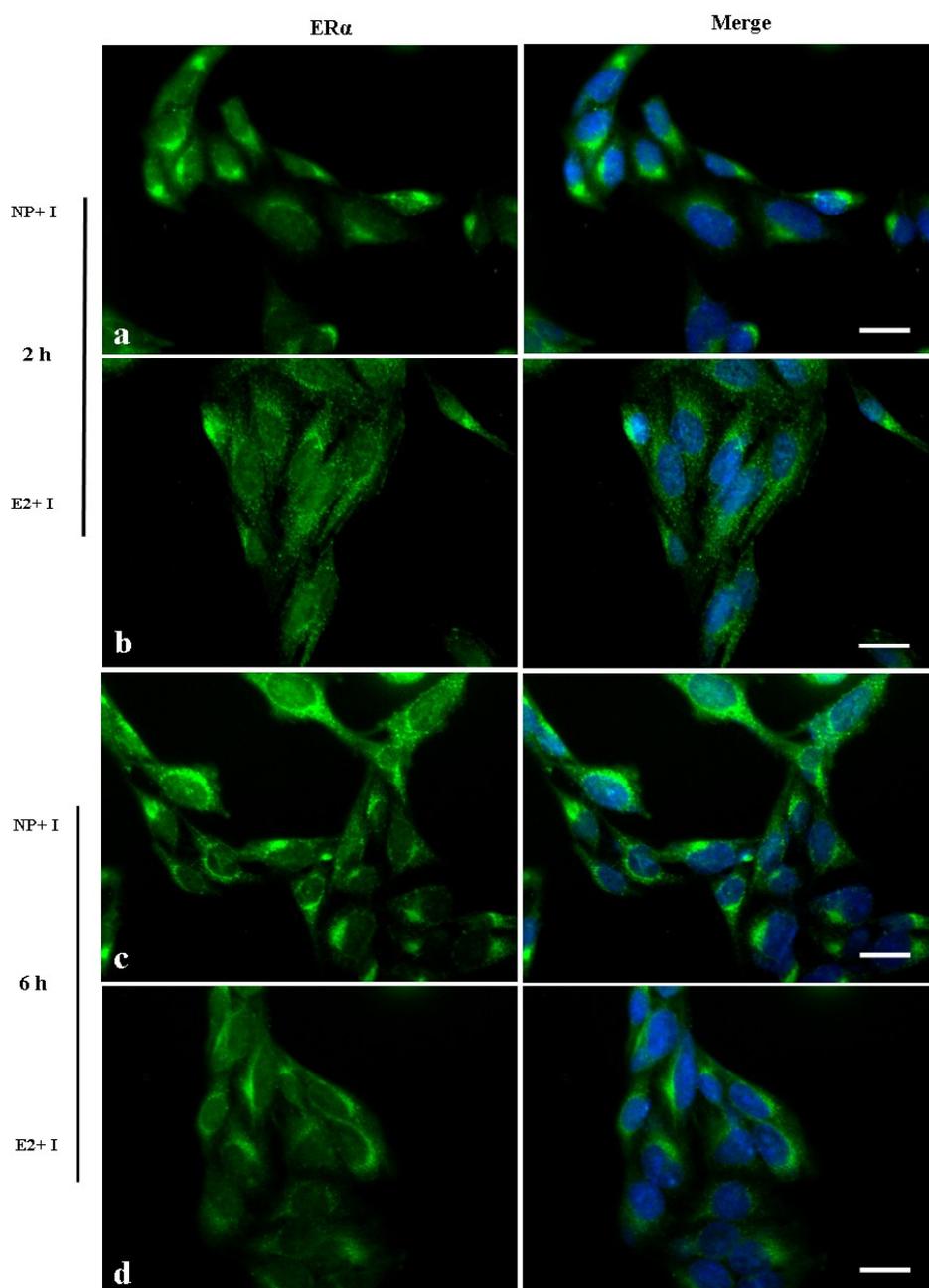


Fig 11 Localizzazione di ER α dopo 2h e 6h di esposizione al nonilfenolo (NP) (a; c) e al 17 β -estradiolo (E2) (b; d) in presenza dell'inibitore ICI 182,780 (I): si noti la localizzazione citoplasmatica di ER α in tutte le immagini mostrate e debole segnale nucleare. Le PNT1A sono state fatte crescere in chamber slide e messe in condizioni serum-free. 24 ore dopo, le cellule sono state trattate con 10^{-6} M di NP e 10^{-6} M di E2 con addizionato 10^{-7} M di ICI. ER α (Alexa Fluor 488) e i nuclei (Höchst) sono stati analizzati per immunofluorescenza. Scale bar 10 μ m.

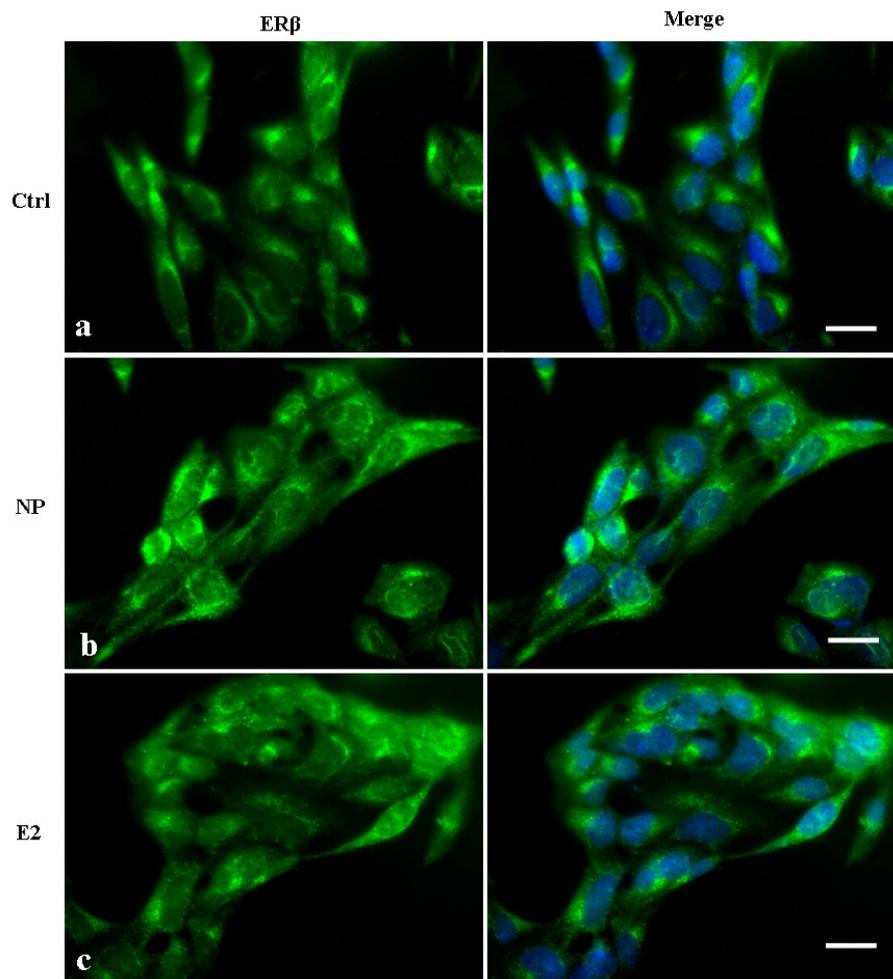


Fig 12 Localizzazione di ERβ dopo 2h di esposizione al nonilfenolo (NP) (b) e al 17β-estradiolo (E2) (c): distribuzione prevalentemente citoplasmatica di ERβ. Le PNT1A sono state fatte crescere in chamber slide e messe in condizioni serum-free. 24 ore dopo, le cellule sono state trattate con 10^{-6} M di NP (b) e 10^{-6} M di E2 (c). Le cellule controllo (a) sono state trattate con DMSO 0,01 %. ERβ (Alexa Fluor 488) e i nuclei (Höchst) sono stati analizzati per immunofluorescenza. Scale bar 10μm.

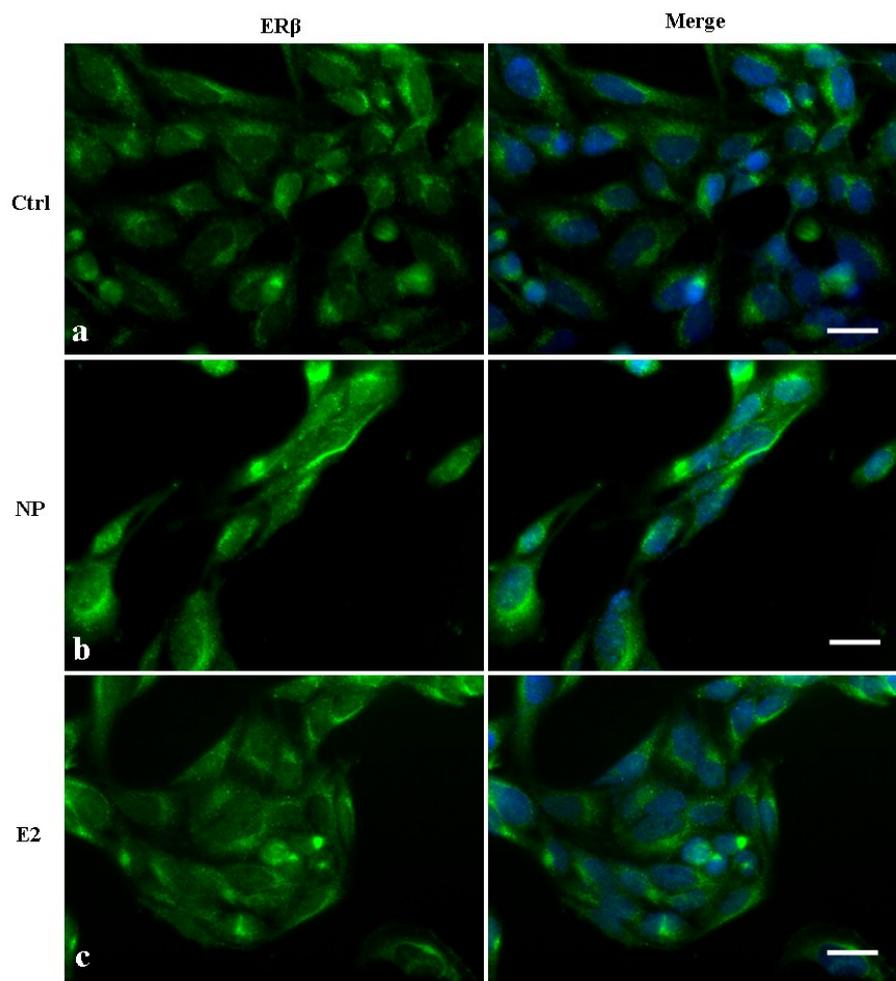


Fig 13 Localizzazione di ERβ dopo 6h di esposizione al nonilfenolo (NP) (b) e al 17β-estradiolo (E2) (c): segnale fluorescente più evidente nelle zone citoplasmatiche. Le PNT1A sono state fatte crescere in chamber slide e messe in condizioni serum-free. 24 ore dopo, le cellule sono state trattate con 10^{-6} M di NP (b) e 10^{-6} M di E2 (c). Le cellule controllo (a) sono state trattate con DMSO 0,01 %. ERβ (Alexa Fluor 488) e i nuclei (Höchst) sono stati analizzati per immunofluorescenza. Scale bar 10μm.

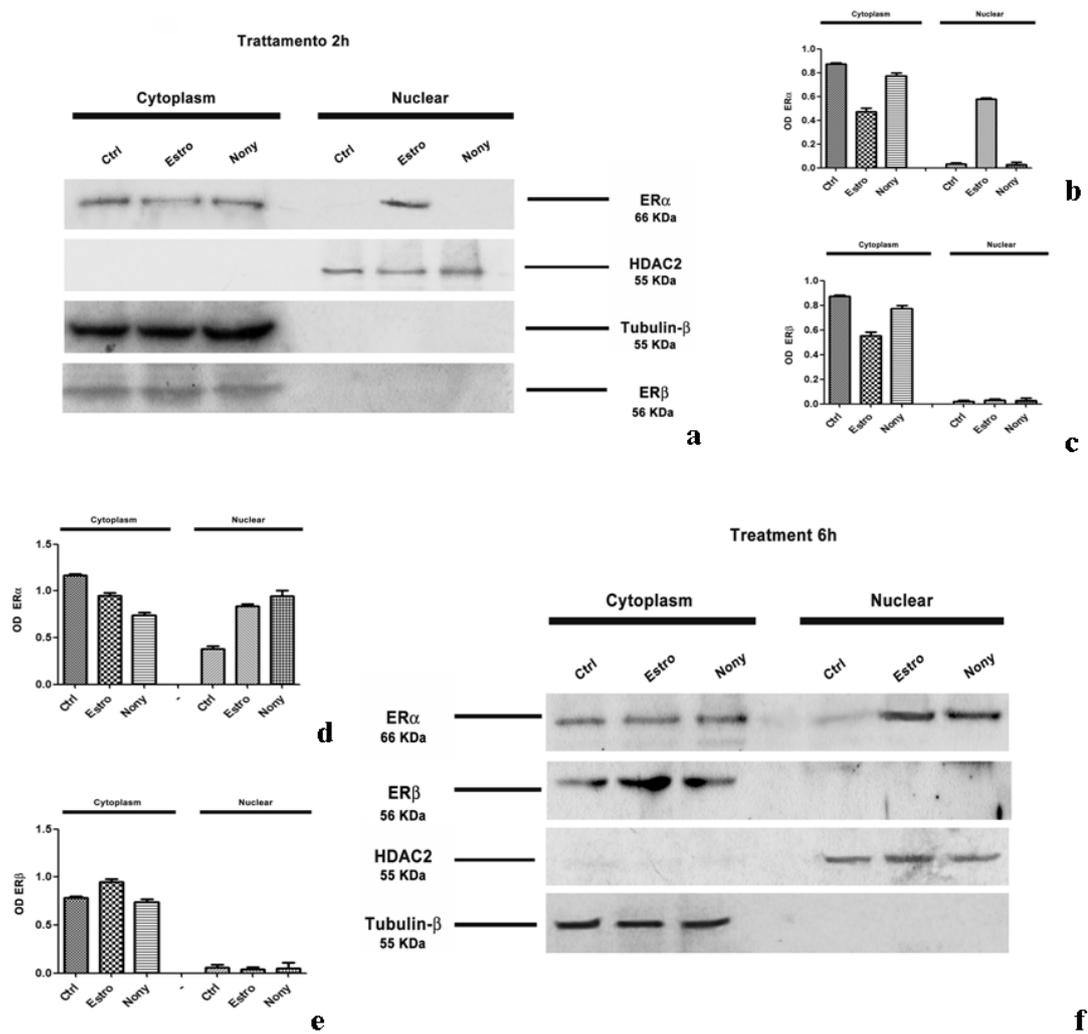


Fig 14 Analisi di Western Blot (SDS PAGE 10%) per ERα e ERβ dopo 2h (a) e 6h (f) di trattamento con Nonilfenolo (Nony) 10^{-6} M e 17β-Estradiolo (Estro) 10^{-6} M. I valori di densità ottica (OD)- 2h: (b),(c) 6h: (d), (e) - sono normalizzati sulla β-tubulina per gli estratti proteici citoplasmatici (cytoplasm) e su HDAC2 per gli estratti nucleari (nuclear). $P < 0,05$

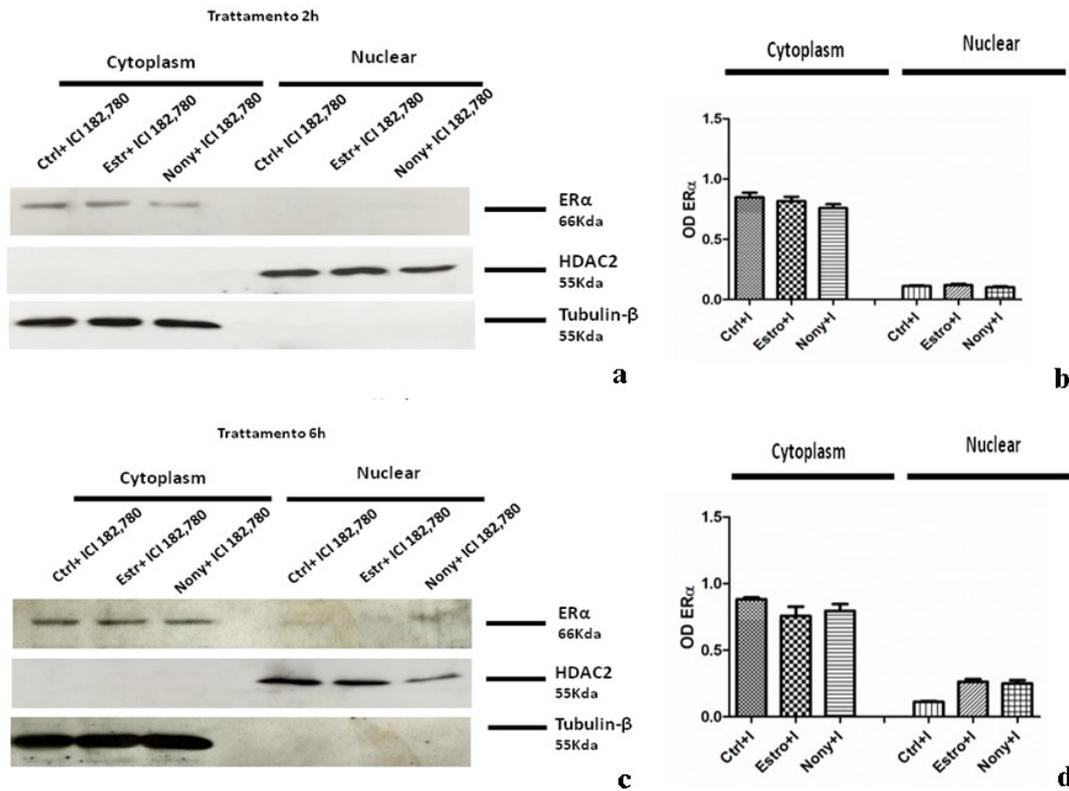


Fig 15 Analisi di Western Blot (SDS PAGE 10%) per ERα dopo 2h (a) e 6h (c) di trattamento con Nonilfenolo (Nony) 10^{-6} M e 17β-Estradiolo (Estro) 10^{-6} M in presenza dell'inibitore ICI 182,780 10^{-7} M (I). I valori di densità ottica (OD)- 2h: (b), 6h: (d)- sono normalizzati sulla β-tubulina per gli estratti proteici citoplasmatici (cytoplasm) e su HDAC2 per gli estratti nucleari (nuclear). $P < 0,05$

8.2 Trattamento LNCaP

8.2.1. Saggi MTT

I grafici relativi al trattamento delle LNCaP con diverse concentrazioni di NP (**Fig. 16a**) ed E2 (**Fig. 16b**) mostrano un effetto di stimolo della proliferazione cellulare dopo esposizione alle due sostanze. Per il NP (**Fig. 16a**), tale effetto si manifesta alle concentrazioni più basse testate; in modo particolare, alla concentrazione di 10^{-10} M si riscontra il massimo effetto, con i valori più alti di assorbanza. L'aggiunta dell'inibitore ICI comporta una riduzione di tale effetto. Le LNCaP trattate con le concentrazioni più alte presentano valori simili a quelli che si osservano per le cellule controllo. L'E2, invece, stimola la proliferazione delle LNCaP a tutte le concentrazioni utilizzate, con il massimo effetto evidenziato a quella di 10^{-9} M (**Fig. 16b**). A questa concentrazione, in presenza di ICI, si riduce l'effetto di E2. Mettendo le due curve a confronto (**Fig. 16c**), si nota un andamento pressoché simile tra le due sostanze, con valori di assorbanza più alti nella curva relativa all'E2.

