

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI  
"FEDERICO II"  
SCUOLA DI MEDICINA E CHIRURGIA  
DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE  
TRASLAZIONALI**

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

**Coordinatore: Prof. Claudio Pignata**

**Tesi di Dottorato**

***"Inquinamento ambientale e patologie  
ostetrico-ginecologiche"***

**Tutore  
Prof. Carmine Nappi**

**Candidato  
Dott.ssa Paola Di Iorio**

**Anno Accademico 2013-2014**

# INDICE

## INTRODUZIONE:

### *Effetti potenziali dell'inquinamento ambientale sulla*

*salute umana* **pag 4**

1.1 Il “*delicato*” rapporto tra rifiuti e inquinamento pag 4

1.2 Effetti dell'inquinamento sull'animale e sull'uomo pag 15

1.3 La situazione nella regione Campania pag 24

## 1° LINEA DI RICERCA: INQUINAMENTO

### AMBIENTALE E PATOLOGIA OSTETRICA

#### Capitolo I “*PCB telomeri e malformazioni fetali*”

**I.1 Introduzione pag 53**

**I.2 Obiettivo dello studio pag 72**

**I.3 Materiali e Metodi pag 74**

**I.4 Risultati pag 86**

**I.5 Discussione pag 100**

**I.6 Bibliografia pag 107**

#### Capitolo II “*Bisfenolo A e malformazioni fetali*”

<b>II.1 Introduzione</b>	<b>pag 114</b>
<b>II.2 Obiettivi</b>	<b>pag 122</b>
<b>II.2 Materiali e metodi</b>	<b>pag 124</b>
<b>II.3 Risultati</b>	<b>pag 132</b>
<b>II.4 Discussione</b>	<b>pag 144</b>

**2° LINEA DI RICERCA: INQUINAMENTO**  
**AMBIENTALE E PATOLOGIA GINECOLOGICA**

**Capitolo I “*Valutazione del ruolo delle Organoclorine*  
*nello sviluppo del cancro endometriale*”**

<b>I.1 Abstract</b>	<b>pag 164</b>
<b>I.2 Introduzione</b>	<b>pag 165</b>
<b>I.3 Materiali e metodi</b>	<b>pag 167</b>
<b>I.4 Risultati</b>	<b>pag 174</b>
<b>I.5 Discussione</b>	<b>pag 176</b>
<b>I.6 Bibliografia</b>	<b>pag 179</b>

**Pubblicazione scientifica: “*Bisphenol A and Congenital***

<b><i>Development Defects in Humans</i>”</b>	<b>pag 180</b>
--	----------------

## INTRODUZIONE

*"La Speranza ha due bellissimi figli:*

*lo sdegno e il coraggio ...*

*Lo sdegno per la realtà delle cose, il coraggio per cambiarle"*

(Pablo Neruda)

### **Effetti potenziali dell'inquinamento ambientale sulla salute umana**

#### **1.1 Il delicato rapporto tra Rifiuti e Inquinamento**

Nel corso degli ultimi trent'anni, si è andata progressivamente imponendo una nuova e più diffusa attenzione rispetto ai temi, sempre più attuali e scottanti, dell'inquinamento ambientale e delle relative ripercussioni sulla salute umana.

L'ambiente è definito come "l'insieme degli elementi che, nella complessità delle loro relazioni costituiscono le condizioni di vita dell'uomo" (CE, 1973); l'uomo, come tutti gli esseri viventi, interagisce continuamente con l'ambiente, che può essere causa di effetti negativi sul suo stato di salute. L'equilibrio del rapporto uomo-ambiente è stato fortemente influenzato dai progressi socioeconomici e tecnico-scientifici avvenuti negli ultimi due secoli. [1]

Perciò, l'inquinamento è inteso come “una qualsiasi alterazione dell'ambiente, di origine antropica o naturale, che produce disagi o danni permanenti per la vita e che non è in equilibrio con i cicli naturali esistenti”.

Non esiste una sostanza di per sé inquinante, ma è l'uso di qualsiasi sostanza o un evento che possono essere inquinanti. E' infatti inquinamento “tutto ciò che è nocivo per la vita o altera in maniera significativa le caratteristiche fisico-chimiche dell'acqua, del suolo o dell'aria, tale da cambiare la struttura dei viventi e soprattutto ciò che non viene compensato da una reazione naturale o antropica che ne annulli gli effetti negativi totali”.

Benché possano esistere cause naturali che possono provocare alterazioni ambientali sfavorevoli alla vita, il termine “*inquinamento*” si riferisce in genere alle attività antropiche.

I rifiuti sono ormai da anni al centro di tematiche politico-ambientali, ma anche e soprattutto medico-scientifiche, a livello internazionale ed europeo.

Non a caso l'Europa ha promosso e integrato una serie di normative di settore allo scopo di raggiungere una maggiore tutela dell'ambiente e della salute umana. [2]

Per rifiuto si intende “qualsiasi sostanza od oggetto di cui il detentore si disfi o abbia l'obbligo di disfarsi (CEE 751442),o qualsiasi sostanza od

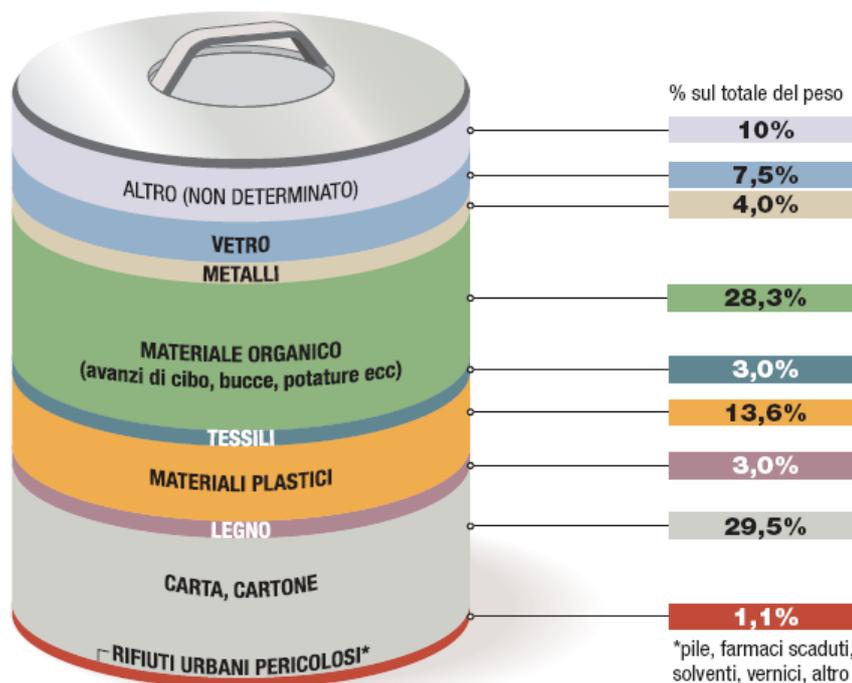
oggetto derivante da attività umane o da cicli naturali abbandonato o destinato all'abbandono (DPR 915/82)".

I rifiuti vengono classificati, in base all'origine, in rifiuti urbani e rifiuti speciali, oppure, in base alle loro caratteristiche di pericolosità, in rifiuti pericolosi e rifiuti non pericolosi.

I rifiuti domestici si producono nelle abitazioni civili e costituiscono la maggior parte dei rifiuti urbani prodotti nell'ambito della municipalità. Oltre ai rifiuti prodotti in ambito domestico e assimilabili, i rifiuti urbani comprendono anche i rifiuti derivanti dallo spezzamento delle strade, rifiuti giacenti sulle strade pubbliche, spiagge e rive dei corsi d'acqua e rifiuti vegetali provenienti da aree verdi, giardini e parchi.

Un rifiuto urbano contiene, sul totale del peso, 7,5% vetro, 4%

Fig. 1.2 Composizione di un rifiuto organico



metallo, 28.3% materiale organico (avanzi di cibo, bucce, patate, etc), 3% tessili, 13.6% materiali plastici, 3% legno, 29,5% carta, cartone, 10% altro (non determinato), 1.1% rifiuti urbani pericolosi (pile, farmaci scaduti, solventi, vernici).

Pertanto, all'interno di un sacchetto di rifiuti domestici, può avvenire:

- una parziale decomposizione della frazione organica con formazione di sostanze molto odorigene, in genere non dotate di particolare tossicità, a causa della flora microbica ambientale;
- rottura dei sacchetti con spargimento dei rifiuti domestici che possono fornire facile nutrimento per animali che, a loro volta, possono essere vettori di malattie per l'uomo;
- combustione dei sacchetti che può generare sostanze tossiche;



**Fig. 1.3 Combustione di rifiuti solidi urbano**

Per quanto riguarda i rifiuti domestici, è improbabile un rischio intrinseco diossina. Non è impossibile, però, che incendi prolungati per diversi giorni di grandi quantità di rifiuti domestici possano determinare un impatto ambientale rilevabile. Rifiuti di origine industriale abbandonati sul territorio possono rappresentare un rischio intrinseco diossina per l'ambiente. La loro combustione incontrollata, infatti, potrebbe aggravare significativamente l'immissione delle diossine nell'ambiente, soprattutto se nella miscela di combustione sono presenti i precursori di diossina.

Inoltre, una discarica che riceve rifiuti indifferenziati può avere un impatto ambientale molto maggiore rispetto a una discarica di rifiuti selezionati e/o protrattati.

Un altro aspetto da considerare riguarda il “percolato”, ovvero il colaticcio che si genera da un ammasso di rifiuti per effetto delle acque che, infiltrandosi nei rifiuti, portano in soluzione le sostanze più solubili (cloruri, ammoniaca, solfati, metalli, solventi organo alogenati etc) spesso ricche di diversi inquinanti. [3]

È importante inoltre considerare che da un ammasso di rifiuti a prevalente matrice organica, a causa della flora microbica ambientale di tipo aerobico e anaerobico, si libera un gas definito “biogas”. Metano (CH<sub>4</sub>) e anidride carbonica (CO<sub>2</sub>) sono i costituenti principali del biogas e vengono prodotti durante la decomposizione della sostanza organica e delle proteine presenti nei rifiuti smaltiti in discarica.

Un altro problema non trascurabile nel trattamento dei rifiuti solidi urbani (Rsu) è il recupero e la stabilizzazione delle ceneri. [2]

I principali filoni di indagine e di miglioramento tecnologico, oltre a quelli relativi al recupero e al riutilizzo dei residui di combustione (ceneri e scorie), sono:

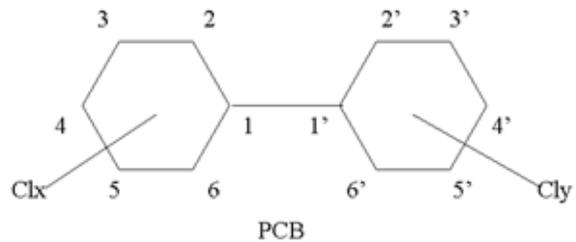
- *pretrattamento chimico-fisico dei rifiuti*: studio degli effetti di una preselezione a monte della camera di combustione, per ottenere combustibile da rifiuti (Rdf) che ottimizzi la gestione della combustione, garantendo la “qualità” delle scorie e delle emissioni inquinanti.
- *depurazione e strategia di controllo degli effluenti gassosi*: le ricerche sono numerose e spaziano dalle tecnologie applicative di depurazione e controllo dei fumi, alle sperimentazioni specialistiche di laboratorio per ricavare meccanismi e cinetiche di reazione.
- *monitoraggio dei terreni circostanti gli impianti*: diverse ricerche hanno affrontato l'utilizzo di bioindicatori, per la determinazione della concentrazione di microinquinanti nel suolo e dei loro effetti sull'agricoltura.
- *monitoraggio degli inquinanti in emissione e acquisizione dei dati in remoto*: la disposizione di sistemi di monitoraggio in continuo nelle emissioni di impianti di incenerimento è ormai stabilita dalle vigenti normative.
- *campionamento costante dei microinquinanti (per esempio, diossine) in emissione*: oltre ai controlli periodici previsti per la verifica del rispetto dei limiti in emissione, si sono sviluppati sistemi di

campionamento che permettono di studiare nel tempo i fattori di emissione di questi inquinanti (campionamento di circa un mese).

- *recupero energetico nei processi di incenerimento*: le attuali normative in materia di incenerimento e termoutilizzazione dei rifiuti impongono, per la realizzazione dei nuovi impianti, l'effettuazione del recupero energetico.
- *sistemi di combustione e struttura del forno di incenerimento*: le principali tipologie di forni impiegate per i rifiuti solidi.
- *ricaduta degli inquinanti al suolo e verifica di impatto ambientale*: per lo studio degli effetti in termini di qualità dell'aria determinati dal sistema di termodistruzione dei rifiuti, possono essere utilizzati modelli diffusionali per rappresentare le fenomenologie di diffusione e ricaduta al suolo degli inquinanti, sia gassosi che particellari.

L'Unione Europea ha ufficialmente dichiarato guerra agli inquinanti organici persistenti. Una decisione del Consiglio ha infatti approvato, a nome dell'Unione Europea, la Convenzione di Stoccolma, firmata nel 2001. Quest'ultima, basandosi sul principio di precauzione, fornisce il quadro atto a garantire l'eliminazione e la diminuzione della produzione e dell'uso delle sostanze nocive per la salute umana e per l'ambiente. La convenzione riguarda 12 POP (inquinanti organici persistenti) prioritari, principalmente diossine, prodotti intenzionalmente o meno. La produzione non intenzionale di queste sostanze è legata a fonti di vario tipo, quali la combustione domestica o l'uso di inceneritori di rifiuti.

Il termine generico “diossina” viene utilizzato comunemente per indicare una numerosa famiglia di sostanze chimiche che contengono cloro, e che si caratterizzano per proprietà simili, tra cui: difficoltà a sciogliersi nell’acqua, elevata capacità di sciogliersi nei grassi, difficoltà a



**Fig. 1.4 Struttura chimica PCB**

biodegradarsi, lunga durata nell’ambiente, forte tendenza ad accumularsi negli organismi viventi. Le diossine sono, quindi, considerate contaminanti globali, in quanto ubiquitarie e, sia pure in bassissime dosi, praticamente presenti ovunque. Il problema non è, perciò, la loro presenza, ma la loro quantità.

Le diossine non sono prodotti industriali, ma sottoprodotti indesiderati di altre reazioni chimiche (processi di combustione incontrollata quali incenerimento dei rifiuti delle attività agricole, incendi di boschi e siti industriali, fuochi di caminetti). La formazione di diossine nella combustione incontrollata è agevolata in modo sensibile dalla presenza di certe sostanze chimiche contenenti cloro, i cosiddetti “precursori”. Si tratta di sostanze prodotte dall’uomo e, tra queste, si ricordano i policlorobifenili (PCB). I PCB ( $C_{12}H_{10-n}Cl_n$ , con n compreso tra 1 e 10) appartengono alla classe di idrocarburi clorurati non polari con nucleo bifenilico, con sostituzione da 1 fino a 10 atomi di idrogeno con atomi di cloro. Questa struttura fa sì che i PCB siano una numerosissima famiglia

di ben 209 congeneri definiti “diossina-simili”. In genere, si ha quindi a che fare con miscele di PCB.

L’Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha identificato 12 dei 209 congeneri, che presentano caratteristiche di tossicità simili alla 2,3,7,8- tetraclorodibenzo-p-diossina (TCDD), temibile tossico ambientale. Questi congeneri, definiti "diossina-simili", presentano le seguenti caratteristiche:

- a) sono “coplanari” con le sostituzioni con atomi di cloro non in posizione orto o solo con una delle posizioni orto, tra la 2, 2', 6 o 6';
- b) hanno un totale di quattro o più posizioni sostituite con atomi di cloro;
- c) hanno entrambe le posizioni para sostituite con atomi di cloro (4 e 4');
- d) hanno due o più delle posizioni meta sostituite con atomi di cloro (3, 3', 5, 5').

I PCB sono tossici insidiosi, invisibili ed impercettibili; si accumulano nell’organismo soprattutto in situazioni di contaminazione cronica e di lungo periodo, producendo effetti dannosi a lunga scadenza difficilmente prevedibili.

La maggior fonte di contaminazione umana riguarda la loro assunzione attraverso gli alimenti, anche se in alcuni casi l’inalazione e l’esposizione cutanea possono rappresentare delle importanti vie di contaminazione [4]. È importante sottolineare come in soggetti

particolarmente suscettibili, i danni determinati da tali esposizioni potrebbero essere particolarmente gravi. In particolare, neonati contaminati da PCB per via transplacentare mostrano alterazioni neurologiche che vanno dall'ipotonia alla nascita, al ritardo dello sviluppo psicomotorio tra i 6 ed i 12 mesi, ad una minor capacità di cognizione visiva a 7 mesi di vita [5].

I Policlorobifenili sono stati utilizzati fino al 1977 come materiale isolante nei trasformatori e nei condensatori, così come in svariate applicazioni industriali. La loro alta stabilità da un punto di vista chimico ne ha determinato la capacità di persistere nell'ambiente come inquinanti, essere trasportati anche a distanza dal sito di produzione ed essere accumulati nell'organismo umano producendo effetti dannosi.

Le normative di settore promosse e integrate dall'Unione Europea, recepite in Italia con il DL Ronchi del 1997, allo scopo di raggiungere una maggiore tutela dell'ambiente e della salute umana, sono le seguenti:

- Criteri di priorità (Art.179)

- Sviluppo di tecnologie pulite

- Ideazione e messa in commercio di prodotti che non contribuiscono o diano un contributo minimo alla produzione di rifiuti ed all'inquinamento

- Miglioramenti tecnologici per eliminare la presenza di sostanze pericolose nei rifiuti

-Ruolo attivo delle amministrazioni pubbliche nel riciclaggio dei rifiuti e loro utilizzo come fonte di energia

- Prevenzione della produzione di rifiuti (Art.180)

-Corretta valutazione dell'impatto ambientale di ogni prodotto durante il suo intero ciclo vitale

-Capitolati di appalto che considerino l'abilità nella prevenzione della produzione

-Promuovere accordi e programmi sperimentali per prevenire e ridurre la quantità e pericolosità dei rifiuti

-Attuare il DL 18 Febbraio 2005 n.59 e la direttiva 96/61/CE specifica per la riduzione e prevenzione integrate dell'inquinamento

- Recupero dei rifiuti

-Il riutilizzo,il reimpiego ed il riciclaggio

-Produzione di materia prima secondaria trattando i rifiuti stessi

-Favorire tramite misure economiche e capitolati nelle gare d'appalto il mercato dei prodotti reimpiegati

-Uso dei rifiuti per produrre energia (recupero energetico,ossidazione biologica a freddo,gassificazione,incenerimento).

Importante è anche la normativa per il controllo di diossine negli alimenti e nei mangimi.

Per quanto riguarda i contaminanti negli alimenti, la normativa in vigore è il regolamento Ce 1881/2006 che stabilisce, tra l'altro, i tenori massimi di diossine e della somma di diossine e policlorobifenili (PCB) diossino-simili in diversi prodotti alimentari (carni, pesce, latte, uova, grassi animali, olio, etc).

Si tratta di valori che tengono conto sia della contaminazione ambientale esistente, sia dell'esposizione umana. In particolare, per il latte e i prodotti lattiero-caseari, questo regolamento stabilisce un tenore massimo pari a:

- 3 Oms<sup>1</sup>-Teq pg/g di materia grassa per le diossine
- 6 Oms-Teq pg/g di materia grassa per la somma di diossine e policlorobifenili (Pcb) diossino-simili.

Pertanto, i prodotti alimentari contenenti un livello di diossine o PCB diossino-simili superiore a questi valori non possono essere commercializzati.

## **1.2 Effetti dell'inquinamento sull'animale e sull'uomo**

I potenziali effetti sulla salute derivanti dall'inquinamento delle grandi aree urbane sono stati studiati e in parte evidenziati da molti dati epidemiologici e clinici.

Le diossine possono entrare nella catena alimentare attraverso diverse vie, e particolari fonti di inquinamento ambientali possono creare aree localizzate dove la contaminazione è maggiore.

Il trasporto atmosferico e la ricaduta sono le principali fonti di inquinamento di verdure a foglia, di pascoli e di foraggio. Il suolo, quindi, costituisce un luogo di accumulo naturale e gli animali, per questo, diventano i primi ad essere esposti alla diretta assunzione di diossina.

Le diossine si concentrano nei tessuti grassi di bovini, ovini, suini, pollami e frutti di mare poiché esse sono sostanze liposolubili e, in linea di massima, più è lunga la durata di vita dell'animale, più è facile che queste si accumulino nel suo organismo. [2]

L'azione tossica della TCDD nei vari tessuti animali è mediata dall'azione del recettore cellulare AHR (Aryl Hydrocarbon Receptor), una proteina solubile intracellulare in grado di legarsi a numerose sostanze aromatiche, alogenate e non. Gli atomi di cloro nelle quattro posizioni laterali, caratteristici della TCDD, conferiscono alla molecola la massima affinità con il recettore e, di conseguenza, la massima tossicità. L'affinità diminuisce al diminuire dei sostituenti Cl laterali e all'aumentare del numero totale dei sostituenti Cl. Il recettore AHR possiede caratteristiche biochimiche affini ai recettori per gli ormoni steroidi, anche se per ora non è stata individuata una molecola endogena specifica che vi corrisponda. Allo stato libero è reperibile sia nel citosol

che nel nucleo, apparentemente in condizioni di equilibrio [6], complessato con almeno 3 proteine addizionali [7]. La diossina, che si trova nei tessuti allo stato libero, diffonde liberamente all'interno della cellula e incontrando il recettore ARH forma il complesso TCDD/ARH. Tale complesso subisce una serie di trasformazioni che comportano il rilascio di hsp90 ("heat shock protein" da 90 kDa) e di altre proteine, e acquista così la capacità di legarsi ad una proteina nucleare, chiamata ARNT (Ah Receptor Nuclear Translocator) [8;9]. Quest'ultimo complesso possiede un'elevata affinità per alcune sequenze di DNA, le DRE (Dioxin Responsive Elements), situate nelle adiacenze del gene CYP1A1 che regola la sintesi del citocromo microsomiale P-450 e l'attività della correlata monossigenasi AHH (Aryl Hydrocarbon Hydroxylase) [10]. Queste interazioni possono portare a diversi risultati finali, ma il quadro più clamoroso è senza dubbio quello delle malformazioni congenite.

Negli animali esposti cronicamente a dosi subletali di TCDD è possibile notare una marcata porfiria, malattia rara dovuta all'alterazione dell'attività di uno degli enzimi che sintetizzano il gruppo Eme nel sangue. Le cause sembrano risiedere in due diversi tipi di meccanismi indotti dalla diossina negli epatociti. Il primo è rappresentato dalla mancanza di ALA-Sintetasi [11] e il secondo consiste nella diminuzione dell'attività del porfinogeno decarbossilasi. [12]

Inoltre la TCDD appare coinvolta anche nel meccanismo di accumulo di vitamina A, infatti, molti degli effetti riscontrati negli animali in

seguito all'esposizione a diossina sono sovrapponibili a quelli tipici conseguenti ad una carenza di vitamina A nella dieta, quali ritardo di accrescimento, cheratosi, lesioni epiteliali, immunosoppressione, ipofertilità e problemi teratogeni. [13]

In particolare, sono interessanti gli effetti sui tessuti epiteliali riguardanti il processo di cheratinizzazione. La vitamina A riveste un ruolo essenziale nei processi di differenziazione cellulare: una carenza può indurre la trasformazione di un epitelio ghiandolare in squamoso cheratinizzato, mentre il processo inverso può essere determinato da un eccesso di vitamina.

A livello molecolare, il meccanismo d'azione della vitamina A, nei tessuti epiteliali, consiste nel modulare la sintesi della cheratina, attraverso il controllo del corrispondente mRNA [14]. La TCDD è in grado di causare una forte deplezione della riserva epatica di vitamina A, provocandone la rapida escrezione nelle feci e nelle urine. Ciò sembra accadere soprattutto a causa delle conseguenze degli effetti tossici della diossina sull'epatocita, unitamente ad un effetto di interferenze sul meccanismo di accumulo della vitamina [15].

Il quadro anatomo-patologico, tipico dell'animale morto per intossicazione da diossina, presenta aspetti in comune in numerose specie animali, unitamente a tratti peculiari riscontrabili solo in alcune. In genere, i reperti anatomo-patologici sono rappresentati da:

- perdita pressoché totale del grasso corporeo;

- aumento di peso e volume del fegato;
- atrofia del timo.

Nonostante i differenti effetti che inducono nelle diverse specie, ma anche intra-specie, gli isomeri più tossici (ad esempio con Cl nelle posizioni 2,3,7 e 8) causano effetti sovrapponibili: il potenziale tossico degli isomeri sembra dipendere dall'idoneità più o meno spiccata ad unirsi con il recettore AHR. L'interazione del complesso isomero-recettore con il DNA cellulare induce l'espressione dei geni diversi. A seconda del tipo cellulare coinvolto, si potranno avere conseguenze degenerative o proliferative. [16]

Le lesioni epatiche riscontrabili nel ratto consistono in un rigonfiamento del reticolo endoplasmatico liscio e nell'aumento del contenuto lipidico degli epatociti. Sono inoltre presenti numerose cellule multinucleate per fusione del citoplasma.

Nel pollo prevalgono invece steatosi e degenerazione ialina.

Nel cavallo, nel gatto e nei piccoli ruminanti è possibile notare un'evidente iperplasia dei dotti biliari, accompagnata da focolai di necrosi nelle zone centro lobulari, con una elevata quantità di cellule del Kupffer sature di emosiderina. Attorno alle vene centro lobulari è presente notevole fibrosi che appare invece limitata alla periferia del lobulo, con aspetto simile alle forme croniche veno-occlusive nell'uomo.

[17]

Reperti anatomico-patologici che coinvolgono reni ed apparato urinario sono stati descritti solo in occasione di avvelenamenti da diossine, con esito letale, in cavalli da maneggio e gatti domestici, con un quadro di nefrite interstiziale acuta, con segni di degenerazione a carico dell'epitelio tubulare e dilatazione dei glomeruli, associate ad una disseminazione di microascessi.

Gli esseri umani risultano tra i più indifesi all'esposizione delle sostanze organiche clorurate, in quanto come tutti i mammiferi hanno un ciclo di vita abbastanza lungo e non possono sviluppare efficaci sistemi di difesa in poche generazioni. Inoltre è noto, dagli studi della letteratura, che il rilascio nell'aria e nelle acque delle sostanze da parte degli inceneritori costituisce una diluizione ed una dispersione d'inquinanti nello spazio e nel tempo. Questo causa un lento ma graduale accumulo di sostanze inquinanti nella catena alimentare e nel corpo umano, tanto che gli effetti sulla salute possono spesso diventare chiari e misurabili solo dopo un lungo periodo di incubazione.

La maggior parte degli studi epidemiologici sulla salute delle popolazioni residenti vicino agli inceneritori si sono concentrati soprattutto sull'incidenza del cancro e sui sintomi respiratori. Alcune ricerche hanno inoltre esaminato altri effetti potenziali, compresi le anomalie congenite ed i cambiamenti nel rapporto dei sessi.

Considerando l'uso esteso dell'incenerimento dei rifiuti su scala globale, il numero delle indagini sugli effetti sulla salute dei residenti vicini agli impianti è purtroppo tuttora scarsa.

Secondo l'OMS l'esposizione dell'uomo alle diossine ha luogo quasi esclusivamente attraverso l'assunzione di cibo, soprattutto carne, pesce e latticini: per il fenomeno del "bioaccumulo" e per la tendenza delle sostanze a conservarsi nei grassi, l'uomo è il più inquinato tra gli esseri viventi.

In caso di esposizione di soggetti a concentrazioni particolarmente elevate di diossine (ad esempio per esposizione accidentale o sul lavoro), si è potuto constatare la capacità di questi composti a ridurre la fertilità, la capacità di sviluppo e quelle di immunodifesa, oltre che l'insorgenza di tumori.

I risultati di recente studi dimostrano che le concentrazioni di diossine nei tessuti umani nella popolazione generale (dei paesi industrializzati) hanno già raggiunto, o quasi, livelli ai quali si possono verificare effetti negativi sulla salute. [18]

E' ragionevolmente concreta, anche se non facilmente stimabile, la capacità che tali sostanze, vista l'influenza negativa che disseminano nel mondo animale e in particolare nei mammiferi, possono esercitare sull'uomo.

Alla luce delle dimostrazioni dell'azione che queste sostanze determinano a livello cellulare sugli animali, si presume che non lascino

l'uomo illeso, ma che possano contribuire all'incremento dell'incidenza di determinate patologie. Possiamo, infatti, menzionare forse uno degli effetti più blandi di intossicazione da diossina e sostanze diossino-simile (PCB), ma considerabile come sentinella da intossicazione, la cloracne, che è stata storicamente la prima espressione clinica e patologica collegata all'esposizione a diossine, descritta per la prima volta nel 1897 [19]. Tuttavia la causa della cloracne non è stata individuata con certezza nella diossina fino al 1953, quando si rilevarono alcuni gravi episodi tra i lavoratori di un impianto chimico BASF in Germania che vennero risolti con l'eliminazione della TCDD dal processo produttivo [20].

La cloracne si manifesta con eruzioni cutanee e pustole simili a quelle dell'acne giovanile, però con possibile localizzazione estesa all'intera superficie corporea e con manifestazioni protratte, nei casi più gravi, per molti anni.

Una temibile evenienza conseguente all'esposizione alla diossina è rappresentata dall'aumento dell'incidenza di determinati tipi di tumori.

Le diossine sono ormai diffuse su tutta la terra. Inoltre, chiunque può, in modo del tutto casuale, essere esposto a concentrazioni tossiche. È molto difficile, quindi, associare all'aumento dell'incidenza di tumori una eventuale esposizione alle diossine.

Studi condotti sulla popolazione di Seveso e dei paesi limitrofi hanno dimostrato un aumento di incidenza soprattutto di sarcomi dei tessuti molli e di linfomi [21]. L'effetto cancerogeno è stato ampiamente

documentato negli animali da laboratorio in tutta la sua complessità, [22;23] anche se a rigore di termini la diossina non può essere considerata un cancerogeno completo. Infatti la diossina ed i suoi congeneri esplicano sicuramente una attività di promotori, tramite l'induzione di moltiplicazione cellulare e l'inibizione dell'apoptosi (effetti mediati dall'interazione con il recettore endocellulare AHR), tuttavia, non sembrano in grado di spiegare di per sé una completa azione cancerogena. Attualmente la diossina è da ritenersi classificata come sostanza ad azione cancerogena di classe B1, ovvero “probabile carcinogena per l'uomo in base ad informazioni limitate provenienti da studi sull'uomo e sugli animali”. [24]

Anche la dimensione degli ormoni sessuali maschili rappresenta una conseguenza evidente del problema diossina: il testosterone negli esseri umani del sesso maschile, esposti al contatto con diossina, è significativamente più basso rispetto ai controlli [25]. Il dato preoccupante è rappresentato dal bassissimo livello di accumulo al quale si manifestano i primi effetti, solo 17 ng/kg di diossine p.v, un valore facilmente rilevabile anche in persone non professionalmente non esposte.

La diossina è fortemente indiziata come causa della caduta di fertilità, che affligge molte specie animali, attraverso una serie complessa di effetti dovuti all'azione simil-estrogenica di questa molecola, comportando una diminuzione della conta spermatica nel sesso maschile, ma anche l'endometriosi nel sesso femminile. [26;27]

Non da meno il diabete ha trovato un significativo incremento nell'incidenza, ed è stato dimostrato in esseri umani con livelli di accumulo di diossina in un intervallo da 99 ng/kg p.v. a 140 ng/kg p.v. attraverso un monitoraggio durato oltre 20 anni su veterani della guerra del Vietnam [28]. I risultati ottenuti mostrano che, all'aumentare della dose di TCDD, si osserva un progressivo declino della sopravvivenza cellulare pancreatica. In particolare, una drammatica riduzione della sopravvivenza cellulare si verifica in seguito all'esposizione a dosi di TCDD comprese fra 12 e 25 nM.

Dal punto di vista ultrastrutturale, lo studio della morfologia cellulare al microscopio elettronico ha permesso di stabilire che la morte cellulare si associa ad una estensiva degranulazione delle cellule, alla comparsa di vacuoli autofagici contenenti strutture citoplasmatiche ed in particolare mitocondri, alla condensazione periferica della cromatina nucleare e alla progressiva scomparsa degli organuli citoplasmatici.

La diossina può danneggiare anche il sistema immunitario con un meccanismo sia diretto che indiretto, e numerosi studi condotti su topi, ratti, porcellini d'India, conigli, bovini, scimmie, esseri umani, evidenziano alterazioni a carico del sistema immunitario indotte da diossine anche a dosi molto limitate [24]. La diossina sembra ridurre direttamente la popolazione di linfociti B, mentre i linfociti T verrebbero danneggiati indirettamente attraverso effetti indotti sul sistema endocrino. Il timo è uno degli organi più sensibili in assoluto all'azione della diossina. Le lesioni al timo sono dirette, a carico dei timociti

immaturi (linfociti della corticale), la cui evoluzione a linfociti T immunocompetenti viene bloccata. Il recettore AHR è particolarmente abbondante nelle cellule epiteliali della corticale, fatto che sembra giustificare la particolare sensibilità del timo alla diossina. L'immunità umorale viene alterata attraverso una riduzione quantitativa delle immunoglobuline, anche a livelli di TCDD talmente bassi da non determinare alcun altro effetto. Purtroppo un danno al sistema immunitario non solo ci espone all'attacco di qualche virus, batterio, fungo o parassita, ma ci espone anche a tutta una serie di importanti malattie quali allergie, malattie autoimmuni, tumori, AIDS.

Il meccanismo che accomuna le modalità di aggressione delle diossine e tutte le patologie ad esse correlate ci permette di intuire il forte pericolo nel complesso: l'aggressione al nostro sistema endocrino produce una cascata di altre conseguenze che coinvolgono sistema immunitario, sistema riproduttivo con esposizione al diabete, cancro e malattie autoimmuni.

In particolare, l'attenzione è proiettata su quella che è la fase maggiormente suscettibile alle aggressioni teratogene, neoplastiche o al sistema immunitario, la fase della formazione primaria di un essere vivente, nel nostro caso, umano, che va dalle prime settimane di gestazione fino a tutta l'infanzia.