8.2.2. Immunofluorescenza per ER α

Nel gruppo sperimentale controllo, le cellule LNCaP presentano positività al recettore ER- α , che si localizza a livello citoplasmatico e più precisamente nella zona perinucleare (**Fig. 16a; Fig. 17a**). Il trattamento con NP 10^{-10} M, dopo 2h di esposizione, non altera tale localizzazione perinucleare del recettore α (**Fig. 17b**): i nuclei cellulari, appaiono, infatti, scuri ed il segnale fluorescente si riscontra prevalentemente a livello citoplasmatico; dopo 6h di trattamento, al contrario, è possibile osservare una forte positività nucleare, seppur il segnale fluorescente permanga nel citoplasma (**Fig. 18b**). Il trattamento con E2 (10^{-9} M) sembra indurre una traslocazione di ER α dal citoplasma al nucleo ad entrambi i tempi considerati; come si può notare nell'immagine **Fig. 17c**, l'immunopositività dopo 2h è forte a livello dei nuclei, che appaiono verdi, mentre nel citoplasma il segnale fluorescente è scarso o assente. La sovrapposizione dei canali per Alexa Fluor 488 ed Hoechst, rende ancor più evidente la positività nucleare di ER α dopo trattamento con E2 (**Fig. 17c merge**); al tempo di 6 ore, ER α si localizza nel nucleo delle LNCaP, con un debole segnale citoplasmatico (**Fig. 18c**). In presenza dell'inibitore ICI (10^{-7}) la distribuzione di ER α è

citoplasmatica sia nelle LNCaP trattate con E2 (**Fig. 19b; Fig. 19d**) sia in quelle trattate con il NP (**Fig 19a; Fig. 19c**) ad entrambi i tempi presi in esame (confrontare con le classi senza inibitore).

8.2.3. Immunofluorescenza per ER β

Le cellule controllo mostrano una localizzazione recettoriale citoplasmatica (**Fig. 20a; Fig. 21a**): i nuclei appaiono scuri ed il segnale fluorescente è citoplasmatico. Il trattamento con NP (**Fig. 20b; Fig. 21b**) ed E2 (**Fig. 20c; Fig. 21c**) non comporta alcuna variazione in questa localizzazione. La positività al segnale è infatti prevalentemente perinucleare e paragonabile al gruppo controllo sia dopo 2h che dopo 6h di incubazione.

8.2.4. Espressione della ciclina D1

L'espressione relativa del gene della ciclina D1, normalizzata sul gene housekeeping HPRT1, risulta essere significativamente aumentata nelle LNCaP trattate rispetto alle LNCaP controllo. In modo particolare, il trattamento con l'E2 up-regola la ciclina D1 in maniera maggiore rispetto al trattamento con NP (**Fig. 22**).

8.2.5. Livelli di Calcio (Ca^{2+}) e di AMP ciclico (cAMP)

In **Fig. 23a** sono mostrati i risultati ottenuti dall'indagine condotta, mediante la sonda Quest Fluo-8, sul rilascio di Ca^{2+} intracellulare, in cellule LNCaP, dopo somministrazione di NP alle concentrazioni di 10^{-6} e 10^{-10} M e di E2 alle concentrazioni di 10^{-6} e di 10^{-9} M, in presenza o in assenza dell'inibitore ICI (10^{-7} M). Dall'osservazione dei dati, nelle cellule controllo la concentrazione del Ca^{2+} risulta di 278,665 nM. Il nonilfenolo, usato alle concentrazioni di 10^{-10} M e 10^{-6} M provoca un aumento del Ca^{2+} intracellulare, rispettivamente, a 410,074 nM e a 440,019 nM, mentre in seguito al trattamento con E2 alle concentrazioni di 10^{-9} e 10^{-6} M, la concentrazione del Ca^{2+} risulta ancora maggiore e, aumenta a 431,956 nM e 522,442 nM. L'aggiunta dell'inibitore selettivo per il recettore degli estrogeni riduce la concentrazione di calcio nelle LNCaP trattate con E2, mentre nelle cellule trattate con NP tale diminuzione si manifesta soltanto alla concentrazione più bassa di NP (10^{-10} M). Mediante saggio ELISA competitivo, sono state quantizzate le variazioni

di cAMP in seguito al trattamento a vari tempi (30min e 1h) con diverse concentrazioni di NP (10^{-6} M e 10^{-10} M) e di E2 (10^{-6} M e 10^{-9} M) (**Fig. 23b**). Dal grafico si può notare che il NP 10^{-10} M induce un lieve aumento di cAMP ad entrambi i tempi di esposizione (dopo 30 minuti il cAMP aumenta a 333,5 pmol/ml e dopo 1 h fino a 412,731 pmol/ml), mentre alla concentrazione di 10^{-6} M l'aumento si registra soltanto dopo 1h di esposizione (392,955 pmol/ml). Il trattamento con E2, al contrario, non mostra alcun effetto sul rilascio di cAMP rispetto a quello registrato per le cellule controllo.

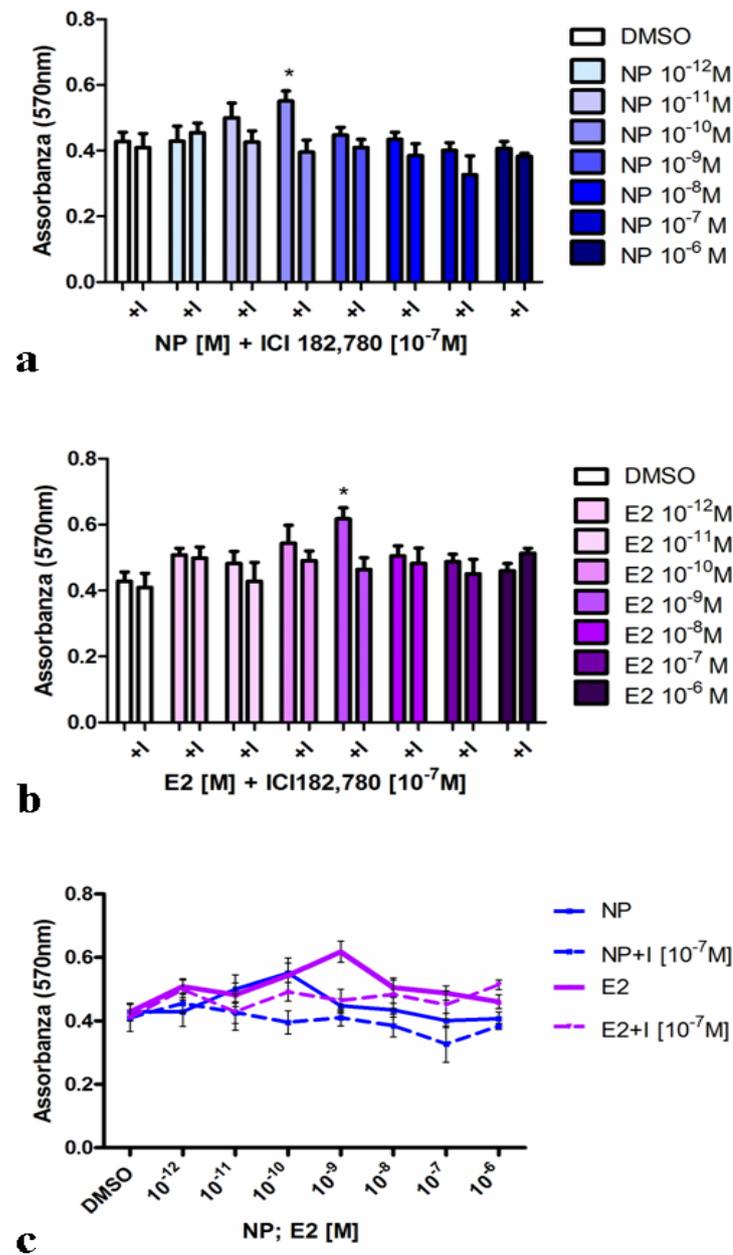


Fig. 16 Saggi di proliferazione MTT dopo 24 ore di esposizione al Nonilfenolo (NP) (a) e al 17 β -estradiolo (b) (Da 10⁻⁶ M a 10⁻¹² M) in presenza o in assenza dell'inibitore selettivo dei recettori degli estrogeni ICI 182,780 (I). Le cellule LNCaP controllo sono state trattate con DMSO 0,01 %. Notare l'effetto proliferativo del nonilfenolo alla concentrazione di 10⁻¹⁰ M e dell'E2 a 10⁻⁹ M. In figura (c) i due andamenti messi al confronto. In grafico sono riportate le medie \pm SEM di tre esperimenti. *P<0,05 rispetto al controllo.

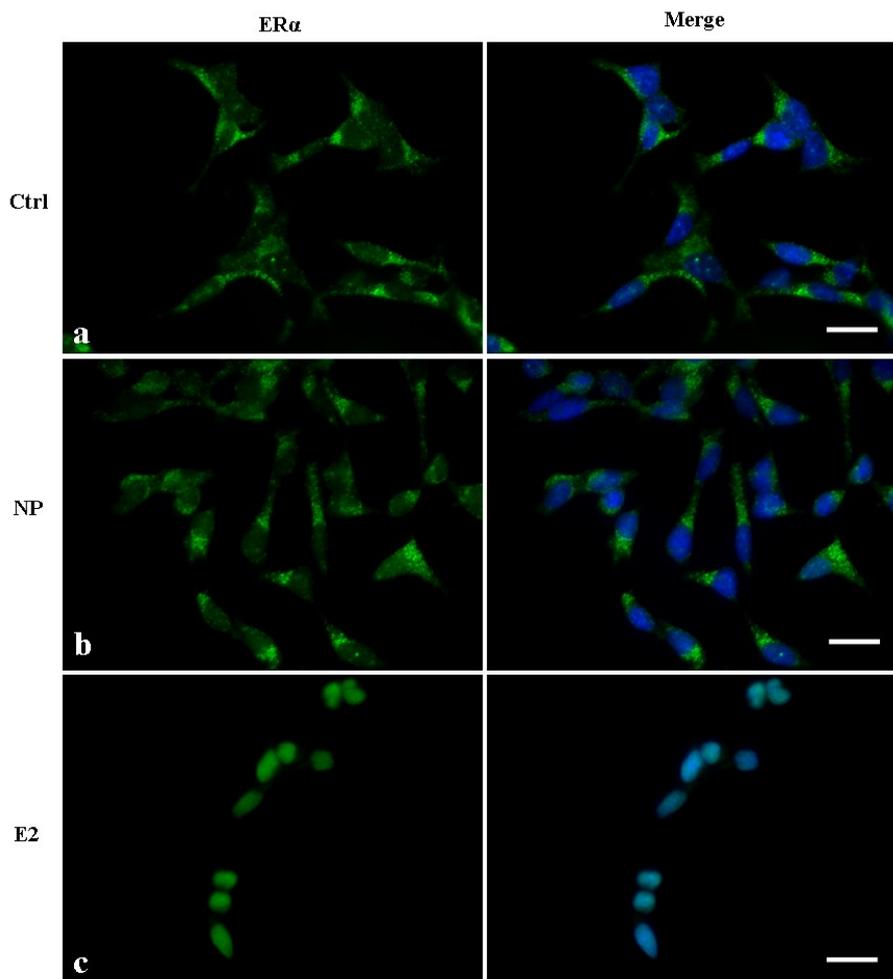


Fig. 17 Localizzazione di ER α in cellule LNCaP dopo 2h di trattamento con Nonilfenolo (NP) (b) e 17 β -Estradiolo (E2) (c). Le cellule LNCaP sono state fatte crescere in chamber slide e dopo essere state deprivate di FBS per 24 ore sono state trattate con il nonilfenolo (10^{-10} M) o con il 17 β -Estradiolo (10^{-9} M). Le cellule controllo sono state trattate con 0,01 % DMSO. Notare la distribuzione prevalentemente citoplasmatica di ER α nelle cellule controllo (a) e nelle LNCaP trattate con NP (b) e nucleare in quelle esposte all'E2 (c). ER α (Alexa Fluor 488) e i nuclei (Höechst) sono stati analizzati attraverso immunofluorescenza. Merge: sovrapposizione dei canali per Alexa Fluor 448 e Höechst. Scale bar 10 μ m

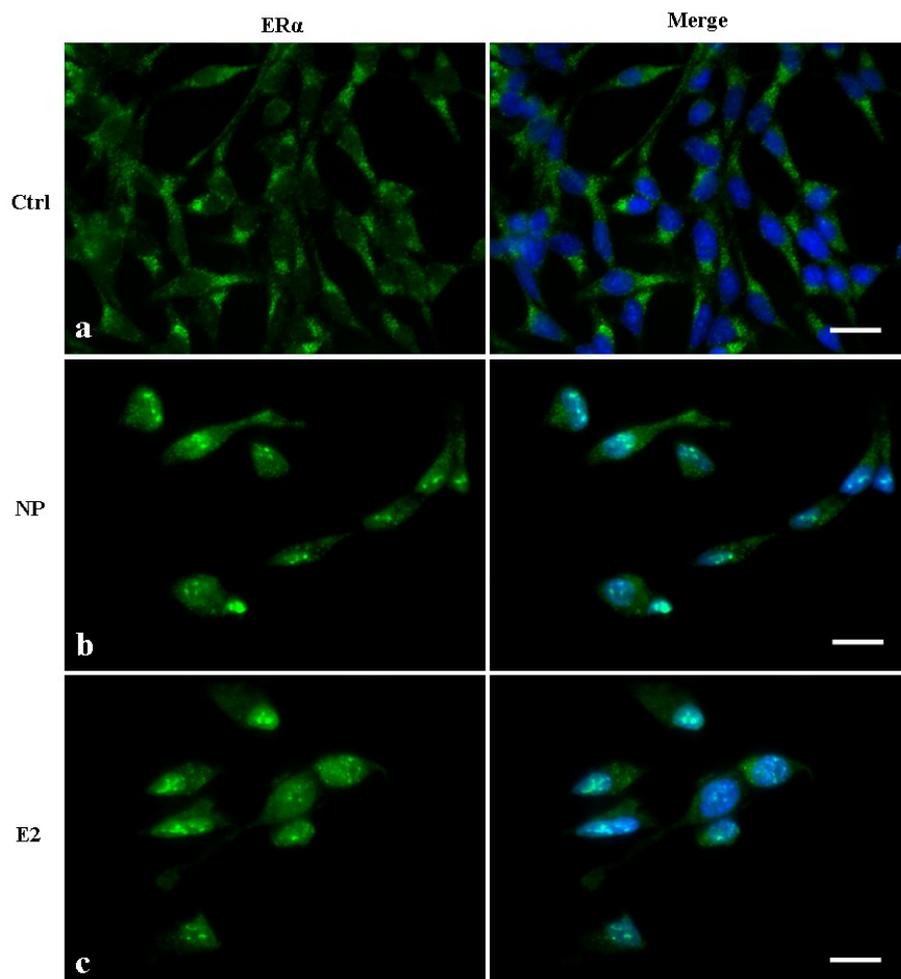


Fig. 18 Localizzazione di ER α in cellule LNCaP dopo 6h di trattamento con Nonilfenolo (NP) (b) e 17 β -Estradiolo (E2) (c). Le cellule LNCaP sono state fatte crescere in chamber slide e dopo essere state deprivate di FBS per 24 ore sono state trattate con il nonilfenolo (10^{-10} M) o con il 17 β -Estradiolo (10^{-9} M). Le cellule controllo (a) sono state trattate con 0,01 % DMSO. Notare il segnale nucleare nelle LNCaP trattate (b, c). ER α (Alexa Fluor 488) e i nuclei (Höchst) sono stati analizzati attraverso immunofluorescenza Scale bar 10 μ m

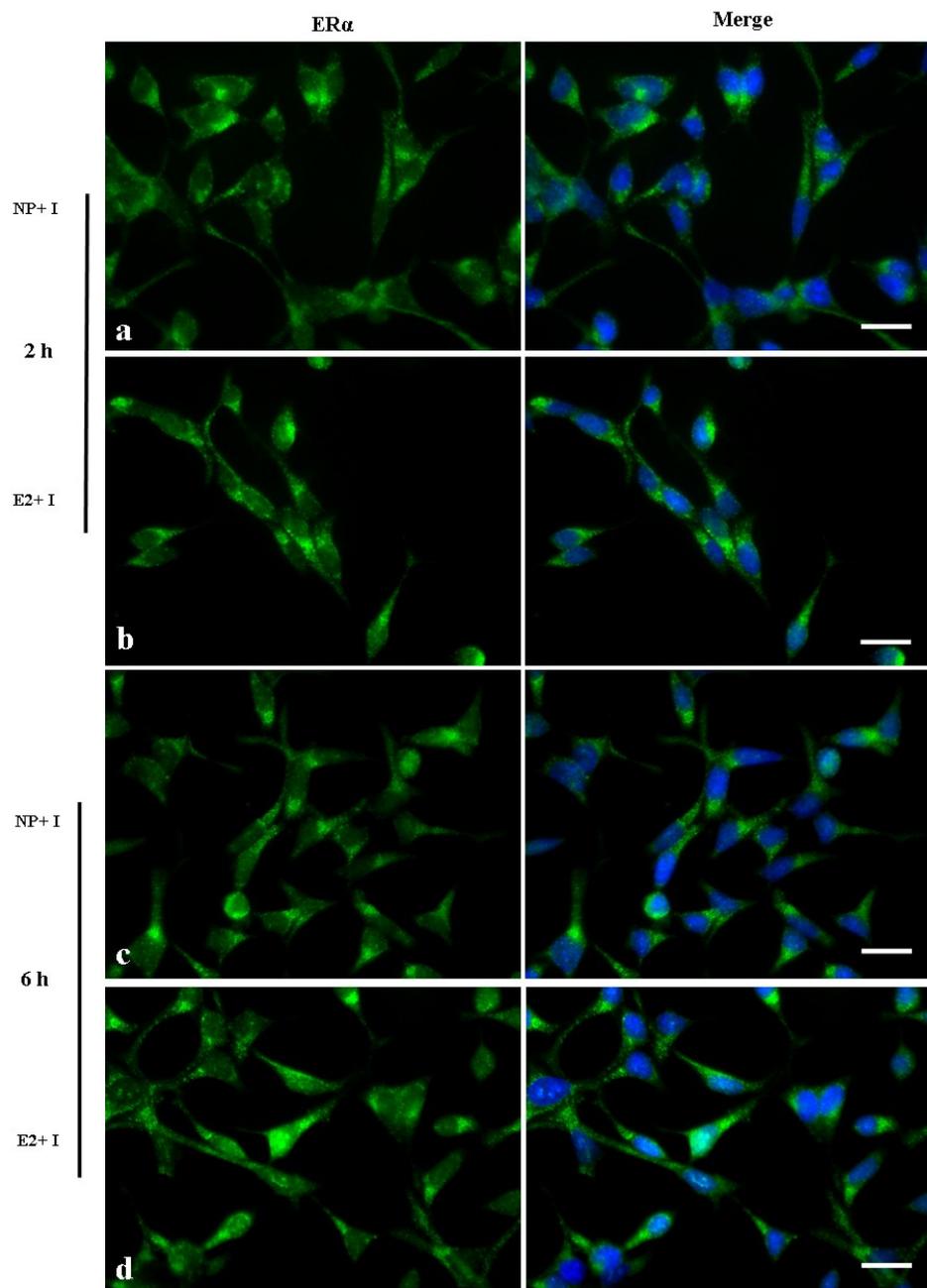


Fig 19 Localizzazione di ER α dopo 2h e 6h di esposizione al nonilfenolo (NP) (a; c) e al 17 β -estradiolo (E2) (b; d) in presenza dell'inibitore ICI 182,780 (I): si noti la localizzazione citoplasmatica di ER α in tutte le immagini mostrate e segnale nucleare presente soltanto in poche cellule. Le LNCaP sono state fatte crescere in chamber slide e messe in condizioni serum-free. 24 ore dopo, le cellule sono state trattate con 10^{-10} M di NP e 10^{-9} M di E2 con addizionato 10^{-7} M di ICI. ER α (Alexa Fluor 488) e i nuclei (Höchst) sono stati analizzati per immunofluorescenza. Scale bar 10 μ m.