La ricerca sulle popolazioni residenti nei pressi di impianti di incenerimento ha registrato un aumento dell'incidenza di anomalie

congenite. Uno studio condotto ad Amsterdam ha trovato un aumento del numero di fessurazioni oro-facciali e di altre imperfezioni in una comunità che viveva ad un inceneritore usato per bruciare prodotti chimici all'aperto. Un'altra indagine, in Belgio, ha rilevato un aumento dell'incidenza di anomalie congenite tra i residenti vicino ad un inceneritore, mentre un'altra ricerca sulle malformazioni congenite dell'occhio non ha scoperto un aumento della incidenza nei pressi degli impianti. Ad esempio tra il 1961 e il 1969, un inceneritore a Zeeburg, Amsterdam, mal regolato, trattava rifiuti chimici che venivano bruciati all'area aperta. Una recente analisi dei dati di questa regione ha rilevato un aumento drammatico dell'incidenza di fessurazioni oro-facciali nei bambini nati dopo l'inizio dell'attività dell'inceneritore [29]. Come termine di paragone, durante lo stesso periodo, è stata presa in considerazione un'altra zona non soggetta alle emissioni dell'inceneritore in cui non è stato osservato alcun incremento nelle nascite di queste malformazioni. E' stato verificato che numerose donne, mamme di bambini che presentavano fessurazioni oro-facciali, erano residenti in una zona posta lungo un corridoio sottovento rispetto all'inceneritore. Si sa che l'esposizione alle sostanze chimiche può essere la causa di queste malformazioni oro facciali e che le diossine causano spaccature nel palato dei topi. Gli autori concludevano che, sebbene in questo caso non possa essere dimostrato un rapporto causa-effetto, sembra probabile che ci sia un legame tra l'inceneritore di sostanze chimiche all'area aperta e l'aumento dell'incidenza di fessurazioni oro-facciali a Zeeburg,

Amsterdam negli anni dal 1960 al 1969. Oltre queste malformazioni la maggior parte dei bambini nati a Zeeburg nell'aria sottovento rispetto all'inceneritore presentava altre patologie, in particolare alterazioni del sistema nervoso centrale (principalmente la spina dorsale bifida) ed imperfezioni genitali (soprattutto ipospadia).

Ci sono risultati poco convincenti riportati nella letteratura scientifica circa un possibile aumento delle gravidanze multiple in prossimità degli inceneritori. Un primo studio ha indagato i parti gemellari intorno a due impianti di rifiuti chimici in Scozia tra il 1976 e il 1983 [30]. Per gli anni che vanno dal 1980 al 1983, lo studio ha rilevato che i casi maggiori di parti gemellari apparivano nelle aree più soggette ai rilasci degli inceneritori. I valori riferiti al 1980 erano statisticamente significativi. Allo stesso modo, valori elevati erano stati osservati anche nelle zone indicate come meno vulnerabili nel periodo dal 1976 al 1979. L'analisi dei risultati ha indicato che negli ultimi anni '70 ed i primi dell' '80 è stato evidenziato un aumento di parti gemellari nella zona sottoposta ad indagine. Il professore belgo Van Larebeke, invece, ha notato che i dati di uno studio realizzato in Belgio sull'impatto sanitario dell'incenerimento dimostravano che c'era un aumento statisticamente importante (2-6volte) della probabilità di gravidanze multiple in una popolazione che viveva nelle vicinanze di due inceneritori di RSU [31].

In letteratura si possono, quindi, trovare numerosi studi che si sono focalizzati sulla correlazione esistente tra esposizione ad inquinanti

ambientali e danno al prodotto del concepimento, anche se nella maggior parte dei casi non giungono a conclusioni definitive.

Il mancato risultato, ovvero la mancanza di dati statisticamente significativi, non implica necessariamente che non esista teratogenicità o pericolo per il prodotto del concepimento, ma che probabilmente esistono molte variabili di fraintendimento.

La valutazione dello stato della salute e dell'ambiente nelle aree inquinate potrebbe consentire di quantificare il danno alla salute associato alla residenza in zone ad alto rischio e di misurare i benefici associati ad eventuali interventi di bonifica, contribuendo a rafforzare su basi scientifiche i processi decisionali in materia di sanità pubblica.

La preoccupazione dei cittadini per il rischio sanitario potenzialmente associabile agli impianti di smaltimento dei rifiuti è un problema sempre più sentito. Si tratta di una dinamica che può portare a un generale dissenso della popolazione nella scelta di localizzazione degli impianti stessi, creando quindi ulteriori difficoltà nella già complessa gestione dei rifiuti, sia urbani che pericolosi.

### **1.3 La situazione nella Regione Campania**

La Regione Campania già nel rapporto del 1997 dell'OMS è definita una delle regioni con il maggior numero di abitanti potenzialmente a rischio per esposizione a rifiuti. Una gestione pluriennale non sempre corretta dell'intero ciclo di rifiuti, sia solidi urbani che pericolosi, e le

pratiche illegali legate a tali attività hanno determinato sul territorio una vera e propria crisi ambientale.

Nel 2000 il Litorale domizio flegreo e agro aversano, comprendente 61 comuni delle province di Napoli e Caserta, è stato inserito tra i siti di interesse nazionale per le bonifiche, in ragione della presenza diffusa di numerose discariche di rifiuti urbani e industriali.

### **1.3.1 Le denunce iniziali**

Nel settembre 2004 la prestigiosa rivista scientifica internazionale “*The Lancet Oncology*” ha pubblicato uno studio di Kathryn Senior, giornalista inglese, e Alfredo Mazza, giovane medico di Nola, dal titolo **Italian “Triangle of death” linked to waste crisis** (Il “Triangolo della morte” italiano collegato alla crisi dei rifiuti), in cui si indaga sui possibili effetti sulla mortalità per cancro nel Nolano.

L’area attorno a Salerno e Napoli produce più immondizia di quanto possa essere smaltita dalle discariche e dagli inceneritori esistenti, e la criminalità organizzata italiana da anni ne approfitta per trarre lauti guadagni con le discariche fuori legge.

Alfredo Mazza del CNR di Pisa spiega che gli impianti moderni possono costituire un rischio per la salute perché sono diventati dei parcheggi per enormi quantità di immondizia indifferenziata. Tale emergenza ha costretto le amministrazioni comunali e regionali a stanziare risorse finanziarie per programmi di riciclaggio e per la costruzione di nuovi impianti di trattamento dei rifiuti a tecnologia

avanzata. Il bisogno dello smaltimento dei rifiuti ha offerto così alla camorra l'opportunità di sfruttare con grossi profitti le discariche abusive. E la differenza tra il trattamento legale dei rifiuti e quello illegale in rispetto alla conformità alle norme igieniche è molto sottile, ed i rischi per la salute sono in aumento.

Questa situazione ha richiamato l'attenzione della Commissione Europea che ha già ammonito più volte l'Italia per aver eluso la direttiva sui rifiuti pericolosi e quella sulle discariche.

Nel frattempo pochi sono gli studi condotti sugli effetti del trattamento dei rifiuti sulla salute umana.

Negli anni '90 Goldberg et al. hanno prospettato che le persone che vivevano nelle vicinanze di una discarica municipale per l'interramento dei rifiuti solidi presso Montreal presentavano un rischio più elevato di contrarre un tumore del fegato, pancreas, rene ed un linfoma non Hodgkin.

Comba et al. hanno reso noto che coloro che risiedevano nel raggio di 2 km di distanza da un inceneritore di Mantova presentavano un aumento significativo del rischio di contrarre un sarcoma dei tessuti molli. Le prove esistenti facevano pensare ad un ruolo determinante della 2,3,7,8 tetraclorodibenzo-p-diossina.

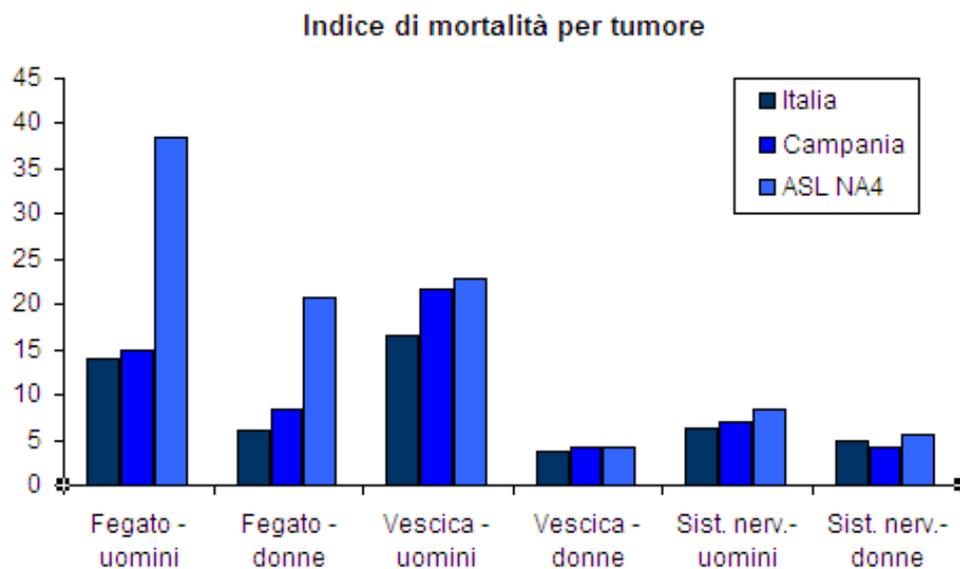
Stefano Parodi et al. hanno studiato la mortalità per cancro al polmone in due regioni del nord Italia esposte all'inquinamento ambientale prodotto da centrali a carbone e altre fonti industriali, incluso gli

inceneritori. I risultati nelle donne suggerivano un rischio legato all'inquinamento ambientale, ma negli uomini i risultati erano confusi dall'esposizione professionale e dalla crescente tendenza al fumo.

Mazza commenta quindi che abbiamo notizie sull'impatto delle discariche sulla salute umana quando si osservano le norme, ma non abbiamo nessuna idea di quali conseguenze comporti l'interramento dei rifiuti quando le norme vengono stravolte o apertamente violate.

Nel frattempo i dati forniti dal rapporto dell'archivio dei tumori dell'ASL 4 di Napoli del febbraio 2002 causano allarme, in quanto rivelano che la mortalità per cancro del colon, del retto e del fegato, e per leucemia e linfoma era più elevata nel Distretto 73 che nel resto dell'ASL. Questo distretto si trova nell'area orientale della Campania dove si registra un livello record di attività illegali di tipo ambientali ad opera della camorra. Quest'area è definita tristemente ***“Triangolo della morte”*** ed ha i suoi vertici in Nola, Marigliano ed Acerra, tre città un tempo importanti centri agricoli, ma usate così a lungo dalla camorra come discariche di rifiuti illegali che la terra è diventata praticamente inservibile. Secondo i dati del Dipartimento della Forestale Italiana, la quantità totale di rifiuti nell'area ammonta a 277.500 metri cubi e Mazza sottolinea che le sostanze inquinanti dell'aria, dell'acqua e dei prodotti agricoli della zona superano di molto i livelli consentiti. I dati stanno anche ad indicare un elevatissimo livello di cancro del fegato, di leucemia e linfoma nell'ASL 4 della Campania, e nelle donne un livello molto simile di cancro del fegato, del seno, del sistema nervoso, del

colon-retto, e la leucemia e il linfoma più elevati nel Distretto 73 (Comuni di Nola, Casamarciano, Saviano, Liveri, Scisciano, San Paolo Bel Sito, Carbonara di Nola e Visciano) che nel resto dell'ASL4 campana.



In precedenza i livelli di incidenza dei tumori e della mortalità erano maggiori nell'Italia settentrionale, ma a partire dagli anni '80 il miglioramento di diagnosi e trattamento ha portato ad un aumento della sopravvivenza ed una diminuzione della mortalità per cancro in tutta Italia, andamento generale che non si è verificato però in Campania, nell'ASL 4, dove la mortalità per tumore ha continuato ad aumentare dal 1970 al 1974 e dal 1995 al 2000. Quindi sebbene la mortalità per la maggior parte dei tumori nell'area intorno a Nola è generalmente più bassa che nel nord Italia, la tendenza all'incremento della mortalità sta chiudendo questa piccola differenza.

In conclusione Mazza è convinto che il livello di inquinamento causato da metodi inadeguati di smaltimento di rifiuti e delle discariche illegali è correlato alla elevata mortalità per cancro nell'area presa in considerazione.

Il diritto alla salute garantito dalla Costituzione italiana è seriamente compromesso e questo sarebbe sufficiente , secondo Mazza, a dichiarare lo stato di emergenza nella provincia di Nola, e se necessario, a mobilitare le Forze Armate. [32]

Nel fascicolo di Novembre-Dicembre 2004 della rivista *Epidemiologia e Prevenzione* è stato pubblicato uno studio di Altavista et al. che ha l'obiettivo di analizzare la mortalità causa-specifica in un'area della Campania fortemente urbanizzata e caratterizzata dalla presenza di discariche abusive, in molte delle quali negli ultimi anni si ha la consuetudine di incenerire in modo del tutto incontrollato la frazione organica ma anche rifiuti speciali e pericolosi. Già nel 1992 l' ATDSDR aveva definito un elenco di 7 tipi di patologie da monitorare prioritariamente in popolazioni residenti in prossimità delle discariche di rifiuti pericolosi: malformazioni congenite ed esiti riproduttivi avversi, tumori, disturbi immunologici e neurologici, patologie epatiche, renali e respiratorie. Ma le indicazioni di una possibile relazione tra esposizione al complesso degli agenti prodotti dai rifiuti e l'insorgenza di alcune patologie vengono in parte da alcuni studi di epidemiologia occupazionale, e in parte da studi di popolazioni.

Nel 2000 è stata pubblicata una copiosa rassegna di studi, pubblicati dal 1980 al 1998, su popolazioni residenti entro 1,5-3 km di distanza da discariche di rifiuti urbani, pericolosi o misti. Le patologie indagate in questi 51 studi comprendono tumori (tumore polmonare maschile, tumore vescicale in entrambi i sessi, tumore epatico negli uomini, tumore della prostata, tumore dello stomaco in entrambi i sessi e nei soli uomini, il tumore dell'utero, tumore del retto, leucemia), malformazioni, mortalità infantile, abortività spontanea, basso peso alla nascita. Tra gli studi di popolazione, lo studio multicentrico europeo EURHAZCON, tipo caso-controllo, sul rischio di malformazioni congenite associato alla residenza entro 7 km da discariche per rifiuti pericolosi sulla base della direttiva UE 689/91, considera 21 siti di discariche in 15 aree, utilizzando i dati di 10 registri regionali delle malformazioni congenite operanti in Europa, tra cui il registro della Toscana coordinato dall'Istituto di fisiologia clinica del CNR di Pisa. I risultati evidenziano tra i residenti nel raggio di 3 km dalla discarica rispetto alla corona esterna un significativo aumento del rischio di anomalie congenite cromosomiche (OR=1,33) e non cromosomiche (OR=1,49), in particolare di difetti del tubo neurale, dei grandi vasi e dei setti cardiaci.

Nonostante i numerosi studi, non è stata dimostrata la relazione causale tra residenza in prossimità di discariche di rifiuti ed esiti avversi della salute. Questo sia per il lungo periodo di latenza di molte patologie in esame, sia per l'eziologia multifattoriale delle stesse e quindi la presenza di fattori di fraintendimento sul territorio, che per la complessità delle

miscele di sostanze chimiche presenti nelle varie tipologie di rifiuti. Tutti gli studi invitano quindi a maggiori approfondimenti per la valutazione della rilevanza della problematica dei rifiuti in termini di sanità pubblica.

Per quanto riguarda l'Italia, nel 2004 è stato pubblicato il rapporto dell'Istituto Superiore della Sanità *“Valutazione del rischio sanitario e ambientale nello smaltimento di rifiuti urbani e pericolosi”* (ISTISAN 04/05) che costituisce un passo importante nel processo di definizione e quantificazione dei rischi posti alla salute umana dagli impianti di smaltimento rifiuti. Lo studio prende in considerazione un gruppo di siti di discarica ipotizzabili rappresentativi della situazione italiana; su di essi è stata effettuata, innanzitutto, una caratterizzazione ambientale allo scopo di individuare i fattori di rischio eventualmente presenti; sulle aree circostanti tali siti di discarica sono state quindi condotte analisi epidemiologiche di dati disaggregati a livello comunale di malformazioni congenite, natimortalità, abortività spontanea, basso peso alla nascita, nascite premature, rapporto maschi/femmine; è stata inoltre effettuata una valutazione di protocolli per studi di epidemiologia veterinaria. Dai risultati ottenuti, che non mostrano forti evidenze di rischi aumentati per gli esiti riproduttivi considerati nelle aree esposte, emerge la necessità di ulteriori approfondimenti al fine di individuare con sufficiente attendibilità le eventuali relazioni causa-effetto tra esposizione a rifiuti e rischi ambientali. Non è possibile, infatti, stabilire un nesso di causalità certo tra i lievi aumenti di rischio relativi per alcuni indicatori riproduttivi e la presenza di discariche, sia per la presenza di fattori esterni di tipo

ambientale ma anche di fattori di fraintendimento individuali. Inoltre l'utilizzo di una variabile ecologica non permette di tener conto dei diversi stili di vita dei soggetti coinvolti che possono far variare considerevolmente il livello di esposizione del singolo. E ancora le discariche non rappresentano di per sé un fattore di rischio oggettivamente confrontabile, in quanto ogni discarica può infatti essere diversa dall'altra. [33]

Altavista et al. prendono in esame nello studio, pubblicato dalla rivista *Epidemiologia e Prevenzione* nel novembre del 2004, un'area formata dai comuni di Giugliano in Campania, Qualiano e Villaricca che rientrano nel sito di interesse nazionale per la bonifica "litorale flegreo e aversano", con una popolazione al 2001 di 150.000 abitanti circa. Di questa area specifica si hanno informazioni dettagliate grazie all'attività istituzionale svolta indipendentemente dall' ARPA Campania e dalla struttura del Commissario per l'emergenza rifiuti e in ultimi da Legambiente Campania. La delimitazione del contesto è quindi effettuata a priori, sulla base delle condizioni ambientali, in assenza di specifiche conoscenze sui dati sanitari dei comuni in esame. La caratterizzazione dell'area in esame è stata effettuata con un'applicazione GIS, attraverso l'esame della distribuzione territoriale delle discariche, dei siti di abbandono incontrollato di rifiuti e dei siti inquinati oggetto di bonifiche, per ottenere un'immagine del territorio di tipo geomorfologico-naturalistico e antropico. Le discariche possono essere suddivise in autorizzate (per rifiuti urbani, inerti, speciali e pericolosi) e non

autorizzate ( siti abusivi e di abbandono incontrollato di rifiuti, siti contaminati soggetti a bonifica). Sono stati utilizzati dati di mortalità di fonte Istat disponibili presso la banca dati epidemiologica dell'ENEA. I valori di mortalità attesi sono stati calcolati utilizzando i tassi di mortalità della regione Campania. Le cause di morte di interesse a priori sono quelle che in base alla letteratura scientifica risultano associate alla residenza in prossimità di discariche di rifiuti pericolosi. I tre comuni al limite Nord-ovest della provincia di Napoli erano negli anni '80 siti di considerevoli attività agricole che hanno poi negli ultimi anni subito una discreta diminuzione dovuta al forte sviluppo dell'edilizia, all'impovertimento dei suoli in seguito all'inquinamento. Inoltre va considerato il fatto che il territorio è stato interessato da una migrazione interna, con cittadini di Napoli che hanno acquistato case proprio a ridosso delle discariche. Su una superficie complessiva di 108 km<sup>2</sup> sono stati individuati 39 siti di smaltimento rifiuti, di cui presumibilmente solo 2 autorizzati e, dei restanti 37 illegali, 27 interessati dalla presenza di rifiuti pericolosi.

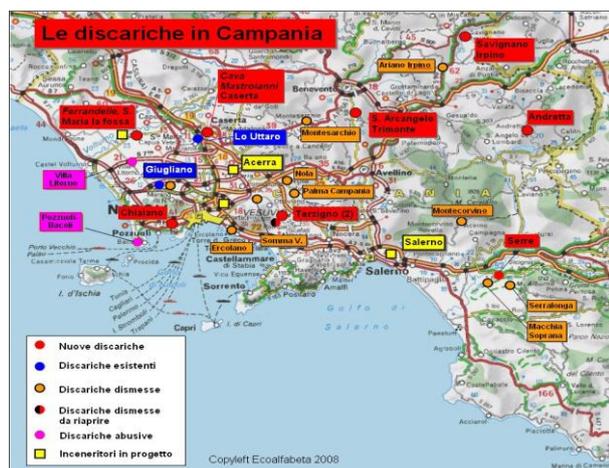


Fig. 1.11 Mappa delle discariche in Campania

Vi è nel complesso una buona concordanza tra i dati prodotti da ARPA Campania e da Legambiente Campania; piccole discordanze sono dovute alla differente modalità di acquisizione dei dati: l' ARPA Campania si muove su segnalazioni ufficiali mentre Legambiente si basa sulla collaborazione di cittadini e di esperti di vario genere, tenendo conto della conoscenza storica delle vicende del territorio. Dai risultati emerge che la popolazione di Giugliano in Campania e Qualiano presenta una mortalità totale superiore a quella regionale, mentre a Villaricca la mortalità osservata è lievemente superiore a quella attesa. L'incremento della mortalità per tumore fa riferimento ai tumori maligni del polmone, della pleura, della vescica, della laringe, del fegato e dei dotti, e dell'encefalo. La mortalità per malattie cardiocircolatorie è accresciuta in entrambi i sessi, così come il diabete e la malattia di Alzheimer nella popolazione femminile di Giugliano in Campania, e il diabete e la cirrosi epatica nella popolazione femminile di Qualiano. L'esame dell'andamento temporale della mortalità mostra un decremento della mortalità totale e un aumento della mortalità legata a cause neoplastiche (soprattutto tumori polmonari nelle donne). Importante però risulta studiare le interazioni con altri fattori di rischio; per esempio l'aumento della mortalità per tumori della pleura a Giugliano in Campania e Villaricca è correlata anche ad un'alta proporzione di lavoratori esposti all'amianto.

In conclusione, le mappature delle fonti di esposizione ad agenti tossici indicano le aree territoriali di maggiore interesse, e quindi

rilevanti per studi epidemiologici. Viste le indicazioni fornite dall'analisi dei dati comunali di mortalità si suggerisce la necessità di ulteriori approfondimenti sullo stato di salute della popolazione e sui potenziali fattori di rischio. Andrà prima definito il destino ambientale degli agenti inquinanti, per individuare le possibili vie di esposizione e caratterizzati poi gli altri fattori di pressione presenti sul territorio (industrie, reti stradali a traffico intenso, etc). I dati sui livelli socioeconomici, stile di vita, esposizioni occupazionali dovranno essere presi in considerazione come fattori di fraintendimento per l'interpretazione dei dati sullo stato di salute della popolazione locale. Su queste basi sarà possibile progettare in modo ottimale gli studi sul campo per una maggiore validità di possibili inferenze causali. [34]

In questo scenario, il Dipartimento della Protezione Civile ha commissionato uno studio sul trattamento dei rifiuti e sull'impatto dello stesso sulla salute umana in Campania, il cui obiettivo è quello di descrivere la distribuzione geografica della mortalità per cause tumorali e delle malformazioni congenite nei 92 comuni della provincia di Napoli e nei 104 comuni della provincia di Caserta e porre quindi le basi per uno studio di correlazione geografica su presenza e tipologia delle discariche e le patologie in esame.

Il rapporto è frutto della collaborazione di un esteso Gruppo di Lavoro che ha coinvolto numerose istituzioni nazionali e locali: Organizzazione Mondiale della Sanità, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Istituto Superiore di Sanità, in collaborazione con l'Osservatorio Epidemiologico

Regionale, l'ARPAC (Azienda Regionale per la Protezione Ambientale della Campania) e l'ESA (Epidemiologia per lo Sviluppo e l'Ambiente).

Sono state effettuate analisi descrittive di mortalità sul territorio comunale delle province di Napoli e Caserta, sulla base di dati provenienti dai nastri di mortalità ISTAT forniti dall'Osservatorio Epidemiologico Regionale della Campania. Sono state studiate, separatamente per uomini e donne, 20 cause di morte nel periodo 1994-2001, tra cui la mortalità per tutte le cause, per tutte le cause tumorali e per cause tumorali specifiche.

Sono state condotte analisi descrittive a livello provinciale basate su tassi di mortalità standardizzati con riferimento nazionale e su rapporti standardizzati di mortalità calcolati con riferimento regionale. Le analisi a livello comunale consistono nel calcolo dei rapporti standardizzati di mortalità, con riferimento regionale degli stimatori Bayesiani gerarchici, che migliorano la qualità delle stime di rischio tenendo conto della forte variabilità casuale delle cause rare e di eventuali strutture di aggregazione spaziale. Le stime di rischio sono poi state riportate su mappe. Le analisi hanno consentito l'identificazione di un'area nella quale la mortalità generale e i tassi specifici per diverse patologie tumorali sono particolarmente elevati rispetto ai valori regionali. Questa zona comprende alcuni comuni della parte Sud-est della provincia di Caserta (Aversa, Capodrise, Casagiove, Casal di Principe, Caserta, Castel Volturno, Marcianise, San Cipriano d'Aversa, Santa Maria Capua Vetere, San Nicola la Strada, Villa Literno) e alcuni ad essi limitrofi della

parte nord della provincia di Napoli (Afragola, Arzano, Caivano, Casoria, Frattamaggiore, Giugliano in Campania, Marano di Napoli, Marigliano, Melito di Napoli, Mugnano di Napoli, Pomigliano d'Arco, Sant'Antimo, Volla). In particolare, la mortalità per tutte le cause è risultata in eccesso per gli uomini nel 19% dei comuni della provincia di Caserta e nel 43% dei comuni della provincia di Napoli; per le donne nel 23% dei comuni della provincia di Caserta e nel 47% dei comuni della provincia di Napoli. Inoltre, in molti di questi comuni è stato registrato un eccesso di mortalità anche per tumori dello stomaco, del rene, del fegato, della trachea, bronchi e polmoni, della vescica e della pleura.

Con metodi analoghi è stata studiata la distribuzione di malformazioni congenite nei comuni della provincia di Napoli e Caserta. Utilizzando i dati del Registro Campano dei Difetti Congeniti sono stati analizzati 11 gruppi di patologie per il periodo 1996-2002. I casi con malformazioni congenite sono stati rilevati tra:

- nati vivi (diagnosi alla nascita o in periodo post-natale);
- morti fetali dalla 20° settimana di gestazione;
- interruzioni volontarie di gravidanza dopo diagnosi prenatale entro la 24° settimana di gestazione;

La valutazione della prevalenza di malformazioni congenite in ciascun comune rispetto al riferimento regionale dello stesso periodo è effettuata

mediante il calcolo del rapporto tra casi osservati e casi attesi (SMR) e l'analisi di questo rapporto mediante BMR.

Alcuni dei comuni nei quali sono emersi incrementi significativi sul totale delle malformazioni e su gruppi di esse sono adiacenti o vicini tra loro e identificano aree degne di attenzione:

1. L'area sud della provincia di Caserta (parte del sito di bonifica dell'Agro Aversano e del litorale Domitio-Flegreo), dove sono frequentemente rappresentati eccessi per il totale delle malformazioni e per le anomalie urogenitali;

2. L'area di Napoli e il suo Nord-est, dove sono stati segnalati incrementi di malformazioni totali, cardiovascolari e, in minor misura, urogenitali;

3. Ampia parte della ASL 5 NA, con segnalazione per malformazioni totali, cardiovascolari e, in modo minore, degli arti.

Le zone a maggior rischio identificate negli studi sulla mortalità e sulle malformazioni congenite si sovrappongono in buona parte e sono interessate anche dalla presenza di discariche e siti di abbandono incontrollato di rifiuti.

È comunque difficile stabilire un nesso di causalità in quanto nell'area in questione insistono numerose altre pressioni ambientali. Tutte le indicazioni emerse sono ovviamente di carattere descrittivo ma possono essere considerate utili per informare e indirizzare aree e problematiche di approfondimento. [35]

La prima reazione all'articolo "*Italian "Triangle of death" linked to waste crisis*", pubblicato dalla rivista *The Lancet Oncology*, si ritrova proprio sulla stessa rivista nel Dicembre del 2004. Le dichiarazioni di Mazza e Senior vengono messe in discussione.

Innanzitutto, sembrerebbe che la selezione dell'area del Triangolo della morte non si basi su inconfutabili dati epidemiologici. Attualmente, i comuni adiacenti a Napoli e Caserta hanno centinaia di discariche e sono stati segnalati conseguenti rischi per la salute.

Ma la situazione in Campania risulta essere molto più complicata: studi descrittivi hanno dimostrato un eccesso di mortalità prematura (0-14 anni) e di malformazioni congenite in parecchi comuni con discariche di primario interesse, ma hanno mostrato uno schema differente nel triangolo della morte.

Comunque, questi risultati devono essere messi in relazione a diversi fattori, che potrebbero modificarli, quali l'età, il sesso, l'esposizione professionale, la contiguità di aree ecologicamente simili, caratteristiche proprie della regione. La regione Campania presenta mortalità per cause specifiche e tassi di morbosità differenti dalla media italiana, e il rischio legato al problema dei rifiuti deve essere correlato agli altri fattori di rischio ambientali, sociali e legati all'assistenza sanitaria.

La delimitazione di un'area a più elevato rischio è un compito arduo che deve prendere in considerazione dati che caratterizzano lo stato di salute e ambientale in relazione al contesto di riferimento.

Semplificazioni possono portare ad inappropriate conclusioni nelle quali risulta erroneamente di facile evidenza l'associazione tra il trattamento dei rifiuti e il peggioramento dello stato di salute.

In ultimo lo studio di Mazza e Senior non fornisce alcuna utile indicazione su come ridurre o risolvere il problema;

In più, gli autori non fanno altro che alimentare polemiche e rendere più difficoltosa la ricerca epidemiologica. [36]

Ulteriore seguito alla discussione scatenata dalle dichiarazioni di Mazza e Senior si riscontra sempre nella rivista *Epidemiologia e Prevenzione* nel numero di Novembre-Dicembre 2004. Viene commentato da Benedetto Terracini, nello stesso editoriale, lo studio di Altavista et al. riferito all'area in questione e pubblicato sul medesimo fascicolo.

Paradossalmente, è la Campania – commenta Terracini- la regione da privilegiare per studiare gli effetti del problema rifiuti sulla salute, in quanto ha tra le maggiori concentrazioni di discariche, anche illegali, tanto che dal 1994 è stato dichiarato lo stato di emergenza, e nello stesso tempo è anche la regione dove sono state rese maggiormente disponibili informazioni sullo smaltimento di rifiuti grazie all'Arpa Campania, a Legambiente Campania e alla struttura del Commissario per l'emergenza rifiuti.

Condanna, innanzitutto, il Reportage di *The Lancet Oncology*: in primis per la difficile interpretazione dei dati del confronto tra la zona del

triangolo e il resto della Campania; risulta, infatti, da questi dati quasi un raddoppio della mortalità per tumori primitivi del fegato nei due sessi, e negli uomini, ma non nelle donne, un limitato aumento di mortalità per tumore della vescica, della laringe e per leucemie; non risulta eccesso di mortalità per cancro polmonare e del grosso intestino; in più, un'altra critica mossa da Terracini è che gli autori hanno intervistato epidemiologi italiani che non hanno familiarità con il problema locale, non preoccupandosi di raccogliere informazioni da chi si occupa dell'argomento presso l'Osservatorio epidemiologico della Regione Campania, presso il Registro Tumori dell'ASL4 e presso l'Istituto superiore di sanità.

L'editore, infine, risponde a tre problematiche che discendono dallo studio di Altavista: l'epidemiologia ha senso nella misura in cui si rapporta alla prevenzione, promuovendola e valutandone l'efficacia, e non è quindi da studi epidemiologici ex novo che deve discendere la bonifica delle discariche, bensì è nella letteratura scientifica che bisogna trovare le basi dell'intervento; in secondo luogo anche se il confronto ecologico non consente alcuna affermazione di causalità, esso aggiunge ulteriori motivi per un approfondimento della situazione ambientale e per catalizzare le decisioni relative alle misure di bonifica. Così gli studi ecologici di Altavista et al. sono una premessa necessaria a una migliore comprensione dei meccanismi dell'eventuale rapporto causale, mediante indagini più sofisticate.

Conclude ricordando che ogni avanzamento delle conoscenze, anche parziale, deve essere accompagnato dal contatto con la popolazione: è necessario mettersi in ascolto delle preoccupazioni espresse da chi vive quotidianamente nel territorio a rischio sottoposto all'esame. Un processo di comunicazione può contribuire a determinare un clima di fiducia, nell'ambito del quale si possono attivare meccanismi partecipativi e conseguire un consenso informato in merito ai processi decisionali in atto. [37]

Ancora nel fascicolo di Novembre-Dicembre 2004 della rivista *Epidemiologia e Prevenzione*, un articolo di Cinzia Colombo "La calda estate campana non è ancora finita" riprende la discussione sull'emergenza rifiuti in Campania e sulle dichiarazioni scottanti di Mazza et al. Sebbene le ricerche condotte a livello internazionale, benché non conclusive, facciano ritenere possibile un rischio di esposizione residenziale e occupazionale a discariche e inceneritori, per quanto concerne eccessi di malformazioni congenite e alcune cause di morte, gli studi effettuati finora in Italia, compresi quelli che riguardano la Campania, sono per la quasi totalità di carattere descrittivo: segnalano la presenza di sofferenze per alcuni parametri di salute in aree con una storia di rischi ambientali rilevanti, ma non sono in grado di stabilire un nesso certo di causalità. Quello che occorre, al fine di determinare una relazione diretta tra vivere in prossimità di discariche o inceneritori e le ricadute sulla salute, sono studi analitici, studi complessi che richiedono risorse molto maggiori rispetto a quelle oggi disponibili, che valutino

l'esposizione individuale ai diversi inquinanti di diversa origine e i possibili effetti sulla salute [38].

Il Commissariato di Governo per l'emergenza rifiuti in Campania ha pubblicato nel 2008 uno studio relativo all'inquadramento statistico-epidemiologico delle malformazioni fetali in Campania. Tale studio negava un incremento delle malformazioni fetali in Campania. In effetti, ciò era in contrasto con i dati riportati fino a quel momento.

La valutazione del rischio di malformazioni congenite in Campania è stata effettuata raccogliendo dati da un Registro delle malformazioni congenite, che si basa sulle diagnosi che vengono registrate nei centri nascita della Campania.

Nel complesso, dal 1997 al 2005, le malformazioni congenite, rilevate per 10.000 nati sorvegliati, in tre periodi successivi, non sono aumentate.

In conclusione, non esiste alcun dato che indichi la Campania come un'area ad elevata frequenza di malformazioni congenite.

Anzi, la frequenza globale delle malformazioni congenite in Campania si aggira intorno a 120 per 10.000 nati, mentre nell'insieme delle altre quattro regioni italiane ( Nord-Est, Emilia Romagna, Toscana, Sicilia Orientale) si osserva un valore pari a 200 per 10.000 nati. E addirittura nei 39 registri afferenti ad Eurocat (Registro di malformazioni congenite per l'Europa) il valore si aggira intorno a 240 per 10.000 [2].

Per quanto riguarda i dati esposti nel rapporto del Commissariato di Governo nel 2008 per l'emergenza rifiuti, che denunciano una

diminuzione delle malformazioni congenite in Campania, va precisato che la segnalazione delle malformazioni non è però obbligatoria e alcuni dei centri nascita in Campania non riferiscono le malformazioni al registro; per questo le frequenze potrebbero non corrispondere alla reale situazione. Inoltre, alcune malformazioni, come le cardiopatie congenite, non vengono diagnosticate alla nascita e sono certamente sottostimate dal registro.