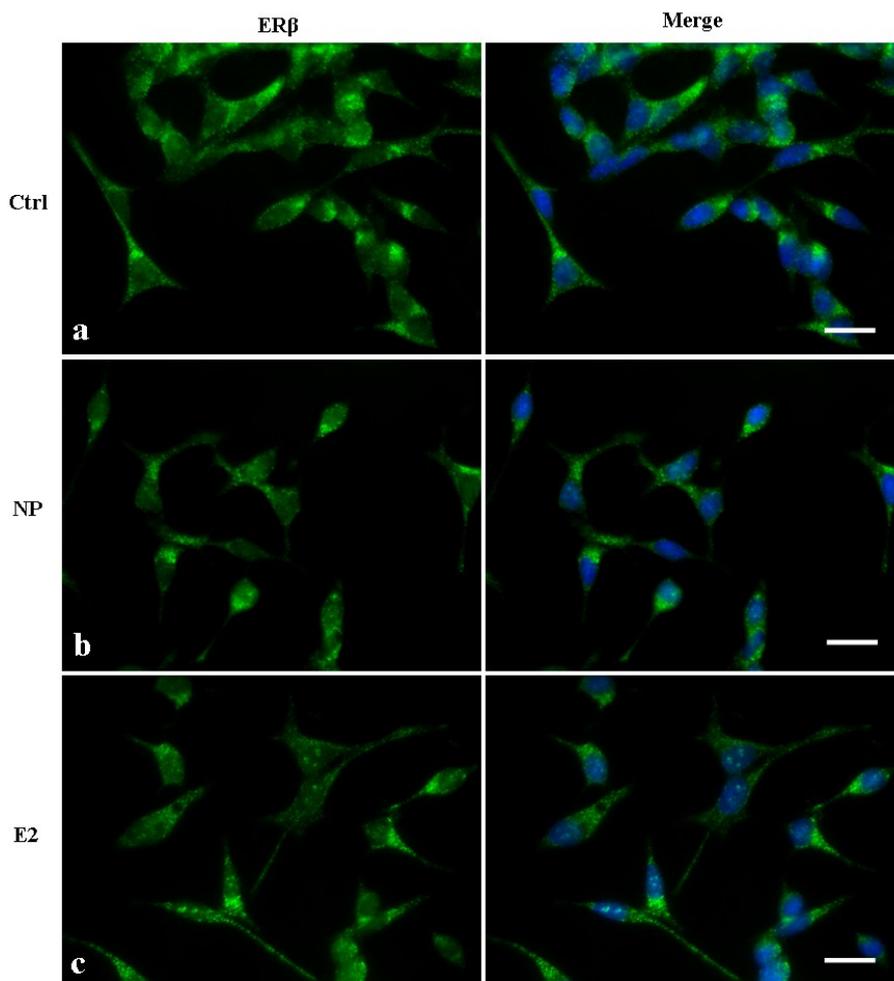


Fig. 20 Localizzazione di ERβ in cellule LNCaP dopo 2h di trattamento con Nonilfenolo (NP) (b) e 17β-Estradiolo (E2) (c). Le cellule LNCaP sono state fatte crescere in chamber slide e dopo essere state deprivate di FBS per 24 ore sono state trattate con il nonilfenolo (10^{-10} M) o con il 17β-Estradiolo (10^{-9} M). Le cellule controllo (a) sono state trattate con 0,01 % DMSO. Segnale fluorescente più evidente nei citoplasmici cellulari. ERβ (Alexa Fluor 488) e i nuclei (Höchst) sono stati analizzati attraverso immunofluorescenza. Scale bar 10μm

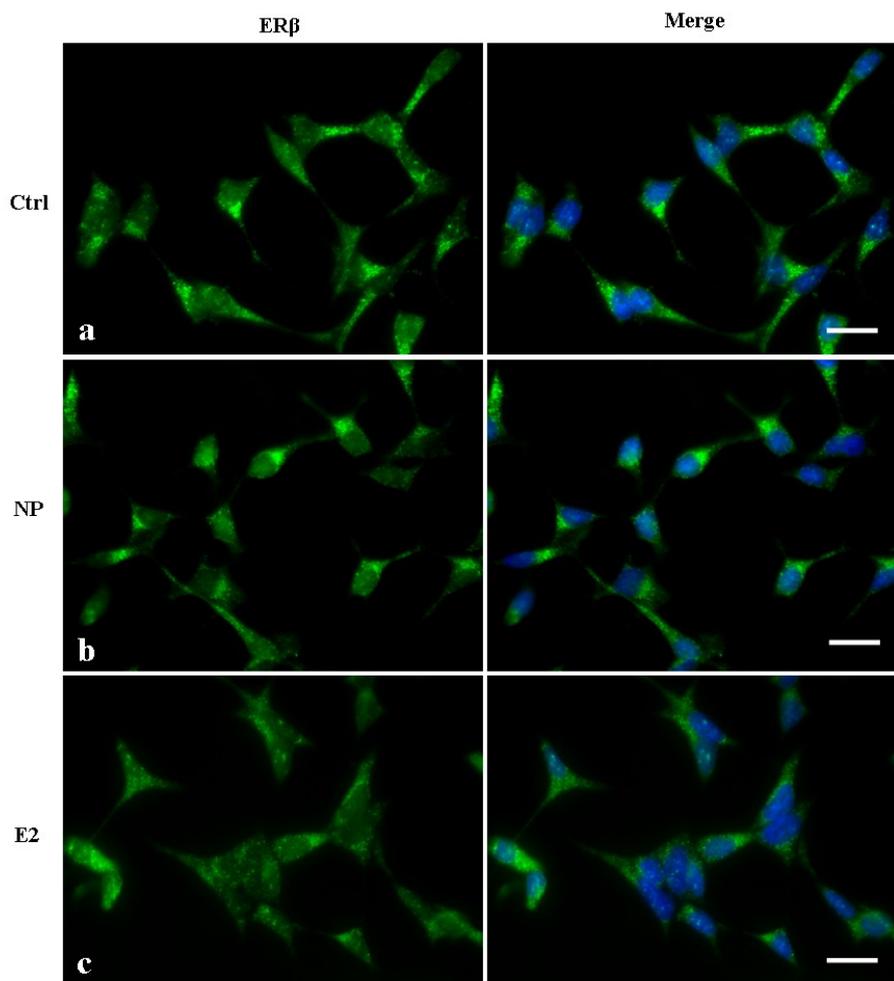


Fig. 21 Localizzazione di ER β in cellule LNCaP dopo 6h di trattamento con Nonilfenolo (NP) (b) e 17 β -Estradiolo (E2) (c). Le cellule LNCaP sono state fatte crescere in chamber slide e dopo essere state deprivate di FBS per 24 ore sono state trattate con il nonilfenolo (10^{-10} M) o con il 17 β -Estradiolo (10^{-9} M). Le cellule controllo (a) sono state trattate con 0,01 % DMSO. Si notino le zone dei nuclei con scarso segnale fluorescente. ER β (Alexa Fluor 488) e i nuclei (Höchst) sono stati analizzati attraverso immunofluorescenza. Scale bar 10 μ m

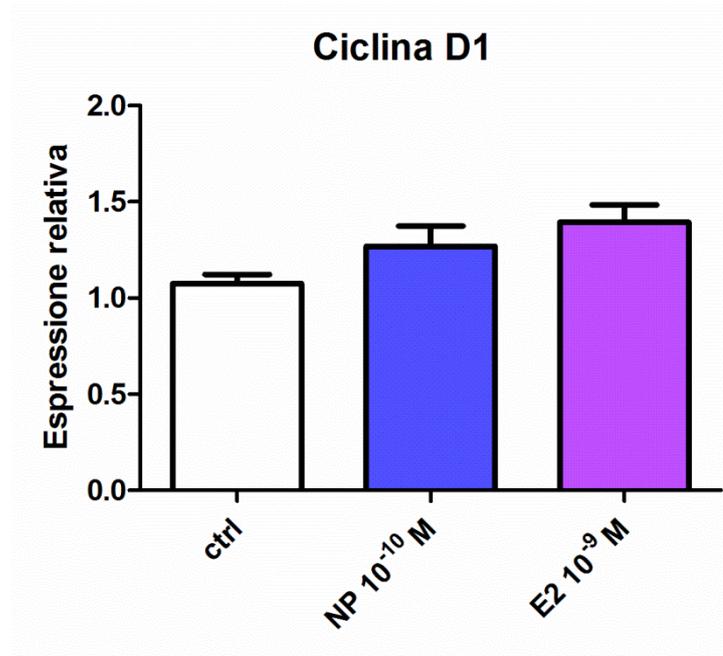


Fig. 22 Real Time PCR per la ciclina D1 su cellule LNCaP dopo 24 h di esposizione al nonilfenolo (NP) 10^{-10} M e al 17β - estradiolo (E2) 10^{-9} M. Notare un lieve incremento di espressione dell'mRNA della ciclina D1 in seguito al trattamento. I valori sono normalizzati utilizzando come gene housekeeping l'HPRT1 e riportati in grafico come media \pm SEM di tre esperimenti indipendenti. I valori tra cellule trattate e cellule controllo sono statisticamente significativi ($P < 0.05$)

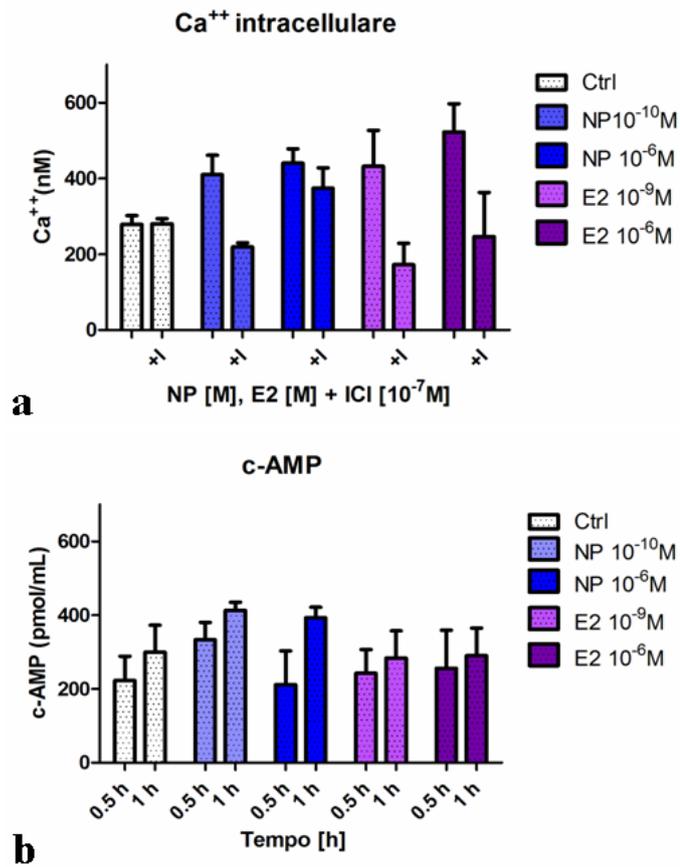


Fig. 23 Valutazione dei livelli di Ca²⁺ (a) e di cAMP intracellulare (b) mediante Quest Fluor 8 e saggio ELISA competitivo, rispettivamente (vedi testo per i dettagli). In grafico sono riportate le medie \pm SEM di tre esperimenti, dopo aver trasformato per il Ca²⁺ i valori di fluorescenza in nM e per il cAMP i valori delle letture a 420nm in pmol/mL. P < 0,05 rispetto al controllo.

CAPITOLO IX

DISCUSSIONI

La classe dei distruttori endocrini (EDCs) è sicuramente la categoria di inquinanti ambientali più studiata dalla comunità scientifica. E' un gruppo eterogeneo di molecole, che comprende una pletera di strutture chimiche abili nell'interferire col sistema endocrino, causando disequilibri ormonali responsabili di differenti patologie in diversi distretti corporei, come la tiroide, l'endometrio, il sistema nervoso centrale ed altri. Tra queste, destano particolare attenzione i mimetici degli estrogeni naturali, conosciuti come xenoestrogeni, in quanto una prolungata esposizione ad essi, in maniera particolare nelle fasi critiche per lo sviluppo di un organismo, potrebbe essere la causa, nelle fasi successive della vita, di problemi al sistema riproduttivo e di tumori collegati agli ormoni (Dairkee et al., 2008; Cook et al., 2007). Il nonilfenolo, noto distruttore endocrino presente in diverse matrici ambientali e in prodotti di uso quotidiano (Colin et al., 2014; Soares et al., 2008), ha dimostrato attività xenoestrogenica sia in test *in vitro* sia in test *in vivo* (Tabata et al., 2001; Soto et al., 1991; Joblin et al., 1996). Tuttavia, sono pochi i dati presenti in letteratura che riguardano i precisi meccanismi molecolari attivati da tale inquinante, in particolar modo quelli relativi ai suoi effetti su modelli di prostata umana. A tal proposito, considerando il ruolo degli estrogeni naturali nella crescita di tale ghiandola e nelle patologie prostatiche, in questo studio abbiamo voluto studiare gli effetti del nonilfenolo su due differenti modelli cellulari di prostata umana: le PNT1A (non tumorali) e le LNCaP (tumorali), linee cellulari accettate ed usate per lo studio degli EDCs, xenoestrogeni inclusi, grazie alla loro sensibilità all'azione degli ormoni steroidei e all'espressione dei recettori per gli stessi (Stephen et al., 2004; He e Falany, 2007; Johnson et al., 2010; Dong et al., 2013). In parallelo, le cellule sono state esposte al 17 β -estradiolo, al fine di verificare analogie e differenze tra estrogeni e xenoestrogeni. I primi risultati evidenti da noi ottenuti, dimostrano, su entrambe le linee, un effetto proliferativo delle sostanze testate dopo 24 h ore di esposizione. Tuttavia, tale effetto si è dimostrato essere cellulo-specifico, in quanto sulle PNT1A è stato di tipo dose-dipendente, con la massima risposta a concentrazioni alte (10^{-6} M), mentre sulle LNCaP è avvenuto a concentrazioni più basse (NP: 10^{-10} M; E2: 10^{-9} M). L'E2 ha provocato uno stimolo proliferativo maggiore se paragonato al NP; in entrambi i casi, tuttavia, l'inibitore selettivo per gli estrogeni ICI 182,780 (Dalvai e Bystricky, 2010) ha parzialmente inibito gli effetti riscontrati dal trattamento con le

sostanze analizzate singolarmente. Questo primo dato conferma l'azione xenoestrogenica del nonilfenolo sui modelli da noi testati ed è in accordo con dati ottenuti su altre linee cellulari dipendenti da estrogeni (Soto et al., 1991; Soto e Sonnenschein, 2010). Il dato più interessante è sicuramente l'effetto biologico visualizzato a concentrazioni relativamente basse sulle LNCaP, quasi a suggerire una modalità dose-risposta non monotonica riscontrata in altri studi sugli EDCs (Vandenberg et al., 2012). Successivamente, è stata posta l'attenzione sul possibile coinvolgimento dei recettori per gli estrogeni (ERs), dopo esposizione per 2h e 6h al NP e all'E2, alle concentrazioni dalle quali abbiamo ottenuto una risposta significativa nei saggi MTT. Attraverso analisi di immunofluorescenza e western blot (per le PNT1A) abbiamo ottenuto risultati simili per le due linee cellulari: una rapida traslocazione (2h) citoplasma-nucleo di ER α dopo trattamento con E2 e una più lenta (6h) dopo aggiunta del NP. Tuttavia, l'azione dell'E2 perdura fino a 6h di esposizione. Come avvenuto per i saggi di proliferazione, la co-esposizione delle due sostanze con ICI 182,780 inibisce questa traslocazione, con ER α che si ridistribuisce nel citoplasma cellulare. Al contrario, la localizzazione del recettore ER β non sembra essere influenzata dal trattamento. La presenza del recettore ER α nel nucleo suggerisce l'attivazione della trascrizione di geni estrogeno-responsivi; è noto dalla letteratura il duplice significato nella prostata dei recettori per gli estrogeni; ER α è implicato, infatti, in processi di crescita cellulare ed è il responsabile di stati patologici (iperplasia prostatica, cancro), mentre ER β ha un ruolo apoptotico e anti-ossidante (Ellem e Risbridger, 2009; Hartman et al., 2012); probabile quindi, che l'effetto proliferativo da noi riscontrato sia imputabile all'interazione del NP e dell'E2 con ER α e non con ER β . Altri studi condotti su altre linee cellulari, hanno dimostrato la traslocazione citoplasma-nucleo di ER α in seguito al trattamento con estrogeni e xenoestrogeni (bisfenolo e cadmio), sebbene i tempi analizzati sono stati tra i 30 minuti e le quattro ore (Weng et al., 2010; Simpkins et al., 2012; Siewit et al., 2010). La differenza tra NP ed E2 riscontrata negli esperimenti di immunofluorescenza è in primis imputabile all'affinità ligando-recettore, che è di gran lunga superiore per l'E2, ligando naturale degli ERs, ma anche dal fatto che il NP possa agire attraverso altri pathway molecolari. A tal proposito, abbiamo valutato l'azione del NP e dell'E2 su due vie di segnalazione rapide non genomiche, ponendo l'attenzione sui messaggeri secondari intracellulari AMP ciclico e Ca $^{2+}$, mediante saggi ELISA e saggi spettrofluorimetrici, rispettivamente. Dai risultati ottenuti si evince che l'E2 è in grado soltanto di provocare un aumento di Ca $^{2+}$ intracellulare, mentre il NP induce un rilascio di entrambi i messaggeri secondari, sebbene l'aumento di cAMP sia lieve. Il dato interessante

è che l'aggiunta dell'inibitore ICI 182,780 interferisce con il rilascio di Ca^{2+} indotto dalle due sostanze. E' nota, infatti, la presenza sulla membrana plasmatica di recettori per gli estrogeni (mER) in grado di indurre un rilascio di Ca^{2+} e la loro inibizione da parte di ICI 182,780 (Bulayeva e Watson, 2004), così come è stato caratterizzato il recettore GPR30, accoppiato a proteine di tipo G_s (Simoncini et al., 2003). Tuttavia, non esistono studi relativi alla loro espressione nelle cellule PNT1A e nelle LNCaP, quindi possiamo soltanto speculare che il NP, prima dell'interazione con i classici ER, possa interagire con recettori di membrana, scatenando l'attivazione di percorsi di segnalazione mediati dai messaggeri intracellulari cAMP e Ca^{++} . Il 17β -estradiolo, al contrario, agisce soltanto sul rilascio di Ca^{++} , probabilmente via mER, ma predilige l'interazione con gli ER intracellulari. Mediante esperimenti di Real Time PCR, sulle LNCaP abbiamo riscontrato una lieve up-regolazione dell'mRNA messaggero della ciclina D1 dopo 24h di esposizione, sebbene tale effetto sia più evidente dopo trattamento con l'ormone naturale 17β -estradiolo. Tale dato è in accordo con l'effetto proliferativo ottenuto, essendo la ciclina D1 un target di sensibilità agli estrogeni, la cui deregolazione è indice di stati iperplastici e neoplastici della prostata (Leu et al., 2014; Ju et al., 2014; Casimiro et al., 2007). Tuttavia, andrebbero valutati altri geni e tempi più lunghi di esposizione (48 h; 72 h). In conclusione, si può affermare che i nostri risultati offrono spunti interessanti per proseguire la ricerca sulla tematica interferenti endocrini e prostata: in primo luogo, l'azione riscontrata sulla proliferazione cellulare, avvenuta in modalità simil-estrogenica, suggerisce l'attivazione di altri geni estrogeno-responsivi e la deregolazione di molecole coinvolte nel ciclo cellulare, oltre alla ciclina D1 da noi esaminata; presumibilmente, questa azione coinvolge il recettore $ER\alpha$; in secondo luogo, il NP, dopo brevi tempi di esposizione, sembra attivare risposte rapide non genomiche e presumibilmente pathway alternativi alla segnalazione estrogenica.