Con il passare degli anni però la percentuale dei nati vivi sorvegliati dal Registro è aumentata sempre di più fino a raggiungere una buona copertura delle nascite. Questo dovrebbe comportare una maggiore affidabilità dei dati. In più in Campania è possibile rilevare anche le malformazioni dei nati morti e dei feti per cui si è fatto ricorso all'interruzione volontaria di gravidanza.

La frequenza globale va, inoltre, analizzata anche rispetto al tipo di malformazione, valutando la frequenza singolarmente per ognuna di queste.

In più, ci sono diverse variabili da prendere in considerazione. Un esempio è l'età delle partorienti. In Campania è stata registrata una frequenza diminuita delle trisomie 13, 18 e 21, ma questa è dovuta alla minore percentuale di parti di donne con età superiore a 35 anni.

La frequenza più bassa di ipospadia è quasi sicuramente attribuibile alla diversa definizione di "caso da registrare", così come le frequenze aumentate per anencefalia, idrocefalia e agenesia renale potrebbero

emergere da una maggiore registrazione in Campania di interruzione volontaria di gravidanza.

In conclusione, la diminuzione o l'aumento di particolari malformazioni congenite potrebbero essere dovuti a motivi di metodologia (migliore capacità diagnostica, maggiore frequenza di nati da donne di età riproduttiva avanzata, maggior numero di casi "conteggiati" che in precedenza erano stati esclusi per l'esito in aborto spontaneo, inclusione di un maggior numero di casi di donne non residenti nell'area usualmente sorvegliata). Se si escludono tali problematiche, solo la minore frequenza di gastroschisi e di atresia esofagea potrebbe essere considerata reale.

L'Icbsr, ogni anno, analizza l'andamento nel tempo di 35 specifiche malformazioni in ogni singolo registro nel mondo, per valutare le eventuali variazioni, sottolineandone in particolar modo gli incrementi, e mettere in luce quelle che presentano una spiegazione metodologica.

Per quanto concerne la Campania, nel periodo 1994-2005 quattro delle 35 malformazioni esaminate presentavano decremento (anoftalmia, trasposizione dei vasi cardiaci, labio-palatoschisi, estrofia della vescica urinaria) e una presentava un incremento (ipospadia).

Prima di concludere che i decrementi siano reali bisogna però escludere una possibile sottonotifica oppure una diversa precisazione diagnostica nel tempo. L'unica tra le quattro malformazioni che presentano decremento meno suscettibile ai bias sopra nominati è la

labio-palatoschisi, in tal caso correlata ad una riduzione dei fattori di rischio per essa ovvero fumo di sigarette e farmaci anticonvulsivanti combinati.

Per quanto riguarda l'ipospadia, l'unica malformazione congenita di cui si registra un aumento, invece, bisogna prestare attenzione alla maggiore presentazione della sua notifica al registro, anche se in Campania vengono segnalate le forme meno lievi. Prima però di concludere che ci si trovi di fronte ad un reale aumento bisogna effettuare una serie di verifiche che dimostrano appunto problemi di notifica.

In uno studio di “correlazione ecologica” effettuato recentemente (ULPIANO11), si è calcolata la frequenza di malformazioni congenite sul totale dei nati residenti nelle province di Napoli e Caserta e non sul totale dei nati negli ospedali partecipanti. Questa è stata una novità interessante anche se c'è stata maggior difficoltà di interpretazione dei dati.

In una prima fase dello studio è stata effettuata una raccolta di dati dal Registro campano dei difetti congeniti nel periodo 1996-2002 .

In una seconda fase dello studio, i Comuni sono stati raggruppati in base a un indice di deprivazione (ID) socio economico in 5 gruppi ed inoltre c'è stato un raggruppamento in cluster in base alle malformazioni congenite ed il cluster principale statisticamente significativo per le malformazioni congenite è situato a Nord Est di Napoli .

Importante è valutare eventuali differenze statisticamente significative se si aggiungono informazioni delle covarianze (che aiutano a mettere in risalto solo alcuni comuni in eccesso non statisticamente significativi e distribuiti in maniera irregolare sul territorio).

Parallelamente è stata effettuata una raccolta dei dati disponibili sui siti di smaltimento rifiuti legali ed illegali, urbani ed industriali presenti sul territorio costruendo un indicatore di pressione ambientale da smaltimento rifiuti per ogni singolo comune.

Si è proceduto poi all'analisi per rispondere al quesito iniziale ovvero se c'è o meno relazione tra pressione ambientale da smaltimento rifiuti ed eccessi di patologie riscontrati. Si è svolta poi un'analisi di regressione che non riguarda più i singoli comuni, ma i gruppi con lo stesso indice di pressione ambientale per capire se all'aumento di questo corrispondono eccessi di patologie.

Utile poi è stata l'analisi bayesiana per valutare sia la situazione di ciascun comune (tenendo presente IR e ID) sia un'immagine complessiva delle aree a diverso rischio sanitario.

La regressione di Poisson tra gruppi di comuni simili per pressione ambientale è , invece, adatta a valutare la presenza o meno di un andamento crescente di malformazioni al crescere della pressione ambientale da rifiuti.

Pertanto un diverso uso di questi risultati, ad esempio applicando i risultati medi di ciascun gruppo di comuni a comuni singoli, potrà dare

un'immagine approssimativa o non aderente alla realtà, creando anche percezioni distorte o addirittura allarmi ingiustificati.

In questo studio, ad esempio, per quanto concerne l'ipospadia non si rilevano differenze particolari tra le diverse classi IR e ID (a differenza di quanto descritto sopra).

In conclusione, il 10-20% di malformazioni sono dovute a cause esclusivamente genetiche. Circa il 10% delle malformazioni sono dovute a cause note (virus come rosolia, farmaci come talidomide, deficit di vitamine come acido folico) assolutamente prevenibili. Ma allora circa il 70% delle cause di malformazioni rimane sconosciuto! Sicuramente è naturale porsi delle domande di questo tipo ma illogico accanirsi poiché di fatto in Campania non c'è alcun dato reale che possa configurarsi come incremento nel tempo o nello spazio di malformazioni [2].

# **Prima linea di ricerca: Inquinamento ambientale e Patologie Ostetriche**

## **CAPITOLO I**

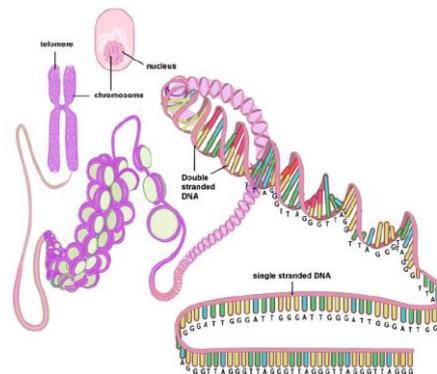
### ***“PCB Telomeri e malformazioni fetali”***

#### **I.1 introduzione**

I telomeri (dal greco *telos*, estremità, e *meros*, parte), presenti alle estremità dei cromosomi lineari, sono sequenze di DNA non codificante altamente ripetuto ed associato a proteine.

La sequenza telomerica ripetuta varia a seconda delle specie e nell'uomo è composta di sei nucleotidi (TTAGGG), ripetuti per una lunghezza che varia da 3 a 20 kilobasi. Nonostante la sequenza telomerica vari da specie a specie, essa è generalmente ricca in GC, caratteristica che li rende particolarmente sensibili al danno da stress ossidativo. Sono

Fig. 1 Telomeres are located at the very final ends of the linear chromosomes and consists of TTAGGG repeats in vertebrates. Reproduced with permission [42]



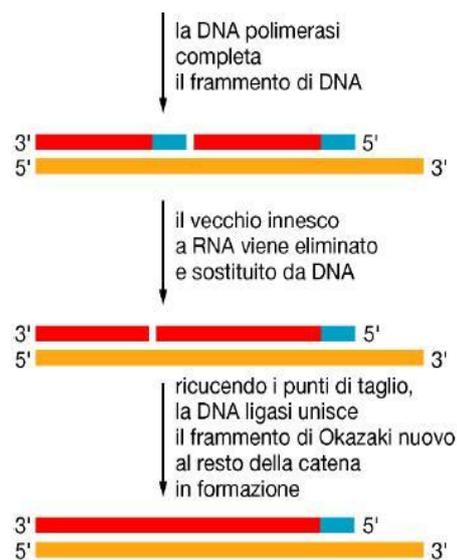
**Fig. 1.12 struttura telomeri**

presenti, inoltre, 100-300 kilobasi addizionali di ripetizioni telomero-associate, che si dispongono tra il telomero ed il resto del cromosoma.

I telomeri hanno un ruolo determinante nell'evitare la perdita di informazioni durante la duplicazione dei cromosomi. La DNA polimerasi, infatti, non è in grado di replicare il cromosoma fino alla sua terminazione e, se non ci fossero i telomeri, che quindi vengono accorciati ad ogni replicazione, la replicazione del DNA comporterebbe in ogni evento replicativo una significativa perdita di informazione genetica.

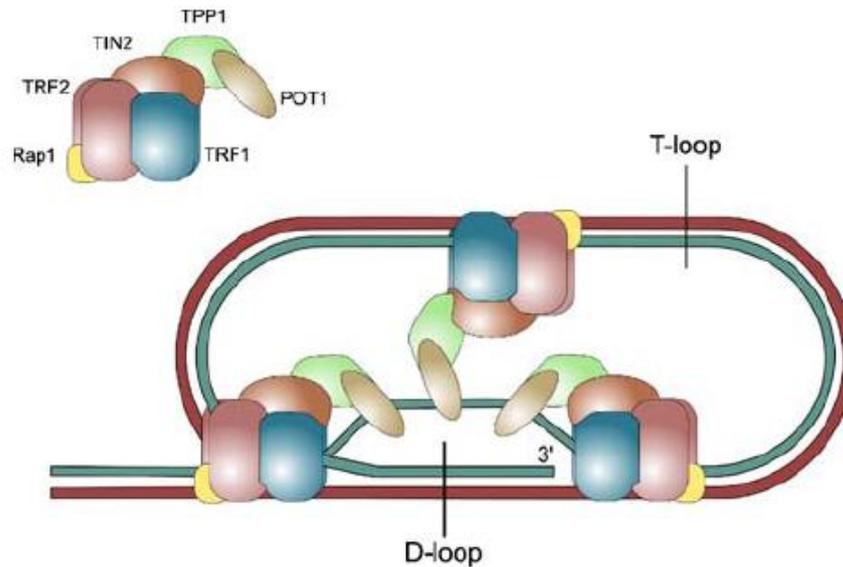
I telomeri tendono ad accorciarsi a causa del meccanismo di replicazione del filamento lagging del DNA. Poiché che la replicazione del DNA non ha inizio dalle estremità ma da varie regioni centrali di ogni cromosoma e poiché tutte le DNA polimerasi polimerizzano in direzione 5'→3' (spostandosi in direzione 3'→5'), il DNA in replicazione presenta un filamento leading ed uno lagging. Sul filamento leading, la DNA polimerasi può produrre un filamento complementare senza ostacoli, perché procede da 3' a 5'. Sul filamento lagging, invece, la DNA polimerasi non procede in maniera continua, ma discontinua per polimerizzare nel senso 5'→3'; la sintesi sul filamento lagging avviene mediante piccole sequenze di RNA (RNA primer) che legano tale filamento e agiscono come innesco, favorendo l'attacco della DNA polimerasi e l'avvio della polimerizzazione. Questo processo genera la formazione dei frammenti di Okazaki. I frammenti di Okazaki sono processati infine dalla DNA polimerasi, che sostituisce l'RNA dei

primers con DNA, e dalla DNA ligasi, che forma il legame fosfodiesterico tra frammenti consecutivi. Questo accade presso tutti i siti del filamento lagging, ma non dove si appaia l'ultimo primer di RNA. In questa regione, infatti, l'RNA viene distrutto da RNAsi, ma non c'è alcuna sostituzione con DNA. Questo genera un continuo processo di accorciamento di queste regioni, che si trovano appunto presso i telomeri.



**Fig. 1.13 Duplicazione Dna**

La struttura secondaria dei telomeri (T-loop e D-loop) e l'associazione a specifici complessi proteici (TRF1, TRF2, POT1, Rap1, TPP1, TIN1), li rende indispensabili per il mantenimento dell'integrità cromosomica; il ruolo dei telomeri è quindi anche quello di stabilizzare le estremità cromosomiche lineari formando quello che viene definito un "cappuccio protettivo", che impedisce la possibilità di riarrangiamenti intra- ed intercromosomici. [39]



**Fig. 1.14 Struttura secondaria dei telomeri**

L'enzima telomerasi, che appartiene ad una classe di retrotrascrittasi specializzate, presenti in numerosi organismi (tra cui l'uomo), ma assente in alcune fasi dello sviluppo, permette di risolvere il problema della replicazione delle estremità cromosomiche aggiungendo ripetizioni telomeriche ad ogni ciclo di sintesi del DNA.

La telomerasi è costituita da una piccola molecola di RNA, l'RNA telomerasico (TR), e da una subunità catalitica, la trascrittasi inversa telomerasica (TERT).

La telomerasi permette il mantenimento della lunghezza telomerica bilanciando l'accorciamento telomerico e prevenendo la senescenza cellulare; infatti studi condotti su topi transgenici TR<sup>-/-</sup>, deficienti per l'attività telomerasica, sono soggetti ad

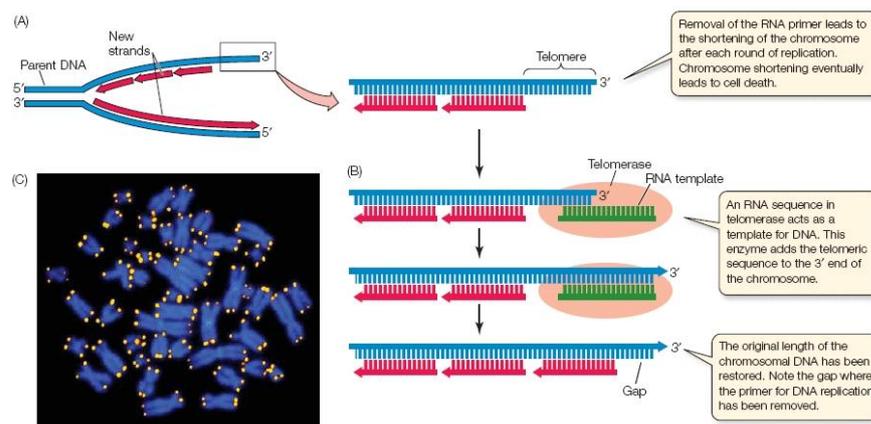
accorciamento progressivo dei telomeri e presentano assenza dei telomeri, anomalie cromosomiche ed, eventualmente, sterilità femminile (ma solo dopo diverse generazioni). [40]

In particolare, nell'uomo (così come nella maggior parte degli eucarioti multicellulari) le telomerasi sono attive solo nelle cellule della linea germinale ed in cellule embrionali, ma non nella maggior parte dei tessuti adulti. La telomerasi è presente anche in cellule tumorali e in cellule immortalizzate. La sua riattivazione in qualche passaggio dello sviluppo tumorale previene l'accorciamento critico dei telomeri e quindi l'arresto proliferativo in più del 90% dei tumori nell'uomo, e per questo, la sua abrogazione è stata proposta come un possibile meccanismo di inibizione della progressione tumorale.

Le cellule somatiche differenziate, invece, non esprimono la telomerasi e vanno incontro a senescenza duplicativa, che è associata con una diminuzione della lunghezza dei telomeri. Questo perché i telomeri agirebbero come una sorta di orologio biologico, legato cioè ad un numero massimo di mitosi (e di replicazioni del DNA), al termine del quale la cellula sarebbe troppo vecchia per essere mantenuta in vita e prenderebbe la via dell'apoptosi.

Il meccanismo molecolare attraverso cui i telomeri troppo corti (4-6 kb, fino ad un massimo di 20kb) possono portare alla morte cellulare sembra essere legato alla perdita del loro corretto

ripiegamento naturale (evento legato ad una loro dimensione troppo ristretta). Secondo alcune teorie comunemente accettate, la cellula è infatti in grado di riconoscere questo diverso ripiegamento come danno al DNA, avviando il pathway dell'apoptosi sulla base dell'attività di molecole come p53. Tale processo di morte cellulare può anche essere avviato da una fusione tra cromosomi.



La lunghezza dei telomeri può essere considerata un biomarker di invecchiamento cellulare. Ma, oltre che ad un processo fisiologico come quello della senescenza replicativa, la riduzione della lunghezza dei telomeri è stata associata in numerosi studi a condizioni patologiche quali la sindrome di Down, la discheratosi congenita, la sindrome di Werner.

L'accorciamento telomerico è stato dimostrato compromettere lo sviluppo fetale determinando difetti nelle sinapsi cromosomiche accompagnati da aumento dell'apoptosi delle cellule meiotiche

maschili e arresto della differenziazione meiotica precoce; nelle cellule che raggiungono la fase pachitene, l'accorciamento telomerico determina compromissione della ricombinazione cromosomica.

La risposta alla disfunzione telomerica femminile può essere diversa da quella maschile: l'apoptosi all'inizio della profase meiotica rimuove le cellule con telomeri aberranti dalla popolazione di cellule germinali maschili, quindi gli individui maschili possono innescare l'apoptosi e rimuovere gli spermatociti difettivi, mentre le cellule germinali femminili sono sottoposte ad arresto meiotico con perdita della distribuzione perinucleare e distruzione della formazione delle sinapsi. [41]

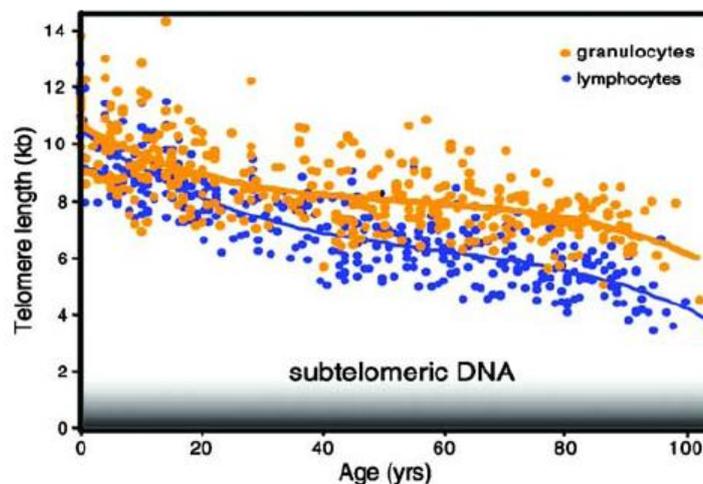


Fig. 3 Telomere length in lymphocytes and granulocytes during human lifespan. Reproduced with permission from [4]

## **Telomeri, meiosi e riproduzione**

Molti degli oociti e degli embrioni aneuploidi sono soggetti ad apoptosi prima dell'impianto, determinando l'infertilità; tuttavia alcuni si sviluppano e vanno incontro ad aborto durante lo sviluppo o generano prole con handicap.

Alcune anomalie sembrano predisporre gli oociti di donne in età avanzata a non-disgiunzione meiotica, a riduzione dei chiasmi e della ricombinazione, ad anomalie strutturali dei complessi fuso-cromosoma, del DNA mitocondriale.

Studi sperimentali sull'accorciamento telomerico su topo (che normalmente ha lunghi telomeri e non mostra nessuna delle anomalie elencate) mostrano il coinvolgimento delle estremità cromosomiche nei processi di meiosi: gli oociti con telomeri accorciati farmacologicamente o geneticamente mostrano riduzione dei chiasmi e delle sinapsi, fusi anomali con errato allineamento cromosomico e sviluppo embrionale interrotto (che conduce all'apoptosi).

La disfunzione telomerica degli oociti di donne in età avanzata può fornire una spiegazione di come l'invecchiamento predisponga gli oociti alla non-disgiunzione [42].

I meccanismi che sono alla base dell'appaiamento meiotico e la formazione di sinapsi sono complessi e possono coinvolgere diversi

processi ed è probabile che i telomeri siano coinvolti indirettamente nell'appaiamento dei cromosomi omologhi. [43]

Nei mammiferi, gli oociti iniziano la meiosi durante lo sviluppo fetale, che consiste nell'accoppiamento, nella formazione di sinapsi e nella ricombinazione, seguiti da un arresto protratto della meiosi. I chiasmi formati durante la vita fetale influenzano la disgiunzione cromosomica durante la fase pre-ovulatoria dell'adulto. Durante la prima fase meiotica, i chiasmi formati durante l'oogenesi fetale accoppiano i cromosomi omologhi; la deficienza di tali strutture predispone, quindi, a fenomeni di non-disgiunzione alla presenza di aneuploidie, probabilmente perché i chiasmi sono necessari per bilanciare, finché tutti i cromosomi si sono disposti sulla piastra mitotica, le forze esercitate dal fuso mitotico che spingono verso i poli. La dimostrazione di tale meccanismo è fornita dagli individui affetti da sindrome di Down (determinata da non-disgiunzione del cromosoma 21) che presentano ridotta ricombinazione genetica rispetto agli individui normali.

L'accorciamento telomerico, è stato associato, in studi sperimentali condotti su topi transgenici, ad infertilità femminile in seguito ad alcune generazioni dalla transgenesi.

I topi raramente esibiscono disfunzione meiotica correlata all'età e presentano telomeri più lunghi rispetto all'uomo. Tuttavia,

l'induzione di mutazioni che riducono la lunghezza telomerica (mutazioni nulle allo stampo di RNA della telomerasi) ha mostrato ridurre i chiasmi e le sinapsi, conducendo ad instabilità genomica, arresto del ciclo cellulare ed apoptosi. [42]

Prima della comparsa della sterilità, i topi TR  $-/-$  mostrano diminuzione della progenie, degradazione del fuso meiotico, diminuzione dei chiasmi, arresto embrionale e frammentazione citoplasmatica (segno di apoptosi); tali caratteristiche sono significativamente simili alla senescenza riproduttiva femminile.

Studi condotti su fertilizzazioni in vitro (IVF) mostrano differenti livelli di frammentazione citoplasmatica associata ad apoptosi e tale caratteristica morfologica rappresenta un indice del potenziale di sviluppo degli embrioni umani pre-impantati. Gli effetti della lunghezza telomerica sulla morfologia embrionale sembrano infatti essere specifici per la frammentazione citoplasmatica. L'apoptosi, negli embrioni pre-impianto può risultare direttamente dall'accorciamento telomerico o indirettamente dalla distruzione del fuso e dalla riduzione dei chiasmi (che conduce alle aneuploidie). [40; 42]

Gli oociti di donne in età avanzata mostrano anomalie nell'allineamento cromosomico e nella morfologia del fuso. Le anomalie strutturali del fuso meiotico, che includono l'asimmetria dei poli del fuso e il mancato allineamento dei cromosomi sulla

piastra metafisica si verificano in circa l'80% degli oociti di donne oltre i 40 anni e solo nel 17% degli oociti di donne più giovani.

L'accorciamento telomerico nei topi, che si verifica dopo diverse generazioni dall'inizio della deficienza telomerasica o in seguito ad esposizione a specie reattive dell'ossigeno, produce fusi meiotici anomali con asimmetria ed errata disposizione cromosomica, eventi simili a quello che accade in donne in età avanzata. Tali anomalie del fuso e dei cromosomi sono probabilmente associate alla soppressione della meiosi, dato che i checkpoints per la transizione meiotica da metafase ad anafase sono meno efficienti nelle donne rispetto agli uomini; durante la meiosi femminile, la progressione dalla meiosi I alla meiosi II si verifica anche in presenza di malallineamento cromosomico durante la meiosi I, in quanto il processo femminile manca di punti di controllo efficienti durante la metafase.

Il processo che conduce al malallineamento cromosomico e alla distruzione dei fusi mitotici causato dalla disfunzione meiotica non è ben compreso, ma potrebbe essere determinato da un appaiamento e dalla ricombinazione impropri dei cromosomi omologhi durante le prime fasi della meiosi. L'appaiamento errato dei cromosomi determinato da perdita telomerica potrebbe impedire la ricombinazione dei cromosomi omologhi durante la fase leptotene/zigotene della profase I, inibire l'organizzazione e il mantenimento di un fuso meiotico funzionale e prevenire il

normale allineamento cromosomico metafisico durante la divisione meiotica. [42]

### **Telomeri, stress ossidativo e inquinamento**

Le specie reattive dell'ossigeno sono state dimostrate accorciare i telomeri. [42]

I telomeri, infatti, si accorciano attraverso due meccanismi: la senescenza replicativa e la risposta al danno provocato dalle specie reattive dell'ossigeno. Una volta raggiunta la lunghezza critica, la cellula interrompe le divisioni ed eventualmente va incontro ad apoptosi o a fusioni cromosomiche.

Anche le cellule non in divisione possono subire accorciamento telomerico quando l'ossidazione induce una risposta al danno del DNA, che porta all'escissione della sequenza ossidata.

I telomeri sono particolarmente suscettibili alle specie reattive dell'ossigeno a causa delle loro sequenze ricche in guanina (il nucleotide particolarmente suscettibile all'ossidazione), la localizzazione in prossimità della membrana nucleare (che facilita la per ossidazione lipidica) e la relativa mancanza di proteine protettiva. [42]

Lo stress ossidativo può indurre la rottura dei doppi filamenti di DNA e la formazione di 8-ossio-7,8-diidro-2'-deossiguanosina nelle triplette GGG della sequenza telomerica, eventi che inducono

l'accorciamento dei telomeri. Inoltre, lo stress ossidativo può agire nella distruzione dell'associazione delle proteine di mantenimento dei telomeri TRF1 e TRF2. [44]

L'accorciamento telomerico, determinato sia dalla senescenza replicativa che dalle specie reattive dell'ossigeno, si osserva negli oociti murini e negli embrioni pre-impianto, ovvero negli stadi dello sviluppo in cui si verificano la maggior parte delle disgiunzioni in donne in età avanzata. [42].

L'associazione tra stress ossidativo, inquinamento e lunghezza telomerica è stata effettuata mediante diversi studi che hanno analizzato l'esposizione all'inquinamento, al fumo di sigaretta e la concentrazione di sostanze chimiche inquinanti.

L'esposizione agli inquinanti ambientali (quali le emissioni del traffico) sembra essere un fattore determinante dell'invecchiamento biologico precoce e della lunghezza telomerica. Le emissioni del traffico rappresentano una miscela di sottoprodotti dei processi di combustione che include centinaia di inquinanti in fase gassosa e particolata. Le particelle possono stimolare direttamente o indirettamente la generazione di specie reattive dell'ossigeno; altri composti della combustione, come l'ossido nitrico ed il benzene sono stati associati alla produzione di stress ossidativo. L'accorciamento telomerico determinato dallo stress ossidativo rappresenta il principale mediatore degli effetti che l'inquinamento

da traffico esercita sulla salute umana. Infatti, l'esposizione al traffico sembra anticipare la riduzione della lunghezza telomerica correlata con l'età: nonostante sia in soggetti esposti al traffico che in soggetti non esposti la lunghezza dei telomeri sia associata all'età, i primi mostrano lunghezze telomeriche simili a quelle riscontrate in soggetti più anziani (circa 10 anni) del secondo gruppo.

I gruppi di lavoratori esposti al traffico ad alta intensità e l'altro di lavoratori d'ufficio, sono stati analizzati per il rilevamento delle concentrazioni ematiche di benzene e toluene, come markers di esposizione al traffico cittadino. Nel primo gruppo, in cui sono risultate concentrazioni maggiori di questi traccianti, in ogni fascia d'età è stata riscontrata una significativa diminuzione della lunghezza dei telomeri dei leucociti rispetto al gruppo dei controlli. Se si trattava di soggetti fumatori, la lunghezza dei telomeri diminuiva ulteriormente.

In conclusione, è stato dimostrato che l'esposizione ad agenti inquinanti dell'aria può determinare invecchiamento biologico precoce, come attestato dalla lunghezza ridotta dei telomeri dei leucociti, e che tale esposizione sembra quindi anticipare la diminuzione fisiologica, legata all'età, della dimensione telomerica.[45]

Alcuni agenti che inducono stress ossidativo, come il fumo di sigaretta, sono stati associati all'accorciamento telomerico. Infatti, il fumo produce elevati livelli di specie reattive dell'ossigeno e, quindi, lo sbilanciamento tra sostanze ossidanti/antiossidanti nei fumatori conduce a stress ossidativo. Tale processo determina danno al DNA mitocondriale e al DNA nucleare, inducendo l'instabilità cromosomica e lo sviluppo di patologie, infertilità e difetti congeniti.

Il fumo materno è dannoso per le prime fasi di sviluppo embrionale in quanto conduce ad arresto dello sviluppo o a peso ridotto alla nascita; inoltre, l'esposizione al fumo di sigaretta determina la perdita del follicolo primordiale e lo sviluppo di disfunzione ovarica, mentre gli embrioni esposti mostrano stress ossidativo aumentato, telomeri più corti e aumento degli eventi apoptotici.

In concordanza con tali osservazioni, i soggetti fumatori presentano telomeri più brevi rispetto a coloro che non fumano e, a parità di età, la lunghezza telomerica risulta inversamente proporzionale al numero di sigarette fumate.

Studi su embrioni di topo hanno dimostrato che i componenti del fumo (condensato di fumo di sigaretta, CSC, e cadmio) riducono significativamente lo sviluppo embrionale e aumentano la produzione di specie reattive dell'ossigeno, il danno al DNA,

l'accorciamento e la perdita telomerica, l'instabilità cromosomica e/o l'apoptosi. Inoltre, i danni provocati da CSC e cadmio sono prevenuti da sostanze antiossidanti (l'aumento dei livelli cellulari di antiossidanti può avere effetti preventivi o terapeutici sulla instabilità cromosomica e sulla genotossicità indotte da fumo).

L'accorciamento telomerico e la compromissione dello sviluppo embrionale indotti da CSC in colture in vitro sono simili alle conseguenze riscontrate in animali esposti a fumo di sigaretta; questi dati confermano che lo stress ossidativo è implicato nei processi di genotossicità prodotti dal fumo di sigaretta e permettono la correlazione tra stress ossidativo e disfunzione telomerica in risposta ad esposizione al fumo. Inoltre, telomeri corti risultano più suscettibili al danno ossidativo indotto dalle componenti del fumo, come dimostrato dall'aumento della perdita telomerica, della separazione cromosomica e dell'instabilità in embrioni di topi knockout per l'RNA telomerasico con brevi sequenze telomeriche ed esposti a CSC o cadmio.

L'accorciamento telomerico determina un aumento della fusione cromosomica o la separazione precoce dei cromatidi fratelli. Il CSC ed il cadmio aumentano la perdita telomerica e la fusione dei cromosomi in topi wild type; i meccanismi che sono alla base di tali processi sono ancora da comprendere, ma è noto che sono associati con disfunzione telomerica. Gli elevati livelli di specie reattive dell'ossigeno generati dal cadmio possono determinare

danni alla coesione di brevi telomeri l'incompleta separazione dei cromatidi fratelli nelle regioni telomeriche in cellule pre-senescenti può contribuire allo stato "esposto" dei telomeri corti e alla comparsa di anomalie cromosomiche ed alcuni embrioni danneggiati dalle specie reattive dell'ossigeno vanno incontro ad apoptosi o arresto del ciclo cellulare.

Il fumo materno, quindi, sembra avere conseguenze a lungo termine sui feti, e tali caratteristiche possono non essere evidenti subito dopo l'impianto ma anche più tardi nel corso dello sviluppo. [44]

Nonostante nei paesi sviluppati le emissioni di piombo sono sensibilmente diminuite nelle ultime decadi, grazie all'introduzione di carburanti senza piombo, vi è ancora esposizione al piombo nell'aria e negli alimenti.

L'analisi dei livelli di contaminanti, come il piombo, nel fluido follicolare hanno messo in evidenza che tali componenti possono influenzare negativamente l'outcome della fecondazione in vitro. Le concentrazioni follicolari di piombo possono essere maggiori di quelle riscontrate nel sangue ed anche piccole concentrazioni di piombo follicolare risultano inversamente correlate con la gravidanza. [46]

Gli inquinanti ambientali, infatti, ed in particolare i metalli pesanti, possono accumularsi in alcuni distretti del nostro

organismo e influenzare la salute umana (alcuni esempi sono lo sviluppo di cancro e di difetti congeniti).

Le concentrazioni di elementi in piccoli follicoli possono essere diverse da quelle misurate in grandi follicoli e nel circolo sanguigno; la concentrazione plasmatica di elementi chimici influenza la concentrazione follicolare incrementandola, indipendentemente dal fatto che la concentrazione sanguigna sia superiore o inferiore rispetto alla follicolare. Infatti i trasudati sanguigni riempiono i piccoli follicoli in tempi relativamente brevi determinando cambiamenti nelle concentrazioni follicolari che rappresentano esposizioni a lungo termine delle ovaie (la concentrazione sanguigna invece rappresenta l'esposizione a breve termine). [47]

Barker et al. hanno dimostrato, in uno studio su una popolazione del Regno Unito, l'importanza dello stato nutrizionale fetale durante la vita intrauterina nello sviluppo di malattie cardiovascolari e metaboliche nell'età adulta. Quindi, non solo i comuni fattori di rischio, quali, fumo e obesità, ma anche alterazioni della crescita fetale, basso peso alla nascita, presentano una significativa influenza nello sviluppo di dislipidemie, aterosclerosi, ipertensione, ictus, IMA e altre gravi patologie coronariche. I meccanismi fisiopatologici ipotizzati alla base di questi risultati potrebbero essere diversi: da un lato un'alterazione dell'asse ipotalamo-ipofisiario potrebbe condurre ad una maggiore

sensibilità allo stress e contemporaneamente ad una diminuzione della sensibilità all'insulina, dall'altro un numero ridotto di glomeruli renali potrebbe essere la causa dell'ipertensione arteriosa.

In conclusione, l'invecchiamento cardiovascolare è stato strettamente correlato all'accorciamento dei telomeri, che determina variazioni nella crescita sia prenatale che postnatale.

Infatti, in modelli in vitro l'accorciamento dei telomeri delle cellule endoteliali coronariche è stato associato all'espressione di molecole implicate nell'aterogenesi.

Anche se questo non dovesse mai dimostrarsi un diretto nesso eziologico, la lunghezza telomerica potrebbe essere sempre considerata un biomarker di invecchiamento delle cellule endoteliali e del processo aterosclerotico. L'accorciamento dei telomeri può predire inoltre la mortalità a 15 anni per le malattie cardiovascolari.[48]

In conclusione, molti fattori ambientali, quali fumo, dieta, inducono stress ossidativo, che insieme ai processi infiammatori stimolati direttamente o indirettamente dai ROS determinano l'accorciamento dei telomeri. Questo accadrebbe sia perché telomeri sono particolarmente sensibili al danno da stress ossidativo per l'elevato numero di ripetizioni di basi di guanina, sia perché il

DNA telomerico non è efficiente nella riparazione di rotture del singolo filamento indotte dai ROS stessi.[49]

Tra i fattori ambientali responsabili di un'eccessiva produzione di radicali liberi, la nostra attenzione è rivolta all'inquinamento e alle sue possibili ripercussioni genotipiche e fenotipiche fetali.

## **Obiettivi dello studio**

Il presente studio si è proposto di affrontare con rigore metodologico gli aspetti clinico-statistici relativi al rapporto tra malformazioni fetali e inquinamento ambientale. A tale scopo ha preso in esame un campione di donne gravide residenti nei territori campani ritenuti altamente inquinati, comparandolo con un campione di donne gravide residenti fuori dalla Regione Campania, in territori ritenuti non inquinati.

Tale studio è stato suddiviso in più bracci, allo scopo di monitorare l'insorgenza di effetti nocivi sulla riproduzione, rinvenibili a vari livelli sulla popolazione studiata, così come segue:

- Primo braccio: analisi tossicologica su sangue materno per valutare le concentrazioni dei principali inquinanti ambientali e le differenze tra i due gruppi di gestanti in esame;

- Secondo braccio: analisi genetica su sangue materno per valutare differenza di lunghezza dei telomeri dei leucociti estratti da sangue delle gestanti

## **Materiali e Metodi**

- *Arruolamento e popolazione in studio*

Per la realizzazione di questo studio pilota caso-controllo (*donne con feto malformato vs. donne con feto normo-formato*) sono state arruolate 50 donne in gravidanza, afferenti alle strutture di:

- *Dipartimento di Ginecologia Ostetricia e Fisiopatologia della riproduzione* - Università degli studi di Napoli Federico II;
- *Dipartimento di Ostetricia e Ginecologia, Ospedale San Lorenzo – Valdagno (VI).*

Il periodo di arruolamento è stato compreso tra il 1 maggio 2011 ed il 1 maggio 2013.

L'arruolamento è stato preceduto da un colloquio informativo, finalizzato ad illustrare gli obiettivi e le modalità di svolgimento del Progetto, che ha preceduto la sottoposizione del consenso informato. Sono state arruolate solo le pazienti che abbiano fornito un consenso informato scritto.

Il protocollo di studio è stato regolarmente approvato dal Comitato Etico della nostra struttura ospedaliera.

I **criteri d'inclusione/esclusione** utilizzati sono stati differenti per i due gruppi.

Nel **gruppo "CASO"**, sono state incluse pazienti rispondenti ai seguenti **criteri d'inclusione**:

- età compresa tra 27 e 35 anni;
- diagnosi accertata di fetopatia, ad eziologia ignota.

Sono, al contrario, state escluse del **gruppo CASO**:

- donne con età > 40 anni (criterio di rischio per cromosomopatie)

[Savva et al. 2010]

- donne con fetopatia accertata, ma ad eziologia nota.

Nel **gruppo "CONTROLLO"**, sono state incluse pazienti rispondenti ai seguenti **criteri d'inclusione**:

- età compresa tra 27 e 35;
- gravidanza normo-condotta, con feto normo- formato.

Le donne dei **gruppi CASO-CONTROLLO** sono state selezionate tra quelle afferenti agli ambulatori di diagnosi prenatale del dipartimento di Ostetricia dell'Università Federico II di Napoli e del reparto di Ostetrica e Ginecologia dell'ospedale "San Lorenzo" di Valdagno (VI) per controlli ambulatoriale durante la gravidanza.

Da un iniziale numero di 59 pazienti arruolate, **7 CONTROLLI** e **2 CASI** non si sono presentati al momento del prelievo ematico. In definitiva, il campione del nostro studio pilota CASO-CONTROLLO è apparso costituito da (*Appendice 1*):

- n= 30 CASI (GRUPPO A) residenti nelle aree ad alto tasso di inquinamento
- n= 10 CASI (GRUPPO B) non residenti nelle aree ad alto tasso di inquinamento;
- n= 10 (GRUPPO C) CONTROLLI.

- **Anamnesi ginecologica**

Le donne incluse nello studio sono state sottoposte ad un'approfondita anamnesi, con particolare attenzione all'anamnesi ostetrica, guidata da *“Schede Di Raccolta Dati Ginecologici”* e *“Dati Registro Campano Dei Difetti Congeniti”* (**Appendice 2**). Tramite tale fase anamnestica, nel **gruppo CASO**, si è potuto indagare, in maniera esaustiva, sulla presenza di eventuali fattori eziologici noti di malformazione, causa di esclusione della paziente dallo studio, tra cui:

- anamnesi positiva per infezione (es. complesso TORCH);
- stati di malnutrizione o patologie dismetaboliche (es. diabete);
- farmaci (es. talidomide, anticoagulanti, chemioterapici) e sostanze stupefacenti (es. cannabis, cocaina, eroina);
- indagini radiologiche (es. radiografie, TC)
- familiarità per sindromi genetiche.

- **Diagnosi di malformazione**

Tutte le donne del nostro campione sono state sottoposte alle indagini di laboratorio routinariamente eseguite nel corso di ogni gravidanza, tra cui il tri-test: dosaggio di  $\alpha$ -fetoproteina,  $\beta$ -HCG ed estradiolo, per la previsione di trisomia 21. In seguito, la diagnosi prenatale di fetopatia è stata accertata, mediante le due seguenti tecniche diagnostiche: ecografia ostetrica ed amniocentesi trans addominale.

- **Analisi tossicologica su sangue materno**

Abbiamo preso in esame 50 campioni ematici così distribuiti:

1. GRUPPO A: 30 sieri prelevati da donne gravide di età compresa tra 20 e 35 anni residenti nella zona definita a rischio e con accertata diagnosi di malformazione fetale;
2. GRUPPO B: 10 sieri prelevati da donne gravide di età compresa tra 20 e 35 anni non residenti nella zona definita a rischio e con accertata diagnosi di malformazione fetale;
3. GRUPPO C: 10 sieri prelevati da donne gravide non residenti nella Regione Campania e con feti sani;

Il sangue materno è stato prelevato da vena antecubitale con metodo Vacutainer (una singola provetta). Per ogni paziente sono stati raccolti 5mL di sangue. Il siero dopo la separazione è stato conservato a  $-20^{\circ}\text{C}$  fino al momento del dosaggio.

- **Reagenti e prodotti chimici**

I solventi utilizzati per la diluizione degli standard e per l'estrazione erano *n*-esano 99% di purezza, metanolo 99.8% di purezza e dietiletere 99.5% di purezza, e sono stati acquistati da Sigma-Aldrich (Milano, Italia).

La miscela standard dei 12 PCB "diossina-simili" 10ug/ml (77, 81, 105, 114, 118, 123, 126, 156, 157, 167, 169,189) (97% di purezza,) e dei due utilizzati come standard interni 100ug/ml (30e 112) (97% di purezza) erano entrambe in iso-ottano, e sono state acquistate da *Ultrascentific analytical solutions, Italia*.

- **Standard e materiali di riferimento**

Sono stati analizzati i seguenti congeneri: 77, 81, 105, 114, 118, 123, 126, 156, 157, 167, 169,189, mentre i PCB 30 ed il 112 sono stati utilizzati come standard interni.

Per ogni congenere sono state preparate soluzioni standard in *n*-esano e aggiunti ai sieri di controllo per ottenere curve di calibrazione nell'intervallo 0,1-0,8 ng.

I sieri di controllo sono stati scelti relativamente a persone non residenti nella Regione Campania.

I rapporti tra l'area di ciascun congenere analizzato e quella del PCB 112 sono stati riportati in grafico rispetto alle concentrazioni dei diversi PCB analizzati, per ottenere delle curve di calibrazione utilizzando l'analisi di regressione lineare.

- **Preparazione del campione**

I campioni di sangue sono stati raccolti in 5 ml per paziente.

Siringhe di vetro e tubi di vetro sono stati impiegati al fine di evitare contaminazione.

Le provette sono state centrifugate a 4000 giri / min, con centrifuga Mikro 20 (Hettich, Germania), per 10 minuti a 4°C, quindi il siero è stato trasferito in una nuova provetta, etichettata con un codice che identificava la madre ed il bambino. I campioni sono stati congelati e conservati a -20 ° C fino all'analisi e comunque entro una settimana dalla raccolta.

L'analisi è stata condotta sottoponendo il siero ad un'estrazione in fase solida, dopodichè il campione ottenuto è stato analizzato mediante gascromatografia, metodo cromatografico scelto per la volatilità dei composti da analizzare.

- **Purificazione SPE**

1 ml di siero veniva portato a temperatura ambiente e trasferito in una provetta da centrifuga, addizionato a 5  $\mu$ L di standard interno (mix di PCB 30 e PCB 112 in *n*-esano), e posto su vortex per pochi secondi.

Successivamente, per consentire la precipitazione delle proteine, veniva aggiunto un volume di 2 ml di metanolo e posto il campione in agitazione su vortex per 5 secondi.

Il campione veniva sottoposto ad estrazione con una miscela di dietilere/*n*-esano, 1:1 v/v, per 30 minuti in agitazione.

Il supernatante prelevato veniva concentrato sotto vuoto ad un volume totale di 1 ml, e purificato in SPE mediante cartucce Strata FL-PR Florisil (volume: 6ml, impaccamento 1g) e Strata SI-1 Silica (volume: 3 ml, impaccamento 0.5 g). (Phenomenex, Torrance, CA) disposte in serie. Le cartucce venivano condizionate con 10 ml di *n*-esano e l'eluizione effettuata con 10 ml di *n*-esano.

Il campione fluito veniva poi portato a secco sotto vuoto e il residuo disciolto in 100  $\mu$ L di *n*-esano per essere poi iniettato al gas cromatografo.

La concentrazione dei campioni è stata effettuata utilizzando Rotavapor Laborota 4000 Hiidolph (Del chimica, Italia).

La centrifuga utilizzata è stata una Mikro 20 (Hettich, Germania).

L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando software disponibili in commercio per personal computer.

- **Gascromatografia**

Tale studio ha richiesto una metodica analitica adatta per l'identificazione qualitativa e quantitativa dei policlorobifenili nel siero.

Per eseguirlo sono stati scelti i metodi cromatografici, in particolare la Gas Cromatografia (GC). La metodica scelta ha soddisfatto le seguenti caratteristiche:

- sensibilità: capacità di rivelare anche quantità minime del nostro analita, in quanto i PCB provocano effetti tossici anche a basse dosi (concentrazioni dell'ordine di ng/ml);
- robustezza: riproducibilità dei risultati sia da un punto di vista qualitativo che quantitativo, senza risentire di piccole variazioni che si potrebbero avere durante il lavoro di routine;
- accuratezza: capacità di riuscire a produrre una risposta quantitativa effettivamente indicativa delle quantità realmente presenti; in altre parole è la capacità di rappresentare quanto il valore misurato si avvicina a quello conosciuto. Per soddisfare tale requisito

sono state considerate tutte le potenziali interferenze derivanti dalla matrice sulle capacità di identificazione e quantificazione degli analiti;

- riproducibilità durante la fase di quantificazione, in modo da avere una bassa deviazione standard e quindi un'alta precisione. Il requisito di riproducibilità deve garantire anche lo sviluppo di una metodica che richieda tappe preparative quanto più semplici e riproducibili possibili, in modo che i campioni non vengano sottoposti a lunghi e tediosi trattamenti e che assicurino lo stesso risultato nel tempo.

L'analisi dei PCB è stata eseguita su un gascromatografo HP5890 serie II (Hewlett-Packard), equipaggiato con un rivelatore a cattura di elettroni  $^{63}\text{Ni}$  (GC-ECD).

I campioni sono stati iniettati mediante auto campionatore HP7673 (Hewlett-Packard) equipaggiato con una siringa da 10  $\mu\text{L}$  in modalità split su di una colonna capillare Zebron ZB-5ms (60m x 0.25mm x 0.25 $\mu\text{m}$  di spessore (Phenomenex, Inc., Torrance, CA, USA), utilizzando gas elio come carrier gas ad un flusso di 1.1 ml/min, effettuando la seguente programmata di temperatura: 60°C iniziale (1 min) fino a 140 °C a 25 °C/min e poi fino a 280 °C a 2 °C/min. La temperatura del rivelatore è stata regolata a 300 °C, mentre quella dell'iniettore a 280 °C, il flusso del gas ausiliario (azoto) è stato di 70 ml/min. La colonna Zebron è stata utilizzata

come principale colonna analitica ed i dati sui campioni reali sono stati ottenuti utilizzando tale colonna.

I segnali sono stati registrati interfacciando da un PC mediante utilizzo di un software PC (Chromatoplus 2007, Shimadzu-Corporation, Kyoto, Japan). L'identificazione dei composti PCB nei sieri stata confermata mediante l'utilizzo di una seconda colonna, una HP1 silice fusa 30 m × 0,32 mm, 0,25 µm di spessore del film. Analisi quantitativa e qualitativa sono state realizzate dal confronto con 2 standard esterni rispettivamente PCB 30 e PCB 112.

- **Analisi genetica**

Per gli stessi 50 campioni, suddivisi nei medesimi 3 gruppi, per cui è stata già eseguita l'analisi tossicologica per la verifica della presenza dei vari congeneri di PCB nel siero, è stata eseguita una analisi genetica per la valutazione della lunghezza dei telomeri nei leucociti.

Il sangue materno è stato prelevato da vena antecubitale con metodo Vacutainer. È stata utilizzata una provetta contenente EDTA ed il campione ematico è stato conservato a -80° fino al momento dell'analisi genetica.

L'analisi genetica dei telomeri delle cellule ematiche delle pazienti è stata effettuata su campioni di sangue periferico da cui è

stato estratto il DNA genomico; su tali campioni è stata successivamente effettuata l'analisi della lunghezza telomerica mediante saggio di Southern Blot.

- Estrazione del DNA da sangue periferico:

L'estrazione del DNA genomico è stata effettuata su 300 µl di sangue periferico prelevato dalle pazienti mediante il kit Gentra® Puregene® (Qiagen), secondo le indicazioni del produttore.

Il principio su cui si basa l'estrazione del DNA è la lisi delle cellule contenenti il DNA (globuli bianchi) e l'isolamento della molecola di interesse dalle altre componenti cellulari.

Il protocollo di estrazione del DNA ha previsto il trattamento dei campioni con una soluzione di lisi dei globuli rossi (RCB Lysis Solution) e con una soluzione di lisi cellulare (Cell Lysis Solution, un detergente anionico contenente stabilizzatore del DNA che permette di limitare l'attività delle DNasi intracellulari ed esterne), che ha permesso la lisi dei globuli rossi e la rottura delle membrane cellulari. Il DNA è stato successivamente purificato mediante una soluzione di (Protein Precipitation Solution) che ha permesso la precipitazione salina delle proteine ed è stato poi isolato attraverso precipitazione alcolica con isopropanolo ed etanolo al 70%. La risospensione del DNA così ottenuto è stata effettuata in una soluzione tampone contenente uno stabilizzatore del DNA (DNA Hydration Solution) e conservati a +4°C.

La qualità del DNA genomico estratto è stata poi valutata mediante elettroforesi su gel d'agarosio.

- Digestione del DNA genomico:

Al fine di analizzare la lunghezza delle estremità cromosomiche, i campioni di DNA genomico sono stati digeriti con enzimi di restrizione a taglio frequente; la specificità della sequenza di taglio è stata scelta in modo tale da evitare che le regioni telomeriche e sub-telomeriche fossero tagliate, mentre il DNA non telomericò è stato digerito in frammenti di basso peso molecolare.

Gli enzimi di restrizione utilizzati a tale scopo sono stati:

Hinf I (sequenza riconosciuta: 5'-G↓ANTC-3')

Rsa I (sequenza riconosciuta: 5'-GT↓AC-3').

Le digestioni sono state effettuate secondo il protocollo indicato dal kit TeloTAGGG Telomere Length Assay (Roche).

I DNA digeriti sono stati poi sottoposti ad elettroforesi su gel d'agarosio per separare i frammenti di lunghezza diversa.

- Analisi della lunghezza telomerica:

La lunghezza dei telomeri è stata analizzata mediante analisi di Southern blot (kit TeloTAGGG Telomere Length Assay, Roche).

I campioni di DNA digeriti con gli enzimi di restrizione suddetti e corsi su gel d'agarosio, sono stati trasferiti (per capillarità) su un

filtro di nitrocellulosa caricato positivamente e i frammenti di DNA sono stati poi fissati al filtro mediante trattamento a 120°C per 30'.

Il filtro contenente i frammenti di DNA è stato successivamente ibridato con sonde oligonucleotidiche specifiche per il riconoscimento delle sequenze telomeriche ripetitive marcate con digossigenina e la sonda in eccesso è stata lavata dal filtro per evitare il rilevamento di segnali aspecifici. Il rilevamento è stato poi effettuato mediante incubazione del filtro ibridato dalla sonda con anticorpi specifici per la digossigenina e marcati con fosfatasi alcalina e mediante aggiunta del substrato cromogenico BCIP/NBT (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato/nitroblu di tetrazolio).

La fosfatasi alcalina rimuove il gruppo fosfato del BCIP, producendo una molecola che dimerizza in condizioni ossidanti e forma il 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-indaco, un prodotto indaco insolubile; Il colore indaco è amplificato dall'aggiunta di NBT (il NTB viene ridotto dall'indolil e produce un colorante blu intenso, il NBT formazano).

Il confronto tra i segnali ottenuti dal rilevamento dei campioni e un marcatore di peso molecolare (frammenti di DNA di peso molecolare noto) ha permesso l'identificazione delle lunghezze telomeriche dei campioni analizzati.

# Risultati

## Risultati delle analisi di laboratorio

### **Risultati dell'analisi tossicologica su sangue materno**

Sono stati determinati i seguenti congeneri di PCB: PCB 77, PCB 81, PCB 105, PCB 114, PCB 118, PCB 123, PCB 126, PCB 156, PCB 157, PCB 167, PCB 169 e PCB 189. La miscela di tali composti in *n*-esano, soluzione standard, è stata opportunamente diluita sempre con *n*-esano ed aggiunta al siero di soggetti non residenti in Campania, considerato come bianco, e per i quali era stata verificata, mediante analisi GC, la totale assenza di segnali interferenti con i composti in esame. Ciò ha consentito di ottenere curve di calibrazione nel range da 0.10 a 0.80 ng/mL. I congeneri PCB 30 e PCB 112 sono stati utilizzati come standard interni per la quantizzazione dei 12 PCB in esame. Il rapporto tra le aree di ciascun congenere PCB e l'area del PCB 112 è stato utilizzato per ottenere le curve di calibrazione, mediante analisi di regressione lineare. In tabella 1 sono riportati i valori dei coefficienti angolari e delle rispettive deviazioni standard, i valori delle intercette e delle rispettive deviazioni standard, il valore del coefficiente di correlazione ( $r$ ), l'errore standard ( $s$ ) ed il numero di osservazione ( $n$ ). Il limite di quantificazione (10 volte il rapporto segnale-rumore picchi) variava tra i PCB, ma è stato generalmente inferiore a 0.1 ng/mL per ciascun congenere ad eccezione del PCB 123 (0.2

ng/mL). Tali valori sono riportati nella seguente tabella.

Tabella 4.9

<b>Congenere PCB</b>	<b>Coefficiente angolare</b>	<b>Intercetta</b>	<b>r</b>	<b>s</b>	<b>N</b>	<b>Limite di quantizzazione ng/mL (LOQ)</b>
81	11921 (± 2236)	1712 (± 1059)	0.95	1187	5	0.05
77	8888 (± 1776)	1378 (± 841)	0.94	943	5	0.03
123	17769 (± 3247)	3234 (± 1588)	0.95	1724	5	0.2
118	17770 (± 3469)	3315 (± 1643)	0.94	1842	5	0.06
114	24228 (± 4709)	4412 (± 2231)	0.94	2501	5	0.11
105	23313 (± 4324)	4222 (± 2049)	0.95	2296	5	0.08
126	14681 (± 2920)	1708 (± 1383)	0.94	1550	5	0.07
167	21004 (± 3051)	3485 (± 1146)	0.96	1620	5	0.08
156	27067 (± 4249)	4704 (± 2013)	0.96	2256	5	0.04
157	26338 (± 4344)	4401 (± 2058)	0.96	2307	5	0.06
169	19017 (± 2608)	2306 (± 1235)	0.92	1384	5	0.05
189	31044 (± 5788)	5410 (± 2742)	0.95	3073	5	0.08

30	16171 (± 1012)	1230 (± 476)	0.99	840	6	0.05
112	24130 (± 874)	1383 (± 412)	0.99	726	6	0.04

In particolare per definire il limite di quantificazione occorre definire quello di rilevabilità. Il limite di rilevabilità (LOD) rappresenta il più piccolo segnale sul cromatogramma che si possa attribuire con certezza all'analita, ma di cui non sia possibile stimare la concentrazione. Il limite di quantizzazione (LOQ) rappresenta il più piccolo segnale relativo all'analita di cui si possa conoscere con certezza la concentrazione.

Inoltre il PCB 112 è stato utilizzato per calcolare la resa di estrazione dalla matrice biologica; la resa media della metodica è risultata essere del 89% con un valore minimo del 72% ed un valore massimo del 114%.

La precisione intra-day, effettuata su cinque sieri, ha mostrato un coefficiente di variazione del 3% (PCB 30) e del 6% (PCB 112), mentre quella inter-day ha riportato un coefficiente di variazione del 3.5% (PCB 30) e del 7.0% (PCB 112); ciò è servito a stabilire che il metodo fosse riproducibile.

Dei 12 diversi congeneri di PCB indagati, 10 (PCB 77, PCB 81, PCB 105, PCB 123, PCB 126, PCB 156, PCB 157, PCB 167, PCB 169 e PCB 189) sono stati esaminati nei 3 gruppi.

Nelle tabelle sottostanti sono riportate per i tre gruppi il numero e la percentuale di sieri con livello rilevabile di ciascun congenere di PCB, il valore medio, il valore minimo ed il valore massimo, la deviazione standard e il coefficiente di variazione (CV) ( $\sigma/\mu$ ) per i PCB riscontrati in più di un siero analizzato.

Per il primo gruppo (tabella 4.10) la presenza di PCB è stata riscontrata nel 73.3% dei sieri in esame; i congeneri 77, 81, 118, 123 non sono stati riscontrati in alcun siero.

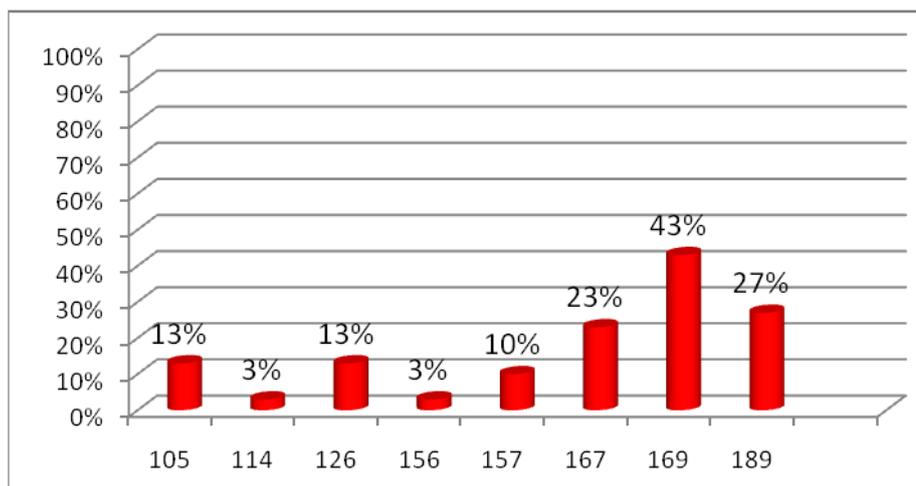
Dallo studio abbiamo ottenuto valori di PCB nel campione di pazienti analizzati, che non rientrano all'interno della gamma di valori osservati dalla letteratura internazionale (**ATSDR Agency for Toxic Substances and Disease Registry**). In particolare, il PCB 126 presenta la quantità media più elevata (45,46 ng/ml in un range da 7,74 ng/ml a 104,78 ng/ml), tenendo presente i valori di riferimento che corrispondono a 1 - 7.4 ng/ml.

Il congenere PCB più frequente è il 169 riscontrato dal 43% dei soggetti campionati;

Tabella 4.10 gruppo A: donne con feto malformato residenti in Campania

<b>Congeneri PCB</b>	<b>Numero di sieri con livello rilevabile</b>	<b>Percentuale di ciascun PCB nel totale dei soggetti campionati</b>	<b>Media ng/ml (<math>\mu</math>)</b>	<b>Deviazione standard (<math>\sigma</math>)</b>	<b>Min-Max ng/ml</b>	<b>Coefficiente di variazione (<math>\sigma / \mu</math>)</b>
105	4	13%	14,73	10,19	8,09-29,80	0,69
114	1	3%	0,02	0	0,02-0,02	-
126	4	13%	45,46	44,94	7,74-104,78	0,99
156	1	3%	3,80	0,00	3,80-3,80	-
157	3	10%	31,37	25,25	14,54-60,42	0,80
167	7	23%	23,56	30,80	0,93-89,64	1,31
169	13	43%	28,35	21,40	1,76-79,58	0,75
189	8	27%	24,78	30,56	2,52-82,15	1,23
<b>Totale</b>	<b>41</b>					

**Fig. 4.3**



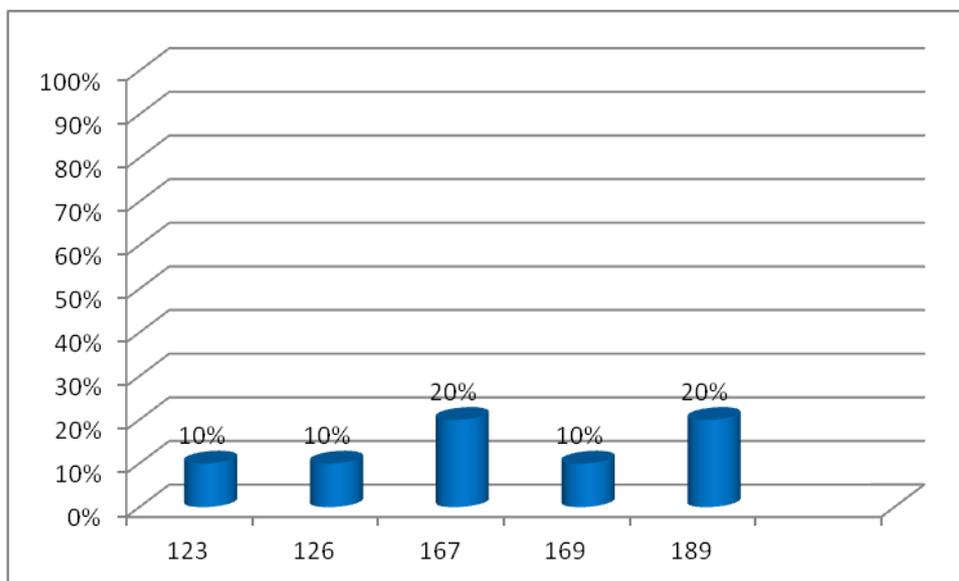
Per il secondo gruppo (gruppo B) (tabella 4.11) la presenza di PCB è stata riscontrata nel 40.0% dei sieri in esame; i congeneri 77, 81, 105, 114, 118, 156, 157 non sono stati riscontrati in alcun siero.

In questo caso i valori di PCB rientrano all'interno della gamma di valori osservati dalla letteratura internazionale (**ATSDR Agency for Toxic Substances and Disease Registry**). Il congener PCB 167 è quello che presenta una quantità media più elevata (69,73 ng/ml in un range da 14,93 ng/ml a 124,52 ng/ml).

I congeneri PCB più frequenti sono il 167 e il 189, rilevati sul 20% dei soggetti campionati;

Tabella 4.11 Gruppo B: pazienti cin feto malformato non residenti in Campania

Congeneri PCB	Numero di sieri con livello rilevabile	Percentuale di ciascun PCB nel totale dei sieri	Media ng/ml ( $\mu$ )	Deviazione standard ( $\sigma$ )	Min-Max ng/ml	Coefficiente di variazione ( $\sigma / \mu$ )
123	1	10%	1,94	0,00	1,94-1,94	0
126	1	10%	38,62	0,00	38,62-38,62	0
167	2	20%	69,73	77,49	14,93-124,52	1,11
169	1	10%	9,94	0,00	9,93-9,93	0
189	2	20%	0,53	0,72	0,53-0,72	1,36
<b>Totale</b>	<b>7</b>					



**Fig. 4.4**

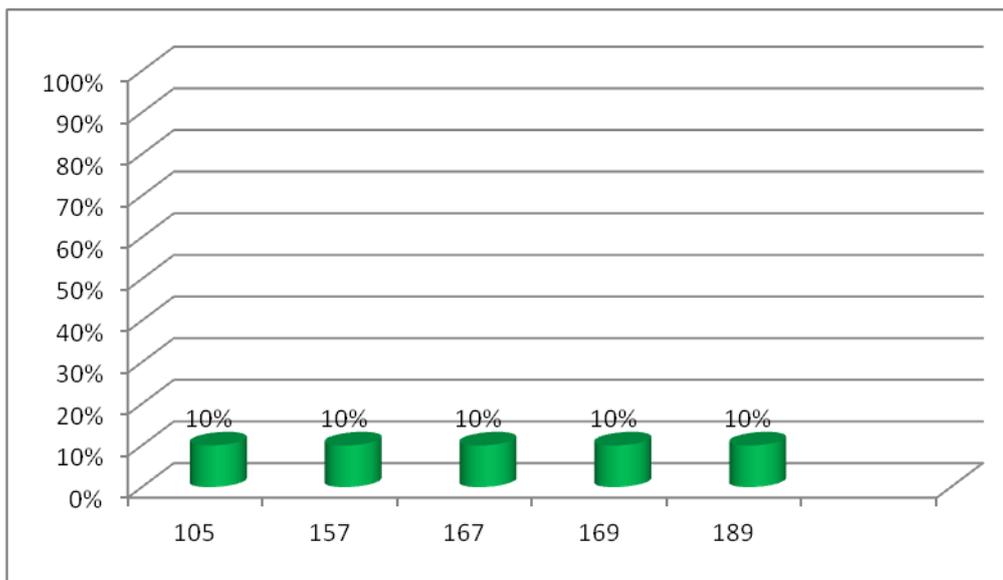
Per il terzo gruppo (gruppo C) (tabella 4.12) la presenza di PCB è stata riscontrata nel 30.0% dei sieri in esame; i congeneri 77, 81, 114, 118, 126, 156 non sono stati riscontrati in alcun siero.

Anche in questo caso i valori di PCB rientrano all'interno della gamma di valori osservati dalla letteratura internazionale (**ATSDR Agency for Toxic Substances and Disease Registry**). Il congenere PCB 157 è quello con la quantità media più elevata (0,75 ng/ml).

Non è stato registrato alcun congenere PCB più frequente in quanto ciascuna tipologia è stata rilevata in un solo siero.

Tabella 4.12 Gruppo C: Donne gravide con feto normoformato

<b>Congenere PCB</b>	<b>Numero di sieri con livello rilevabile</b>	<b>Percentuale di ciascun PCB nel totale dei sieri</b>	<b>Media ng/ml (<math>\mu</math>)</b>	<b>Deviazione standard (<math>\sigma</math>)</b>	<b>Min-Max ng/ml</b>	<b>Coefficiente di variazione (<math>\sigma/\mu</math>)</b>
105	1	10%	0,74	0	0,74-0,74	0
157	1	10%	0,75	0	0,75-0,75	0
167	1	10%	0,17	0	0,17-0,17	0
169	1	10%	0,54	0	0,54-0,54	0
189	1	10%	0,04	0	0,04-0,04	0
<b>Totale</b>	<b>5</b>					



**Fig.4.5**

Per verificare se il numero di sieri con livello rilevabile di congeneri è statisticamente diverso per i due gruppi (A-B), è stato utilizzato il test t sul confronto tra medie che non ha riscontrato alcuna differenza significativa ( $p > 0,05$ ).

Tabella 4.13

<b>Congener PCB</b>	<b>% PCB gruppo A</b>	<b>% PCB gruppo B</b>	<b>% PCB gruppo C</b>
105	13%		10%
114	3%		
123		10%	
126	13%	10%	
156	3%		
157	10%		10%
167	23%	20%	10%

169	43%	10%	10%
189	27%	20%	10%

E' stato applicato il test z sul confronto tra proporzioni per verificare se esiste una differenza statisticamente significativa tra le percentuali di ogni PCB rilevato nel gruppo dei residenti nella zona a rischio e quelli della zona non a rischio (in quest'ultimo caso sono stati accorpati i campioni del gruppo B e C). Solo per il congenere 169 la differenza è risultata significativa ( $p < 0,05$ ).

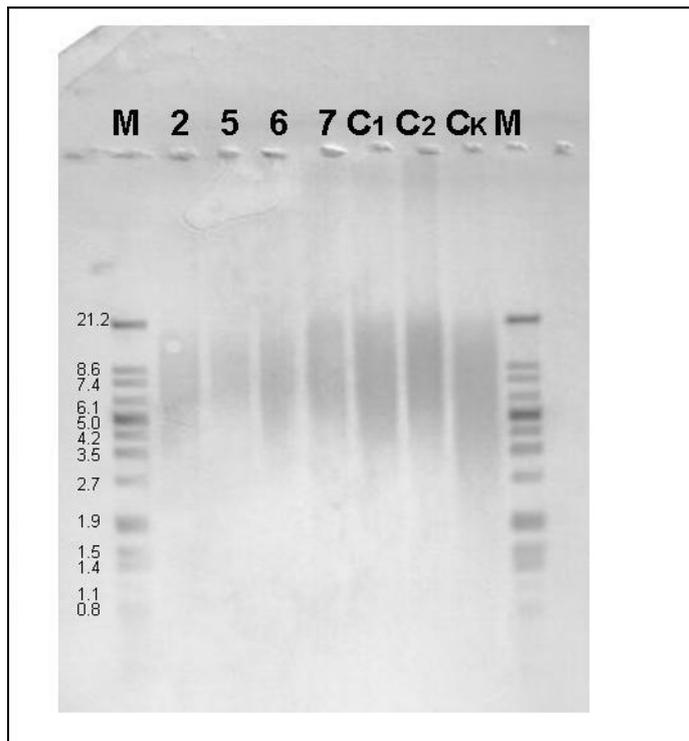
Dei PCB presi in esame, sette in particolare (PCB 105, PCB 126, PCB 167, PCB 156, PCB 157, PCB 169, PCB 189) hanno contribuito a circa il 75% del totale di PCB, suggerendo che solo questi congeneri, o eventualmente solo alcuni di essi, potrebbero essere utilizzati come indicatori dell'inquinamento ambientale.