Bibliografia

- Abdelouahab N, Mergler D, Takser L, Vanier C, St-Jean M, Baldwin M, Spear PA, Chan HM (2008). Gender differences in the effects of organochlorines, mercury, and lead on thyroid hormone levels in lakeside communities of Quebec (Canada). *Environmental Research*, 107(3):380-392.
- Abdulla Bin-Dohaish el-J (2012). The effects of 4-nonylphenol contamination on livers of Tilapia fish (*Oreochromis spilurs*) in Jeddah. *Biol Res*. 2012;45(1):15-20.
- Adams JY, Leav I, Lau KM, et al. (2002). Expression of estrogen receptor beta in the fetal, neonatal, and prepubertal human prostate. *Prostate* 52: 69–81.
- Ademollo, N., Ferrara, F., Delise, M., Fabietti, F., Funari, E., (2008). Nonylphenol and octylphenol in human breast milk. *Environ. Int.* 34, 984–987.
- Ahel M, Giger W, Koch M. (1994) Behavior of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment 1. Occurrence and transformation in sewage treatment. *Water Res.* 28:1131–42.
- Åkesson A, Julin B, Wolk A (2008). Long-term dietary cadmium intake and postmenopausal endometrial cancer incidence: A population based prospective cohort study. *Cancer Research*, 68(15):6435-6441.
- Al- Mousa F, Michelangeli F, (2012) Some Commonly Used Brominated Flame Retardants Cause Ca²⁺-ATPase Inhibition, Beta-Amyloid Peptide Release and Apoptosis in SH-SY5Y Neuronal Cells. *Plos One* 7:4-e33059
- Alava JJ, Ikonou MG, Ross PS, Costa D, Salazar S, Aurioules-gamboa D, Gobas FA (2009). Polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers in Galapagos sea lions (*Zalophus wollebaeki*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28(11):2271-2282.
- Alavanja MCR, Samanic C, Dosemeci M, Lubin J, Tarone R, Lynch CF, Knott C, Thomas K, Hoppin JA, Barker J, Coble J, Sandler DP, Blair A (2003). Use of agricultural pesticides and prostate cancer risk in the agricultural health study cohort. *American Journal of Epidemiology*, 157(9):800-814.
- Alonso-Magdalena P, Quesada I, Nadal A (2011). Endocrine disruptors in the etiology of type 2 diabetes mellitus. *Nature Reviews. Endocrinology*, 7(6):346-353.
- Alonso-Magdalena P, Vieira E, Soriano S, Menes L, Burks D, Quesada I, Nadal A (2010). Bisphenol A exposure during pregnancy disrupts glucose homeostasis in mothers and adult male offspring. *Environmental Health Perspectives*, 118(9):1243-1250.
- Amano I, Miyazaki W, Iwasaki T, Shimokawa N, Koibuchi N (2010). The effect of hydroxylated polychlorinated biphenyl (OH-PCB) thyroid hormone receptor (TR)-mediated transcription through native-thyroid hormone response element (TRE). *Industrial Health*, 48(1):115-118.
- Armitage JM, Schenker U, Scheringer M, Martin JW, MacLeod M, Cousins IT (2009). Modeling the global fate and transport of perfluorooctane sulfonate (PFOS) and precursor compounds in relation to temporal trends in wildlife exposure. *Environmental Science and Technology*, 43:9274-9280.
- Aronson KJ, Wilson JWL, Hamel M, Diarsvitri W, Fan WL, Woolcott C, Heaton JPW, Nickel JC, Macneily A, Morales A (2010). Plasma organochlorine levels and prostate cancer risk. *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology*, 20(5):434-445.
- Asp V, Cantillana T, Bergman Å, Brandt I (2010a). Chiral effects in adrenocorticolytic action of o,p'-DDD (mitotane) in human adrenal cells. *Xenobiotica*, 40(3):177-183.
- Atanasov AG, Tam S, Rocken JM, Baker ME, Odermatt A. Inhibition of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 by dithiocarbamates. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;308:257–62.
- Attanasio R, Scinicariello F, Blount BC, Valentin-Blasini L, Rogers KA, Nguyen DC, Murray HE (2011). Pendrin mediates uptake of perchlorate in a mammalian in vitro system. *Chemosphere*.
- Auger J, Le Denmat D, Berges R, Doridot L, Salmon B, Canivenc-Lavier MC, Eustache F. Environmental levels of oestrogenic and antiandrogenic compounds feminize digit ratios in male rats and their unexposed male progeny. 2013 Aug 7;280(1768):20131532. doi: 10.1098/rspb.2013.1532. Print 2013 Oct2010
- Banks E, Beral V, Bull D, Reeves G, Austoker J, English R, Patnick J, Peto R, Vessey M, Wallis M, Abbott S et al., (2003). Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet*, 362(9382):419-427.
- Banu SK, Govindarajulu P, Aruldas MM (2002). Testosterone and estradiol differentially regulate TSH-induced thyrocyte proliferation in immature and adult rats. *Steroids*, 67(7):573-579.

- Bechi N, Ietta F, Romagnoli R, Focardi S, Corsi I, Buffi C, Paulesu L (2006). Estrogen-like response to p-nonylphenol in human first trimester placenta and BeWo choriocarcinoma cells. *Toxicol Sci.* 93(1):75-81.
- Bechi N, Ietta F, Romagnoli R, Jantra S, Cencini M, Galassi G, Serchi T, Corsi I, Focardi S and Luana Paulesu (2010) Environmental Levels of para-Nonylphenol Are Able to Affect Cytokine Secretion in Human Placenta. *Environmental Health Perspectives* 118:3
- Bechi N, Ietta F, Romagnoli R, Jantra S, Cencini M, Galassi G, Serchi T, Corsi I, Focardi S, Paulesu L (2009). Environmental Levels of para-Nonylphenol Are Able to Affect Cytokine Secretion in Human Placenta. *Environ Health Perspect*, 118(3): 427-431.
- Beral V, Bull D, Green J, Reeves G (2007). Ovarian cancer and hormone replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet*, 369(9574):1703-1710.
- Bergman et al.: Science and policy on endocrine disrupters must not be mixed: a reply to a “common sense” intervention by toxicology journal editors. *Environmental Health* 2013 12:69.
- Berquin IM, Min Y, Wu R, Wu H, Chen YQ (2005). Expression signature of the mouse prostate. *J Biol Chem.* 2005 Oct 28;280(43):36442-51.
- Besse J-P, Garric J (2009). Progestagens for human use, exposure and hazard assessment for the aquatic environment. *Environmental Pollution*, 157(12):3485-3494.
- Bester K, Theobald N, Schroder HF (2001). Nonylphenols, nonylphenol-ethoxylates, linear alkylbenzenesulfonates (LAS) and bis(4 chlorophenyl)-sulfone in the German Bight of the North Sea. *Chemosphere.* 45:817–26.
- Bianco, NR, Chaplin LJ e Montano MM (2005). Differential induction of quinone reductase by phytoestrogens and protection against oestrogen-induced DNA damage. *Biochem. J.* 385: 279–287.
- Birnbaum LS, Fenton SE (2003). Cancer and developmental exposure to endocrine disruptors. *Environmental Health Perspectives*, 111(4):389-394.
- Bjornstrom L, Sjoberg M (2005). Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Mol Endocrinol*; 19:833–842.
- Blair A, Sandler D, Thomas K, Hoppin JA, Kamel F, Coble J, Lee WJ, Rusiecki J, Knott C, Dosemeci M, Lynch CF, Lubin J, Alavanja M (2005). Disease and injury among participants in the Agricultural Health Study. *J Agric Saf Health*, 11(2):141-150.
- Blanck HM, Marcus M, Tolbert PE, Rubin C, Henderson AK, Hertzberg VS, Zhang RH, Cameron L (2000). Age at menarche and tanner stage in girls exposed in utero and postnatally to polybrominated biphenyl. *Epidemiology*, 11(6):641-647.
- Blatt J, Van Le L, Weiner T, Sailer S (2003). Ovarian carcinoma in an adolescent with transgenerational exposure to diethylstilbestrol. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*, 25(8):635-636.
- Blom A, Ekman E, Johannisson A, Norrgren L, Pesonen M. (1998). Effects of xenoestrogenic environmental pollutants on the proliferation of a human breast cancer cell line (MCF-7). *Arch Environ Contam Toxicol* 34:306–310.
- Blount BC, Pirkle JL, Osterloh JD, Valentin-Blasini L, Caldwell KL (2006). Urinary perchlorate and thyroid hormone levels in adolescent and adult men and women living in the United States. *Environmental Health Perspectives*, 114(12):1865-1871.
- Boberg J, Mandrup KR, Jacobsen PR, Isling LK, Hadrup N, Berthelsen I, Elleby A, Kiersgaard M, Vinggaard AM, Hass U, Nellemann (2013) Endocrine disrupting effects in rats perinatally exposed to a dietary relevant mixture of phytoestrogens. 40:41-51.
- Bostwick D.G., Burke H. B., Djakiew D. et al. (2004). Human prostate cancer risk factors. *Cancer* 101: 2371–2490.
- Bouchardy C, Schuler G, Minder C, Hotz P, Bousquet A, Levi F, Fisch T, Torhorst J, Raymond L (2002). Cancer risk by occupation and socioeconomic group among men - a study by The Association of Swiss Cancer Registries. *Scandinavian Journal of Work Environment & Health*, 28:1-88.
- Bouskine A, Nebout M, Brückner-Davis F, Benahmed M, Fenichel P (2009). Low doses of bisphenol A promote human seminoma cell proliferation by activating PKA and PKG via a membrane G-protein-coupled estrogen receptor. *Environ Health Perspect.* 117(7):1053-8.
- Brian JV, Harris CA, Scholze M, Backhaus T, Booy P, Lamoree M, Pojana G, Jonkers N, Runnalls T, Bonfa A, Marcomini A, Sumpter JP (2005). Accurate prediction of the response of freshwater fish to a mixture of estrogenic chemicals. *Environmental Health Perspectives*, 113(6):721-728.
- Bulayeva NN, Watson CS (2004). Xenoestrogen-induced ERK-1 and ERK-2 activation via multiple membrane-initiated signaling pathways. *Environ Health Perspect.* 112(15):1481-7.

- Cabaton NJ, Wadia PR, Rubin BS, Zalko D, Schaeberle CM, Askenase MH, Gadbois JL, Tharp AP, Whitt GS, Sonnenschein C, Soto AM (2011). Perinatal exposure to environmentally relevant levels of bisphenol A decreases fertility and fecundity in CD-1 mice. *Environmental Health Perspectives*, 119(4):547-552
- Cakmak H, Taylor HS (2010). Molecular mechanisms of treatment resistance in endometriosis: the role of progesterone-hox gene interactions. *Seminars in Reproductive Medicine*, 28(1):69-74.
- Capaldo A, Gay F, Valiante S, De Falco M, Sciarrillo R, Maddaloni M, Laforgia V (2012). Endocrine-disrupting effects of nonylphenol in the newt, *Triturus carnifex* (Amphibia, Urodela). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 155(2):352-8.
- Carmichael SL, Cogswell ME, Gonzalez Feliciano A, Olney RS, Correa A, Shaw GM (2013). Hypospadias and maternal intake of phytoestrogens;178(3):434-40..
- Carmichael SL, Herring AH, Sjodin A, Jones R, Needham L, Ma C, Ding K, Shaw GM (2010). Hypospadias and halogenated organic pollutant levels in maternal mid-pregnancy serum samples. *Chemosphere*, 80(6):641-646.
- Casajuana, N., Lacorte, S., (2004). New methodology for the determination of phthalate esters, bisphenol A, bisphenol A diglycidyl ether, and nonylphenol in commercial whole milk samples. *J. Agric. Food Chem*. 52, 3702–3707.
- Casals-Casas C, Desvergne B (2011). Endocrine disruptors: from endocrine to metabolic disruption. *Annual Review of Physiology*, 73:135-162.
- Casimiro M1, Rodriguez O, Pootrakul L, Aventian M, Lushina N, Cromelin C, Ferzli G, Johnson K, Fricke S, Diba F, Kallakury B, Ohanyerenwa C, Chen M, Ostrowski M, Hung MC, Rabbani SA, Datar R, Cote R, Pestell R, Albanese C. (2007). ErbB-2 induces the cyclin D1 gene in prostate epithelial cells in vitro and in vivo. *Cancer res*. 1;67(9):4364-72.
- Chalubinski M, Kowalski ML (2006). Endocrine disrupters--potential modulators of the immune system and allergic response. *Allergy*. 61(11):1326-35
- Chapin R, Delaney J, Wang Y, Lanning L, Davis B, Collins B, Mintz N, Wolfe G (1999). The effects of 4-nonylphenol in rats: a multigeneration reproduction study. *Toxicological Sciences*, 52: p. 80-91.
- Chapin R, Delaney J, Wang Y, Lanning L, Davis B, Collins B, Mintz N, Wolfe G (1999). The effects of 4-nonylphenol in rats: a multigeneration reproduction study. *Toxicological Sciences*, 52: p. 80-91.
- ChemSec (2011). SIN LIST 2.0. (Secretariat IC ed.) www.chemsec.com, ChemSec, Göteborg, Sweden.
- Chen GW, Ding WH, Ku HY, Chao HR, Chen HY, Huang MC, Wang SL (2010). Alkylphenols in human milk and their relations to dietary habits in central Taiwan. doi: 10.1016/j.fct.2010.04.038.
- Chen M, Tang R, Fu G, Xu B, Zhu P, Qiao S, Chen X, Xu B, Qin Y, Lu C, Hang B, Xia Y, Wang X. (2013) Association of exposure to phenols and idiopathic male infertility. 250-251:115-21
- Cheshenko K, Pakdel F, Segner H, Kah O, Eggen RI. 2008. Interference of endocrine disrupting chemicals with aromatase CYP19 expression or activity, and consequences for reproduction of teleost fish. *Gen Comp Endocrinol*. 2008 Jan 1;155(1):31-62
- Cheung CP, Yu S, Wong KB, Chan LW, Lai FM, Wang X, Suetsugi M, Chen S, Chan FL (2005). Expression and functional study of estrogen receptor-related receptors in human prostatic cells and tissues. *J Clin Endocrinol Metab.*: 90(3):1830-44.
- Chevalier N, Bouskine A, Fenichel P (2012). Bisphenol A promotes testicular seminoma cell proliferation through GPER/GPR30. *Int J Cancer*. 30(1):241-2.
- Chitra KC, Latchoumycandane C, Mathur PP (2003) Induction of oxidative stress by bisphenol A in the epididymal sperm of rats. *Toxicology* 14: 119–127.
- Choi H, Kim J, Im Y, Lee S, Kim Y (2012). The association between some endocrine disruptors and hypospadias in biological samples. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng*. 47(13):2173-9
- Choi JS, Oh JH, Park HJ, Choi MS, Park MS, Kang SJ, Oh MJ, Kim SJ, Hwang SY, Yoon S (2011). miRNA regulation of cytotoxic effects in mouse Sertoli cells exposed to nonylphenol. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 9:126.
- Christiansen S, Scholze M, Dalgaard M, Vinggaard AM, Axelstad M, Kortenamp A, Hass U (2009). Synergistic disruption of external male sex organ development by a mixture of four antiandrogens. *Environmental Health Perspectives*, 117(12):1839-1846.
- Cincinelli A, Mandorlo S, Dickhut RM, Lepri L (2003). Particulate organic compound in the atmosphere surrounding an industrialised area of Prato (Italy). *Atmos Environ*;37:3125–33.
- Cockburn M, Mills P, Zhang X, Zadnick J, Goldberg D, Ritz B (2011). Prostate cancer and ambient pesticide exposure in agriculturally intensive areas in California. *Am J Epidemiol.*; 173(11): 1280-1288.