Tabella 4.14

<b>Congeneri di PCB</b>	81	77	123	118	114	105	126	167	156	157	169	189	30	112
<b>Tempo di ritenzione assoluto (minuti)</b>	57.31	58.32	60.33	60.70	61.71	63.20	66.45	68.19	70.36	70.82	74.00	77.43	36.89	56.98
<b>Tempo di ritenzione relativo (minuti)</b>	1.55	1.58	1.64	1.65	1.67	1.71	1.80	1.85	1.91	1.92	2.01	2.10	1.00	1.54

## Risultati delle analisi genetica

### *a. Risultati dell'analisi di Southern Blot per la valutazione della lunghezza telomerica di pazienti provenienti dal triangolo della morte e controlli*



**Fig. 4.6**

(M) Marcatore di peso molecolare;

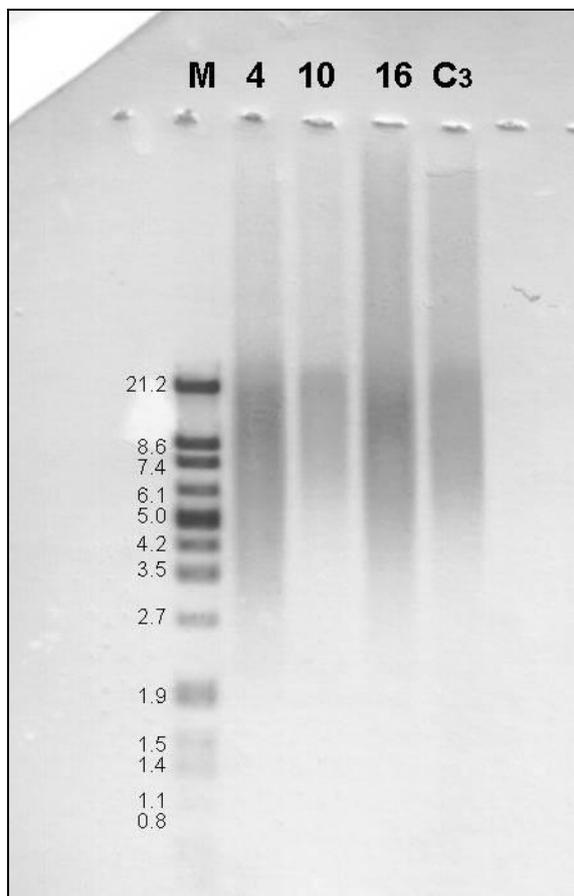
(2, 5, 6, 7) Campioni di pazienti provenienti dal “Triangolo della morte”;

(C1, C2) Campioni di controllo;

(Ck) Controllo del kit.

La lunghezza dei frammenti di restrizione terminali è stata determinata mediante analisi di Southern blot e successiva analisi densitometrica. Quantità equivalenti di DNA genomico sono state caricate in ciascuna lane. Sono rappresentati i risultati ottenuti su 4/30 campioni di pazienti provenienti dalla regione del “Triangolo della morte” e 2/10 campioni di controllo.

*b. Risultati dell'analisi di Southern Blot per la valutazione della lunghezza telomerica di pazienti non provenienti dal triangolo della morte e controllo*



**Fig.4.7**

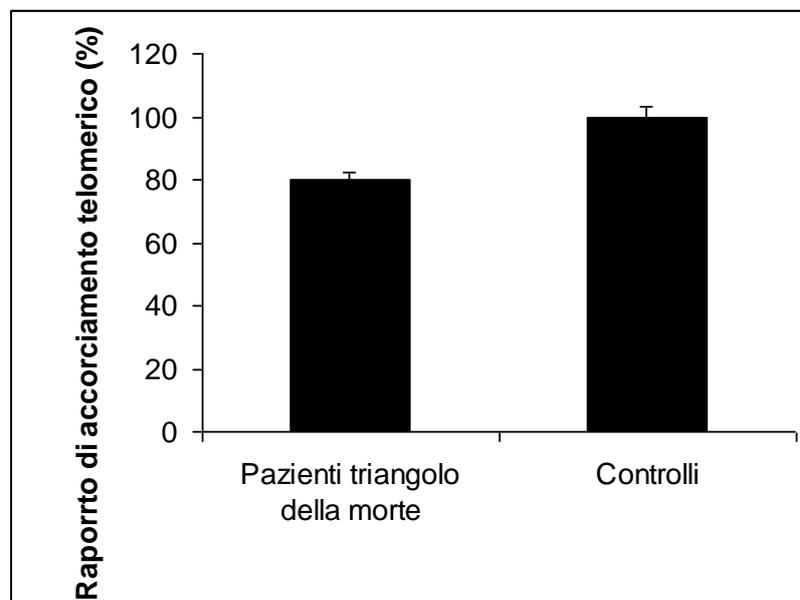
(M) Marcatore di peso molecolare;

(4, 10, 16) Campioni di pazienti non provenienti dal “Triangolo della morte”;

(C3) Campione di controllo;

La lunghezza dei frammenti di restrizione terminali è stata determinata mediante analisi di Southern blot e successiva analisi densitometrica. Quantità equivalenti di DNA genomico sono state caricate in ciascuna lane. Sono rappresentati i risultati ottenuti su 3/10 campioni di pazienti provenienti da zone non inquinate e 1/10 campioni di controllo.

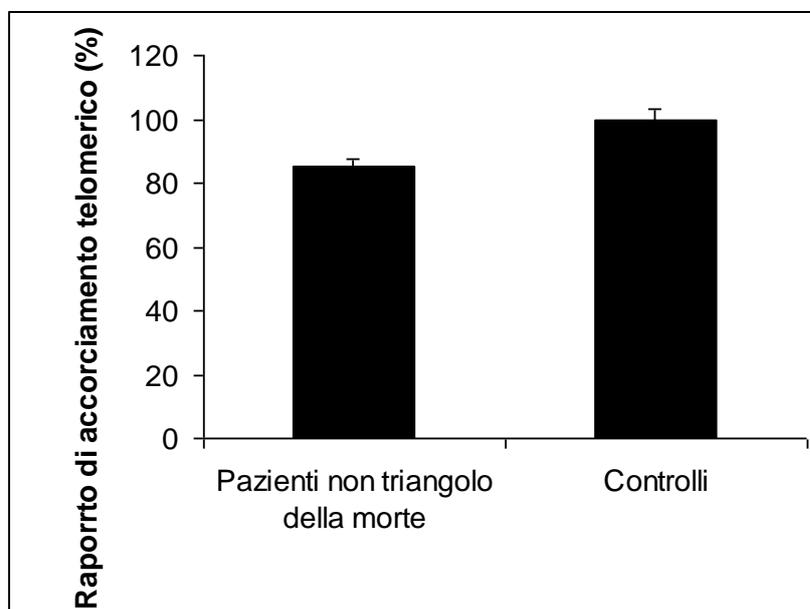
*c. Stima quantitativa del tasso di accorciamento telomerico (%) dal confronto tra pazienti residenti nel triangolo della morte e controlli.*



**Fig. 4.8**

Tasso dell'accorciamento telomerico nei campioni delle pazienti e nei controlli. I dati rappresentano le medie ( $\pm$  SD) delle lunghezze telomeriche di 30 pazienti residenti nella zona del "Triangolo della morte" e 10 controlli.

*d. Stima quantitativa del tasso di accorciamento telomerico (%) dal confronto tra pazienti non residenti nel triangolo della morte e controlli.*



**Fig. 4.9**

Tasso dell'accorciamento telomerico nei campioni delle pazienti e nei controlli. I dati rappresentano le medie ( $\pm$  SD) delle lunghezze telomeriche di 10 pazienti non residenti nella zona del "Triangolo della morte" e 10 controlli.

Dai dati ottenuti emerge che:

1. Non c'è accorciamento dei telomeri nelle donne gravide con feti sani residenti in territori non inquinati;
2. C'è un estremo accorciamento dei telomeri (~20%) nelle donne gravide con feti malformati residenti nel "Triangolo della morte";
3. C'è un minimo accorciamento dei telomeri nelle donne gravide con feti malformati residenti in territori non inquinati;

## **DISCUSSIONE E CONCLUSIONI**

Il presente studio offre numerosi spunti di considerazioni, in virtù dell'analisi dei vari bracci che abbiamo condotto analizzando dai singoli punti di vista (clinico, sierologico e genetico) i dati in nostro possesso.

Ne sono derivate, altresì, conclusioni di natura anche socio-politica: esse sono ripartibili in due ordini di considerazioni, rispettivamente preventivo e prospettico.

## **5.1 Aspetti socio-politici**

Dal punto di vista prospettico, il presente studio ha consentito di riconoscere quelli che sono i punti deboli della pianificazione socio-sanitarie nella gestione delle problematiche relative all'impatto dell'inquinamento ambientale sulla salute umana.

Deriva da queste considerazioni il forte richiamo alle autorità politiche e sanitarie per un'implementazione dei rilievi epidemiologici in oggetto, che, pur naturalmente scontrandosi con le ben note carenze di risorse economiche ed umane, potrebbe invece dimostrarsi un formidabile volano persino di risparmio economico, laddove si riuscisse ad eliminare le cause delle patologie piuttosto che limitarsi a curarle.

Il nostro studio consente pertanto di richiamare le seguenti iniziative:

1. Precisa localizzazione dei territori effettivamente esposti ad inquinanti ambientali
2. Elaborazione di rilevatori epidemiologici relativi allo stato di salute dei cittadini ivi residenti
3. Rigoroso monitoraggio degli effetti addebitabili all'esposizione inquinante, sia a carico dei nati, sia a carico dei non nati
4. Rigoroso controllo nosografico delle malformazioni riscontrabili sui feti e sugli embrioni, sia nati sia non nati.

5. Ristrutturazione dei test statistici relativi alle malformazioni fetali

6. Istituzione di links organizzativo-telematici con altri territori nazionali ed internazionali che presentano i medesimi trends sulla riproduzione umana

Dal punto di vista preventivo, infatti, emerge senza alcun dubbio che l'offerta di servizi di natura psico-medica costituisce un importante fattore di assicurazione sociale nel contesto di quelle popolazioni che maggiormente avvertono il rischio di minacce alla propria salute, non solo riproduttiva. Tale considerazione è ricavabile dalla evidenza del raggiungimento di un equilibrio psicologico nelle pazienti che si erano rivolte al nostro Centro in virtù della convenzione con l'Ente Provincia. Esse hanno potuto ritrovare l'atteso riscontro alle proprie preoccupazioni, nelle prestazioni erogate a titolo gratuito per effettuare i vari livelli di diagnosi prenatale possibili (visita specialistica, ecografia di base, ecografia strutturale, cordocentesi, amniocentesi, villocentesi).

Si è così raggiunta la dimostrazione che il livello politico-amministrativo può nei fatti interfacciarsi con i cittadini, manifestando comprensione per i loro bisogni e impegno nei confronti delle necessità emergenti, anche quando queste consistano nel solo stadio di ansia "sociale", non supportata da validazioni scientifiche.

Si conferma, cioè, la petizione che la letteratura scientifica e la pratica politica suggeriscono in merito alla opportunità di assecondare le richieste della popolazione, quando si è in presenza di minacce avvertite come di estremo allarme e alle quali non si riesce a contrapporre nella immediatezza una efficace contromisura di natura politico-amministrativa.

L'intera vicenda dei rifiuti napoletani ha visto infatti, nelle sua scansione temporale, il progressivo passaggio da alti livelli di tensione sociale ad uno stadio di allerta che, pur non del tutto sedato, ha trovato una qualche mitigazione sia nelle misure politico-amministrative disposte dal governo centrale e dalle strutture politiche locali (commissariato straordinario ed amministrazione regionale, provinciali e comunali) sia nella evidenza scientifica e clinica della assenza di ripercussioni attualmente evidenti sulla salute riproduttiva, anche in base all'offerta dei servizi resi dalle strutture sanitarie e di programmi clinico-epidemiologici come il nostro.

Ciò non ci esima, però, dal sottolineare che a nostro avviso i dati necessitano delle succitate modifiche nella modalità di raccolta e classificazione per potersi considerare completamente attendibili.

Infine, come meglio verrà specificato più avanti, è necessario rimarcare che talune suggestioni chimico-laboratoriche ricavabili dal presente studio potranno ritrovare in un prossimo tempo

riscontri ben più rilevanti sia nel passaggio delle ricerche dalle cavie all'uomo, sia nel riscontro delle effettive ripercussioni, ad esempio, delle modifiche telomeriche sulla qualità e sulla durata dell sopravvivenza umana.

## **5.2 Aspetti genetici**

Uno degli aspetti maggiormente incoraggianti derivato dal presente studio è certamente riferibile al braccio relativo allo studio dei telomeri nel siero delle madri di feti malformati, residenti nei territori maggiormente esposti all'inquinamento ambientale.

Come risulta infatti dall'analisi statistica riportata nei precedenti paragrafi, non vi è dubbio che l'accorciamento estremo dei telomeri materni si accompagna alla presenza di malformazioni fetali nelle gravidanze insorte nei territori del triangolo della morte. Ciò non avviene nelle madri di feti sani ed avviene in misura molto ridotta nei feti malformati di zone non a rischio.

Trattasi di un dato molto stimolante, che, con la necessaria cautela, merita di essere maggiormente approfondito soprattutto nelle prospettive di seguito indicate:

1. Incremento del numero dei casi studiati sia nelle zone a rischio sia al di fuori di esse

2. Precisa attribuzione dei diversi gradi di accorciamento telomerico ai singoli quadri di malformazione fetale
3. Rigorosa comparazione tra i livelli dei vari congeneri di PCB con le singole riduzioni telomeriche
4. Continuo controllo della letterature internazionale in merito al significato clinico effettivo delle modifiche telomeriche.

Risulta evidente che se verrà ulteriormente confermata la nostra ipotesi di correlazione tra inquinamento ambientale, modifiche telomeriche materne e malformazioni fetali, si renderanno possibili interventi sia di natura preventiva sia di natura socio-politico-amministrativa per la tutela delle popolazioni in età feconda residenti nelle zone esposte al rischio.

### **5.3 Diossina e congeneri di PCB**

Il presente studio ha riscontrato, nell'ambito del braccio dedicato allo studio della diossina, dati incoraggianti ma non definitivi sull'effettiva presenza nei liquidi biologici umani di alcuni congeneri di PCB. In particolare l'elevata percentuale di pazienti portatrici di livelli eccessivi del congenere 169 indica che effettivamente nelle zone a rischio esiste il fondato rischio di assumere elementi inquinanti dall'ambiente nell'organismo umano.

Pur essendo necessario riconoscere che importanti esperienze internazionali relative all'esposizione delle popolazioni alla diossina non hanno consentito di ottenere risultati omogenei in merito all'effettivo impatto della diossina sulla salute riproduttiva, i dati relativi al nostro studio tracciano una pista attraente per un approfondimento di questi aspetti.

In definitiva, non è ancora possibile raggiungere una univocità di interpretazione dalla ampia messe di dati ricavabili dai vari bracci del presente studio. Però, per quanto i nostri risultati necessitano di un più ampio inquadramento epidemiologico e laboratoristico di cui attualmente nemmeno la letteratura è in grado di fornire il necessario supporto, è pur vero che sussistono varie prove "parziali" che collegano l'inquinamento ambientale a ripercussioni sulla riproduzione animale ed umana. Ne deriva un severo monito ad inquadrare le singole evidenze sperimentali in un più ampio contesto scientifico, che debba, però, mantenere nella debita considerazione i molteplici fattori che interferiscono sulla riproduzione umana in concomitanza con gli effetti dell'inquinamento. Risulta comunque accertato che gli inquinanti ambientali rivestono in ogni caso la funzione di "endocrine disruptor" e cioè di fattori capaci di interagire a vari livelli ed in varie epoche sullo sviluppo umano.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] Gilli G. et al. “ *Inquinamento atmosferico e salute – un documento di approfondimento sui temi della qualità dell’aria e delle implicazioni sulla salute.*” Provincia di Torino, 2008
- [2] *Salute e rifiuti in Campania.* Commissariato di Governo per l’emergenza rifiuti in Campania, Giugno 2008
- [3] Punziano L. G. *Salute e discariche: lo stato attuale delle conoscenze.* Sicurezza e Igiene, Maggio 2008
- [4] Cerioni M. *Veleni in circolo.* La nuova Ecologia, Marzo, 2005
- [5] K. B., Thomas, T. Colborn, *Organochlorine endocrine disruptors in human tissue. In Chemically - induced alteration in sexual and functional development: the wildlife/human connection.* Princeton Scientific Publishing Co., Inc. 1992, pp.365-394
- [6] Denison M. et al. *Ah receptor for 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin.* J Biochem Toxicol, Feb, 1986
- [7] Perdew A. et al. *Reconstitution of the multiprotein complex of pp60src, hsp90, and p50 in a cell-free system.* [J Biol Chem.](#), Dec, 1992
- [8] [Dolwick G. et al.](#) *Cloning and expression of a human Ah receptor cDNA.* [Mol Pharmacol.](#), Dec, [1993](#)

- [9] [Hoffman L. et al.](#) *Cloning of a factor required for activity of the Ah (dioxin) receptor.* Science, Sept, [1991](#)
- [10] [Withlock B. et al.](#) *2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin induces cytochrome P450IA1 enzyme activity by activating transcription of the corresponding gene.* [Adv Enzyme Regul.](#), May, [1990](#)
- [11] [Goldstein F. et al.](#) *Hepatic porphyria induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in the mouse.* [Res Commun Chem Pathol Pharmacol.](#) Dec, [1973](#)
- [12] [Poland & Glover.](#) *2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin: a potent inducer of -aminolevulinic acid synthetase.* Science, Apr, [1973](#)
- [13] [Thunberg T. et al.](#) *Effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on the hepatic storage of retinol in rats with different dietary supplies of vitamin A (retinol).* [Arch Toxicol.](#), Nov; [1980](#)
- [14] [Fuchs & Green.](#) *Regulation of terminal differentiation of cultured human keratinocytes by vitamin A.* Cells, [Apr, 1981](#)
- [15] [Olson & Gunning.](#) *The storage form of vitamin A in rat liver cells.* J Nutr., Aug, [1983](#)
- [16] [Poland & Knutson.](#) *2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: examination of the*

*mechanism of toxicity.* Annu Rev Pharmacol Toxicol., Dec; 1982

[17] Kimbrough R.D. et al. *Human exposure to polychlorinated biphenyls and health effects: a critical synopsis.* *Toxicol Rev.*, June, 2003

[18] Allsopp G. et al. *Incineration and Human Health: State of Knowledge of the Impacts of Waste Incinerators on Human Health.* National Research Council. January, 2000

[19] [Herxhaimer H.](#) *Chloracne.* *Munchener Med. Wochenschr.*, Sept, 1899

[20] [Bauer M. et al.](#) *Occupational poisoning in the manufacture of chlorophenol compounds.* *Arch. Gewerbepathol.* Feb, 1961

[21] Zambon et al. *Rischio di sarcoma in rapporto all'esposizione ambientale a diossine emesse dagli inceneritori: studio caso controllo nella provincia di Venezia.* *Registro tumori del Veneto.* 2006

[22] Kociba N. et al. *Results of a two-year chronic toxicity and oncogenicity study of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin.* [Toxicol Appl Pharmacol.](#) May, 1978

[23] Maronpot P. et al. *Dose response for TCDD promotion of hepatocarcinogenesis in rats initiated with DEN: histologic,*

*biochemical, and cell proliferation end points.* Environ. Hlth. Perspect June, 1993

[24] U.S.E.P.A. Environmental Protection Agency. *Health assessment document for 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and related compounds.* Oct, 1994

[25] Egeland, M.G. et al. *Total serum testosterone and gonadotropins in workers exposed to dioxin.* American Journal of Epidemiology. Dec, 1994

[26] Baldi et al. *Interazioni geni-ambiente nel determinismo della sterilità.* Atti Società Italiana di Ginecologia e Ostetricia. Vol LXXXIII. 2007

[27] Cobellis et al. *Endometriosi, inquinamento ambientale e disruptors endocrini.* Atti Società Italiana di Ginecologia e Ostetricia. Vol LXXXIII. 2007

[28] USAF. *Veterans and dioxin exposure.* Dec, 1996

[29] Tusscher T. et al. *Open chemical combustions resulting in a local increased incidence of orofacial clefts.* Chemosphere. Oct, 2000

[30] Lloyd P. et al. *Toxicity from ragwort and fat cow syndrome, or from industrial chemicals: the value of epidemiological analysis for interpreting clinico-pathological findings.* Science of the Total Environment. Feb, 1988

- [31] Van Larabeke. *Health effects of a household waste incinerator near Wilrijk, Belgium*. Health impacts of waste management policies. May, 2000
- [32] Senior K, Mazza A. *Italian "Triangle of death" linked to waste crisis*. Lancet Oncol. 2004 Sep;5 (9):525-527
- [33] Istituto Superiore della Sanità. *Valutazione del rischio sanitario e ambientale nello smaltimento di rifiuti urbani e pericolosi*. Rapporti ISTISAN 2004; 04(05)
- [34] Altavista P. *Mortalità per causa in un'area della Campania con numerose discariche di rifiuti*. Epidemiologia & Prevenzione, 28 (6) 2004 Nov-Dec; 311-321.
- [35] AA.VV. *"Trattamento dei rifiuti in Campania: impatto sulla salute umana"* Rapporto OMS-ISS-CNR-Legambiente, 2005
- [36] Bianchi F. et al. *Italian "Triangle of death"*. The Lancet Oncology, 2004 Dec; 5:710
- [37] Terracini B. *Discariche, Triangoli e aree calde*. Epidemiologia & Prevenzione, 2004 Nov-Dec; 6: 299-300.
- [38] Colombo C. et al. *"La calda estate campana non è ancora finita"* Epidem. E Preven 28 (6) Nov-Dic 2004: 303-306
- [39] Oeseburg H. et al. *"Telomere biology in healthy aging and disease"* Eur J Physiol (2010) 459:259–268

- [40] David L. Keefe et al. “*Telomere length predicts embryo fragmentation after in vitro fertilization in women-Toward a telomere theory of reproductive aging in women*” American Journal of Obstetrics and Gynecology (2005) 192, 1256–61
- [41] Lin Liu et al. “*Telomerase deficiency impairs differentiation of mesenchymal stem cells*” Experimental Cell Research 294 (2004) 1–8
- [42] D. L. Keefe et al. “*Telomeres and aging-related meiotic dysfunction in women*” Cell. Mol. Life Sci. 64 (2007) 139–143
- [43] Lin Li et al. “*Irregular telomeres impair meiotic synapsis and recombination in mice*” PNAS April 2004, 101 (17) 6496–6501
- [44] Junjiu Huang et al. “*Telomere susceptibility to cigarette smoke-induced oxidative damage and chromosomal instability of mouse embryos in vitro*” Free Radical Biology & Medicine 48 (2010) 1663–1676
- [45] Hoxha et al. “*Association between leukocyte telomere shortening and exposure to traffic pollution: a cross-sectional study on traffic officers and indoor office workers*” Env. Health 2009, 8:41 1-9
- [46] Silberstein T. et al. “*Lead concentrates in ovarian follicle compromises pregnancy*” Journal of Trace Elements in Medicine and Biology 20 (2006) 205–207

[47] Silberstein T. et al. “*Trace element concentrations in follicular fluid of small follicles differ from those in blood serum, and may represent long-term exposure*” *Fertility and Sterility* 91 (5), May 2009 1771-1774

[48] Ellen W. Demerath et al. “*Telomeres and Telomerase in the Fetal Origins of Cardiovascular Disease: A Review*” *Hum Biol.* 2004 February ; 76(1): 127–146.

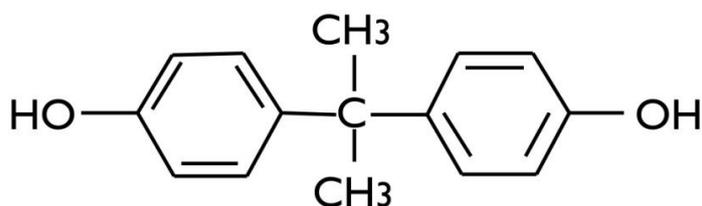
[49] Aedín Cassidy et al. “*Associations between diet, lifestyle factors, and telomere length in Women*” *Am J Clin Nutr* 2010;91:1273–80

## PRIMA LINEA DI RICERCA - CAPITOLO II

### *BISFENOLO A E MALFORMAZIONI CONGENITE FETALI*

#### **Introduzione**

Attualmente, una crescente attenzione della comunità scientifica si sta rivolgendo verso la correlazione esistente tra lo sviluppo di malformazioni e l'ambiente qualitativamente modificato da xenobiotici ed in particolar modo verso l'interferente endocrino Bisfenolo A (BPA) (**Figura 6**).



**Figura 6. Struttura chimica del BPA.**

Il BPA è un composto organico ubiquitario, fondamentale nella sintesi di materie plastiche (policarbonati e resine epossidiche) ed additivi plastici, la cui produzione è diffusa in tutto il mondo [**Vandenberg et al. 2010**]. Il policarbonato ha numerose applicazioni, tra cui la produzione di: bottiglie, stoviglie, biberon, compact disc, carta utilizzata in alcune ricevute di acquisto, etichette autoadesive, carta de fax e sigillanti dentali. [**European-Union Updated European Risk Assessment Report, 2008; Lopez-Espinosa MJ et al. 2007**]. Le plastiche contenenti BPA sono contrassegnate con i simboli del riciclo “3” o “7” (**Figura 7**).



**Figura 7. Plastiche contenenti BPA.**

Le resine epossidiche, invece, sono usate come rivestimenti interni dei prodotti in metallo (ad esempio, lattine per alimenti e bevande) e nelle tubazioni idriche. Nonostante la diffusione del composto, si ritiene, che l'esposizione dell'uomo, avvenga principalmente attraverso la fonte alimentare [Wilson NK et al. 2006] mediante la contaminazione di bevande contenute in bottiglie in policarbonato, nonché attraverso lattine per alimenti e bibite, rivestite internamente con resine epossidiche [Kang J et al. 2006], in seguito a fenomeni di “migrazione” di monomeri di BPA non legati [Hoekstra & Simoneau 2013]. Infatti, il contatto prolungato tra il contenitore in plastica (contenente BPA) con cibi acidi o basici oppure anche l'esposizione alle alte temperature (in particolar modo il riscaldamento nel forno a microonde) favorirebbero il fenomeno di migrazione [Welshons 2006; Le et al. 2006].

L'interpretazione dei dati di biomonitoraggio del bisfenolo A è utile per capire i processi con cui il corpo metabolizza il composto, una volta che si verifica l'esposizione, e per determinare se il questo costituisce un rischio potenziale per la riproduzione e lo sviluppo umano.

Nell'organismo, il BPA può essere rinvenuto in due forme:

- il BPA libero, vale a dire la quota con attività endocrino-simile. Non viene convertito in metaboliti inattivi, ma lega le proteine plasmatiche ed interferisce con diversi processi biologici;

- il BPA coniugato, privo di attività xeno-ormonale.

Studi sulla farmacocinetica del BPA [**Matsumoto et al. 2002; Domoradzki et al. 2004**] hanno evidenziato che la metabolizzazione del BPA avviene principalmente attraverso la glucuronosiltransferasi epatica (GT), con la formazione del BPA-glucuronidato, idrosolubile e, dunque, eliminato per via renale. In minor percentuale, la metabolizzazione avviene ad opera di una sulfottransferasi, con la formazione di BPA-solfato. I due metaboliti, BPA-glucuronidato e BPA-solfato, non interferiscono con i processi biologici dell'organismo.

I risultati di Matsumoto et al. hanno evidenziato come l'attività della GT sia età-dipendente ed, in particolare, molto più bassa in età fetale e neonatale [**Matsumoto J et al 2002**]. Al contrario, nella vita fetale e neonatale, la principale via di metabolizzazione del BPA sembrerebbe essere quella della solfatazione [**Chapin RE et al. 2008**]; di fatti, un certo numero di enzimi coinvolti nel metabolismo del BPA a BPA-solfato, sono noti e hanno dimostrato di essere attivi già durante la vita intrauterina [**Suiko et al. 2000; Hines 2008**].

Il bisfenolo A può essere rilevato: nel sangue delle donne in gravidanza, nonché nel liquido amniotico nel tessuto placentare e nel sangue del cordone ombelicale, per ottenere un indice del grado di esposizione fetale all'IE [**Padmanabhan V et al 2008; Engel SM et al 2006; Kuroda N et al 2003**].

Grazie alle proprietà estrogeno-simili del composto, che mima l'ormone  $17\beta$ -estradiolo, il bisfenolo A, lega i recettori estrogenici ( $ER\alpha$  ed  $ER\beta$ ), innescando pathway atipici di attivazione. Tuttavia la National Toxicology Program - U.S. Department of Health and Human Services, ritiene opportuno non considerare gli

effetti biologici del bisfenolo A, riferiti solo esclusivamente al legame con i recettori estrogenici  $\alpha$  e  $\beta$  [Shelby 2008]. Un numero crescente di studi in vitro, infatti, suggerisce che attribuire al bisfenolo A unicamente il classico meccanismo d'azione estrogenica, sarebbe troppo semplicistico.

Oltre a legarsi ai recettori degli estrogeni nucleari ER $\alpha$  ed ER $\beta$  il bisfenolo A ha la capacità di interagire con:

- i recettori estrogenici di membrana: “non classical membrane estrogen receptor” (ncmER) [Nadal et al. 2004; Alonso-Magdalena et al. 2005];
- un recettore per estrogeni a sette domini transmembrana (GPR30) [Thomas P et al. 2006];
- un recettore nucleare orfano, chiamato “estrogen-related receptor- $\gamma$ ” (ERR- $\gamma$ ) [Matsushima et al. 2007; Abad et al. 2008];
- il recettore arilico (AhR) [Bonefeld-Jorgensen et al. 2007; Kruger et al. 2008];
- il recettore degli androgeni, fungendo da antagonista [Bonefeld-Jorgensen EC et al. 2007; Paris F et al. 2002]. In più, attraverso l'interazione con una forma mutata del recettore degli androgeni, ha azione mitogena su una linea cellulare del carcinoma prostatico umano [Wetherill et al. 2002];
- recettori degli ormoni tiroidei (TR) [Moriyama et al. 2002];

Infine, il BPA è in grado di inibire l'attività dell'aromatasi, enzima che converte il testosterone in estradiolo [Benachour et al. 2007].

Le conseguenze delle suddette azioni del BPA sono, tuttavia, poco chiare [Shelby 2008]. In alcuni casi, infatti, il ruolo fisiologico del recettore è sconosciuto o non ben caratterizzato (ad esempio nel caso dell'ERR- $\gamma$  e del GPR30); in altri, invece, l'affinità di legame del bisfenolo per il recettore è sufficientemente bassa che ci si

aspetterebbe nessuna, se non minima, influenza sui processi biologici in vivo. Tuttavia, anche quando gli effetti fisiologici sono generalmente compresi, ad esempio nel caso dell'interazione con l'Androgen Receptor o l'inibizione dell'aromatasi, gli scienziati possono solo speculare sul possibile impatto nel vivo, in quanto dovrebbero essere considerati nell'insieme: recettori multipli ed altre interazioni cellulari [Shelby 2008].

La figura mostra, nel complesso, gli effetti sulla salute indotti dal BPA (**Figura 8**).

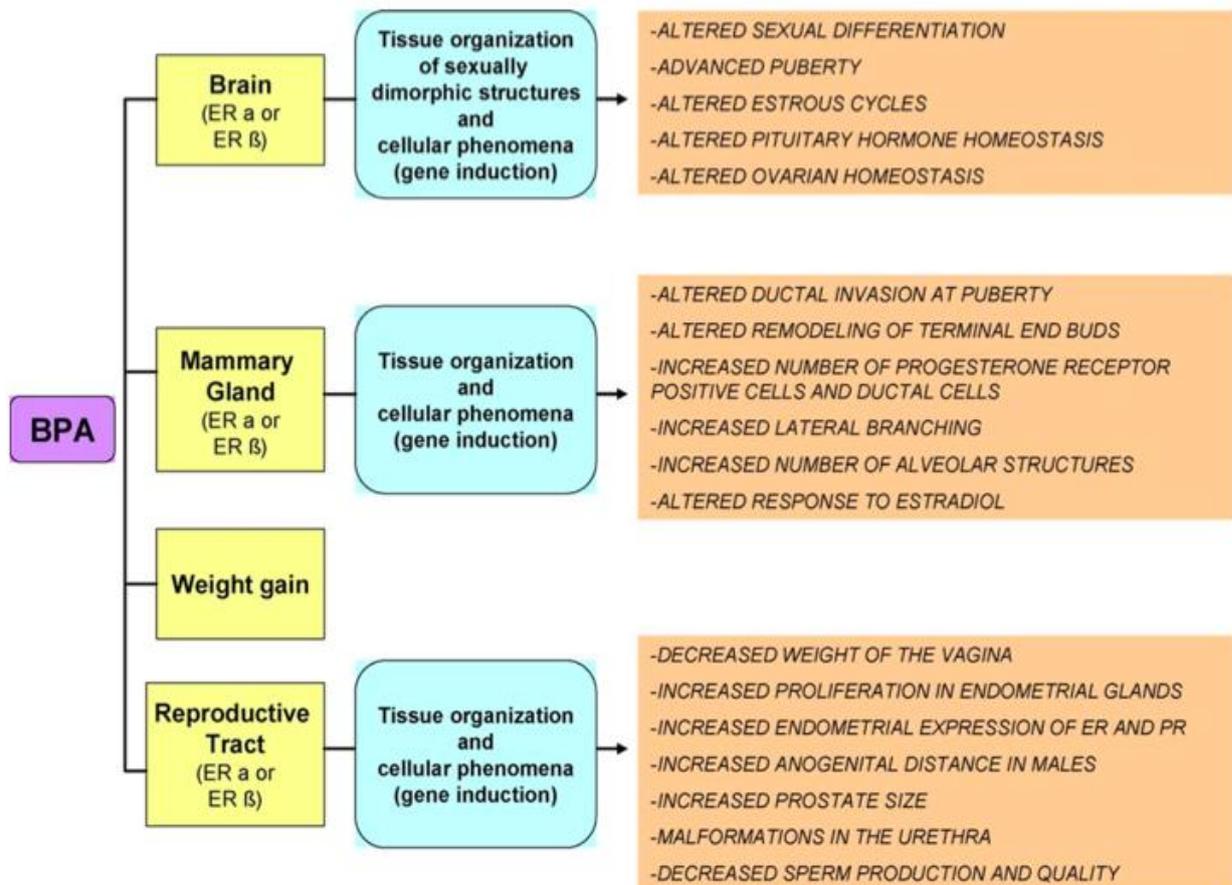


**Figura 8. Effetti sulla salute del BPA (da: Chouhan et al. 2013).**

### **Ruolo del Bisfenolo A nella genesi delle malformazioni: stato dell'arte**

Già durante la vita intrauterina, il feto subisce indirettamente gli effetti dell'esposizione materna al bisfenolo A; infatti livelli elevati di BPA sono stati riscontrati sia nel tessuto placentare, che nel plasma materno e fetale [Vandenberg et al. 2007]. Molti apparati dell'organismo subiscono, quindi, nel corso del loro

sviluppo, l'*interferenza* di questo xenoestrogeno. La figura 9 riassume alcuni dei principali effetti dell'esposizione prenatale al BPA e gli ipotizzati meccanismi sottostanti (**Figura 9**).



**Figura 9. Effetti dell'esposizione prenatale al BPA e meccanismi sottostanti (da: Maffini et al. 2006).**

La maggior parte delle informazioni sul ruolo del BPA nella genesi delle malformazioni deriva da studi effettuati su modelli animali, ma i risultati a riguardo sono ancora frammentari e contrastanti. Una chiara influenza del BPA sui processi di sviluppo si è dedotta da studi effettuati su topi di laboratorio sottoposti a dosi elevate

di bisfenolo A durante la gravidanza. L'esposizione al BPA si è mostrata capace di ridurre:

- la sopravvivenza embrio-fetale [**Morrissey et al. 1987; Tyl et al. 2002; NTP 1985**];
- il peso alla nascita;
- la crescita della prole nei primi anni di vita [**Morrissey et al. 1987; Tyl et al. 2002; Tyl et al. 2008**].

In aggiunta a questi effetti “*high dose*” sulla sopravvivenza e la crescita, altri studi hanno evidenziato una varietà di effetti indotti da dosi molto inferiori di BPA, che riproducono al meglio quella che è l'effettiva esposizione umana. Tra gli effetti avversi indotti dalla “*low dose*” di BPA ricordiamo:

- alterazioni neuronali e comportamentali [**Ryan et al. 2006; Della Seta et al. 2006; Negishi et al. 2004**];
- lesioni potenzialmente precancerose della prostata e della ghiandola mammaria [**Murray et al. 2007**];
- patologia malformativa delle vie urinarie maschili (aumentata distanza anogenitale) [**Gupta 2000; Timms et al. 2005**] e della vagina [**Markey et al. 2005**].

In contrasto con gli effetti dannosi indotti da dosi elevate di bisfenolo A, vi è controversia circa l'interpretazione degli effetti indotti dalle basse dosi, per i quali le evidenze sono limitate e contrastanti, anche in animali da laboratorio.

La tabella 3 mostra alcuni dei principali studi, in modelli animali, non testimonianti il ruolo dell'esposizione al BPA come interferente nei processi di sviluppo (**Tabella 3**).

Study	Design	General toxicity	Pregnancy outcome
<i>Other studies with pregnancy outcome data</i>			
Tinwell et al. (2002) NTP-A EU (2008)	SD, Wistar rats GD 6-21 20, 100 µg/kg d, 50 mg/kg d, gavage N = 7/group	No effects on maternal weight	No effects litter size, sex ratio, birth weight
Negishi et al. (2003) NTP-A EU (2008)	F344 rats 0, 4, 40, and 400 mg/kg d GD 10-PND 20 Gavage N = 8, 9/group	40, 400 ↓ maternal body weight during pregnancy	No effect: total pups/litter, sex ratio at birth; no birthweight measure

**Tabella 3. Studi con outcome negativo in modelli animali (da Golub et al. 2010).**

Il numero limitato di studi negli esseri umani [Itoh et al. 2007; Wolff et al. 2008], esposti al BPA, non è sufficiente, invece, per giungere a conclusioni in merito ai possibili rischi di anomalie di sviluppo. La tabella 4 mostra alcuni degli studi effettuati nell'uomo (Tabella 4).

<b>TABELLA 4. STUDI SUGLI EFFETTI INDOTTI DALL'ESPOSIZIONE AL BPA NELL'UOMO</b>	
<b>Takeuchi et al. 2002</b>	Livelli elevati di BPA urinario e/o circolante <b>correlano positivamente</b> con <b>livelli circolanti di ormoni sessuali</b> (testosterone)
<b>Yang et al. 2006</b>	<b>Nessuna correlazione</b> è stata riscontrata tra i livelli urinari e/o circolanti di BPA e la <b>durata della gestazione</b>
<b>Snijder et al. 2013; Miao et al. 2011</b>	Livelli elevati di BPA urinario e/o circolante <b>correlano positivamente</b> con la <b>IUGR</b>
<b>Sugiura-Ogasawara et al. 2005</b>	Livelli elevati di BPA urinario e/o circolante <b>correlano positivamente</b> con la frequenza di <b>aborti spontanei</b>
<b>Yamada et al. 2002</b>	Livelli elevati di BPA urinario e/o circolante <b>correlano positivamente</b> con l'insorgenza di <b>difetti cromosomici</b>
<b>Takeuchi et al. 2004</b>	Livelli elevati di BPA urinario e/o circolante <b>correlano</b>

	<b>positivamente</b> con lo sviluppo della <b>PCOS</b>
<b>Sathyanarayana et al. 2011</b>	Livelli elevati di BPA urinario e/o circolante <b>correlano positivamente</b> con <b>alterato sviluppo neuronale</b>

Riconoscendo, in conclusione, la scarsità di dati sugli effetti del bisfenolo A negli esseri umani e considerando le controversie circa i dati sugli effetti indotti da basse dosi di BPA in modelli animali, la possibilità che il bisfenolo A possa alterare lo sviluppo umano non può essere esclusa.

## **OBIETTIVI**

Del tutto recentemente, una notevole attenzione della comunità scientifica si sta rivolgendo verso le implicazioni sulla salute umana dell'esposizione agli interferenti endocrini. **Premesso**, quindi, che attualmente:

- a) sussistono **incertezze sull'origine di oltre il 50% delle malformazioni fetali**, parallelamente alla vastità degli agenti eziologici chiamati in causa;
- b) non può essere escluso un ruolo del bisfenolo A nell'indurre anomalie dello sviluppo, ma:
  - la maggior parte delle informazioni a riguardo deriva da studi effettuati su modelli animali ed i risultati sull'argomento sono ancora frammentari e contrastanti;
  - **scarseggiano i dati** sugli effetti del bisfenolo A sullo sviluppo embrio-fetale, derivati da studi in donne in gravidanza;

- c) chiarimenti circa le ancora poco conosciute basi eziopatogenetiche delle malformazioni potrebbero consentire **nuovi approcci preventivi**.

Sulla base delle suddette recenti, ancorché frammentarie, evidenze della letteratura scientifica pubblicata, che propongono il BPA quale nuovo teratogeno, il presente studio si propone i seguenti obiettivi:

1. elaborare una più approfondita revisione sistematica dei dati disponibili in letteratura scientifica circa nuovi fattori eziologici di malformazioni fetale, effettuando la nostra ricerca in banche dati della letteratura pubblicata (Pubmed e Google Scholar), con le seguenti keywords, ricavate dalle premesse della sezione introduttiva della presente Tesi: *Fetal Malformation, Endocrin Disrupter, Bisphenol A*. La ricerca è stata completata ricorrendo anche all'uso degli elenchi bibliografici degli articoli stessi;
2. approfondire sperimentalmente la correlazione patogenetica tra IE, ed in particolar modo il BPA, e sviluppo di malformazioni fetali, tramite la raccolta e lo studio di dati clinico-anamnestici e laboratoristici di pazienti arruolate in uno studio pilota caso-controllo (*donne con feto malformato vs. donne con feto normo-formato*), ai fini di identificare nuovi potenziali agenti teratogeni;
3. identificare e proporre, in conseguenza al chiarimento dei suddetti nuovi fattori teratogeni, strategie preventive, attuabili nella donna in gravidanza tendenti ad impedire lo sviluppo della patologia e delle sue gravi complicanze a breve, medio e lungo termine.

Lo studio, **primo negli esseri umani** ad accertare il ruolo del BPA nell'alterazione della riproduzione umana, potrà essere utile, dunque, a meglio delineare nuovi aspetti

della patogenesi delle malformazioni, auspicando di identificare nuove strategie preventive attuabili nella **donna in gravidanza**

## **MATERIALI E METODI**

### **3.1a Arruolamento e popolazione in studio**

Per la realizzazione di questo studio pilota caso-controllo (*donne con feto malformato vs. donne con feto normo-formato*) sono state arruolate 151 donne in gravidanza, afferenti alle strutture di:

- *Dipartimento di Scienze Ostetrico-Ginecologiche, Urologiche e Medicina della Riproduzione* dell'Università Federico II di Napoli
- *Dipartimento di Ostetricia e Ginecologia* Ospedale San Lorenzo – Valdagno (VI)

Il periodo di arruolamento è stato compreso tra il 30 maggio 2011 ed il 10 gennaio 2013.

L'arruolamento è stato preceduto da un colloquio informativo, finalizzato ad illustrare gli obiettivi e le modalità di svolgimento del Progetto, che ha preceduto la sottoposizione del consenso informato. Sono state arruolate solo le pazienti che abbiano fornito un consenso informato scritto.

Il protocollo di studio è stato regolarmente approvato dal Comitato Etico della nostra struttura ospedaliera.

**I criteri d'inclusione/esclusione** utilizzati sono stati differenti per i due gruppi.

Nel **gruppo “CASO”**, sono state incluse pazienti rispondenti ai seguenti **criteri d’inclusione**:

- età compresa tra 27 e 40 anni;
- diagnosi accertata di fetopatia, ad eziologia ignota.

Le donne del **gruppo CASO** sono state selezionate tra quelle afferenti agli ambulatori di diagnosi prenatale dei suddetti dipartimenti clinici.

Sono, al contrario, state escluse del **gruppo CASO**:

- donne con età > 40 anni (criterio di rischio per cromosomopatie) [**Savva et al. 2010**]
- donne con fetopatia accertata, ma ad eziologia nota.

Nel **gruppo “CONTROLLO”**, sono state incluse pazienti rispondenti ai seguenti **criteri d’inclusione**:

- età compresa tra 25 e 38;
- gravidanza normo-condotta, con feto normo- formato.

Le donne del **gruppo CONTROLLO** sono state selezionate tra quelle afferenti al reparto di Ginecologia ed Ostetricia dell’Università Federico II e dell’ospedale San Lorenzo di Valdagno (VI) , per controllo ambulatoriale durante la gravidanza fisiologica.

Da un iniziale numero di 180 pazienti arruolate, **10 CONTROLLI** e **9 CASI** non si sono presentati al momento del prelievo ematico. In definitiva, il campione del nostro studio pilota CASO-CONTROLLO è apparso costituito da (**Appendice I**):

- n= **101 CASI**;
- n= **50 CONTROLLI**.
-

## **Anamnesi ginecologica**

Le donne incluse nello studio sono state sottoposte ad un'approfondita anamnesi, con particolare attenzione all'anamnesi ostetrica, guidata da “*Schede Di Raccolta Dati Ginecologici*” e “*Dati Registro Campano Dei Difetti Congeniti*” (**Appendice 2**). Tramite tale fase anamnesticca, nel **gruppo CASO**, si è potuto indagare, in maniera esaustiva, sulla presenza di eventuali fattori eziologici noti di malformazione, causa di esclusione della paziente dallo studio, tra cui:

- anamnesi positiva per infezione (es. complesso TORCH);
- stati di malnutrizione o patologie dismetaboliche (es. diabete);
- farmaci (es. talidomide, anticoagulanti, chemioterapici) e sostanze stupefacenti (es. cannabis, cocaina, eroina);
- indagini radiologiche (es. radiografie, TC)
- familiarità per sindromi genetiche.

## **Diagnosi di malformazione**

Tutte le donne del nostro campione sono state sottoposte alle indagini di laboratorio routinariamente eseguite nel corso di ogni gravidanza, tra cui il tri-test: dosaggio di  $\alpha$ -fetoproteina,  $\beta$ -HCG ed estradiolo, per la previsione di trisomia 21. In seguito, la diagnosi prenatale di fetopatia è stata accertata, mediante le due seguenti tecniche diagnostiche: ecografia ostetrica ed amniocentesi trans addominale.

### **▪ Ecografia ostetrica**

L'ecografia è senz'altro la metodica che ha permesso lo sviluppo e l'affermazione della diagnosi prenatale. Con gli ultrasuoni, utilizzati, secondo l'epoca di gravidanza, attraverso sonde vaginali o sonde addominali, esiste la

possibilità di individuare anomalie congenite, fornendo alla diagnosi prenatale un contributo diretto notevolissimo. L'ecografia, infatti, permette la diagnosi diretta di un numero elevato di anomalie e malformazioni congenite a carico dei vari distretti del corpo fetale:

- anomalie del collo, torace e dell'addome;
- anomalie dell'apparato genitale;
- presenza di cisti dei plessi coroidei fetali;
- difetti del tubo neurale;
- anomalie di arti e annessi.

Si è potuto, inoltre, rilevare che molte anomalie strutturali evidenziate in utero si associano di frequente a cromosomopatie (markers ecografici di cromosomopatia), richiedendo un approfondimento diagnostico citogenetico. La valutazione della translucenza nucale, ad esempio, può essere definita come marker sonografico dell'aneuploidia fetale (**Figura 10**).

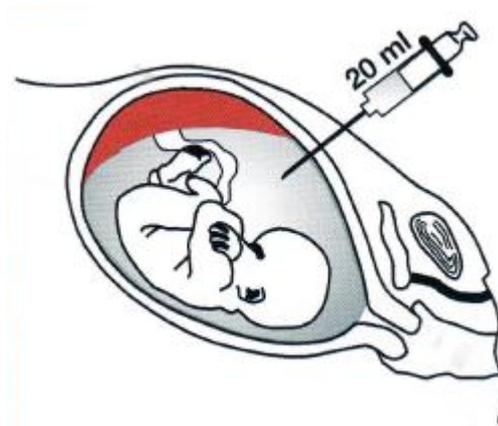


**Figura 10. Feto di 13 settimane di gravidanza con misura della translucenza nucale, angolo facciale e osso nasale**

Nel nostro studio, la rilevazione ecografica è stata eseguita, dopo un'applicazione abbondante di gel, mediante sonda trans addominale convex multifrequenza con frequenza centrale di 3,75MHz.

- **Amniocentesi trans addominale**

È la procedura di diagnosi prenatale invasiva più praticata e consiste nel prelievo di liquido amniotico (LA) mediante puntura trans-addominale del sacco amniotico (**Figura 11**).



**Figura 11. Amniocentesi.**

L'amniocentesi "genetica" è stata eseguita nel II trimestre, generalmente tra la 16<sup>a</sup> e la 18<sup>a</sup> settimana di gestazione, epoca in cui la vitalità degli amniociti è ottimale per le colture cellulari e la quantità di LA (150-200 ml) è tale per cui ne è possibile il prelievo di 20 ml senza alcun danno per il prodotto del concepimento [Purvis-Smith et al. 1992].

Per il prelievo abbiamo usato un ago di 20-22 gauge e della lunghezza di 10-20 cm, inserito a mano libera, sotto controllo ecografico (amniocentesi ecoassistita). Ecograficamente, è stata localizzata la placenta ed individuata una tasca di liquido amniotico, sufficientemente ampia e lontana da parti fetali, dove

infiggere l'ago. Dopo l'inserimento dell'ago, tolto il mandrino si aspirano 20 ml di liquido amniotico (LA) dopo aver allontanato il 1° ml, prelevato con un'altra siringa, per evitare contaminazioni materne.

Il prelievo è stato effettuato ambulatorialmente, a vescica vuota, senza anestesia. Abbiamo praticato, nelle gravide Rh negative non immunizzate con partner Rh positivo, la profilassi con immunoglobuline anti-D, per il possibile passaggio, di sangue fetale nel circolo materno.

Il materiale fetale (liquido amniotico ed amniociti) ottenuto con l'amniocentesi è stato indirizzato ad indagini citogenetiche, biochimiche e sul DNA, ai fini di escludere dal nostro campione tutte le gravide con fetopatia da causa nota (es. errori congeniti del metabolismo, agenti infettivi, etc.).

La tabella 5 riporta in breve le finalità di esecuzione dell'amniocentesi (**Tabella 5**).

<b>Tabella 5. Scopi di esecuzione dell'amniocentesi.</b>
<p><b>Determinazione del cariotipo fetale</b> → indicata in caso di:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>- età materna avanzata &gt;35anni;</li><li>- pregressa aneuploidia fetale;</li><li>- genitori portatori di traslocazioni bilanciate;</li><li>- storia familiare di cromosomopatie;</li><li>- diagnosi di sesso per malattie legate al cromosoma X;</li><li>- malformazioni congenite rilevate all'esame ecografico;</li><li>- screening "positivo" biochimico (tri-test) e/o ecografico;</li><li>- eventuali mosaicismi alla villocentesi.</li></ul>
<p><b>Ricerca di agenti infettivi nel liquido amniotico</b> → per documentare la</p>

trasmissione verticale di una infezione materna.
<b>Determinazione dell’Rh fetale</b> → indicato in caso di gravide Rh negative con partner Rh positivo.
<b>Studio del DNA fetale.</b>
<b>Esami enzimatici</b> → per la diagnosi di anomalie congenite del metabolismo.
<b>Dosaggio dell’<math>\alpha</math>-fetoproteina e dell’acetilcolinesterasi</b> → per la diagnosi di difetti del tubo neurale.

I limiti e le complicanze materno fetali conseguenti all'amniocentesi sono assolutamente modesti.

### **Raccolta campioni ematici**

Abbiamo provveduto alla raccolta di due provette di sangue di 5ml e 10ml, per ciascuna paziente, ai fini del dosaggio dei livelli circolanti di BPA totale, libero e coniugato.

Il sangue materno è stato prelevato dalla vena antecubitale con metodo Vacutainer. Per il **gruppo CASO**, i prelievi sono stati eseguiti al momento del ricovero ospedaliero, prima di effettuare l’IVG, tra la 17<sup>a</sup> e la 22<sup>a</sup> settimana di gestazione. Per il **gruppo CONTROLLO**, invece, il prelievo è stato effettuato ambulatorialmente.

Per tutti i trasporti di campioni sono stati impiegati contenitori in polistirolo espanso o borse termiche contenenti siberini.

### 3.3 Misurazione del BPA

#### 3.3a Reagenti e standard

Bisfenolo A (BPA) (>99 in purezza),  $\beta$ -glucuronidase/sulfatase da *Helix pomatia* (tipo H-2,  $\geq 100.000$  unità glucuronidasi/mL e  $\leq 7.500$  unità solfatasi/mL) BSTFA (N,O-bis(trimetil silil) trifluoroacetammide) e Piridina, sono stati acquistati dalla Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Bisfenolo-A-d16 (>95 in purezza) è stato acquistato presso la ISOTEC (Taufkirchen, Germany). Metanolo, Acetone e reagenti di grado LC-MS sono stati acquistati da ROMIL (Cambridge, United Kingdom). Le cartucce SPE Florisil e C18 sono state acquistate dalla Phenomenex (Torrence, CA). L'acqua deionizzata di tipo 0 è stata prodotta direttamente in laboratorio per mezzo del Milli-DirectQ-UV3 (Millipore, Bedford, MA, USA).

#### 3.3b Pretrattamento dei campioni

##### ▪ Estrazione

La determinazione del BPA e del BPA coniugato è stata condotta secondo quanto riportato da Kosarac [Kosarac et al. 2012] con alcune modifiche secondarie. Brevemente, da ogni campione di sangue sono state campionate 2 aliquote da 0.5 mL, su una si è dosato il BPA libero e sull'altra il BPA totale cioè la somma di BPA libero e BPA-coniugato (con acido glucuronico e con solfato). Dalla differenza delle due determinazioni è stato determinato il BPA coniugato.

Per il dosaggio del BPA libero sono stati aggiunte 20  $\mu$ l di d16-BPA alla concentrazione di 100  $\mu$ g/L, 1 mL di una soluzione satura di  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2 mL di etanolo e 4 mL di esano. Il campione è stato quindi agitato su vortex per 30

secondi e poi lasciato a riposo per lasciar separare le due fasi. La fase organica superiore (contenete le sostanze lipidiche) è stata allontanata. La fase non polare è stata ulteriormente sgrassata con altri 4 mL di esano. Dopo aver di nuovo agitato, lasciato separare le fasi ed eliminato la fase non polare, 3 mL di diclorometano sono stati aggiunti. Il campione agitato su vortex per 30 secondi è stato sonicato a 30 °C per 10 minuti. La fase organica inferiore è stata trasferita in una nuova vial, il solvente allontanato mediante flusso di azoto in bagno ad acqua a 40 °C e il campione ricostituito con 2 mL di acqua grado 0.

- **Purificazione**

Il campione estratto è stato purificato in due successivi step SPE, uno con una fase solida FLORISIL e l'altro con una fase solida C18.

La colonnina FLORISIL (1 g, 6 mL) è stata condizionata con 10 mL di diclorometano seguiti da 10 mL di esano. Il campione estratto (2 mL) è stato caricato e quindi sono stati eluiti 10 mL di esano (questa frazione contenete grassi residui è stata scartata), quindi gli analiti di interesse sono stati eluiti con 25 mL di diclorometano. La frazione così raccolta è stata portata a secco con un flusso di azoto in bagno a 40°C e quindi ricostituita con 3 mL di acqua grado 0. Nel secondo step la cartuccia SPE C18 (0.5 g, 6 mL) è stata condizionata con 9 mL di acetone, 9 mL di metanolo e 5 mL di acqua di grado 0. Dopo aver caricato i 3 mL di campione la colonnina è stata essiccata sotto vuoto e quindi eluita con 6 mL di metanolo seguiti da 5 mL di acetone. L'eluato è stato essiccato in flusso d'azoto in bagno a 40°C e ridisciolti in 50 µL di piridina. 50 µL di BSTFA sono stati aggiunti per la derivatizzazione e la reazione è stata condotta per 4 ore a 70°C. 1 µL di campione derivatizzato è stato quindi analizzato in GC-MS/MS.

#### ▪ **Deconiugazione**

La reazione di deconiugazione è stata condotta su una aliquota di 0.5 mL di campione. Prima della reazione enzimatica sono stati aggiunti 20 µl di d16-BPA alla concentrazione di 100 µg/L come standard interno. Quindi 50 µl di β-glucuronidase/sulfatase (4,414/168 U/µL). La reazione di deconiugazione è stata condotta per 3 ore in bagno ad acqua agitante a 37°C. Dopo l'idrolisi 100 µL di HCl 2N sono stati aggiunti per disattivare gli enzimi e il BPA è stato estratto e purificato allo stesso modo del BPA libero.

#### **3.3c Analisi strumentale**

Il metodo gas cromatografico è basato su una colonna Supleco® SLB®-5ms con una lunghezza di 10 m e un diametro interno di 0,1 mm, con uno spessore di pellicola di 0,1 µm. Il programma del forno GC comprende una fase iniziale di 1,5 minuti a 160 °C e due rampe: la prima a 20 °C/min fino a 260 °C, la seconda a 40 °C/min fino a 320 °C. La temperatura di iniezione è stata fissata a 260 °C e la velocità del gas vettore lineare (elio) è a 70 cm/sec. Questa impostazione richiede una pressione iniziale di 654 kPa e un flusso lineare di 1.12 mL/min. Il tempo totale di corsa è di 8 min. Questi tempi di analisi veloci richiedono elevate velocità di acquisizione dati. Sono stati utilizzati due canali di acquisizione, uno in modalità SCAN tra  $m/z=50$  e  $m/z=500$  e l'altro in modalità MRM:  $357.10>191.20$  per il BPA e  $370.50>73.10$  per il d16-BPA. L'event time per la modalità SCAN è stato settato su 0.07 sec (corrispondente ad una velocità di scansione di 10000 amu/sec, il massimo ottenibile utilizzando il TQ-8030). La calibrazione è stata effettuata utilizzando nove soluzioni standard ed un bianco ad una concentrazione di 0.01 µg/L fino a 100 µg/L. Ogni standard è stato analizzato in triplicato. La quantizzazione è stata condotta con il

metodo della diluizione isotopica utilizzando il d16-BPA come standard interno. Ogni 10 campioni sono stati analizzati un bianco e due soluzioni di calibrazione una a 25 µg/L ed una a 0.01 µg/L. I criteri di tolleranza adottati sono stati <LOQ per il bianco, ±30% per la soluzione a 0.01 µg/L e ±10% per quella a 25 µg/L.

### **3.4 Analisi statistica**

L'analisi statistica è stata condotta utilizzando i software Statistica (StatSoft, Oklaoma, USA) e Minitab (Minitab Inc, Pennsylvania, USA). La comparazione tra i gruppi è stata fatta con il Rank Sum Test secondo Mann-Whitney o per mezzo della analisi della varianza a singolo via sui rank preformati (secondo Kruskal-Wallis) utilizzando anche il test post-hoc di Dunn. La normalità della distribuzione dei dati è stata verificata per mezzo del test di Shapiro-Wilks. Il valore alfa è stato fissato a 0,05 se non diversamente specificato.

## **RISULTATI**

### **4.1 POPOLAZIONE IN STUDIO**

Al termine dell'arruolamento, il campione del nostro studio pilota CASO-CONTROLLO è risultato costituito da n = **101** donne con feto malformato (**CASI**) ed n = **50** donne con feto normo-formato (**CONTROLLI**).

La tabella 6 mostra a confronto le caratteristiche demografiche del gruppo CASO e CONTROLLO (**Tabella 6**).

**Tabella 6.** Caratteristiche demografiche della popolazione in esame.

	n°	Età materna		Età gestazionale media di interruzione
		MEDIA	DS	
<b>CASO</b>	<b>101</b>	33,82	6,98	19,90
<b>CONTROLLO</b>	<b>50</b>	31,57	6,06	/

**Abbreviazioni:** n°= numero; DS= deviazione standard.

L'età media del gruppo caso è maggiore di 2,25 anni rispetto a quella del gruppo controllo (33,82 vs. 31,57). La media dell'età gestazionale a cui è stata eseguita l'IVG corrisponde alla 19<sup>a</sup> settimana.

La tabella 7, invece, mostra a confronto le caratteristiche delle pazienti del **gruppo CASO**, suddivise, però, per classe di malformazione (**Tabella 7**).

**Tabella 7.** Caratteristiche demografiche della popolazione CASO, per ciascun gruppo di malformazione.

Classe di Malformazione	n°	%	Età materna		Età gestazionale media di interruzione
			Media	DS	
Malformazioni del SNC/SNP	28	27,72	31,21	7,32	20,75
Cromosomopatie	46	45,54	35,93	6,97	20,07
Malformazioni cardiache	4	3,96	35,25	2,87	19,50
Malformazioni renali	3	2,97	30,50	4,95	18,33
Polimalformazioni	6	5,94	35,67	5,82	18,40

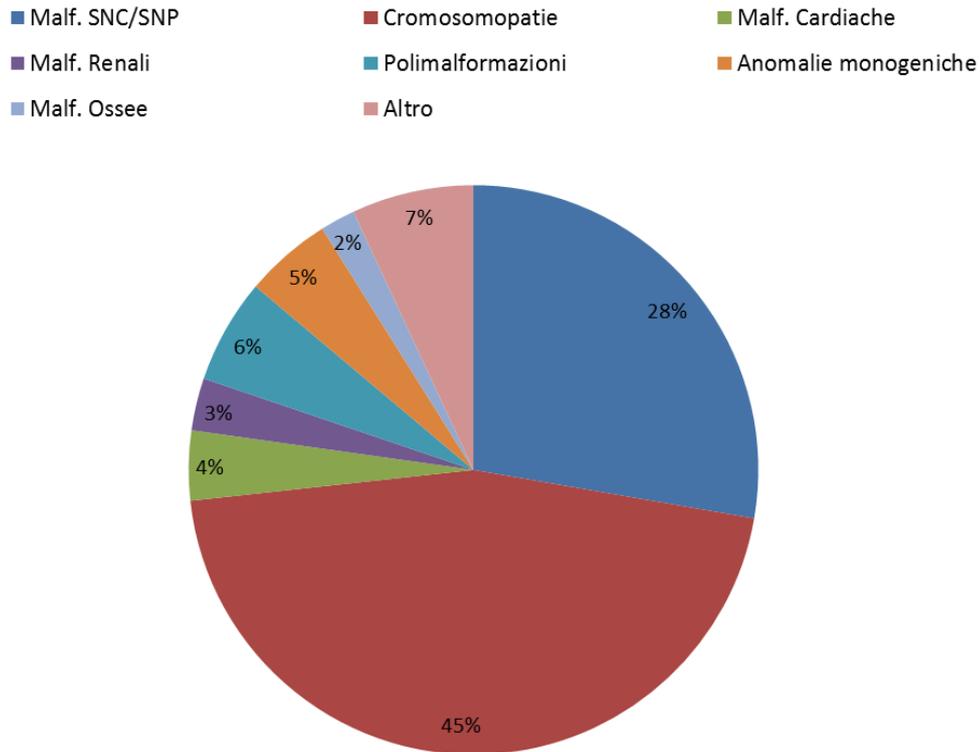
Anomalie monogeniche	5	4,95	26,80	4,15	17,00
Malformazioni ossee	2	1,98	36,00	4,24	22,00
Altro	7	6,93	32,43	6,11	19,29

**Abbreviazioni:** n°= numero; %= percentuale di pazienti con una data anomalia malformativa, rispetto al totale; DS= deviazione standard.

I valori di media e deviazione standard dell'età materna mostrano chiaramente che il maggior valore medio si è riscontrato nelle donne con feto affetto da malformazioni ossee, cromosomopatie e quadri polimalformativi.

L'analisi di frequenza delle differenti classi di malformazioni nell'ambito della nostra popolazione CASO, mostra come la percentuale maggiore si riscontri per le cromosomopatie (45%), seguite dalle malformazioni del Sistema Nervoso Centrale e Periferico (28%), come evidenziato in Figura 12. La minor frequenza si verifica, invece, per le polimalformazioni (2%) (**Figura 12**).

## Malformazioni

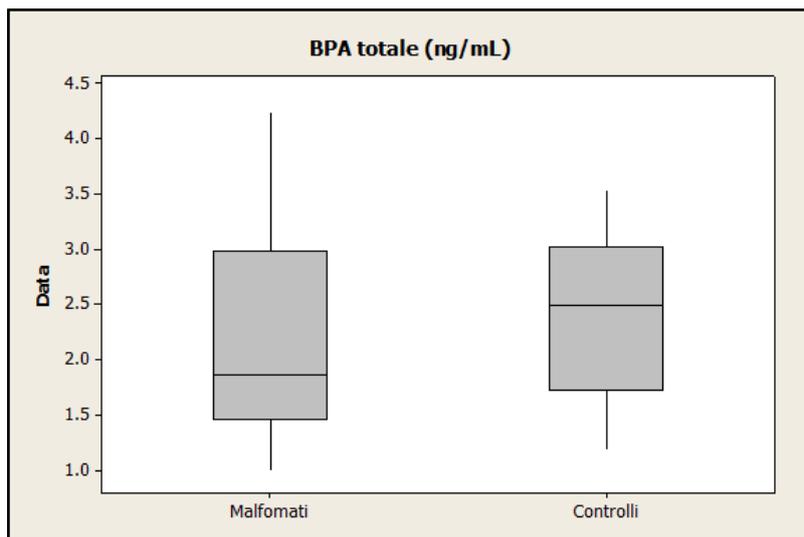


**Figura 12. Frequenza delle differenti classi di malformazioni nella popolazione CASO.**

### 4.2 ESPOSIZIONE AMBIENTALE AL BISFENOLO A E MALFORMAZIONI

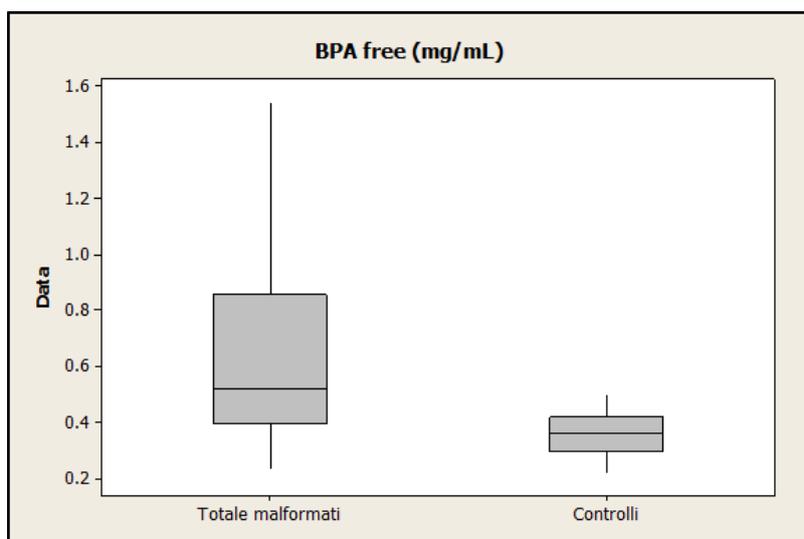
L'analisi del bisfenolo A ematico ha evidenziato i seguenti risultati (**Tabella 8 e 9**).

In primo luogo, la concentrazione media del BPA totale (ng/mL) circolante è risultata pari a  $2,39 \pm 0,73$  ng/mL (min= 1,19; max= 3,52) nel gruppo CONTROLLO e a  $2,14 \pm 0,87$  ng/mL (min= 0,99; max= 4,23) nel gruppo CASO (**Tabella 8**). La Figura 13 permette di apprezzare meglio la variabilità del dato *concentrazione ematica di BPA totale* nei 2 gruppi di soggetti. Dall'osservazione del box-plot è chiaro come la mediana della distribuzione sia superiore nel gruppo CONTROLLO (**Figura 13**), sebbene in maniera non statisticamente significativa ( $p= 0,076$ ).



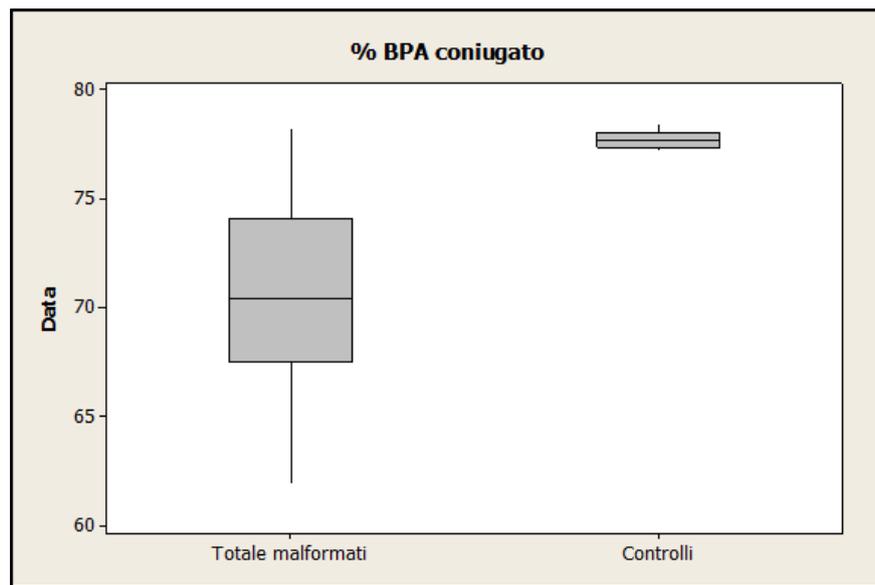
**Figura 13. Confronto tra la distribuzione della concentrazione plasmatica di BPA totale nei 2 gruppi.**

La concentrazione media di BPA free è risultata superiore nel gruppo CASO, rispetto ai CONTROLLI, con un valore pari a  $0,64 \pm 0,32$  ng/mL nel gruppo CASO (min= 0,23; max= 1,54) vs. il valore di  $0,36 \pm 0,08$  ng/mL nel gruppo CONTROLLO (min= 0,22; max= 0,5) ( $p < 0.001$ ) (Figura 14 e Tabella 8).