- Colin A, Bach C, Rosin C, Munoz JF, Dauchy X. (2014) Is drinking water a major route of human exposure to alkylphenol and bisphenol contaminants in France? *Arch Environ Contam Toxicol.* 66(1):86-99.
- Cook JD, Davis BJ, Cai SL, Barrett JC, Conti CJ, Walker CL (2005). Interaction between genetic susceptibility and early-life environmental exposure determines tumor-suppressor-gene penetrance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(24):8644-8649.
- Cook JD, Davis BJ, Goewey JA, Berry TD, Walker CL (2007). Identification of a sensitive period for developmental programming that increases risk for uterine leiomyoma in Eker rats. *Reproductive Sciences*, 14(2):121-136.
- Cooke PS, Young P, Hess RA, Cunha GR (1991). Estrogen receptor expression in developing epididymis, efferent ductules, and other male reproductive organs. *Endocrinology* 128:2874–2879.
- Cooper GS, Klebanoff MA, Promislow J, Brock JW, Longnecker MP (2005). Polychlorinated biphenyls and menstrual cycle characteristics. *Epidemiology*, 16(2):191-200.
- Corvini PFX, Schaffer A, Schlosser D (2006). Microbial degradation of nonylphenol and other alkylphenols: our evolving view. *App Microbiol Biotechnol* 72:223–43
- Crofton KM, Craft ES, Hedge JM, Gennings C, Simmons JE, Carchman RA, Carter WH, DeVito MJ (2005). Thyroid-hormone-disrupting chemicals: Evidence for dose-dependent additivity or synergism. *Environmental Health Perspectives*, 113(11):1549-1554
- Crump D, Werry K, Veldhoen N, Van Aggelen G, Helbing CC (2002). Exposure to the herbicide acetochlor alters thyroid hormone dependent gene expression and metamorphosis in *Xenopus laevis*. *Environmental Health Perspectives*, 110(12):1199-1205.
- Daidoji T, Inoue H, Kato S, Yokota H (2003). Glucuronidation and excretion of nonylphenol in perfused rat liver. *Drug Metab. Dispos.*, 31(8): 993-998.
- Dairkee SH, Seok J, Champion S, Sayeed A, Mindrinos M, Xiao WZ, Davis RW, Goodson WH (2008). Bisphenol A induces a profile of tumor aggressiveness in high-risk cells from breast cancer patients. *Cancer Research*, 68(7):2076-2080.
- Dalvai M, Bystricky K (2010). Cell cycle and anti-estrogen effects synergize to regulate cell proliferation and ER target gene expression. *PLoS One.* 8;5(6):e11011.
- Damgaard IN, Jensen TK, Petersen JH, Skakkebaek NE, Toppari J, Main KM (2007). Cryptorchidism and maternal alcohol consumption during pregnancy. *Environmental Health Perspectives*, 115(2):272-277.
- Dann AB, Hontela A (2011). Triclosan: Environmental exposure, toxicity and mechanisms of action. *Journal of Applied Toxicology*, 31:285-311.
- De Falco M, Sciarrillo R, Capaldo A, Russo T, Gay F, Valiante S, Varano L, Laforgia V (2007). The effects of the fungicide methyl thiophanate on adrenal gland morphophysiology of the lizard, *Podarcis sicula*. *Arch Environ Contam Toxicol.* 53(2):241-8.
- De Falco M, Sellitti A, Sciarrillo R, Capaldo A, Valiante S, Iachetta G, Forte M, Laforgia V (2014). Nonylphenol effects on the HPA axis of the bioindicator vertebrate, *Podarcis sicula* lizard. *Chemosphere*; 104: 190-196
- De Jager C., Bornman M.S., Oosthuizen J.M (1999). “The effect of p-nonylphenol on the fertility potential of male rats after gestational, lactational and direct exposure”. *Andrologia*; 31: 107-113.
- De Rosa M, Zarrilli S, Paesano L, Carbone U, Boggia B, Petretta M, et al (2003). Traffic pollutants affect fertility in men. *Hum Reprod* 18:1055–61.
- de Wit C, Fisk A, Hobbs K, Muir D (2004). AMAP assessment 2002: Persistent organic pollutants in the Arctic. Oslo, Norway, Arctic Monitoring and Assessment Programme.
- Di Maio S, Grizenko N, Joobor R (2003). Dopamine genes and attention deficit hyperactivity disorder: a review. *Journal of Psychiatry and Neuroscience*, 28(1):27-38.
- Dietrich, Sonja von Aulock, Hans Marquardt, Bas Blaauboer, Wolfgang Dekant, Jan Hengstler, et al. (2013) “Scientifically unfounded precaution drives European Commission’s recommendations on EDC regulation, while defying common sense, well-established science and risk assessment principles. *Toxic. in vitro* S0887-2333(13)00166-5
- Dimitrova KR, Degroot W, Suyderhoud P, et al. (2002). 17-beta estradiol preserves endothelial cell viability in an in vitro model of homocysteine-induced oxidative stress. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 39: 347–353.
- Diotel, N., Page, Y. L., Mouriec, K., Tong, S.-K., Pellegrini, E., Vaillant, C., Anglade, I., Brion, F., Pakdel, F., Chung, B., and Kah, O. 2010. Aromatase in the brain of teleost fish: Expression, regulation and putative functions. *Front. Neuroendocrinol.* 31:172–192.
- Directive 2000/60/EC. Establishment and framework for community action in the field of water policy.

Luxembourg, Luxembourg; European Parliament and the Council of the European Union; 2000.

Directive 2003/53/EC of the European Parliament and of the Council of 18 June 2003 amending for the 26th time Council Directive 76/769/EEC relating to restrictions on the marketing and use of certain dangerous substances and preparations (nonylphenol, nonylphenol ethoxylate and cement).

Dirinck E, Jorens PG, Covaci A, Geens T, Roosens L, Neels H, Mertens I, Van Gaal L (2011). Obesity and persistent organic pollutants: possible obesogenic effect of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls. *Obesity (Silver Spring)*, 19(4):709-714.

Dodds E.C, Lawson W. Synthetic estrogenic agents without the phenanthrene nucleus. (1936). *Nature*. 137, 996.

Dong P, Jiang L, Liu J, Wu Z, Guo S, Zhang Z, Zhou F, Liu Z. (2013). Induction of Paclitaxel Resistance by ER α Mediated Prohibitin Mitochondrial-Nuclear Shuttling. *Plos One*. 23;8(12)

Driggers PH, Segars JH (2002). Estrogen action and cytoplasmic signaling pathways. Part II: the role of growth factors and phosphorylation in estrogen signaling. *Trends Endocrinol. Metab*;13(10):422-7.

Edlow AG, Chen M, Smith NA, Lu C, McElrath TF (2012). Fetal bisphenol A exposure: concentration of conjugated and unconjugated bisphenol A in amniotic fluid in the second and third trimesters. *PLoS One*. 34(1):1-7.

Edwards JR, Prozialeck WC (2009). Cadmium, diabetes and chronic kidney disease. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 238(3):289-293.

EEA (2012). The impacts of endocrine disruptors on wildlife, people and their environments – The Weybridge+15 (1996–2011) report. Copenhagen, Denmark, European Environment Agency.

Ellem SJ, Risbridger GP (2009). The dual, opposing roles of estrogen in the prostate. *Ann N Y Acad Sci*. 2009; 1155:174–186.

Emmen JM, McLuskey A, Adham IM, Engel W, Verhoef-Post M, Themmen AP, Grootegoed JA, Brinkmann AO (2000). Involvement of insulin-like factor 3 (Ins3) in diethylstilbestrol-induced cryptorchidism. *Endocrinology*, 141(2):846-849.

Eriksson P, Viberg H, Jakobsson E, Orn U, Fredriksson A (2002) A brominated flame retardant, 2,2',4,4',5-pentabromodiphenyl ether: Uptake, retention, and induction of neurobehavioral alterations in mice during a critical phase of neonatal brain development. *Toxicol. Sci*.

67: 98–103.

Eskenazi B, Warner M, Samuels S, Young J, Gerthoux PM, Needham L, Patterson D, Olive D, Gavoni N, Vercellini P (2007). Serum dioxin concentrations and risk of uterine leiomyoma in the Seveso Women's Health Study. *American Journal of Epidemiology*, 166(1):79.

Evans T, Sany O, Pearmain P, Ganesan R, Blann A, Sundar S (2011). Differential trends in the rising incidence of endometrial cancer by type: data from a UK population-based registry from 1994 to 2006. *British Journal of Cancer*, 104(9):1505-1510.

Falkenberg JA, Persson B, Hojsholt U, Rokkjaer A, Wahid M (2003). Typical values for diffuse soil pollution in Danish urban soil. NIRAS, Allerød, Denmark: Report to the Danish Environmental Protection Agency.

Farr SL, Cai J, Savitz DA, Sandler DP, Hoppin JA, Cooper GS (2006). Pesticide exposure and timing of menopause: the Agricultural Health Study. *American Journal of Epidemiology*, 163(8):731-742.

Fenaux JB, Goyal RM, Jr., Ahmed SA (2004). Diethylstilbestrol exposure during fetal development affects thymus: studies in fourteen-month-old mice. *Journal of Reproductive Immunology*, 64(1-2):75-90.

Fernandez MO, Bourguignon N, Lux-Lantos V, Libertun C (2010). Neonatal exposure to bisphenol A and reproductive and endocrine alterations resembling the polycystic ovarian syndrome in adult rats. *Environmental Health Perspectives*.

Ferrara F, Ademollo N, Orrù M, Silvestroni L, Funari E (2011). Alkylphenols in adipose tissue of Italian population. *Chemosphere*. 82(7):1044-1049.

Ferrara, F., Fabietti, F., Delise, M., Funari, E., (2005). Alkylphenols and alkylphenol ethoxylates contamination of crustaceans and fishes from the Adriatic Sea (Italy). *Chemosphere* 59, 1145–1150.

Fick J, Lindberg RH, Parkkonen J, Arvidsson B, Tysklind M, Joakim Larsson DG (2010). Therapeutic levels of levonorgestrel detected in blood plasma of fish: Results from screening rainbow trout exposed to treated sewage effluents *Environmental Science and Technology*, 44 (7):2661-2666

Filipov NM, Pinchuk LM, Boyd BL, Crittenden PL (2005). Immunotoxic effects of short-term atrazine exposure in young male C57BL/6 mice. *Toxicological Sciences*, 86(2):324-332.

Focazio MJ, Kolpin DW, Barnes KK, Furlong ET, Meyer MT, Zaugg SD, Barber LB, Thurman ME (2008). A national reconnaissance for pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the United States - II

- Untreated drinking water sources. *Science of the Total Environment*, 402:201-216.
- Fonnum, F., and Mariussen, E. 2009. Mechanisms involved in the neurotoxic effects of environmental toxicants such as polychlorinated biphenyls and brominated flame retardants. *J. Neurochem.* 111:1327–1347.
- Foster BA, Evangelou A, Gingrich JR, Kaplan PJ, DeMayo F, Greenberg NM. (2002). Enforced expression of FGF-7 promotes epithelial hyperplasia whereas a dominant negative FGFR2 promotes the emergence of neuroendocrine phenotype in prostate glands of transgenic mice. *Differentiation*70: 624–632.
- Foster PMD (2005). Mode of action: Impaired fetal Leydig cell function Effects on male reproductive development produced by certain phthalate esters. *Critical Reviews in Toxicology*, 35(8-9):713-719.
- Foster PMD (2006). Disruption of reproductive development in male rat offspring following in utero exposure to phthalate esters. *International Journal of Andrology*, 29(1):140-147.
- Fox DA, Opanashuk L, Zharkovsky A, Weiss B (2010). Gene-chemical interactions in the developing mammalian nervous system: Effects on proliferation, neurogenesis and differentiation. *Neurotoxicology*, 31(5):589-597.
- Fries E, Puttmann W (2004). Occurrence of 4-nonylphenol in rain and snow. *Atmos Environ.* 38:2013–6.
- Fucic A, Gamulin M, Ferencic Z, Katic J, Krayner von Krauss M, Bartonova A, Merlo DF (2012). Environmental exposure to xenoestrogens and oestrogen related cancers: reproductive system, breast, lung, kidney, pancreas, and brain. *Environ Health.* 28;11
- Geens T, Aerts D, Berthot C, Bourguignon JP, Goeyens L, Lecomte P, Maghuin-Rogister G, Pironnet AM, Pussemier L, Scippo ML, Van Loco J, Covaci A (2012). A review of dietary and non-dietary exposure to bisphenol-A. *50(10):3725-40*
- Gelinas S, Bureau G, Valastro B, et al. (2004). Alpha and beta estradiol protect neuronal but not native PC12 cells from paraquat-induced oxidative stress. *Neurotox. Res.* 6: 141–148.
- Genualdi S, Hamer T, Cheng Y, MacLeod M, Hansen KM, van Egmond R, Shoeib M, Lee SC (2011). Global distribution of linear and cyclic volatile methyl siloxanes in air. *Environmental Science and Technology*, 45(8):3349-3354.
- Ghisari M, Bonefeld-Jorgensen EC (2005). Impact of environmental chemicals on the thyroid hormone function in pituitary rat GH3 cells. *Mol Cell Endocrinol.* 244(1-2):31-41.
- Giddings JM, Anderson TA, Hall LWJ, Kendall RJ, Richards RP, Solomon KR, Williams WM (2005). A probabilistic aquatic ecological risk assessment of atrazine in North American surface waters. Pensacola, FL, SETAC Press.
- Giger W, Brunner PH, Schaffner C (1984). 4-Nonylphenol in sewage-sludge: accumulation of toxic metabolites from nonionic surfactants. *Science*;225:623–5.
- Gilbert ME, Rovet J, Chen ZP, Koibuchi N (2012). Developmental thyroid hormone disruption: Prevalence, environmental contaminants and neurodevelopmental consequences. *Neurotoxicology*, 33(4):842-852.
- Giusti F, Falchetti A, Franceschelli F, Marini F, Tanini A, Brandi ML (2010). Thyroid cancer: current molecular perspectives. *J Oncol*, 2010:351679.
- Gong Y, Wu J, Huang Y, Shen S, Han X (2009). Nonylphenol induces apoptosis in rat testicular Sertoli cells via endoplasmic reticulum stress. *Toxicol Lett.* 186(2):84-95.
- Guenther K, Heinke V, Thiele B, Kleist E, Prast H, Raecker T (2002). Endocrine disrupting nonylphenols are ubiquitous in food. *Environ Sci Technol*; 36:1676–80.
- Guo H, Liu T, Uemura Y, Jiao S, Wang D, Lin Z, Narita Y, Suzuki M, Hirose N, Ichihara Y, Ishihara O, Kikuchi H, Sakamoto Y, Senju S, Zhang Q, Ling F (2010). Bisphenol A in combination with TNF-alpha selectively induces Th2 cell-promoting dendritic cells in vitro with an estrogen-like activity. *Cellular and Molecular Immunology*, 7(3):227-234.
- Guo SW (2009). Epigenetics of endometriosis. *Molecular Human Reproduction*, 15(10):587-607.
- Guo TL, Chi RP, Zhang XL, Musgrove DL, Weis C, Germolec DR, White KL, Jr. (2006). Modulation of immune response following dietary genistein exposure in F0 and F1 generations of C57BL/6 mice: evidence of thymic regulation. *Food and Chemical Toxicology*, 44(3):316-325.
- Guo YL, Hsu PC, Hsu CC, Lambert GH (2000). Semen quality after prenatal exposure to polychlorinated biphenyls and dibenzofurans. *Lancet*, 356(9237):1240-1241.
- Gustafsson JA (2000). Novel aspects of estrogen action. *J. Soc. Gynecol Investig*; 7(1 Suppl):S8-9.
- Hampl R, Kubatova J, Heracek J, Sobotka V, Starka L

- (2103).Hormones and endocrine disruptors in human seminal plasma. 47(3):149-58.
- Hansen LG, Robertson LW (2001). PCBs: Recent Advances in Environmental Toxicology and Health Effects. Lexington, KY, University Press of Kentucky.
- Hardell L, Andersson SO, Carlberg M, Bohr L, van Bavel B, Lindstrom G, Bjornfoth H, Ginman C (2006). Adipose tissue concentration of persistent organic pollutants and the risk of prostate cancer. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 48(7):700-707.
- Hardell L, van Bavel B, Lindstrom G, Bjornfoth H, Orgum P, Carlberg M, Sorensen CS, Graflund M (2004). Adipose tissue concentrations of p,p'-DDE and the risk for endometrial cancer. *Gynecologic Oncology*, 95(3):706-711.
- Hardell L, van Bavel B, Lindstrom G, Eriksson M, Carlberg M (2006). In utero exposure to persistent organic pollutants in relation to testicular cancer risk. *International Journal of Andrology*, 29(1):228-234.
- Hart CA, Nisbet ICT, Kennedy SW, Hahn ME (2003). Gonadal feminization and halogenated environmental contaminants in common terns (*Sterna hirundo*): Evidence that ovotestes in male embryos do not persist to the pre fledgling stage. *Ecotoxicology*, 12(1-4):125-140.
- Hartman J, Ström A, Gustafsson JA (2012). Current concepts and significance of estrogen receptor b in prostate cancer- *Steroids* 77: 1262-1266
- He D, Falany CN (2007) Inhibition of SULT2B1b Expression Alters Effects of 3 β -Hydroxysteroids on Cell Proliferation and Steroid Hormone Receptor Expression in Human LNCaP Prostate Cancer Cells. *The prostate* 67: 1318-1329
- He Y, Murphy MB, Yu RMK, Lam MHW, Hecker M, Giesy JP, Wu RSS, Lam PKS (2008). Effects of 20 PBDE metabolites on steroidogenesis in the H295R cell line. *Toxicology Letters*, 176(3):230-238.
- Henley DV, Lipson N, Korach KS, Bloch CA (2007). Brief report - Prepubertal gynecomastia linked to lavender and tea tree oils. *New England Journal of Medicine*, 356(5):479-485.
- Ho SM (2004). Estrogens and anti-estrogens: key mediators of prostate carcinogenesis and new therapeutic candidates. *J. Cell Biochem*. 91: 491-503.
- Ho SM, Lane K, Lee K. (1997). Neoplastic transformation of the prostate. In *Prostate: Basic and Clinical Aspects*. Rajesh K Naz, Ed.: 74-114. CRC Press. New York.
- Ho SM, Leav I, Merk FB, et al. (1995). Induction of atypical hyperplasia, apoptosis, and type II estrogen-binding sites in the ventral prostates of Noble rats treated with testosterone and pharmacologic doses of estradiol-17 beta. *Lab. Invest*. 73: 356-365.
- Hosie S, Loff S, Witt K, Niessen K, Waag KL (2000). Is there a correlation between organochlorine compounds and undescended testes? *European Journal of Pediatric Surgery*, 10(5):304-309.
- Hossaini A, Dalgaard M, Vinggaard AM, Frandsen H, Larsen JJ (2001). In utero reproductive study in rats exposed to nonylphenol. *Reprod Toxicol*; 15:537-543.
- Howard SG, Lee DH (2012). What is the role of human contamination by environmental chemicals in the development of type 1 diabetes? *Journal of Epidemiology and Community Health*, 66(6):479-481.
- Howdeshell KL (2002). A model of the development of the brain as a construct of the thyroid system. *Environmental Health Perspectives*, 110 Suppl 3:337-348.
- Hsu PC, Huang WY, Yao WJ, Wu MH, Guo YL, Lambert GH (2003). Sperm changes in men exposed to polychlorinated biphenyls and dibenzofurans. *Jama-Journal of the American Medical Association*, 289(22):2943-2944.
- Hsu PY, Deatherage DE, Rodriguez BA, Liyanarachchi S, Weng YI, Zuo T, Liu J, Cheng AS, Huang TH (2009). Xenoestrogen-induced epigenetic repression of microRNA-9-3 in breast epithelial cells. *Cancer Res*; 69:5936-5945.
- Huang LW, Pu YB, Alam S, Birch L, Prins GS (2004). Estrogenic regulation of signaling pathways and homeobox genes during rat prostate development. *Journal of Andrology*, 25(3):330-337.
- Hudson DL. (2004). Epithelial stem cells in human prostate growth and disease. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 7: 188-194.
- Huggins C, Hodges CV (2002). Studies on prostatic cancer I. The effect of castration, of estrogen and of androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate (Reprinted from *Cancer Res*, vol 1, pg 293-297, 1941). *Journal of Urology*, 167(2):948-951.
- Hung CH, Yang SN, Kuo PL, Chu YT, Chang HW, Wei WJ, Huang SK, Jong YJ (2010). Modulation of cytokine expression in human myeloid dendritic cells by environmental endocrine-disrupting chemicals involves epigenetic regulation. *Environmental Health Perspectives*, 118(1):67-72.

- IPCS (2002). Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors. Geneva, Switzerland, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety
- Iwamuro S, Sakakibara M, Terao M, Ozawa A, Kurobe C, Shigeura T, Kato M, Kikuyama S (2003). Teratogenic and anti-metamorphic effects of bisphenol A on embryonic and larval *Xenopus laevis*. *General and Comparative Endocrinology*, 133(2):189-198.
- Janesick A, Blumberg B (2011). Endocrine disrupting chemicals and the developmental programming of adipogenesis and obesity. *Birth Defects Research. Part C, Embryo Today*, 93(1):34-50.
- Jie X, Yang W, Jie Y, Hashim JH, Liu XY, Fan QY, Yan L. (2010). Toxic effect of gestational exposure to nonylphenol on F1 male rats. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*. 2010
- Jobling S, Casey D, Rodgers-Gray T, Oehlmann J, Schulte-Oehlmann U, Pawlowski S, Baunbecke T, Turner AP, Tyler CR. Comparative responses of molluscs and fish to environmental estrogens and an estrogenic effluent. (2002). *Aquatic Toxicology*. Volume 65, Pages 205–220.
- Johnson JJ, Syed DN, Suh Y, Heren CR, Saleem M, Siddiqui IA, Mukhtar H (2010). Disruption of androgen and estrogen receptor activity in prostate cancer by a novel dietary diterpene carmosol: implications for chemoprevention. *Cancer Prev Res (Phila)*. (9):1112-23.
- Johnson MD, Kenney N, Stoica A, Hilakivi-Clarke L, Singh B, Chepko G, Clarke R, Sholler PF, Lirio AA, Foss C, Reiter R, Trock B, Paik S, Martin MB (2003). Cadmium mimics the in vivo effects of estrogen in the uterus and mammary gland. *Nature Medicine*, 9(8):1081-1084.
- Jonsson M, Lundwall A, Malm J. (2006) The semenogelins: proteins with functions beyond reproduction? *Cell Mol Life Sci*; 63:2886–8.
- Ju X1, Casimiro MC, Gormley M, Meng H, Jiao X, Katiyar S, Crosariol M, Chen K, Wang M, Quong AA, Lisanti MP, Ertel A, Pestell RG. (2014). Identification of a cyclin D1 network in prostate cancer that antagonizes epithelial-mesenchymal restraint. *Cancer res*. 74(2):508-19
- Jubendradass R, Shereen Cynthia D'Cruz, and P. P. Mathur (2012). Short-Term Exposure to Nonylphenol Induces Pancreatic Oxidative Stress and Alters Liver Glucose Metabolism in Adult Female Rats. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 25(2): 77-83.
- Kabbarah O, Sotelo AK, Mallon MA, Winkeler EL, Fan MY, Pfeifer JD, Shibata D, Gutmann DH, Goodfellow PJ (2005). Diethylstilbestrol effects and lymphomagenesis in Mlh1-deficient mice. *International Journal of Cancer*, 115(4):666-669.
- Kandaraki E, Chatzigeorgiou A, Livadas S, Palioura E, Economou F, Koutsilieris M, Palimeri S, Panidis D, Diamanti-Kandarakis E (2011). Endocrine disruptors and polycystic ovary syndrome (PCOS): Elevated serum levels of bisphenol A in women with PCOS. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 96(3):E480.
- Kang J-H, Aasi D, Katayama Y (2007). Bisphenol A in the aquatic environment and its endocrine-disruptive effects on aquatic organisms. *Critical Reviews in Toxicology*, 37:607-625.
- Kanis JA, Odén A, McCloskey EV, Johansson H, Wahl DA, Cooper C (2012). A systematic review of hip fracture incidence and probability of fracture worldwide. *Osteoporosis International*, 23(9):2239-2256.
- Kärman A, Ericson I, van Bavel B, Darnerud PO, Aune M, Glynn A, Lignell S, Lindstrom G (2007). Exposure of perfluorinated chemicals through lactation: Levels of matched human milk and serum and a temporal trend, 1996-2004, in Sweden. *Environmental Health Perspectives*, 115(2):226-230.
- Karrow NA, Guo TL, Delclos KB, Newbold RR, Weis C, Germolec DR, White KL Jr, McCay JA (2004). Nonylphenol alters the activity of splenic NK cells and the numbers of leukocyte subpopulations in Sprague-Dawley rats: a two-generation feeding study. *Toxicology*. 196(3):237-45
- Kimura N, Kimura T, Suzuki M, Totsukawa K (2006). Effect of gestational exposure to nonylphenol on the development and fertility of mouse offspring. *J. Reprod. Dev.* 52:789-795.
- Knoblauch R, Garabedian MJ (1999). Role for Hsp90-associated cochaperone p23 in estrogen receptor signal transduction. *Mol. Cell Biol*; 19(5):3748-59.
- Kortenkamp A (2011). Are cadmium and other heavy metal compounds acting as endocrine disrupters? *Metal Ions in Life Sciences*, 8:305-317.
- 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. European Commission, DG Environment, Project Contract Number 070307/2009/550687/SER/D3
- Koutros S, Alavanja MCR, Lubin JH, Sandler DP, Hoppin JA, Lynch CF, Knott C, Blair A, Freeman LEB (2010). An update of cancer incidence in the agricultural health study. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 52(11):1098-1105.

- Krieg MR, Nass R e Tunn S. (1993). Effect of aging on endogenous level of 5 alpha-dihydrotestosterone, testosterone, estradiol, and estrone in epithelium and stroma of normal and hyperplastic human prostate. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 77: 375–381.
- Krstevska-Konstantinova M, Charlier C, Craen M, Du Caju M, Heinrichs C, de Beaufort C, Plomteux G, Bourguignon JP (2001). Sexual precocity after immigration from developing countries to Belgium: evidence of previous exposure to organochlorine pesticides. *Human Reproduction*, 16(5):1020-1026.
- Krurger T, Barnhoon I, Jansen Van Vuren J, Borman R. The use of the urogenital papillae of male feral African sharptooth catfish (*Clarias gariepinus*) as indicator of exposure to estrogenic chemicals in two polluted dams in an urban nature reserve, Gauteng, South Africa. 2013 Jan;87:98-107. doi: 10.1016/j.ecoenv.2012.10.004. Epub 2012 Nov 3.
- Kuch HM, Ballschmiter K (2001). Determination of endocrine-disrupting phenolic compounds and estrogens in surface and drinking water by HRGC-(NCI)-MS in the picogram per liter range. *Environ Sci Technol*;35:3201–6.
- Kudo C, Wada K, Masuda T, Yonemura T, Shibuya A, Fujimoto Y, Nakajima A, Niwa H, Kamisaki Y (2004). Nonylphenol induces the death of neural stem cells due to activation of the caspase cascade and regulation of the cell cycle. *J. Neurochem*, 88: 1416-1423.
- Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Häggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA (1997). Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors α and β . *Endocrinology* 138:863–870.
- Kuiper GG, Enmark E, Peltro-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA (1996). Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA*. 93: p. 5925-30.
- Kundakovic M, Gudsruk K, Franks B, Madrid J, Miller RL, Perera FP, Champagne FA (2013). Sex-specific epigenetic disruption and behavioral changes following low-dose in utero bisphenol A exposure. *Proc Natl Acad Sci U S A*;110(24):9956-61.
- Kuo CC, Kuo DH, Huang CJ, Fang YC, Shieh P, Chen FA, Shaw CF, Jan CR (2010). Nonylphenol induced apoptosis pathways in SCM1 human gastric cancer cells. *Drug Dev Res*, 2010, 71: 139-148.
- Kuo PL, Hsu YL, Tsai MJ, Lien CT, Huang MS, Ko YC (2011). Nonylphenol Induces Bronchial Epithelial Apoptosis via Fas-mediated Pathway and Stimulates Bronchial Epithelium to Secrete IL-6 and IL-8, causing Bronchial Smooth Muscle Proliferation and Migration. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. doi: 10.1111/j.1742-7843.2011.00797.x.
- Lafuente, A., Marquez, N., Pazo, D., and Esquifino, A. I. 2001. Cadmium effects on dopamine turnover and plasma levels of prolactin, GH and ACTH. *J. Physiol. Biochem.* 57:231–236.
- Langford KH, Lester JN (2002). Fate and behaviour of endocrine disrupters in wastewater treatment processes. In: Brikett JW, Lester editors. *Endocrine disrupters in wastewater and sludge treatment processes*. Boca Raton, USA: CRC Press Inc.
- Langford KH, Scrimshaw MD, Brikett JW, Lester JN (2005). The partitioning of alkylphenolic surfactants and polybrominated diphenyl ether flame retardants in activated sludge batch tests. *Chemosphere*;61:1221–30.
- Latendresse JR, Newbold RR, Weis CC and Delcols KB (2001). Polycystic kidney disease induced in F(1) Sprague-Dawley rats fed para-nonylphenol in a soy-free, casein-containing diet. *Toxicol.Sci.*62, 140-147.
- Latorre A, Lacorte S, Barcelo D (2003). Presence of nonylphenol, octylphenol and bisphenol a in two aquifers close to agricultural, industrial and urban areas. *Chromatographia*;57:111–6.
- Leav, I., Merk FB, Kwan P e Ho SM. (1989). Androgen-supported estrogen enhance epithelial proliferation in the prostates of intact Noble rats. *Prostate* 15: 23–40.
- Lee PC, Lee W (1996). In vivo estrogenic action of nonylphenol in immature female rats. *Bull Environ Contam Toxicol.* 57:341–8.
- Letcher RJ, Klasson-Wehler E, Bergman A (2000). Methyl sulfone and hydroxylated metabolites of polychlorinated biphenyls. *The Handbook of Environmental Chemistry*, 3K:315-359.
- Leu WJ, Chang HS, Chan SH, Hsu JL, Yu CC, Hsu LC, Chen IS, Guh JH. (2014). Reevesioside A, a cardenolide glycoside, induces anticancer activity against human hormone-refractory prostate cancers through suppression of c-myc expression and induction of G1 arrest of the cell cycle. *Plos One.* 27;9(1)
- Li CI, Malone KE, Porter PL, Lawton TJ, Voigt LF, Cushing-Haugen KL, Lin MG, Yuan XP, Daling JR (2008). Relationship between menopausal hormone therapy and risk of ductal, lobular, and ductallobular breast carcinomas. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 17(1):43-50.
- Li D, Kim M, Shim WJ, Yim UH, Oh J-R, Kwon Y-J (2004). Seasonal flux of nonylphenol in Han River, Korea. *Chemosphere*;56:1–6.

- Li DK, Miao M, Zhou Z, Wu C, Shi H, Liu X, Wang S, Yuan W (2013). Urine bisphenol-A level in relation to obesity and overweight in school age children. *8(6):e65399*
- Li L, Andersen ME, Heber S, Zhang Q (2007). Non-monotonic dose-response relationship in steroid hormone receptor-mediated gene expression. *Journal of Molecular Endocrinology*, 38(5-6):569-585
- Li SA, Weroha SJ, Tawfik O, Li JJ (2002). Prevention of solely estrogen-induced mammary tumors in female ACI rats by tamoxifen: evidence for estrogen receptor mediation. *Journal of Endocrinology*, 175(2):297-305.
- Li SF, Hansman R, Newbold R, Davis B, McLachlan JA, Barrett JC (2003). Neonatal diethylstilbestrol exposure induces persistent elevation of c-fos expression and hypomethylation in its exon-4 in mouse uterus. *Molecular Carcinogenesis*, 38(2):78-84.
- Li, C.T., Cheng, C.Y., Ding, W.H., (2008). Determination of alkylphenol residues in baby-food purees by steam distillation extraction and gas chromatography– mass spectrometry. *Food Chem. Toxicol.* 46, 803–807.
- Lichtenstein P, Holm NV, Verkasalo PK, Iliadou A, Kaprio J, Koskenvuo M, Pukkala E, Skytthe A, Hemminki K (2000). Environmental and heritable factors in the causation of cancer - Analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *New England Journal of Medicine*, 343(2):78-85.
- Lim S, Ahn SY, Song IC, Chung MH, Jang HC, Park KS, Lee KU, Pak YK, Lee HK (2009). Chronic exposure to the herbicide, atrazine, causes mitochondrial dysfunction and insulin resistance. *PLoS One*, 4(4):e5186.
- Lin, W.-C., Wang, S.-L., Cheng, C.-Y., Ding, W.-H., (2009). Determination of alkylphenol residues in breast and commercial milk by solid-phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry. *Food Chem.* 114, 753–757.
- Lind PM, Bergman A, Olsson M, Örborg J (2003). Bone mineral density in male Baltic grey seal (*Halichoerus grypus*). *Ambio*, 32(6):385-388.
- Lindsay RS, Lindsay RM, Waddell BJ, Seckl JR (1996). Prenatal glucocorticoid exposure leads to offspring hyperglycaemia in the rat: studies with the 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase inhibitor carbenoxolone. *Diabetologia*;39:1299–305.
- Lintelmann J, Katayama A, Kurihara N, Shore L, Wenzel A (2003). Endocrine disruptors in the environment - (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 75(5):631-681.
- Livak KJ, Schmittgen TD. (2001). Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods*, 25. 402-408.
- Lope V, Pollan M, Gustavsson P, Plato N, Perez-Gomez B, Aragonés N, Suarez B, Carrasco JM, Rodríguez S, Ramis R, Boldo E, Lopez Abente G (2005). Occupation and thyroid cancer risk in Sweden. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 47(9):948-957.
- Lorenc JL, Scheffer G, Alkylphenols W. Kirk–Othmer (2003) encyclopaedia of chemical technology. John Wiley and Sons Inc.
- Lorenzetti S, Marcoccia D, Narciso L, Mantovani A (2010) Cell viability and PSA secretion assays in LNCaP cells: A tiered in vitro approach to screen chemicals with a prostate-mediated effect on male reproduction within the ReProTect project *Reproductive Toxicology* 25–35
- Lorenzo J (2003). A new hypothesis for how sex steroid hormones regulate bone mass. *J. Clin. Invest*;111(11):1641-3.
- Lukac N, Lukacova J, Pinto B, Knazicka Z, Tvrdá E, Massanyi P. (2013) The effect of nonylphenol on the motility and viability of bovine spermatozoa in vitro. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng.* 48(8):973-9.
- Lyche JL, Gutleb AC, Bergman Å, Eriksen GS, Murk AJ, Ropstad E, Saunders M, Skaare JU (2009). Reproductive and developmental toxicity of phthalates. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 12(4):225-249.
- Manente L, Sellitti A, Lucariello A, Laforgia V, De Falco M, De Luca A (2011). Effects of 4-nonylphenol on proliferation of AGS gastric cells. *Cell Prolif.* 44(5): 477-85.
- Manzano MA, Perales JA, Sales D, Quiroga JM (1999). The effect of temperature on the biodegradation of a nonylphenol polyethoxylate in river water. *Water Res.* 33:2593–600.
- Mao Z, Zheng YL, Zhang YQ (2011). Behavioral impairment and oxidative damage induced by chronic application of nonylphenol. *Int. J. Mol. Sci* 12: 114-127.
- Mao, I.-F., Lu, Y.-Y., Chen, M.-L., (2006). A simplified method for simultaneous quantitation of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates in meat and fish using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 86, 713–722.
- Martini M, Miceli D, Gotti S, Viglietti-Panzica C, Fissore E, Palanza P, Panzica G (2010) Effects of perinatal

- administration of Bisphenol A on the neuronal nitric oxide synthase expressing system in the hypothalamus and limbic system of CD1 mice *J Neuroendocrinol.* (9):1004-12.
- Mastorakos G, Karoutsou EI, Mizamtsidi M, Creatsas G (2007). The menace of endocrine disruptors on thyroid hormone physiology and their impact on intrauterine development. *Endocrine*, 31(3):219-237.
- Masuno H, Okamoto S, Iwanami J, Honda K, Shiosaka T, Kidani T, Sakayama K, Yamamoto H (2003). Effect of 4-nonylphenol on cell proliferation and adipocyte formation in cultures of fully differentiated 3T3-L1 cells. *Toxicol Sci.* 75(2):314-20.
- McClusky LM, de Jager C, Bormman MS (2007). Stage-related increase in the proportion of apoptotic germ cells and altered frequencies of stages in the spermatogenic cycle following gestational, lactational, and direct exposure of male rats to p-nonylphenol. *Toxicol Sci*; 95(1):249-56.
- McKinlay R, Plant JA, Bell JNB, Voulvoulis N (2008). Calculating human exposure to endocrine disrupting pesticides via agricultural and non-agricultural exposure routes. *Science of the Total Environment*, 398(1-3):1-12.
- McNeal JE. (1969). Origin and development of carcinoma in the prostate. *Cancer* 23: 24–34.
- McNeal JE. (1981). The zonal anatomy of the prostate. *Prostate* 2:35–49.
- McNeal JE. (1988). Normal histology of the prostate. *Am J Surg Pathol* 12: 619–633.
- McTiernan AM, Weiss NS, Daling JR (1984). Incidence of thyroidcancer in women in relation to reproductive and hormonal factors. *American Journal of Epidemiology*, 120(3):423-435.
- Menditto A, Caroli S, Di Domenico A, Mantovani A, Silvestroni L, Spagnolo A, Traina M.E, Alleva E. Gli "endocrine disruptors": un problema emergente nel campo della sicurezza dei composti chimici. (1997). *Notiziario dell'Istituto Superiore di Sanità*, 10(2): 1-7.
- Mishra SK, Mazumdar A, Vadlamudi RK, Li F, Wang RA, Yu W, Jordan VC, Santen RJ, Kumar R (2003). MICoA, a novel metastasis associated protein 1 (MTA1) interacting protein coactivator, regulates estrogen receptor-alpha transactivation functions *J. Biol. Chem.* 278(21):19209-19.
- Missmer SA, Hankinson SE, Spiegelman D, Barbieri RL, Michels KB, Hunter DJ (2004). In utero exposures and the incidence of endometriosis. *Fertility and Sterility*, 82(6):1501-1508.
- Miyazaki W, Iwasaki T, Takeshita A, Tohyama C, Koibuchi N (2008). Identification of the functional domain of thyroid hormone receptor responsible for polychlorinated biphenyl-mediated suppression of its action in vitro. *Environmental Health Perspectives*, 116(9):1231-1236.
- Modugno F, Ness RB, Chen C, Weiss NS (2005). Inflammation and endometrial cancer: A hypothesis. *Cancer Epidemiology Biomarker & Prevention*, 14(12):2840-2847.
- Moggs JG, Orphanides G (2001). Estrogen receptors: orchestrators of pleiotropic cellular responses. *Rep.* 2001 Sep;2(9):775-81.
- Montano M, Zimmer KE, Dahl E, Berge V, Olsaker I, Skaare JU, Murk AJ, Ropstad E, Verhaegen S (2011). Effects of mixtures of persistent organic pollutants (POPs) derived from cod liver oil on H295R steroidogenesis. *Food and Chemical Toxicology*, 49(9):2328-2335.
- Montano MM, Deng HM, Liu M et al. (2004). Transcriptional regulation by the estrogen receptor of antioxidative stress enzymes and its functional implications. *Oncogene* 23: 2442–2453.
- Montano, MM e Katzenellenbogen BS (1997). The quinone reductase gene: a unique estrogen receptor-regulated gene that is activated by antiestrogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 2581–2586.
- Monteiro SC, Boxall ABA (2010). Occurrence and fate of human pharmaceuticals in the environment. In:(Whitacre DM ed.) *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, pp. 53-154. New York, Springer.
- Muller S, Schmid P, Schlatter C (1998). Pharmacokinetic behavior of 4-nonylphenol in humans. *Environ Toxicol Pharmacol*;5:257–65.
- Multigner L, Ndong JR, Giusti A, Romana M, Delacroix-Maillard H, Cordier S, Jegou B, Thome JP, Blanchet P (2010). Chlordecone exposure and risk of prostate cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 28(21):3457-3462.
- Murphy S, Pierce G, Law R, Bersuder P, Jepson P, Learmonth J, Addink M, Dabin W, Santos M, Deaville R (2010). Assessing the effect of persistent organic pollutants on reproductive activity in common dolphins and harbour porpoises. *Journal of Northwest Atlantic fishery science*, 42:153-173.
- Murphy S, Pierce GJ, Law RJ, Bersuder P, P.D. J, Learmonth JA, Addink M, Dabin W, Santos MB, Deaville R, Zegers BN, Mets A, Rogan E, Ridoux V, Reid RJ, Smeenk C, Jauniaux T, López A, Farré A, J.M. G, A.F., Guerra A, García-Hartmann M, Lockyer C, Boon JP (2010). Assessing the effect of persistent organic