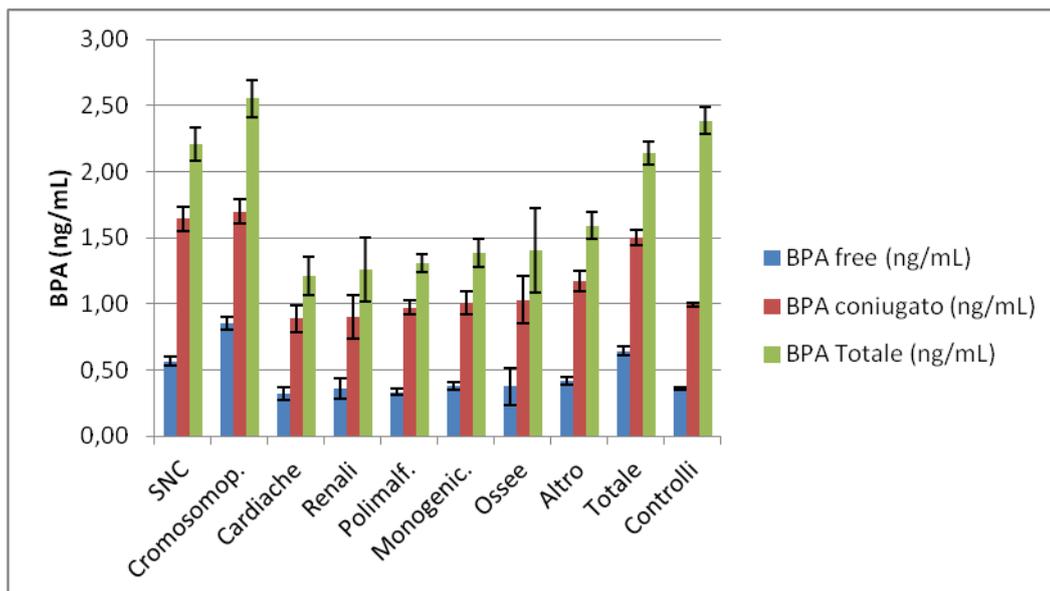
**Figura 14. Confronto tra la distribuzione della concentrazione plasmatica di BPA free nei 2 gruppi.**

Un ulteriore dato riguarda la percentuale di BPA coniugato. Dall'analisi di confronto dei due gruppi, si evince una maggiore quota di BPA inattivo, cioè metabolizzato, nel gruppo CONTROLLO rispetto ai CASI (**Figura 15**).  $70,67\% \pm 4,49$  (min= 62; max= 78,2) è la percentuale di BPA coniugato del gruppo CASO, mentre  $77,77\% \pm 0,39$  (min= 77,2; max= 78,5) quella del gruppo CONTROLLO (**Tabella 8**) ( $p < 0.001$ ).



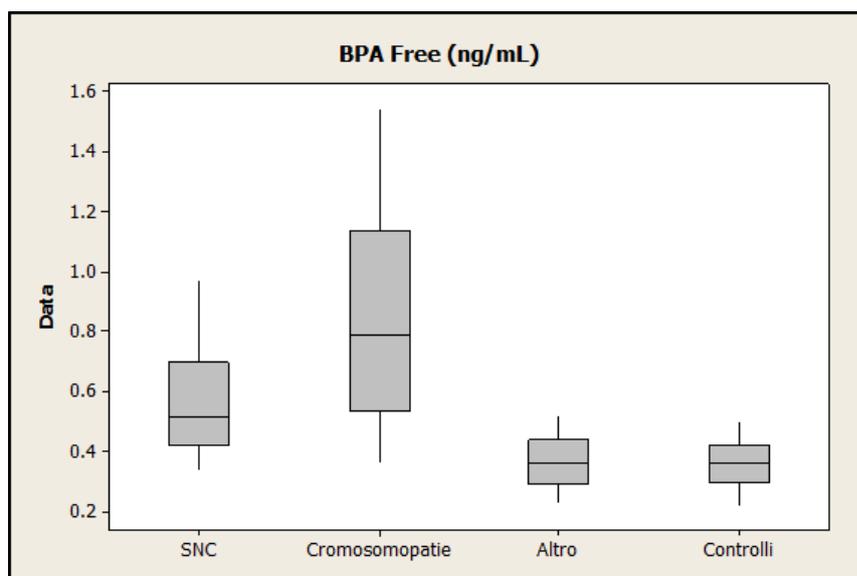
**Figura 15. Confronto tra la distribuzione della percentuale di BPA coniugato nei 2 gruppi.**

I valori di BPA libero, totale e coniugato sono stati anche analizzati nell'ambito di ciascuna singola malformazione (**Figura 16 e Tabella 9**). È risultata una quota di BPA totale, free e coniugato maggiore nelle cromosomopatie e nelle malformazioni del sistema nervoso centrale e periferico, rispetto alle altre classi.



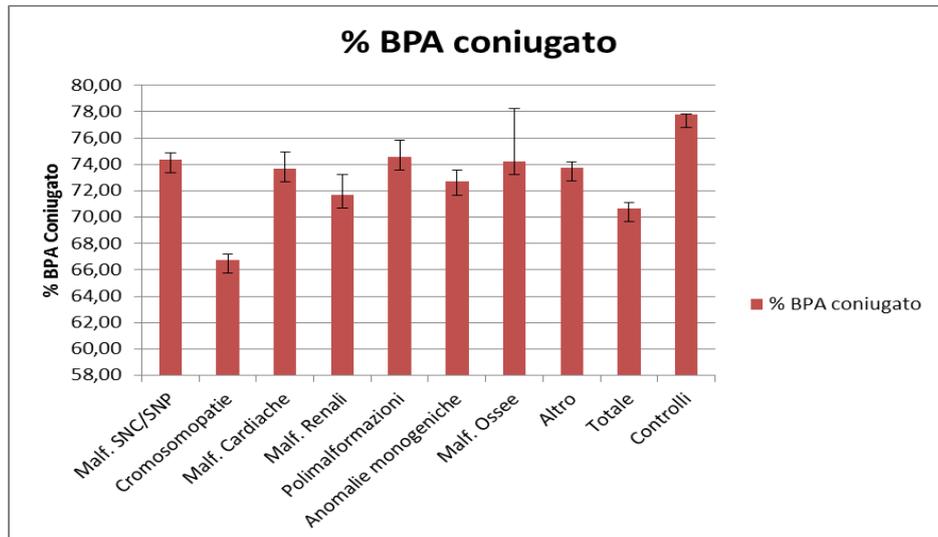
**Figura 16. Valori di BPA totale, free e coniugato in ciascuna classe di malformazioni.**

Il confronto tra la quota di BPA free del gruppo CONTROLLO con le sottoclassi del gruppo CASO, mostra un gap statisticamente significativo solo per le malformazioni del SNC/SNP vs. Controlli ( $p < 0.001$ ) e per le cromosomatie vs. Controlli ( $p < 0.001$ ) (**Figura 17**).



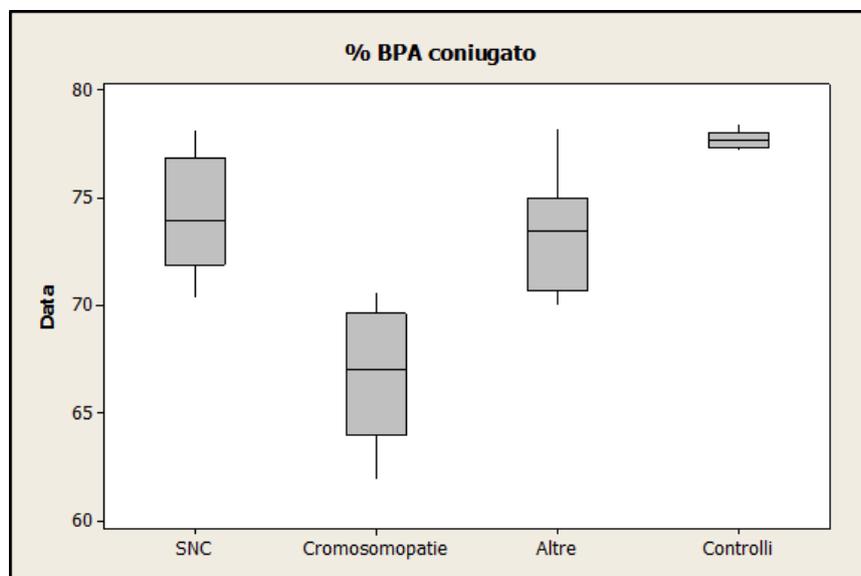
**Figura 17. Confronto tra la distribuzione del BPA free nelle malf del SNC/SNP, nelle cromosomatie e nei controlli.**

Il discorso inverso vale per la percentuale di BPA coniugato, che, analizzato nell'ambito della singola malformazione, è minore nella classe delle cromosomopatie (Figura 18 e Tabella 9).



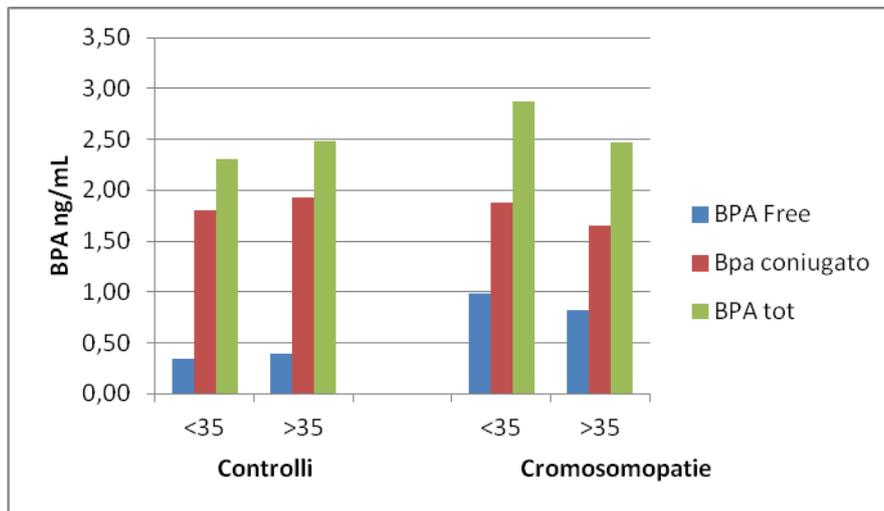
**Figura 18. Percentuale di BPA coniugato in ciascuna classe di malformazioni.**

Il confronto tra la % di BPA coniugato in ciascuna sottoclasse di malformazione ed i controlli risulta statisticamente significativo ( $p < 0,001$ ) non solo per le cromosomopatie, ma anche per le malformazioni del SNC (Figura 19).



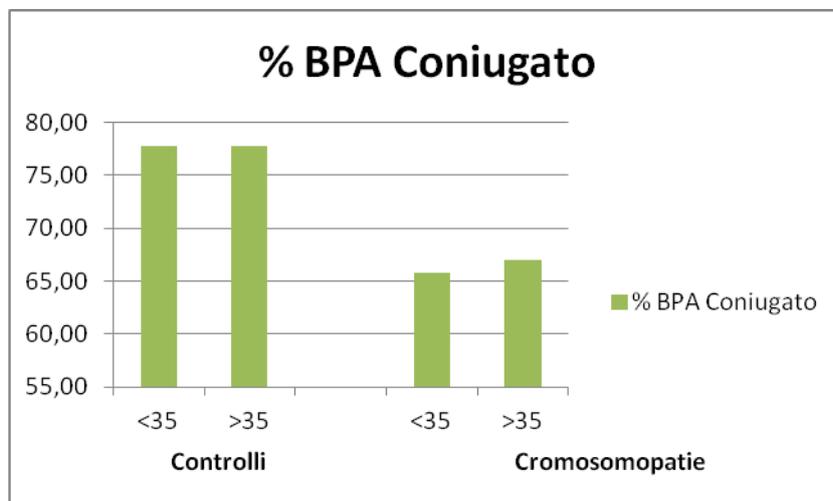
**Figura 19. Box-plot di confronto della percentuale di BPA coniugato.**

Nelle cromosomopatie un fattore confondente risulta essere l'età della gestante, che, come confermato dai dati in letteratura, se maggiore dei 35 anni, aumenta il rischio del fenomeno. Nel grafico si può evincere come anche nei campioni del gruppo caso, affetti da cromosomopatia con età minore di 35 anni la concentrazione di BPA (sia totale che free) sia maggiore dei controlli (**Figura 20**).



**Figura 20. Confronto tra il BPA ematico (tot, free e coniugato) nei controlli vs. cromosomopatie in base all'età.**

La figura 21 mostra, invece, la percentuale di BPA coniugato in funzione dell'età (**Figura 21**).



**Figura 21. Confronto tra il BPA coniugato nei controlli vs. cromosomopatie in base all'età.**

**Tabella 8.** Risultato delle analisi BPA ematico: confronto CASO vs. CONTROLLO.

	n°	BPA free (ng/mL)					BPA coniugato (ng/mL)					BPA Totale (ng/mL)					%
		Media	DS	SE	Min	Max	Media	DS	SE	Min	Max	Media	DS	SE	Min	Max	
Totale	101	0,64	0,32	0,03	0,23	1,54	1,50	0,58	0,06	0,69	2,90	2,14	0,87	0,09	0,99	4,23	70,67
Controlli	50	0,36	0,08	0,01	0,22	0,50	0,99	0,09	0,01	0,87	1,16	2,39	0,73	0,02	1,19	3,52	77,77

Abbreviazioni: n°= numero; DS= deviazione standard; SE= errore standard

**Tabella 9.** Risultato delle analisi BPA ematico per singola classe di malformazione.

	n°	BPA free (ng/mL)					BPA coniugato (ng/mL)					BPA Totale (ng/mL)					% BPA coniugato					
		Media	DS	SE	Min	Max	Media	DS	SE	Min	Max	Media	DS	SE	Min	Max	Media	DS	SE	Min	Max	
Malf. SNC/SNP	28	0,57	0,19	0,04	0,39	1,67	1,64	0,50	0,08	0,84	2,21	2,21	0,67	0,12	0,34	2,21	74,36	2,58	0,49	0,07	0,74	7,72
Cromosomopatie	46	0,85	0,33	0,05	0,37	1,74	1,70	0,60	0,08	0,95	2,55	2,53	0,91	0,12	0,26	2,22	66,77	2,88	0,43	0,06	0,20	0,60
Malf. Cardiache	4	0,32	0,10	0,05	0,24	0,89	0,82	0,11	0,07	1,17	1,21	1,29	0,19	0,05	0,09	1,16	73,65	2,63	1,30	0,14	0,60	7,44
Malf. Renali	3	0,36	0,14	0,08	0,26	0,92	0,86	0,06	0,09	1,22	1,26	1,24	0,24	0,09	0,04	1,17	71,67	2,71	1,75	0,17	0,71	7,48
Polimalformazioni	6	0,33	0,07	0,03	0,26	0,97	0,92	0,05	0,08	1,12	1,31	1,31	0,10	0,07	0,15	1,15	74,53	3,14	1,28	0,30	0,83	8,32
Anomalie monogeniche	5	0,38	0,06	0,03	0,30	1,07	1,09	0,08	0,06	1,39	1,39	1,34	0,11	0,06	0,17	1,17	72,68	2,30	0,91	0,13	0,43	7,35
Malf. Ossee	2	0,38	0,11	0,04	0,25	1,03	1,02	0,18	0,08	1,45	1,41	1,45	0,15	0,09	0,19	1,20	74,20	5,60	4,00	0,02	0,82	7,22
Altro	7	0,42	0,07	0,03	0,31	1,17	1,20	0,08	0,08	1,59	1,59	1,57	0,11	0,02	0,18	1,18	73,73	1,23	0,46	0,23	0,53	7,37
Totale	101	0,64	0,32	0,03	0,23	1,54	1,50	0,58	0,06	0,69	2,90	2,14	0,87	0,09	0,99	4,23	70,67	2,58	0,49	0,07	0,74	7,72
Controlli	50	0,36	0,08	0,01	0,22	0,50	0,99	0,09	0,01	0,87	1,16	2,39	0,73	0,02	1,19	3,52	77,77	0,30	0,07	0,01	0,73	7,80

			8	1	2	0		9	1	7	6		3	2	9	2		9	5	2	5
--	--	--	---	---	---	---	--	---	---	---	---	--	---	---	---	---	--	---	---	---	---

Abbreviazioni: n°= numero; DS= deviazione standard; SE= errore standard

## CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

Si può ritenere che il presente studio costituisce un progetto – pilota per l’analisi delle ripercussioni sulla salute riproduttiva dei fenomeni di esposizione ambientale a xenoromoni, e in particolare del Bisfenolo A. Coerentemente a quanto proposto negli obiettivi si è riusciti a documentare, non solo una reale ripercussione del Bisfenolo A sulla riproduzione umana e sullo sviluppo embrio-fetale, ma anche come la molecola può influenzare la vita fertile della donna e le future gravidanze.

L’importanza e la necessità di indagare su tale aspetto della vita, deriva dagli infiniti risvolti che provocano sulla sfera riproduttiva: dalla possibilità di concepire, alla normale evoluzione della gravidanza fino alla nascita di un figlio “sano”. Non è dunque solo la salute fisica ad essere coinvolta, ma anche la sfera emotiva della donna. Basti pensare alle importanti problematiche psicologiche causate dalle condizioni di sterilità in sé e/o all’iter diagnostico-terapeutico della sterilità a quello dell’interruzione volontaria di gravidanza.

I dati raccolti offrono, inoltre, la possibilità di attuare progetti più ampi ed approfonditi volti ad affrontare e verificare tutti i concomitanti effetti a breve , medio e lungo termine sugli adulti e sui neonati, apparentemente sani, delle possibili interferenze, rappresentate dalla singola costituzione genetica (con eventuali fragilità o predisposizioni), dai particolari stili di vita (relativi al concomitante effetto lesivo di tossicodipendenza, di abuso alcolico, di errate abitudini alimentari e di esercizio

fisico) ed infine dall'ambiente di lavoro (che spesso non è ben controllato nel profilo di tutela e di salvaguardia della salute dei lavoratori).

Inoltre, considerando che gli interferenti endocrini, e in particolare il Bisfenolo A si trovano comunemente in molte delle sostanze che incontriamo nell'ambiente e nel mondo moderno, i dati attuali sono sufficienti per identificare un problema di salute pubblica che deve essere affrontato e risolto. Questo studio costituisce, quindi, anche la prova per informare le autorità responsabili su questa minaccia e sulle misure di prevenzione da adottare in merito alla questione, con particolare riferimento alle donne in gravidanza.

Sono inoltre necessari ulteriori studi per apprendere gli effetti di esposizione intrauterina agli interferenti endocrini, indirizzati specificamente sul meccanismo d'azione, essendo questa la base per eventuali strategie preventive e terapeutiche.

Concludendo, dal momento che prevenire è meglio che curare, si dovrebbe realmente evitare o limitare il contatto con il BPA durante la vita fertile di una donna e in particolar modo durante tutta la gravidanza.

## APPENDICE 1 Campione Dello Studio

Paziente	Età	Gestazione	Malformazione	Classe malformazione	Sesso feto	BPA free (ng/mL)	BPA con (ng/mL)	BTA tot (ng/mL)	% BPA con
EC	27	19	Acrania	1	F	0,49	1,37	1,86	73,6
DM	33	21	Agenesia Corpo calloso	1		0,97	2,31	3,28	70,4
DA	29	14	Anencefalia	1		0,74	2,45	3,19	76,8
FR	26	23	Anencefalia	1		0,73	2,26	2,99	75,6
CA	27	22	Atrofia muscolare spinale tipo 1	1	M	0,43	1,48	1,91	77,6
DA	30	20	Atrofia muscolare spinale tipo 1	1		0,42	1,15	1,57	73,1
MA	29	21	Emimelia arto superiore sx	1	F	0,55	1,35	1,90	71,3
ZF	35	18	Encefalocele	1		0,69	2,30	2,99	76,8
CVC	35	23	idrocefalia Triventricolare severa	1	F	0,90	2,32	3,22	71,9
CA	20	22	Idrocefalo	1	F	0,54	1,65	2,19	75,5
SM	36	22	Idrocefalo	1		0,63	1,97	2,60	75,6
DA	40	24	Idrocefalo	1	M	0,61	1,48	2,09	70,8
CC	34	15	Igroma cistico settato	1	no	0,44	1,60	2,04	78,2
PC	40	14	Igroma cistico settato	1	no	0,65	1,80	2,45	73,5
DN	39	22	malattia di Werding-Hoffmann	1	F	0,34	0,92	1,26	73,0
DNR	39	22	malattia di Werding-Hoffmann	1		0,85	2,15	3,00	71,8
CM	32	19	Malformazione SNC	1	F	0,48	1,68	2,16	77,9
PD	24	20	Malformazione SNC	1	F	0,46	1,58	2,04	77,3
IMI	22	20	Mielomeningocele, spina bifida,	1	M	0,36	0,97	1,33	73,3
DC	29	22	Mielomeningocele, spina bifida, idrocefalia	1	F	0,37	1,25	1,62	77,1
GC	21	19	oligoencefalia	1		0,46	1,53	1,99	76,9

AL	40	19	Oligoprosoencefalia+piede torto	1	F	0,39	1,13	1,52	74,4
MG	33	22	Sequela di emorragia cerebrale	1		0,92	2,23	3,15	70,9
DA	20	17	Sindrome di Dandy Walker	1	F	0,44	1,08	1,52	71,0
RP	40	22	Spina Bifida	1	M	0,55	1,42	1,97	72,2
IR	40	20	Spina bifida	1	no	0,40	1,25	1,65	75,9
AE	25	20	Spina bifida più mielomeningocele e piede torto	1	M	0,35	0,89	1,24	72,1
CD	37	19	Ventricolomegalia	1		0,70	2,44	3,14	77,7
DG	29	21	Cromosomopatia sbilanciata	2	M	0,48	0,86	1,34	64,2
CA	37	20	Sindrome da trisomia	2	M	0,60	1,00	1,60	62,6
PF	35	18	Trisomia 21	2	M	1,26	2,90	4,16	69,6
AA	38	22	Traslocazione bilanciata (t1,4,5)	2	M	0,73	1,72	2,45	70,2
LT	33	21	Trisomia 13	2	F	1,04	2,46	3,50	70,4
DT	39	19	Trisomia 13	2	M	0,82	1,52	2,34	65,1
DR	39	20	Trisomia 18	2	F	1,22	2,13	3,35	63,5
MJ	39	22	Trisomia 18	2	F	0,40	0,95	1,35	70,4
SD	40	18	Trisomia 18	2	F	0,42	0,85	1,27	67,0
SA	33	20	Trisomia 18	2	F	1,23	2,18	3,41	63,9
MV	40	23	trisomia 18	2	M	0,69	1,22	1,91	64,0
NNL	28	23	Trisomia 18	2	M	0,76	1,56	2,32	67,3
FL	37	17	Trisomia 18	2		1,18	2,25	3,43	65,7
BR	17	18	Trisomia 21	2	F	0,57	1,33	1,90	69,9
CV	40	19	Trisomia 21	2	F	1,24	2,34	3,58	65,3
CG	36	19	Trisomia 21	2	F	1,13	2,44	3,57	68,4
DS	40	22	Trisomia 21	2	F	0,46	1,06	1,52	69,7
GC	40	20	Trisomia 21	2	F	0,98	2,32	3,30	70,3
GL	38	14	Trisomia 21	2	F	1,02	1,78	2,80	63,5

IR	21	23	Trisomia 21	2	F	1,13	1,99	3,12	63,7
MP	20	21	Trisomia 21	2	F	0,97	1,67	2,64	63,3
PG	40	20	Trisomia 21	2	F	0,61	1,25	1,86	67,1
PV	36	22	Trisomia 21	2	F	0,49	0,94	1,43	65,7
RS	39	21	Trisomia 21	2	F	0,54	1,21	1,75	69,3
SN	37	20	Trisomia 21	2	F	0,94	1,96	2,90	67,7
UL	36	19	Trisomia 21	2	F	0,54	1,18	1,72	68,7
VR	35	45	Trisomia 21	2	F	1,52	2,50	4,02	62,2
ZC	34	18	Trisomia 21	2	F	1,15	2,54	3,69	68,8
BF	32	22	Trisomia 21	2	M	1,03	2,05	3,08	66,7
CL	37	21	Trisomia 21	2	M	0,53	1,28	1,81	70,6
GS	30	19	Trisomia 21	2	M	0,86	2,06	2,92	70,4
MG	39	19	Trisomia 21	2	M	0,37	0,89	1,26	70,6
NB	34	20	Trisomia 21	2	M	1,01	2,29	3,30	69,5
PC	40	18	Trisomia 21	2	M	0,71	1,24	1,95	63,8
FD	28	19	Trisomia 21	2		1,30	2,13	3,43	62,0
FS	40	19	Trisomia 21	2		1,12	2,60	3,72	69,9
GL	29	21	Trisomia 21	2		1,26	2,25	3,51	64,1
MG	39	19	Trisomia 21	2		0,50	0,89	1,39	64,2
MV	35	21	Trisomia 21	2		0,47	1,12	1,59	70,4
PR	40	19	Trisomia 21	2		1,40	2,33	3,72	62,5
PM	38	16	Trisomia 21	2		0,63	1,18	1,81	65,0
VM	40	21	Trisomia 21	2		1,54	2,69	4,23	63,7
AC	31	13	Trisomia 21+polimalformazione	2	M	0,52	1,10	1,62	67,8
VL	37	17	Trisomia 18+igromacistico	2	F	0,76	1,36	2,12	64,2
VI	17	19	Sindrome di Turner	2		0,66	1,47	2,13	68,8

DL	40	15	Sindrome di Turner	2		0,48	1,08	1,56	69,5
DG	33	21	Cardiopatía Complessa	3	F	0,44	1,17	1,61	72,8
VG	36	19	Cardiopatía complessa	3	M	0,37	0,87	1,24	70,4
SC	33	17	Malformazione cardiaca	3	M	0,23	0,76	0,99	76,4
LT	39	21	Tetralogia di Fallot	3		0,25	0,75	1,00	75,0
BE	34	22	Agenesia Renale	4	no	0,26	0,79	1,05	74,8
DB	40	16	Displasia renale	4		0,30	0,69	0,99	70,1
GF	27	17	Sindrome di Potter	4	F	0,52	1,22	1,74	70,1
SC	40	18	Malformaz Gemellare	5		0,34	1,12	1,46	76,5
CM	27	20	Plurimalformazione	5	F	0,27	0,95	1,22	78,2
RI	34	20	Plurimalformazione	5	F	0,34	0,94	1,28	73,5
CL	34	21	Plurimalformazione	5		0,35	0,83	1,18	70,3
GS	40	13	Plurimalformazione	5		0,44	1,12	1,56	71,8
NA	35	21	Plurimalformazione	5	F	0,26	0,88	1,14	76,9
PD	26	17	Fibrosi cistica	6		0,38	0,93	1,31	70,7
DF	24	18	Leucodistrofia di Kabbe	6	no	0,36	0,86	1,22	70,3
LBS	22	22	Sindrome di Ellis-Van-Creveld	6	F	0,30	0,86	1,16	74,4
DB	30	15	Talassemia Major	6		0,47	1,29	1,76	73,5
SM	32	13	Talassemia Major	6		0,38	1,10	1,48	74,5
RC	39	22	Osteodisplasia letale per ipoplasia toracica	7	M	0,24	0,85	1,09	78,2
GA	33	22	Osteogenesi imperfecta	7	no	0,51	1,21	1,72	70,2
AR	27	21	Sindrome di Budd-Chiari	8		0,43	1,33	1,76	75,7
CP	40	23	Ernia diaframmatica	8	M	0,49	1,32	1,81	73,1
RA	31	13	Idrope generalizzato	8	M	0,39	1,07	1,46	73,6
GG	36	15	Idrope diffusa	8	M	0,48	1,36	1,84	73,9
DS	25	19	Idrope fetale non immune	8		0,35	1,04	1,39	74,9

TE	35	23	Isomerismo cardio splenico	8	F	0,48	1,28	1,76	72,6
MV	30	21	Sindrome di Bochdalek	8	no	0,31	0,81	1,12	72,3
CA	27		Controllo	Controllo		0,29	1,67	2,15	77,8
CF	34		Controllo	Controllo		0,38	0,93	1,19	77,9
SM	36		Controllo	Controllo		0,42	2,72	3,52	77,2
AA	21		Controllo	Controllo		0,34	2,15	2,77	77,6
CM	39		Controllo	Controllo		0,24	2,60	3,37	77,2
SA	37		Controllo	Controllo		0,39	1,61	2,09	77,2
PM	21		Controllo	Controllo		0,50	2,62	3,37	77,7
VA	34		Controllo	Controllo		0,37	1,03	1,32	77,9
PS	34		Controllo	Controllo		0,42	1,16	1,48	78,2
NG	30		Controllo	Controllo		0,31	2,11	2,72	77,5
BLC	20		Controllo	Controllo		0,34	1,28	1,65	77,7
IM	29		Controllo	Controllo		0,22	0,92	1,19	77,2
CAV	30		Controllo	Controllo		0,36	2,62	3,35	78,3
TB	23		Controllo	Controllo		0,33	1,90	2,46	77,2
MA	38		Controllo	Controllo		0,26	0,92	1,19	77,4
LA	22		Controllo	Controllo		0,49	2,04	2,61	78,3
RV	36		Controllo	Controllo		0,36	1,48	1,89	78,5
CE	28		Controllo	Controllo		0,46	1,97	2,55	77,4
BR	33		Controllo	Controllo		0,41	2,33	3,02	77,2
MD	30		Controllo	Controllo		0,26	2,53	3,25	77,8
LT	31		Controllo	Controllo		0,37	1,13	1,44	78,4
HVL	27		Controllo	Controllo		0,44	1,11	1,42	77,9
OL	39		Controllo	Controllo		0,47	1,69	2,17	77,7
PM	30		Controllo	Controllo		0,25	2,38	3,06	77,7

JDM	24		Controllo	Controllo		0,30	1,98	2,56	77,3
SD	31		Controllo	Controllo		0,30	1,87	2,38	78,4
BR	39		Controllo	Controllo		0,47	2,71	3,49	77,7
LJ	26		Controllo	Controllo		0,50	1,53	1,95	78,5
RS	42		Controllo	Controllo		0,41	1,04	1,33	78,0
MA	40		Controllo	Controllo		0,29	1,35	1,74	77,4
LS	38		Controllo	Controllo		0,31	2,70	3,44	78,5
SF	22		Controllo	Controllo		0,30	1,31	1,68	77,8
PO	41		Controllo	Controllo		0,48	2,37	3,06	77,6
OM	38		Controllo	Controllo		0,41	2,30	2,95	77,9
SY	33		Controllo	Controllo		0,41	1,95	2,52	77,5
CG	32		Controllo	Controllo		0,39	1,16	1,49	77,6
GG	26		Controllo	Controllo		0,23	2,16	2,76	78,1
MI	28		Controllo	Controllo		0,33	1,53	1,98	77,4
GF	28		Controllo	Controllo		0,37	2,08	2,68	77,6
DA	35		Controllo	Controllo		0,34	1,61	2,08	77,6
AG	25		Controllo	Controllo		0,29	2,53	3,24	78,0
DF	36		Controllo	Controllo		0,46	1,74	2,23	77,9
SS	23		Controllo	Controllo		0,37	2,24	2,89	77,4
BV	37		Controllo	Controllo		0,43	2,28	2,93	77,8
NM	35		Controllo	Controllo		0,44	2,38	3,07	77,4
RG	25		Controllo	Controllo		0,30	2,19	2,80	78,2
PG	38		Controllo	Controllo		0,44	2,70	3,48	77,6
SA	30		Controllo	Controllo		0,30	1,36	1,74	78,3
NR	42		Controllo	Controllo		0,26	1,66	2,12	78,1
DL	32		Controllo	Controllo		0,22	1,16	1,49	78,0

## BIBLIOGRAFIA

Abad MC, Askari H, O'Neill J, Klinger AL, Milligan C, Lewandowski F, Springer B, Spurlino J, Rentzeperis D (2008) *J Steroid Biochem Mol Biol*. Structural determination of estrogen-related receptor gamma in the presence of phenol derivative compounds. 108:44 – 54.

Alonso-Magdalena P, Laribi O, Ropero AB, Fuentes E, Ripoll C, Soria B, Nadal A (2005) *Environ Health Perspect*. Low doses of bisphenol A and diethylstilbestrol impair Ca<sup>2+</sup> signals in pancreatic alpha-cells through a nonclassical membrane estrogen receptor within intact islets of Langerhans. 113:969 – 977.

Alonso-Magdalena P, Ropero AB, Soriano S et al. Bisphenol-A: a new diabetogenic factor? *Hormones (Athens)*. 2010;9:118-26.

American Society for Reproductive Medicine. Evaluation and treatment of recurrent pregnancy loss: a committee opinion. *Fertil Steril* 2012;98:1103-11

Annual report 2011 (2009 data) - The Annual Report of the ICBDSR is edited by the International Clearinghouse Centre for Birth Defects.

Barker DJ. The developmental origins of adult disease. *Eur J Epidemiol* 2003;18:733- 736.

Beker-van Woudenberg AR, van Tol HT, Roelen BA, Colenbrander B, Bevers MM. Estradiol and its membrane-impermeable conjugate (estradiol-bovine serum albumin) during in vitro maturation of bovine oocytes: effects on nuclear and cytoplasmic maturation, cytoskeleton, and embryo quality. *Biol Reprod* 2004;70:1465–1474.

Benachour N, Moslemi S, Sipahutar H, Seralini GE (2007) *Toxicol Appl Pharmacol*. Cytotoxic effects and aromatase inhibition by xenobiotic endocrine disrupters alone and in combination. 222:129 – 140.

Bonefeld-Jorgensen EC, Long M, Hofmeister MV, Vinggaard AM (2007) *Environ Health Perspect*. Endocrine-disrupting potential of bisphenol A, bisphenol A

dimethacrylate, 4-n-nonylphenol, and 4-n-octylphenol in vitro: new data and a brief review. 115 Suppl 1:69 – 76.

Borgioli A. L'inquinamento ambientale da sostanze nocive per il sistema ormonale: i distruttori endocrini (endocrine disruptors, EDs). *Ig Sanita Pubbl* 2000, LVI 3-4: 263-272.

Borrelli AI (ed) (1996) Studio retrospettivo sulla patologia fetale malformativa occorsa nell'ultimo quinquennio presso la Clinica Ginecologica e Ostetrica della Seconda Università di Napoli. Atti del VI Congresso Nazionale Società Italiana di Medicina Perinatale. Spoleto 3-6 giugno 1996.

Braun JM, Yolton K, Dietrich KN, Hornung R, Ye X, Calafat AM, Lanphear BP. Prenatal bisphenol A exposure and early childhood behavior. *Environ Health Perspect*. 2009 Dec.

Brent RL (1983) The effect of embryonic and fetal exposure to X-ray, microwaves, and ultrasound. *Clin Obstet Gynecol* 26:484-510.

Brent RL. The cause and prevention of human birth defects: what have we learned in the past 50 years? *Congenit Anom (Kyoto)* 2001;41:3-21.