- pollutants on reproductive activity in common dolphins and harbour porpoises. *Journal of Northwest Atlantic Fishery Science*, 42:153-173.
- Nagao T, Wada K, Marumo H., Yoshimura S, Ono H (2001). Reproductive effects of nonylphenol in rats after gavage administration: a two generation study. *Reprod. Toxicol.* 15, 293-315.
- Nagel SC, vom Saal FS, Thayer KA, Dhar MG, Boechler M, Welshons WV. (1997). Relative binding affinity-serum modified access (RBA-SMA) assay predicts the relative in vivo bioactivity of the xenoestrogens bisphenol A and octylphenol. *Environ Health Perspect* 105:70-76.
- Navarro VM, Sanchez-Garrido MA, Castellano JM, Roa J, Garcia-Galiano D, Pineda R, Aguilar E, Pinilla L, Tena-Sempere M (2009). Persistent impairment of hypothalamic KiSS-1 system after exposures to estrogenic compounds at critical periods of brain sex differentiation. *Endocrinology*, 150(5):2359-2367.
- Needham LL, Grandjean P, Heinzow B, Jørgensen PJ, Nielsen F, Sjödin A, Patterson Jr. DG, Turner WE, Weihe P (2011). Partition of environmental chemicals between maternal and fetal blood. *Environmental Science and Technology*, 45:1121-1126.
- Nikaido Y, Yoshizawa K, Danbara N, Tsujita-Kyutoku M, Yuri T, Uehara N, Tsubura A (2004). Effects of maternal xenoestrogen exposure on development of the reproductive tract and mammary gland in female CD-1 mouse offspring. *Reproductive Toxicology*, 18(6):803-811.
- Nomura S, Daidoji T, Inoue H, Yokota H (2008). Differential metabolism of 4-n-nonylphenol and 4-tert-octylphenols in perfused rat liver. *Life Sci.* 83(5-6):223-8.
- OECD (2010). OECD health ministerial meeting, Session 2, Healthy Choices. Paris, 7-8 October 2010. <http://www.oecd.org/health/ministerial/46098333.pdf>
- Oehlmann J, Schulte-Oehlmann U, Tillmann M, Markert B (2000). Effects of endocrine disruptors on prosobranch snails (Mollusca : Gastropoda) in the laboratory. Part I: Bisphenol A and octylphenol as xeno-estrogens. *Ecotoxicology*, 9(6):383-397.
- Ogura Y, Ishii K, Kanda H, Kanai M, Arima K, et al. (2007) Bisphenol A induces permanent squamous change in mouse prostatic epithelium. *Differentiation*.75: 745-756
- Okada H, Tokunaga T, Liu X, Takayanagi S, Matsushima A, Shimohigashi Y. Direct evidence revealing structural elements essential for the high binding ability of bisphenol A to human estrogen-related receptor-gamma.
- Ortiz-Zarragoitia M, Cajaraville MP (2010). Intersex and oocyte atresia in a mussel population from the Biosphere's Reserve of Urdaibai (Bay of Biscay). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73(5):693-701.
- Oskarsson A, Ullerås E, Plant KE, Hinson JP, Goldfarb PS (2006). Steroidogenic gene expression in H295R cells and the human adrenal gland: adrenotoxic effects of lindane in vitro. *Journal of Applied Toxicology*, 26(6):484-492.
- Pacyna EG, Pacyna JM, Sundseth K, Munthe J, Kindbom K, Wilson S, Steenhuisen F, Maxson P (2010). Global emission of mercury to the atmosphere from anthropogenic sources in 2005 and projections to 2020. *Atmospheric Environment*, 44(20):2487-2499.
- Park HY, Park JS, Sovcikova E, Kocan A, Linderholm L, Bergman A, Trnovec T, Hertz-Picciotto I (2009). Exposure to hydroxylated polychlorinated biphenyls (OH-PCBs) in the prenatal period and subsequent neurodevelopment in eastern Slovakia. *Environmental Health Perspectives*, 117(10):1600-1606.
- Pavlova A, Boutin E, Cunha G, Sassoon D (2004). Msx1 (Hox-7.1) in the adult mouse uterus: cellular interactions underlying regulation of expression. *Development*, 120(2):335-345.
- Peehl DM.(2005). Primary cell cultures as models of prostate cancer development. *Endocr Relat Cancer* 12: 19-47.
- Petrovic M, Fernandez-Alba AR, Borrull F, Marce RM, Mazo EG, Barcelo D (2002). Occurrence and distribution of nonionic surfactants, their degradation products, and linear alkylbenzene sulfonates in coastal waters and sediments in Spain. *Environ Toxicol Chem* 21:37-46.
- Pettersson, I., Arukwe, A., Lundstedt-Enkel, K., Mortensen, A. S., and Berg, C. 2006. Persistent sex-reversal and oviducal agenesis in adult *Xenopus (Silurana) tropicalis* frogs following larval exposure to the environmental pollutant ethynylestradiol. *Aquat. Toxicol.* 79:356-365.
- Pongratz I, Vikström Bergander L (2011). *Hormone-Disruptive Chemical Contaminants in Food*. Cambridge, UK, Royal Society of Chemistry.
- Preau JL, Wong LY, Silva MJ, Needham LL, Calafat AM (2010). Variability over 1 week in the urinary concentrations of metabolites of diethyl phthalate and di(2-ethylhexyl) phthalate among eight adults: An observational study. *Environmental Health Perspectives*, 118(12):1748-1754.
- Prins GS, Birch L, Couse JF, Choi I, Katzenellenbogen B, Korach KS (2001). Estrogen imprinting of the developing prostate gland is mediated through stromal estrogen receptor α : studies with α ERKO and β ERKO mice *Cancer*

Res 61:6089–6097.

Prins GS, Korach KS (2008). The role of estrogens and estrogen receptors in normal prostate growth and disease. *Steroids*, 73(3): 233-244.

Raecker T, Thiele B, Boehme RM, Guenther K. (2011) Endocrine disrupting nonyl- and octylphenol in infant food in Germany: considerable daily intake of nonylphenol for babies. *Chemosphere* 82(11):1533-40

Rajoria S, Suriano R, Shanmugam A, Wilson YL, Schantz SP, Geliebter J, Tiwari RK (2010). Metastatic phenotype is regulated by estrogen in thyroid cells. *Thyroid*, 20(1):33-41.

Ravoori S, Vadhanam MV, Sahoo S, Srinivasan C, Gupta RC (2007). Mammary tumor induction in ACI rats exposed to low levels of 17 beta estradiol. *International Journal of Oncology*, 31(1):113-120.

Razia S, Maegawa Y, Tamotsu S, Oishi T (2006). Histological changes in immune and endocrine organs of quail embryos: exposure to estrogen and nonylphenol. *Ecotoxicol Environ Saf.*, 65(3): 364-71.

Recchia AG, Vivacqua A, Gabriele S, Carpino A, Fasanella G, Rago V, Bonofiglio D, Maggiolini M (2004). Xenoestrogens and the induction of proliferative effects in breast cancer cells via direct activation of estrogen receptor alpha. *Food Addit. Contam.*, 21:134- 44.

Reistad T, Fonnum F, Mariussen E (2006) Neurotoxicity of the pentabrominated diphenyl ether mixture, DE-71, and hexabromocyclododecane (HBCD) in rat cerebellar granule cells in vitro. *Arch Toxicol*. 80: 785–796.

Richter C, Birnbaum LS, Farabollini F, Newbold RR, Rubin BS, Talsness CE, Vandenberg JG, Walsler-Kuntz DR, vom Saal FS (2007). In vivo effects of bisphenol A in laboratory rodent studies. *Reproductive Toxicology*, 24(2):199-224.

Ritchie JM, Vial SL, Fuortes LJ, Robertson LW, Guo HJ, Reedy VE, Smith EM (2005). Comparison of proposed frameworks for grouping polychlorinated biphenyl congener data applied to a case-control pilot study of prostate cancer. *Environmental Research*, 98(1):104-113.

Rocheleau CM, Romitti PA, Dennis LK (2009). Pesticides and hypospadias: a meta-analysis. *Journal of Pediatric Urology*, 5(1):17-24.

Rowe AM, Brundage KM, Barnett JB (2007). In vitro atrazine-exposure inhibits human natural killer cell lytic granule release. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 221(2):179-188.

Rubin BS, Lenkowski JR, Schaeberle CM, Vandenberg

LN, Ronsheim PM, Soto AM (2006). Evidence of altered brain sexual differentiation in mice exposed perinatally to low, environmentally relevant levels of bisphenol A. *Endocrinology*, 147(8):3681-3691.

Rubin BS, Murray MK, Damassa DA, King JC, Soto AM (2001). Perinatal exposure to low doses of bisphenol A affects body weight, patterns of estrous cyclicity, and plasma LH levels. *Environmental Health Perspectives*, 109(7):675-680.

Rudel RA, Attfield KR, Schifano JN, Brody JG (2007). Chemicals causing mammary gland tumors in animals signal new directions for epidemiology, chemicals testing, and risk assessment for breast cancer prevention. *Cancer*, 109(12):2635-2666.

Rudel RA, Camann DE, Spengler JD, Korn LR, Brody JG (2003). Phthalates, alkylphenols, pesticides, polybrominated diphenyl ethers, and other endocrine-disrupting compounds in indoor air and dust. *Environ Sci Technol*;37:4543–53.

Rudel RA, Melly SJ, Geno PW, Sun G, Brody JG (1998). Identification of alkylphenols and other estrogenic phenolic compounds in wastewater, septage, and groundwater on Cape Cod, Massachusetts. *Environ Sci Technol*. 32:861–9.

Ruenitz PC, Bourne CS, Sullivan KJ, Moore SA (1996). Estrogenic triarylethylene acetic acids: effect of structural variation on estrogen receptor affinity and estrogenic potency and efficacy in MCF-7 cells. *Journal of Medicinal Chemistry*, 39(24):4853-4859.

Russo J, Russo IH (2006). The role of estrogen in the initiation of breast cancer. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 102(1-5):89-96.

Ryu J, Yoon Y, Oh J (2011). Occurrence of endocrine disrupting compounds and pharmaceuticals in 11 WWTPs in Seoul, Korea. *Ksce Journal of Civil Engineering*, 15(1):57-64.

Sabbieti MG, Agas D, Palermo F, Mosconi G, Santoni G, Amantini C, Farfariello V, Marchetti L (2011) 4-nonylphenol triggers apoptosis and affects 17- β -estradiol receptors in calvarial osteoblasts. *Toxicology*. 290(2-3):334-41

Sahmoun AE, Case LD, Jackson SA, Schwartz GG, Schwartz GG (2005). Cadmium and prostate cancer: A critical epidemiologic analysis. *Cancer Investigation*, 23(3):256-263.

Schrager S, Potter BE (2004). Diethylstilbestrol exposure. *American Family Physician*, 69(10):2395-2400.

Schuhmacher-Wolz U, Dieter HH, Klein D, Schneider K (2009). Oral exposure to inorganic arsenic: evaluation of

- its carcinogenic and noncarcinogenic effects. *Critical Reviews in Toxicology*, 39(4):271-298.
- Sciarrillo R, Capaldo A, Valiante S, Gay F, Sellitti A, Laforgia V, De Falco M (2010). Thyroid Hormones as Potential Early Biomarkers of Exposure to Nonylphenol in Adult Male Lizard (*Podarcis sicula*). *The Open Zoology Journal*. 3:17-22.
- Sciarrillo R, De Falco M, Virgilio F, Laforgia V, Capaldo A, Gay F, Valiante S, Varano L (2008). Morphological and functional changes in the thyroid gland of methyl thiophanate-injected lizards, *Podarcis sicula*. *Arch Environ Contam Toxicol*. 2008 Aug;55(2):254-61. doi: 10.1007/s00244-007-9116-z.
- Seike N, Wanibuchi H, Morimura K, Wei M, Nishikawa T, Hirata K, Yoshikawa J, Fukushima S (2003). Enhancement of lung carcinogenesis by nonylphenol and genistein in a F344 rat multiorgan carcinogenesis model. *Cancer Lett*. 192: 25-36
- Sekine Y, Yamamoto T, Yumioka T, Imoto S, Kojima H, Matsuda T (2004). Cross-talk between endocrine-disrupting chemicals and cytokine signaling through estrogen receptors. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 315(3):692-698.
- Selvaraj KK, Shanmugam G, Sampath S, Larsson DG, Ramaswamy BR. (2013) GC-MS determination of bisphenol A and alkylphenol ethoxylates in river water from India and their ecotoxicological risk assessment. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2014 Jan;99:13-20. doi: 10.1016/j.ecoenv.2013.09.006.
- Shang DY, Macdonald RW, Ikonou MG (1999). Persistence of nonylphenol ethoxylate surfactants and their primary degradation products in sediments from near a municipal outfall in the strait of Georgia, British Columbia, Canada. *Environ Sci Technol*. 33:1366-72.
- Shao B, Hu J, Yang M (2003). Nonylphenol ethoxylates and their biodegradation intermediates in water and sludge of a sewage treatment plant. *Bull Environ Contam Toxicol*. 70:527-32.
- Shao, B., Han, H., Li, D., Ma, Y., Tu, X., Wu, Y., (2007). Analysis of alkylphenol and bisphenol A in meat by accelerated solvent extraction and liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Food Chem*. 105, 1236-1241.
- Shappell SB, Thomas GV, Roberts RL, Herbert R, Ittmann MM, Rubin MA, Humphrey PA, Sundberg JP, Rozengurt N, Barrios R, et al. (2004). Prostate pathology of genetically engineered mice: Definitions and classification. The consensus report from the Bar Harbor meeting of the Mouse Models of Human Cancer Consortium Prostate Pathology Committee. *Cancer Res* 64: 2270-2305.
- Shen MM, Abate-Shen C. (2007). Pten inactivation and the emergence of androgen-independent prostate cancer. *Cancer Res* 67: 6535-6538.
- Shen Y, Xu Q, Ren M, Feng X, Cai Y, Gao Y. (2013) Measurement of phenolic environmental estrogens in women with uterine leiomyoma. *Plos One* 8(11):e79838
- Siewit CL, Gengler B, Vegas E, Puckett R, Louie MC (2010). Cadmium promotes breast cancer cell proliferation by potentiating the interaction between ERalpha and c-Jun. *Mol Endocrinol*; 24(5):981-92.
- Signorile P, Spugnini E, Citro G, Viceconte R, Vincenzi B, Baldi F, Baldi A (2012). Endocrine disruptors in utero cause ovarian damages linked to endometriosis. *Frontiers in Bioscience E4*, 1724-1730.
- Signorile PG, Spugnini EP, Mita L, Mellone P, D'Avino A, Bianco M, Diano N, Caputo L, Rea F, Viceconte R, Portaccio M, Viggiano E, Citro G, Pierantoni R, Sica V, Vincenzi B, Mita DG, Baldi F, Baldi A (2010). Pre-natal exposure of mice to bisphenol A elicits an endometriosis like phenotype in female offspring. *General and Comparative Endocrinology*, 168(3):318-325.
- Silbergeld EK, Patrick TE (2005). Environmental exposures, toxicologic mechanisms, and adverse pregnancy outcomes. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 192(5 Suppl):S11-21.
- Simoncini T, Rabkin E, Liao JK (2003). Molecular basis of cell membrane estrogen receptor interaction with phosphatidylinositol 3-kinase in endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*;23(2):198-203.
- Simpkins F, Hevia-Paez P, Sun J, Ullmer W, Gilbert CA, da Silva T et al. (2012) Src Inhibition with saracatinib reverses fulvestrant resistance in ER-positive ovarian cancer models in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res* 18(21):5911-23
- Skinner MK, Guerrero-Bosagna C (2009). Environmental signals and transgenerational epigenetics. *Epigenomics*, 1(1):111-117
- Slotkin TA (2011). Does early-life exposure to organophosphate insecticides lead to prediabetes and obesity? *Reproductive Toxicology*, 31(3):297-301.
- Soares A, Guieysse B, Jefferson B, Cartmell E, Lester JN (2008). Nonylphenol in the environment: a critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters. *Environ Int*. 34(7):1033-49.
- Soares A, Vijayram IA, Guieysse B, Murto M, Guieysse B, Mattiasson B (2005). Degradation of non-ionic surfactants under anaerobic conditions. In: Rittmann BE,

- van Loosdrecht MCM, editors. Third IWA leading-edge conference on water and wastewater treatment technologies. Sapporo, Japan: IWA Publishing.
- Song L, Xia W, Zhou Z, Li Y, Lin Y, Wei J, Wei Z, Xu B, Shen J, Li W, Xu S (2012). Low-level phenolic estrogen pollutants impair islet morphology and β -cell function in isolated rat islets. *J Endocrinol*. Nov;215(2):303-11.
- Sonne C, Dietz R, Born EW, Riget FF, Kirkegaard M, Hyldstrup L, Letcher RJ, Muir DC (2004). Is bone mineral composition disrupted by organochlorines in east Greenland polar bears (*Ursus maritimus*)? *Environmental Health Perspectives*, 112(17):1711-1716.
- Sonne C, Leifsson PS, Dietz R, Born EW, Letcher RJ, Hyldstrup L, Riget FF, Kirkegaard M, Muir DCG (2006). Xenoendocrine pollutants may reduce size of sexual organs in East Greenland polar bears (*Ursus maritimus*). *Environmental Science and Technology*, 40(18):5668-5674.
- Soto AM, Justicia H, Wray JW, Sonnenschein C (1991). P-Nonylphenol: an estrogenic xenobiotic released from "modified" polystyrene. *Environ Health Perspect*; 92:167-73.
- Soto AM, Sonnenschein C (2010). Environmental causes of cancer: endocrine disruptors as carcinogens. *Nature Reviews Endocrinology*, 6(7):364-371.
- State of Science of Endocrine Disrupting Chemicals, (2012) Åke Bergman, Jerrold J. Heindel, Susan Jobling, Karen A. Kidd and R. Thomas Zoeller.
- Stemmler I, Lammel G (2009). Cycling of DDT in the global environment 1950-2002: World ocean returns the pollutant. *Geophysical Research Letters*, 36:L24602.
- Stephen RL, Gustafsson MC, Jarvis M, Tatoud R, Marshall BR, Knight D, Ehrenborg E, Harris AL, Wolf CR, Palmer CN. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta stimulates the proliferation of human breast and prostate cancer cell lines. *Cancer Res*. 2004 1;64(9):3162-70
- Stewart PW, Lonky E, Reihman J, Pagano J, Gump BB, Darvill T (2008). The relationship between prenatal PCB exposure and intelligence (IQ) in 9-year-old children. *Environmental Health Perspectives*, 116(10):1416-1422.
- Strohsnitter WC, Noller KL, Hoover RN, Robboy SJ, Palmer JR, Titus- Ernstoff L, Kaufman RH, Adam E, Herbst AL, Hatch EE (2001). Cancer risk in men exposed in utero to diethylstilbestrol. *Journal of the National Cancer Institute*, 93(7):545-551.
- Swan SH, Kruse RL, Liu F, Barr DB, Drobnis EZ, Redmon JB, et al (2003). Semen quality in relation to biomarkers of pesticide exposure. *Environ Health Perspect*;111:1478-84.
- Swan SH, Main KM, Liu F, Stewart SL, Kruse RL, Calafat AM, Mao CS, Redmon JB, Ternand CL, Sullivan S, Teague JL, Team SFFR (2005). Decrease in anogenital distance among male infants with prenatal phthalate exposure. *Environmental Health Perspectives*, 113(8):1056-1061.
- Szabo DT, Diliberto JJ, Hakk H, Huwe JK, Birnbaum LS (2010) Toxicokinetics of the flame retardant hexabromocyclododecane gamma: effect of dose, timing, route, repeated exposure, and metabolism. *Toxicol Sci*. 117: 282-293
- Tabata A, Kashiwada S, Ohnishi Y, Ishikawa H, Miyamoto N, Itoh M, et al (2001). Estrogenic influences of estradiol-17 beta, nonylphenol and bis-phenol-A on Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) at detected environmental concentrations. *Water Sci Technol*; 43:109-16.
- Taplin ME e Ho SM (2001). Clinical review 134: The endocrinology of prostate cancer. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 86: 3467-3477.
- TEDX (2011). TEDX List of Potential Endocrine Disruptors. The Endocrine Disruption Exchange
- Thiele B, Heinke V, Kleist E, Guenther K (2004). Contribution to the structural elucidation of 10 isomers of technical p-nonylphenol. *Environ Sci Technol*;38:3405-11.
- Thompson LU, Boucher BA, Liu Z, Cotterchio M, Kreiger N (2006). Phytoestrogen content of foods consumed in Canada, including isoflavones, lignans, and coumestrol. *Nutrition and Cancer-an International Journal*, 54(2):184-201.
- Thomsen C, Haug LS, Stigum H, Froshaug M, Broadwell SL, Becher G (2010). Changes in concentrations of perfluorinated compounds, polybrominated biphenyl ethers, and polychlorinated biphenyls in Norwegian breast-milk during twelve months of lactation. *Environmental Science and Technology*, 44(24):9550-9556.
- Timms BG. (2008). Prostate development: A historical perspective. *Differentiation* 76: 565-577.
- Titus-Ernstoff L, Troisi R, Hatch EE, Wise LA, Palmer J, Hyer M, Kaufman R, Adam E, Strohsnitter W, Noller K, Herbst AL, Gibson- Chambers J, Hartge P, Hoover RN (2010). Menstrual and reproductive characteristics of women whose mothers were exposed in utero to diethylstilbestrol (DES). *International Journal of Epidemiology*, 35(4):862-868.

- Treuter EM, Warner J e Gustafsson JA. (2000). Mechanism of oestrogen signalling with particular reference to the role of ER beta in the central nervous system. *Novartis Found. Symp.* 230: 7–14.
- Tyler CR, Jobling S (2008). Roach, sex, and gender-bending chemicals: The feminization of wild fish in English rivers. *Bioscience*, 58(11):1051-1059.
- US EPA (2009). Overview of the April 2009 final list of chemicals for initial Tier 1 screening. Washington DC, US Environmental Protection Agency, Endocrine Disruptor Screening Program (EDSP). Available at: http://www.epa.gov/endo/pubs/prioritysetting/final_listfacts.htm (accessed October 2011)
- US EPA (2010). Endocrine disruptor screening program; Second list of chemicals for Tier 1 screening. Environmental Protection Agency (EPA).
- Usmani KA, Cho TM, Rose RL, Hodgson E (2006). Inhibition of the human liver microsomal and human cytochrome P450 1A2 and 3A4 metabolism of estradiol by deployment-related and other chemicals. *Drug Metab Dispos.*; 34:1606–14
- Usmani KA, Rose RL, Hodgson E (2003). Inhibition and activation of the human liver microsomal and human cytochrome P450 3A4 metabolism of testosterone by deployment-related chemicals *Drug Metab Dispos.*; 31:384–391.
- van Leenders GJ, Schalken JA. (2003). Epithelial cell differentiation in the human prostate epithelium: Implications for the pathogenesis and therapy of prostate cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 46: S3–S10. doi: 10.1016/S1040-8428(03)00059-3.
- Vandenberg LN, Colborn T, Hayes TB, Heindel JJ, Jacobs DR Jr, et al. (2012) Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocr Rev* 33: 378–455.
- Vandenberg LN, Maffini MV, Schaeberle CM, Ucci AA, Sonnenschein C, Rubin BS, Soto AM (2008). Perinatal exposure to the xenoestrogen bisphenol-A induces mammary intraductal hyperplasias in adult CD-1 mice. *Reproductive Toxicology*, 26(3-4):210-219.
- Vasiliu O, Muttineni J, Karmaus W (2004). In utero exposure to organochlorines and age at menarche. *Human Reproduction*, 19(7):1506-1512.
- Vazquez-Duhalt R, Marquez-Rocha F, Ponce E, Licea AF, Viana MT (2005). Nonylphenol, an integrated vision of a pollutant. *Ecol Environ Res*, 4(1): 1-25.
- Verboven N, Verreault J, Letcher RJ, Gabrielsen GW, Evans NP (2010). Adrenocortical function of Arctic-breeding glaucous gulls in relation to persistent organic pollutants. *General and Comparative Endocrinology*, 166(1):25-32.
- Verderame M, Prisco M, Andreuccetti P, Aniello F, Limatola E (2011). Experimentally nonylphenol-polluted diet induces the expression of silent genes VTG and ER α in the liver of male lizard *Podarcis sicula*. *Environ Pollut.* 159(5):1101-7.
- Vermeulen AR, Rubens A e Verdonck C. (1972). Testosterone secretion and metabolism in male senescence. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 34: 730–735.
- Veveris-Lowe TL, Kruger SJ, Walsh T, Gardiner RA, Clements JA (2007). Seminal fluid characterization for male fertility and prostate cancer: kallikrein-related serine proteases and whole proteome approaches. *Semin Thromb Hemost*;33:87–99.
- Viberg H, Johansson N, Fredriksson A, Eriksson J, Marsh G, et al. (2006) Neonatal exposure to higher brominated diphenyl ethers, hepta octa-, or nonabromodiphenyl ethers, impairs spontaneous behaviour and learning and memory functions of adult mice. *Toxicol. Sci.* 92: 211–218.
- Vivacqua A, Recchia AG, Fasanella G, Gabriele S, Carpino A, Rago V, Di Gioia ML, Leggio A, Bonofiglio D, Maggiolini M, Liguori A (2003). The food contaminants bisphenol A and 4-nonylphenol act as agonists for estrogen receptor alpha in MCF7 breast cancer cells. *Endocrine*. 22: 275-84.
- vom Saal FS, Timms BG, Montano MM, Palanza P, Thayer KA, Nagel SC, Dhar MD, Ganjam VK, Parmigiani S, Welshons WV (1997). Prostate enlargement in mice due to fetal exposure to low doses of estradiol or diethylstilbestrol and opposite effects at high doses. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:2056–2061.
- Wallin E, Rylander L, Hagmar L (2004). Exposure to persistent organochlorine compounds through fish consumption and the incidence of osteoporotic fractures. *Scandinavian Journal of Work Environment & Health*, 30(1):30-35.
- Wan HT, Leung PY, Zhao YG, Wei X, Wong MH, Wong CK (2013). Blood plasma concentrations of endocrine disrupting chemicals in Hong Kong populations. *S0304-3894(13)00052-6*
- Wan Y, Choi K, Kim S, Ji K, Chang H, Wiseman S, Jones PD, Khim JS, Park S, Park J, Lam MHW, Giesy JP (2010). Hydroxylated polybrominated diphenyl ethers and bisphenol A in pregnant women and their matching fetuses: Placental transfer and potential risks. *Environmental Science and Technology*, 44(13):5233-5239.

- Wang JL, Liu CS, Lin KL, Chou CT, Hsieh CH, Chang CH, Chen WC, Liu SI, Hsu SS, Chang HT, Jan CR (2005). Nonylphenol-induced Ca²⁺ elevation and Ca²⁺-independent cell death in human osteosarcoma cells. *Toxicol Lett.* 160(1):76-83.
- Wang Y, Hu H, Zhao M, Zhao J, Yin D, Sun X, Liu S, Gao Q, Yu L, Hao L. (2013). Nonylphenol disrupts the cardio-protective effects of 17 β -estradiol on ischemia/reperfusion injury in isolated hearts of guinea pig. *J Toxicol Sci* ;38(5):731-40.
- Welshons WV, Nagel SC, vom Saal FS (2006) Large effects from small exposures. III. Endocrine mechanisms mediating effects of bisphenol A at levels of human exposure. *Endocrinology* 147: 56–69.
- Weng YI, Hsu PY, Liyanarachchi S, Liu J, Deatherage DE, Huang YW, Zuo T, Rodriguez B, Lin CH, Cheng AL, Huang TH (2010). Epigenetic influences of low-dose bisphenol A in primary human breast epithelial cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 248(2): 111–121.
- Wetherill YB, Akingbemi BT, Kanno J, McLachlan JA, Nadal A, Sonnenschein AC, Watson CS, Zoeller RT, Belcher SM (2007). In vitro molecular mechanisms of bisphenol A action. *Reproductive Toxicology*, 24(2):178-198.
- Wetherill YB, Fisher NL, Staubach A, Danielsen M, de Vere White RW, Knudsen KE (2005) Xenoestrogen action in prostate cancer: pleiotropic effects dependent on androgen receptor status. *Cancer Res* 65(1):54–65
- Wetherill YB, Hess-Wilson JK, Comstock CE, Shah SA, Buncher CR, Sallans L, Limbach PA, Schwemberger S, Babcock GF, Knudsen KE (2006) Bisphenol A facilitates bypass of androgen ablation therapy in prostate cancer. *Mol Cancer Ther* 5(12):3181–3190
- Wetherill YB, Petre CE, Monk KR, Puga A, Knudsen KE (2002) The xenoestrogen bisphenol A induces inappropriate androgen receptor activation and mitogenesis in prostatic adenocarcinoma cells. *Mol Cancer Ther* 1(7):515–524
- White R, Jobling S, Hoare SA, Sumpter JP, Parker MG. (1994) Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. *Endocrinology*; 135:175–82.
- WHO (2007). Evaluation of certain food additives and contaminants; Sixty-seventh report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Geneva, World Health Organization.
- Windham GC, Waller K, Anderson M, Fenster L, Mendola P, Swan S (2003). Chlorination by-products in drinking water and menstrual cycle function. *Environmental Health Perspectives*, 111(7):935-941; discussion A409.
- Xi Y, Li D, San W. (2013) Exposure to the endocrine disruptor nonylphenol alters structure and function of thyroid gland in rats. *Regul Pept.* 185:52-6
- Yang, D.-K., Ding, W.-H., (2005). Determination of alkylphenolic residues in fresh fruits and vegetables by extractive steam distillation and gas chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1088, 200–204.
- Yao G, Yang L, Hu Y, Liang J, Liang J, Hou Y. (2006) Nonylphenol-induced thymocyte apoptosis involved caspase-3 activation and mitochondrial depolarization. *Mol Immunol.* 43(7):915-26.
- Yolton K, Xu Y, Strauss D, Altaye M, Calafat AM, Khoury J (2011). Prenatal exposure to bisphenol A and phthalates and infant neurobehavior. *Neurotoxicology and Teratology*, 33(5):558-566.
- Yongmei Qi, Yingmei Zhang, Yingxia Liu, Wenya Zhang (2011). Nonylphenol decreases viability and arrests cell cycle via reactive oxygen species in Raji. *Exp Toxicol Pathol* doi:10.1016/j.etp.2011.06.002.
- Young HA, Mills PK, Riordan DG, Cress RD (2005). Triazine herbicides and epithelial ovarian cancer risk in central California. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 47(11):1148-1156.
- Yum T, Lee S, Kim Y. (2103) Association between precocious puberty and some endocrine disruptors in human plasma. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng* 48(8):912-7
- Yurino H, Ishikawa S, Sato T, Akadegawa K, Ito T, Ueha S, Inadera H, Matsushima K (2004). Endocrine disruptors (environmental estrogens) enhance autoantibody production by B1 cells. *Toxicological Sciences*, 81(1):139-147.
- Zaccaroni A, Gamberoni M, Mandrioli L, Sirri R, Mordenti O, Scaravelli D, Sarli G, Parmeggiani A (200). Thyroid hormones as a potential early biomarker of exposure to 4-nonylphenol in adult male shubunkins (*Carassius auratus*). *Sci Total Environ.* 1;407(10):3301-6.
- Zhang HY, Xue WY, Li YY, Ma Y, Zhu YS, Huo WQ, Xu B, Xia W, Xu SQ. (2014) Perinatal exposure to 4-nonylphenol affects adipogenesis in first and second generation rats offspring. *Toxicol Lett.* 225(2):325-32
- Zhang, D., Popesku, J. T., Martyniuk, C. J., Xiong, H., Duarte-Guterman, P., Yao, L., Xia, X., and Trudeau, V. L. 2009. Profiling neuroendocrine gene expression changes following fadrozole-induced estrogen decline in the female goldfish. *Physiol. Genom.* 38:351-361.
- Zimmer KE, Kraugerud M, Aleksandersen M, Gutleb AC, Ostby GC, Dahl E, Berg V, Skaare JU, Olsaker I, Ropstad E (2011). Fetal adrenal development: Comparing effects

of combined exposures to PCB 118 and PCB 153 in a sheep model. *Environmental Toxicology*.

Zoeller RT (2010). Environmental chemicals targeting thyroid. *Hormones (Athens)*, 9(1):28-40.

RINGRAZIAMENTI:

Ed eccomi all'ultima pagina, la più semplice, dato che non è richiesto nessuno sforzo per elaborarla e nel ricordare tutti coloro che mi hanno aiutato in questo percorso di dottorato. Nel ringraziarli, ripercorro, con un pizzico di nostalgia, i miei tre anni di dottorato.

Inizio dal laboratorio dove ho svolto la mia attività di ricerca: ringrazio il mio tutor, la Prof. ssa Vincenza Laforgia, guida scientifica e umana, divenuta per me un vero e proprio familiare. Grazie per l'opportunità che mi ha dato nel lavorare nel suo gruppo di ricerca.

Ringrazio la prof. Maria De Falco e il dott. Salvatore Valiante, per tutto l'insegnamento che mi hanno offerto, per la loro simpatia, il loro incoraggiamento e tanto tanto altro. E' stato un onore far parte della loro squadra.

Grazie alla dott. ssa Giuseppina Iachetta (Giusy), collega, coinquilina, amica. A lei devo gran parte di questo percorso di dottorato; per il suo costante e invidiabile aiuto giornaliero, sia dal punto di vista scientifico che emotivo.

Un ringraziamento agli ex colleghi di università, divenuti sempre più amici, seguendo le varie tappe dei tre anni: Albino Carrizzo, Massimiliano Mele e Lucia Mattera. Con loro ho vissuto momenti favolosi.

Grazie ai tanti volti del Dipartimento di Biologia, una vera e propria famiglia: docenti, personale amministrativo, colleghi con i quali ho instaurato un vero e proprio rapporto di amicizia, alternando al lavoro momenti di divertimento e di relax: Luigi Rosati, Marina Prisco, Valeria Lamarca, Raffaella Sica, Giovanna Trinchese, Raimondo Cerciello, Ilaria Verderame, Annetta Sellitti, Marisa Agnese, Marialaura Pollio, Mariagrazia Ruggiero, Mariagrazia Esposito, Antonio Monaco, Massimo Maddaloni, Vincenzo Migliaccio.

Un grazie ai tanti tesisti che mi hanno accompagnato nelle ore di laboratorio; tra tutti le amiche Mariana Di Lorenzo, Lisa Laudato, Rosalba Ferrara, Maria Cerciello.

Ringrazio i colleghi del XXVI ciclo di Biologia Avanzata, davvero persone stupende: Giovanni Capasso, Roberta Gargiulo, Antonella Giorgio, Marcello Mezzasalma, Luigi Rosati.

Per aver "subito" le mie storie di laboratorio senza spesso capirci nulla, grazie ai miei amici più cari: Francesco Li Petri, Francesco Nerone, Raffaele Attanasio, Michele Rossi, Mario Leone, Giuseppe Pagliaro.

Quante belle serate in casa Talamo in questi tre anni, grazie grazie grazie ai tanti amici: Lippo, Giovanni Rizzo, l' "inglese" Angelo Pommella, gli "scozzesi" Nicola Laprano e Brunella Testa, Giusy, Alba Capasso, Sabrina Augusto, Elena Sciaudone, Antonella De Biasio.

A mio cugino Mariano Cinque e mio fratello Roberto...grazie come sempre!!

Grazie alla città di Napoli, al Cavone, via Mezzocannone, piazza San Domenico, piazza del Gesù e Piazza Bellini, luoghi che porterò sempre nel cuore!

Hanno lo stesso valore dell'abstract, sono le ultime righe: le dedico ai miei familiari: grazie a zio Peppino e zia Ivana, grazie a zia Bianca e zia Nora, a Felicia, Gianluca, Mario, Peppe, per tutto l'affetto e la stima che mi hanno sempre dimostrato.

Un rigo per ringraziare mamma può sembrare riduttivo: allora alla parola grazie aggiungo "infinite"

Chiudo i ringraziamenti nel ricordare Papà Raffaele, scomparso proprio durante la stesura di questa tesi. Mio sponsor ovunque andavi, eri orgoglioso sempre del mio lavoro da biologo. Sono sicuro che più di tutti, avrai letto e riletto questa tesi! Grazie.