Chapin RE, Adams J, Boekelheide K, Gray LE, Jr., Hayward SW, Lees PS, McIntyre BS, Portier KM, Schnorr TM, Selevan SG, Vandenberg JG, Woskie SR (2008) Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol. NTP-CERHR Expert Panel Report on the Reproductive and Developmental Toxicity of Bisphenol A. 83:157 – 395.

Chouhan S., Yadav S.K., Prakash J. et al. Effect of Bisphenol A on human health and its degradation by microorganisms: a review. *Ann Microbiol* 2013 DOI 10.1007/s13213-013-0649-2

Corsello G, Giuffrè M. Congenital malformations. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2012;25 Suppl 1:25-9.

Cox KH, Gatewood JD, Howeth C, Rissman EF. 2010. Gestational exposure to bisphenol A and cross-fostering affect behaviors in juvenile mice. *Horm Behav* 58(5):754–761.

De Coster S, van Larebeke N. Endocrine-disrupting chemicals: associated disorders and mechanisms of action. *J Environ Public Health* 2012;2012:713696.

Della Seta D, Minder I, Belloni V, Aloisi AM, Dessi-Fulgheri F, Farabollini F (2006) *Horm Behav*. Pubertal exposure to estrogenic chemicals affects behavior in juvenile and adult male rats. 50:301 – 307.

Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon JP, Giudice LC, Hauser R, Prins GS, Soto AM, Zoeller RT, Gore AC. Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocr Rev*. 2009 Jun;30(4):293-342. doi: 10.1210/er.2009-0002.

Dolk H, Vrijheid M, Armstrong B, et.al. Risk of congenital anomalies near hazardous-waste landfill sites in Europe: the Eurohazcon study. *Lancet*, 1998; 352:423-427.

Domoradzki JY, Thornton CM, Pottenger LH, Hansen SC, Card TL, Markham DA, Dryzga MD, Shiotsuka RN, Waechter JM, Jr. (2004) *Toxicol Sci*. Age and dose dependency of the pharmacokinetics and metabolism of bisphenol A in neonatal Sprague-Dawley rats following oral administration. 77:230 – 242.

Engel SM, Levy B, Liu Z, Kaplan D, Wolff MS (2006) *Reprod Toxicol*. Xenobiotic phenols in early pregnancy amniotic fluid. 21:110 – 112.

Eurocat report 8: Surveillance of fetal anomalies in Europe 1980 1999. Eurocat central registry, University of Ulster, Northern Ireland 2002.

European Workshop on the Impact of Endocrine Disrupters on Human Health and Wildlife, 1996.

European-Union (2008) Updated European Risk Assessment Report 4,4'-Isopropylidenediphenol (bisphenol-A). Environment Addendum of February 2008 (to be read in conjunction with published EU RAR of Bisphenol A, 2003).

Fernando J., Arena P., Smith DW (1978) Sex liability to single structural defects. *Am J. Dis. Child* 132 p. 970 -972.

Frias JL, Gilbert-Barness E. Human teratogens: current controversies. *Advanc Pediat* 2008;55:171-211.

Gilbert SF., *Developmental Biology*, 7th ed. Sinauer Associates, Sunderland, 2003.

Golub MS, Wu KL, Kaufman FL, Li LH, Moran-Messen F, Zeise L, Alexeeff GV, Donald JM. Bisphenol A: developmental toxicity from early prenatal exposure. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol.* 2010;89:441-66.

Gupta C. Reproductive malformation of the male offspring following maternal exposure to estrogenic chemicals. *Proc Soc Exp Biol Med.* 2000 Jun;224(2):61-8.

Guzick DS, Swan S. The decline of infertility: apparent or real? *Fertil Steril* 2006;86:524–526.

Hamilton BE, Ventura SJ. Fertility and abortion rates in the United States, 1960–2002. *Int J Androl* 2006;29:34–45.

Hines RN (2008) *Pharmacol Ther.* The ontogeny of drug metabolism enzymes and implications for adverse drug events. 118:250 – 267.

Hoekstra & Simoneau: Release of Bisphenol A from Polycarbonate—A Review, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2013 53:4, 386-402.

International Program Of Chemical Safety, 2002.

Itoh H, Iwasaki M, Hanaoka T, Sasaki H, Tanaka T, Tsugane S (2007) *Environ Health Prev Med.* Urinary bisphenol-A concentration in infertile Japanese women and its association with endometriosis: A cross-sectional study. 12:258 – 264.

Kalter H and Warkany J. Congenital Malformations – Etiologic factors and their role in prevention (First of two parts). *N Engl J Med.* 1983; 308: 424-431.

Kamrin MA. The low dose hypothesis: validity and implications for human risk. *International Journal of Toxicology* 2007;26:13–23.

Kang J, Kondo F, Katayama Y: Human exposure to bisphenol A. *Toxicology* 2006, 226:79–89.

Kim K., Son T.G., Kim S.J., Kim H.S., Kim T.S., Han S.Y., Lee J. Suppressive effects of bisphenol A on the proliferation of neural progenitor cells. *J Toxicol. Environ. Health A.*, 2007; 70:1288-1295

Kosarac I, Kubwabo C, Lalonde K, Foster W. A novel method for the quantitative determination of free and conjugated bisphenol A in human maternal and umbilical cord blood serum using a two-step solid phase extraction and gas chromatography/tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2012 Jun1;898:90-4. doi: 10.1016/j.jchromb.2012.04.023. Epub 2012 Apr 25.

Kruger T, Long M, Bonefeld-Jorgensen EC (2008) *Toxicology*. Plastic components affect the activation of the aryl hydrocarbon and the androgen receptor. 246:112 – 123.

Kubo K, Arai O, Omura M, Watanabe R, Ogata R, Aou S. Low dose effects of bisphenol A on sexual differentiation of the brain and behavior in rats. *Neurosci Res.* 2003 Mar;45(3):345-56.

Kuroda N, Kinoshita Y, Sun Y, Wada M, Kishikawa N, Nakashima K, Makino T, Nakazawa H (2003) *J Pharm Biomed Anal.* Measurement of bisphenol A levels in human blood serum and ascitic fluid by HPLC using a fluorescent labeling reagent. 30:1743 – 1749.

Le HH, Carlson EM, Chua JP, Belcher SM (2008) *Toxicol Lett.* Bisphenol A is released from polycarbonate drinking bottles and mimics the neurotoxic actions of estrogen in developing cerebellar neurons. 176:149 – 156.

Lee MM. *Endocrine Disrupters. A Current Review of Pediatric Endocrinology* 2007;109-118.

Lopez-Espinosa MJ, Granada A, Araque P, Molina-Molina JM, Puertollano MC, Rivas A, Fernandez M, Cerrillo I, Olea-Serrano MF, Lopez C, Olea N (2007) *Food Addit Contam.* Oestrogenicity of paper and cardboard extracts used as food containers. 24:95 – 102.

Lozano, R. "Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010.". *Lancet*, 2012 Dec 15.

Lubinsky MS (1997) Classifying sex biased fetal anomalies. *Am J. Med Genet.* 69 p. 225-228.

Machtiger R, Combelles CM, Missmer SA, Correia KF, Williams P, Hauser R, Racowsky C. Bisphenol-A and human oocyte maturation in vitro. *Hum Reprod.* 2013 Oct;28(10):2735-45. doi: 10.1093/humrep/det312. Epub 2013 Jul 30.

Maffini MV, Rubin BS, Sonnenschein C, Soto AM. Endocrine disruptors and reproductive health: the case of bisphenol-A. *Mol Cell Endocrinol.* 2006 Jul 25;254-255:179-86. Epub 2006 Jun 15.

Marino B., Dallapiccola B., Mastroiacovo P. (1995) Cardiopatie congenite e sindromi genetiche: una valutazione critica. *Prospettive in pediatria* 24:227-233.

Markey CM, Wadia PR, Rubin BS, Sonnenschein C, Soto AM. Long-term effects of fetal exposure to low doses of the xenoestrogen bisphenol-A in the female mouse genital tract. *Biol Reprod.* 2005 Jun;72(6):1344-51. Epub 2005 Feb 2.

Mastroiacovo P (1993) Epidemiologia e prevenzione dei difetti del tubo neurale. *Editeam Simposia* 133-178.

Matsumoto J, Yokota H, Yuasa A. Developmental increases in rat hepatic microsomal UDP-glucuronosyltransferase activities toward xenoestrogens and decreases during pregnancy. *Environ Health Perspect* 2002;110:193-196.

Matsushima A, Kakuta Y, Teramoto T, Koshiba T, Liu X, Okada H, Tokunaga T, Kawabata S, Kimura M, Shimohigashi Y (2007) *J Biochem.* Structural evidence for endocrine disruptor bisphenol A binding to human nuclear receptor ERR gamma. 142: 517 - 524.

Matthews JB, Twomey K, Zacharewski TR. In vitro and in vivo interactions of bisphenol A and its metabolite, bisphenol A glucuronide, with estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$ . *Chemical Research in Toxicology*, 2001;14:149-157.

Miao M, Yuan W, Zhu G, He X, Li DK. 2011. In utero exposure to bisphenol-A and its effects on birth weight of offspring. *Reprod Toxicol* 32:64-68.

Moriyama K, Tagami T, Akamizu T, Usui T, Saijo M, Kanamoto N, Hataya Y, Shimatsu A, Kuzuya H, Nakao K (2002) *J Clin Endocrinol Metab.* Thyroid hormone action is disrupted by bisphenol A as an antagonist. 87:5185 – 5190.

Morrissey RE, George JD, Price CJ, Tyl RW, Marr MC, Kimmel CA (1987) *Fundam Appl Toxicol.* The Developmental Toxicity of bisphenol A in Rats and Mice. 8: 571 – 582.

Murray TJ, Maffini MV, Ucci AA, Sonnenschein C, Soto AM (2007) *Reprod Toxicol.* Induction of mammary gland ductal hyperplasias and carcinoma in situ following fetal bisphenol A exposure. 23:383 – 390.

N. Heldring, A. Pike, S. Andersson, J. Matthews, G. Cheng, J. Hartman, et al., Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets, *Physiol. Rev.* 87 (3) (2007) 905–931.

Nadal A, Ropero AB, Fuentes E, Soria B, Ripoll C (2004) *Steroids.* Estrogen and xenoestrogen actions on endocrine pancreas: from ion channel modulation to activation of nuclear function. 69:531 – 536.

Nakamura K, Itoh K, Sugimoto T, Fushiki S. Prenatal exposure to bisphenol A affects adult murine neocortical structure. *Neurosci Lett.* 2007 Jun 13;420(2):100-5. Epub 2007 Mar 25.

Nakamura K, Itoh K, Yaoi T, Fujiwara Y, Sugimoto T, Fushiki S. Murine neocortical histogenesis is perturbed by prenatal exposure to low doses of Bisphenol A. *J Neurosci Res.* 2006 Nov 1;84(6):1197-205.

Negishi T, Kawasaki K, Suzaki S, Maeda H, Ishii Y, Kyuwa S, Kuroda Y, Yoshikawa Y (2004) *Environ Health Perspect.* Behavioral alterations in response to fear-provoking stimuli and tranylcypromine induced by perinatal exposure to bisphenol A and nonylphenol in male rats. 112: 1159 – 1164.

NTP (1985) Bisphenol A: reproduction and fertility assessment in CD-1 mice when administered in the feed. NTP-85-192. Research Triangle Park, NC.

Padmanabhan V, Siefert K, Ransom S, Johnson T, Pinkerton J, Anderson L, Tao L, Kannan K (2008) *J Perinatol*. Maternal bisphenol-A levels at delivery: a looming problem? 28:258 – 263.

Pagano M., (1988) *La prescrizione dei farmaci in gravidanza. Guida alla valutazione del rischio genetico*. McGraw Hill, Milano.

Papaleo B., Caporossi L., De Rosa M., et al. Esposizione professionale a distruttori endocrini: stato dell'arte. *G Ital Med Lav Erg* 2004; 26:3, 171-179.

Paris F, Balaguer P, Terouanne B, Servant N, Lacoste C, Cravedi JP, Nicolas JC, Sultan C (2002) *Mol Cell Endocrinol*. Phenylphenols, biphenols, bisphenol-A and 4-tert-octylphenol exhibit alpha and beta estrogen activities and antiandrogen activity in reporter cell lines. 193:43 – 49.

Phillips KP, Foster WG. Key developments in endocrine disrupter research and human health. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 2008;11:322-344.

Pirastu R., Ancona C., Iavarone I., Mitis F., Zona A., Comba P., Mortality study of residents in Italian polluted sites: evaluation of the epidemiological evidence, *Epidemiol Prev* 2010.

Poimenova A, Markaki E, Rahiotis C, Kitraki E. Corticosterone-regulated actions in the rat brain are affected by perinatal exposure to low dose of bisphenol A. *Neuroscience* 2010.

Purvis-Smith SG, Saville T, Manass S et al (1992) Uniparental disomy 15 resulting from "correction" of an initial trisomy 15. *Am J Hum Genet* 50:1348-1349

R.L. Jirtle, M.K. Skinner, Environmental epigenomics and disease susceptibility, *Nat. Rev. Genet.* 8 (4) (2007) 253–262.

R.R. Newbold, E. Padilla-Banks, R.J. Snyder, T.M. Phillips, W.N. Jefferson, Developmental exposure to endocrine disruptors and the obesity epidemic, *Reprod. Toxicol.* 23 (3) (2007) 290–296.

R.R. Newbold, E. Padilla-Banks, W.N. Jefferson, Adverse effects of the model environmental estrogen diethylstilbestrol are transmitted to subsequent gen-

erations, *Endocrinology* 147 (Suppl. 6) (2006) S11–S17.

Ryan BC, Vandenberg JG (2006) *Horm Behav.* Developmental exposure to environmental estrogens alters anxiety and spatial memory in female mice. 50:85 – 93.

Sathyanarayana S, Braun JM, Yolton K, Liddy S, Lanphear BP. Case report: high prenatal bisphenol a exposure and infant neonatal neurobehavior. *Environ Health Perspect.* 2011 Aug;119(8):1170-5. doi: 10.1289/ehp.1003064. Epub 2011 Apr 21.

Savva GM, Walker K, Morris JK, The maternal age-specific live birth prevalence of trisomies 13 and 18 compared to trisomy 21 (Down syndrome), *Prenat Diagn.* 2010 Jan; 30(1):57-64.

Schug TT, Janesick A, Blumberg B, Heindel JJ. Endocrine disrupting chemicals and disease susceptibility. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2011;127:204-15.

Shelby MD. NTP-CERHR monograph on the potential human reproductive and developmental effects of bisphenol A. NTP CERHR MON. 2008 Sep;(22):v, vii-ix, 1-64 passim.

Singh S, Li SS. Epigenetic effects of environmental chemicals bisphenol A and phthalates. *Int J Mol Sci.* 2012;13:10143-53.

Snijder CA, Heederik D, Pierik FH, Hofman A, Jaddoe VW, Koch HM, Longnecker MP, Burdorf A. Fetal growth and prenatal exposure to bisphenol A: the generation R study. *Environ Health Perspect.* 2013 Mar;121(3):393-8. doi: 10.1289/ehp.1205296. Epub 2012 Dec 21.

Soriano, S. et al. Rapid insulinotropic action of low doses of bisphenol-A on mouse and human islets of Langerhans: role of estrogen receptor  $\beta$ . *PLoS ONE* 72012, e31109.

Spranger J, et al. Errors in morphogenesis: Concepts and terms. *J Pediatr* 1982; 100: 160–65.

Sugiura – Ogasawara M, Ozaki Y, Sonta S, Makino T, Suzumori K (2005) *Hum Reprod.* Exposure to bisphenol A is associated with recurrent miscarriage. 20: 2325 – 2329.

Suiko M, Sakakibara Y, Liu MC (2000) *Biochem Biophys Res Commun*. Sulfation of environmental estrogen-like chemicals by human cytosolic sulfotransferases. 267: 80 – 84.

Suk WA, Murray K, Avakian MD. Environmental hazards to children's health in the modern world. *Mutat Res* 2003;544:235- 242.

Takeuchi T, Tsutsumi O (2002) *Biochem Biophys Res Commun*. Serum bisphenol A concentrations showed gender differences, possibly linked to androgen levels. 291:76 – 78.

Takeuchi T, Tsutsumi O, Ikezuki Y, Takai Y, Taketani Y (2004) *Endocr J*. Positive relationship between androgen and the endocrine disruptor, bisphenol A, in normal women and women with ovarian dysfunction. 51:165 – 169.

Tanabe N., Yoshino H., Kimoto T., Hojo Y., Ogiue-Ikeda M., Shimohigashi Y., Kawato S.: Nanomolar dose of bisphenol A rapidly modulates spinogenesis in adult hippocampal neurons. *Mol Cell Endocrinol.*, 2012; 351:317-325

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

Tian Y, Baek J, Lee S, Jang C. Prenatal and postnatal exposure to bisphenol a induces anxiolytic behaviors and cognitive deficits in mice. *Synapse*. 2010; 6 :432–439.

Timms BG, Howdeshell KL, Barton L, Bradley S, Richter CA, vom Saal FS (2005) *Proc Natl Acad Sci U S A*. Estrogenic chemicals in plastic and oral contraceptives disrupt development of the fetal mouse prostate and urethra. 102: 7014 – 7019.

Tyl R, Myers CB, Marr MC. Abbreviated one-generation study of dietary bisphenol A (Bisphenol A) in CD-1® (Swiss) mice. In. Research Triangle Park, NC: RTI (sponsored by the Society of the Plastics Industry, Inc.); 2002.

Tyl RW, Myers CB, Marr MC, Sloan CS, Castillo NP, Veselica MM, Seely JC, Dimond SS, Van Miller JP, Shiotsuka RN, Beyer D, Hentges SG, Waechter JM, Jr.

(2008) *Toxicol Sci.* Two-generation reproductive toxicity study of dietary bisphenol A (Bisphenol A) in CD-1(R) (Swiss) mice. 104:362 – 384.

[Unüvar T](#), [Büyükgebiz A](#). Fetal and neonatal endocrine disruptors. *J Clin Res Pediatr Endocrinol.* 2012;4:51-60.

Vandenberg LN, Colborn T, Hayes TB, Heindel JJ, Jacobs DR, Lee D-H, et al. Hormones and endocrine disrupting chemicals: low dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocrine Reviews* 2012;33:378–455.

Vandenberg LN, Hauser R, Marcus M, Olea N, Welshons WV. Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reprod Toxicol* 2007;24:139- 177.

Vandenberg, L.N., Chahoud, I., Heindel, J.J. et al. Urinary, circulating, and tissue biomonitoring studies indicate widespread exposure to bisphenol A. *Environ. Health Perspect.* 2010;118, 1055–1070.

Vom Saal, F. S., Nagel, S. C., Coe, B. L., Angle, B. M. & Taylor J. A. The estrogenic endocrine disrupting chemical bisphenol A (BPA) and obesity. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2012; 354, 74–84.

Wang MH, Baskin LS. Endocrine disruptors, genital development, and hypospadias. *J Androl* 2008;29:499-505.

Welshons WV, Nagel SC, vom Saal FS (2006) Large effects from small exposures III Endocrine mechanisms mediating effects of BPA at levels of human exposure. *Endocrinology* 147:56–69.

Wetherill YB, Petra, C. E., Monk, K. R., Puga, A. and Knudsen, K. E. (2002) *Mol Cancer Ther.* The xenoestrogen bisphenol A induces inappropriate androgen receptor activation and mitogenesis in prostate adenocarcinoma cells. 1:515 – 524.

Wilson JG. Current status of teratology. General principles and mechanisms derived from animal studies. In: *Handbook of Teratology* (Wilson JG, Fraser FC, Eds), Plenum Press, New York, 1977; vol 1, pp 147-174.

Wilson NK, Chuang JC, Morgan MK et al. . An observational study of the potential exposures of preschool children to pentachlorophenol, bisphenol-A, and nonylphenol at home and daycare. *Environ Res.* 2007;103:9-20.

Wolff M, Engel S, Berkowitz G, Ye X SM, Zhu C, Wetmur J, Calafat A (2008) Environ Health Perspect. Prenatal phenol and phthalate exposures and birth outcomes 116:1092 – 1097.

World Health Organization. World health Report 1998. Geneva: WHO, 1998; 43-47.

Yamada H, Furuta I, Kato EH, Kataoka S, Usuki Y, Kobashi G, Sata F, Kishi R, Fujimoto S (2002) Reprod Toxicol. Maternal serum and amniotic fluid bisphenol A concentrations in the early second trimester. 16:735 – 739.

Yang M, Kim SY, Chang SS, Lee IS, Kawamoto T (2006) Environ Mol Mutagen. Urinary concentrations of bisphenol A in relation to biomarkers of sensitivity and effect and endocrine-related health effects. 47:571 – 578.

## **SECONDA LINEA DI STUDIO – CAPITOLO I**

### ***ORGANOCLORINE E CANCRO ENDOMETRIALE***

#### **Abstract**

E' stato ipotizzato che persistenti inquinanti ambientali come il diclorodifeniltricloroetano (DDT) e il bifenile policlorinato (PCB) possa aumentare il rischio di tumore al seno, almeno parzialmente attraverso un effetto estrogenico.

Poichè l'endometrio è più sensibile alla stimolazione estrogenica rispetto al seno, un effetto carcinogenico dovrebbe essere più pronunciato appunto a livello endometriale che al seno. Con uno studio caso-controllo, abbiamo misurato le concentrazioni sieriche di 10 pesticidi clorinati e 10 congeneri del PCB in 154 casi di carcinoma endometriale e 205 controlli.

Informazioni riguardo eventuali fattori di confondimento sono state ottenute tramite questionari.

Abbiamo usato la regressione statistica per calcolare l'Odd Ratio (OR), come misure del rischio relativo. Abbiamo effettuato analisi per concentrazioni aggiustate per lipidi di ciascuna singola sostanza e poi delle sostanze raggruppate a seconda del loro ipotizzato effetto

ormonale.

Noi non abbiamo ritrovato nessuna associazione significativa tra aumentati livelli di pesticidi o di esposizione al PCB e il rischio di cancro endometriale.

L'Odd ratio multivariato era 1.0 (intervallo di confidenza 95%, 0,6-2.0; *P* per trend, 0.78) per il più alto comparato con il più basso quartile di diclorodifeniltricloroetilene (DDE), il predominante metabolita del diclorodifenildicloroetano (DDT).

Gli Odd ratio corrispondenti erano 1.0 per l'esaclorobenzene, 0.9 per il beta-esaclorocicloesano, 1.4 per l'ossiclordano, e 1.2 per il trans-naacloro. L'analisi delle sostanze raggruppate per l'ipotizzato effetto ormonale inoltre non ha mostrato associazioni con il rischio di cancro endometriale. Per tutti i composti estrogenici, l'OR per il più alto comparato con il più basso quartile era 1.1 (intervallo di confidenza del 95%, 0.6-2.2; *P* per trend, 0.90). I nostri dati non supportano l'ipotesi che l'esposizione alle organoclorine studiate aumenti il rischio di cancro endometriale.

## **INTRODUZIONE**

La preoccupazione che gli inquinanti ambientali come le organoclorine presenti negli alimenti possano essere tra gli agenti responsabili dell'insorgenza di cancro nell'uomo è molto diffusa (1). La teoria

secondo la quale gli effetti cancerogeni proverrebbero dal debole effetto estrogenico posseduto da alcune organoclorine è stata testata quasi esclusivamente in studi epidemiologici di tumore al seno con risultati contrastanti. Infatti sebbene alcuni studi relativamente piccoli supportino l'ipotesi (2-7), due più ampi studi prospettici accuratamente condotti (8-9) e almeno tre studi caso-controllo (10-12) recentemente pubblicati non hanno mostrato nessuna convincente associazione tra l'esposizione alle organoclorine (prevalentemente DDT o PCB) e rischio di sviluppare cancro al seno.

Nonostante le nuove evidenze rassicuranti a riguardo, la preoccupazione pubblica continua, come la ricerca scientifica ad essere focalizzata soprattutto sul tumore al seno.

Comunque, se se si prende in considerazione l'ipotesi che alcune organoclorine intervengono nella patogenesi del cancro al seno attraverso meccanismi estrogenici, appare evidente come gli effetti di tali molecole possano essere rinvenuti anche a livello endometriale. Mentre il rischio di cancro mammario è influenzato minimamente dagli estrogeni orali, il rischio di cancro endometriale aumenta marcatamente già dopo appena pochi anni di assunzione (13-14).

Al momento attuale, pochi sono gli studi che hanno valutato l'associazione tra organoclorine e il rischio di sviluppare cancro dell'endometrio, e i risultati sono stati negativi (15).

Per testare l'ipotesi che elevate concentrazioni ematiche di organoclorine specifiche possano essere associate con un rischio di cancro endometriale, abbiamo portato avanti uno studio su 10 pesticidi organoclorine e 10 congeneri del PCB.

## **MATERIALI e METODI**

### **Arruolamento e popolazione in studio**

Per la realizzazione di questo studio pilota caso-controllo (*donne con cancro dell'endometrio vs. donne sane*) sono state arruolate donne, afferenti alle strutture di:

- *Dipartimento di Scienze Ostetrico-Ginecologiche, Urologiche e Medicina della Riproduzione* dell'Università Federico II di Napoli
- *Dipartimento di Ostetricia e Ginecologia* Ospedale San Lorenzo – Valdagno (VI)
- *Dipartimento di Ostetricia e Ginecologia* Ospedale G.Fracastoro - San Bonifacio (VR)

Il periodo di arruolamento è stato compreso tra il 30 maggio 2011 ed il 10 gennaio 2013.

L'arruolamento è stato preceduto da un colloquio informativo, finalizzato ad illustrare gli obiettivi e le modalità di svolgimento del Progetto, che ha preceduto la sottoposizione del consenso informato.

Sono state arruolate solo le pazienti che abbiano fornito un consenso informato scritto.

Noi assumiamo che l'assunzione di organoclorine attraverso l'ingestione di alimenti probabilmente contaminati dovrebbe essere più alto in Campania che altrove in Italia. Nel gruppo dei CASI sono state incluse donne nate in Campania, senza pregressa isterectomia, senza precedente diagnosi di cancro al seno o familiarità per lo stesso, normopeso e che non avevano mai assunto terapia sostitutiva ormonale (eccetto estriolo topico, dienestrol, o estradiolo); l'uso di tali composti potrebbe mascherare l'effetto di sostanze con effetti similormonali meno potenti, come i composti organoclorine.

Tutte le donne incluse nello studio presentavano diagnosi tumore endometriale istologicamente confermato al momento dell'arruolamento.

Da un numero iniziale di 180 casi 176 volontariamente hanno donato campioni di sangue e hanno completato il questionario dello studio; 4 pazienti si sono rifiutati di partecipare. 18 casi sono stati esclusi perchè hanno usato terapia sostitutiva ormonale, lasciando 154 casi nello studio.

I controlli sono stati reclutati dalle stesse aree geografiche dei casi.

Il periodo di reclutamento dei controlli è coinciso con quello dei casi.

Di 322 donne controllo selezionate, il 75,3%) ha risposto al questionario dello studio, e 492 (66,3%) ha anche donato campioni di sangue.

Dopo l'esclusione di 287 donne a causa di una pregressa isterectomia (n=46) o l'uso di terapia sostitutiva ormonale (n=241), 205 donne controllo sono state incluse nello studio.

I soggetti che sono stati esclusi (a causa del rifiuto a donare un campione di sangue, una pregressa isterectomia, o l'uso di terapia sostitutiva ormonale) non differivano significativamente da quelli che sono stati inclusi nello studio in termini di età e BMI (ovvero, le principali variabili associate con i pesticidi e i livelli di PCB).

Il questionario autocompilato richiedeva informazioni sul peso, l'altezza, storia riproduttiva, dieta, uso di ormoni, fumo, attività fisica e storia medica, tra le altre.

Le informazioni mancanti – principalmente dettagli sulle date di utilizzo e le marche degli ormoni assunti come contraccettivi orali e terapia sostitutiva ormonale – sono state ottenute da un'ulteriore intervista telefonica nel 50% dei casi e dei controlli.

Il Comitato Etico locale ha approvato il disegno dello studio.

**Campioni di sangue.** I campioni di sangue delle donne del gruppo dei CASI sono stati prelevati a digiuno prima di qualsiasi trattamento

antitumorale ed effettuati presso il DH del reparto di ginecologia dei suddetti ospedali. I campioni delle donne appartenenti al gruppo dei CONTROLLI invece sono stati prelevati in corso di comune visita ginecologica ambulatoriale. Il siero è stato separato entro 2 ore dalla raccolta e congelato a -20°C fino alla consegna al laboratorio deputato all'analisi.

**Analisi dei Composti Orgaoclorati nel siero umano.** Dalla porzione lipidica dei campioni di sangue prelevati abbiamo analizzato 10 pesticidi organoclorati e 10 congeneri PCB (tabella 2) scelti a priori sulla base della loro probabilità di presenza nella catena alimentare.

Il metodo è stato descritto in dettaglio in Atuma e Aune (17). Campioni di sangue (4g) sono stati mixati con metanolo e un mix di standard interni è stato aggiunto per assicurare il controllo di qualità.

I campioni sono stati poi estratti tre volte con n-esano-dietiletere (1:1). Dopo evaporazione dei solventi, il contenuto di grassi è stato determinato con analisi gravimetrica.

Il grasso è stato dissolto nuovamente in n-esano e trattato con acido solforico concentrato.

I congeneri PCB sono stati separati dalla mole dei pesticidi clorinati tramite eluzione attraverso una colonna di gel silice (4.5 g di gel silice deattivato con acqua al 3%). La prima frazione, contenente i congeneri

PCB, HCB e p,p'-DDE, è stata diluita con circa 30 ml di n-esano, e la seconda frazione, contenente principalmente pesticidi clorinati, è stata diluita con 40 ml di una miscela di n-esano-dietile etere (3:1).

L'analisi delle due frazioni è stata effettuata con un cromatografo a gas con doppia colonna capillare e detector a captazione elettronica ( $^{63}\text{Ni}$ ). Le colonne erano di differenza polarità per facilitare l'identificazione degli analiti, che era basata sui tempi di ritenzione relativi agli standard interni. La quantificazione è stata effettuata usando curve di calibrazione multilivello ottenute tramite iniezione di soluzioni standard di almeno tre differenti concentrazioni.

Il LOD è stato determinato come il 3 SD sopra il valore del bianco e variava tra 1 e 7 pg/g sierici (non aggiustata per lipidi) per i congeneri PCB e tra 2 e 7 pg/g sierici per i pesticidi clorinati.

Campioni con concentrazioni di LOD 3 SD sopra il bianco hanno il 99% di probabilità di essere non-zero. Per aumentare questa probabilità, i limiti quantitativi sono stati settati a livelli più alti che i LOD. In questo caso, la concentrazione standard più bassa è stata usata: 10 pg/g sierici per i congeneri PCB, isomeri HCH e clorodani; 20 pg/g per p,p'-DDD, e p,p'-DDT e o, p'-DDT; 50 pg/g per HCB; e 200 pg/g per p,p'-DDE. La riproducibilità del metodo è stata dimostrata da 21 determinazioni replicate usando un campione sierico di controllo incluso tra i gruppi analitici durante il corso dello studio.

Le concentrazioni medie dei congeneri PCB varia tra i 10 pg/g sierici (alfa-HCH, g-HCH, p,p'-DDD e o,p'-DDD) a 5260 pg/g sierici (p,p'-DDE).

I coefficienti di variazione erano <13% per la maggior parte dei composti eccetto per i congeneri PCB CB 28 (22%) e CB 105 (20%). Il coefficiente di variazione per contenuto di grasso era il 4%.

La possibilità di eliminazione di alcuni dei composti durante il passaggio dell'evaporazione è stato studiato in un esperimento di addizione standard. I criteri di qualificazione di recupero sono stati settati a 70-120%, a seconda delle sostanze. I recuperi medi dei differenti congeneri PCB aggiunti ai campioni sierici erano 98 +/- 12% e 94 +/- 8% per 0.1 e 0.8 ppb, rispettivamente. I recuperi per i pesticidi clorinati variavano tra 78 e 118%. Questo mostra che la perdita di composti durante il processo analitico è ininfluente. I risultati riportati non sono stati corretti per il recupero.

Gli analisti dello studio sono stati resi ciechi per lo stato dei casi-controllo dei campioni. Poichè le concentrazioni dei composti sono dipendenti dalla quantità dei lipidi nel siero al momento del prelievo ematico, noi abbiamo espresso i risultati in ng/g di lipidi del siero, senza effettuare ulteriori aggiustamenti per contenuto lipidico (18). Quando le concentrazioni erano sotto i limiti quantitativi, sono stati settati al 50% di quel limite in tutte le analisi statistiche.

**Gruppi di organoclorine.** In aggiunta alle analisi dei singoli composti, abbiamo considerato gruppi di sostanze a seconda della loro possibile attività ormonale.

Il raggruppamento è stato basato su quanto dettato un esperto esterno (K. Moysich), descritto in una review letteraria.

Nei composti raggruppati, noi abbiamo aggiunto concentrazioni molari per compensare per le differenze nel peso molecolari (unità di misura, nmol/g lipidici).

Quindi, abbiamo raggruppato i composti come segue:

- a) estrogenici: p,p-DDD, o,p-DDT, p,p-DDT, beta-HCH, gamma-HCH, trans non clorato, oxixlorato e CBs 25,52,101 e 153 (19-31)
- b) antiestrogenici: CBs 105, 118,156, e 167 (30)
- c) senza effetti estrogenici: alfa HCH, HCB, pp-DDE, CBs 137 e 180 (19-31)

L'attività ormonale delle molecole CB 101, 138, 153 e 180 è stata da poco scoperta e per le prime due molecole quella estrogenica sembra essere debole (26,28-31).

Inoltre abbiamo considerato che esiste anche una attività ormonale di tutti le molecole analizzate nel loro complesso.

### **Analisi statistica**

Poiché molte variabili erano fortemente asimmetriche, abbiamo utilizzato il test di Wilcoxon per dati non appaiati. Le variabili di fondo sono state comparate con il T test o il  $\chi^2$  tests.

Abbiamo considerato come elementi di confondimento le seguenti variabili che sono note come fattori di rischio per l'insorgenza del carcinoma dell'endometrio: età, menopausa, età del menarca, della menopausa e del primo e ultimo figlio, parità, allattamento al seno, peso, BMI, uso di contraccettivi orali o topici, fumo di sigaretta, familiarità per cancro dell'endometrio, ipertensione e diabete mellito.

I pesticidi organoclorati e i PCB furono analizzati sia nella forma normale che in quella logaritmica, con risultati simili.

## **RISULTATI**

Le differenze dei casi rispetto ai controlli riflettono largamente le associazioni epidemiologiche conosciute. Non c'erano differenze dei casi rispetto ai controlli riguardo la quantità di cibo ingerito, ma i controlli riportavano più casi di allattamento al seno rispetto ai casi (una maggiore via di secrezione dei composti organoclorati).

Abbiamo comparato le concentrazioni di pesticidi e di PCB corrette per lipidi fra i soggetti a digiuno e quelli non a digiuno e tra le donne che hanno fatto uso di estrogeni topici e quelle che non li hanno usati.

In entrambe le comparazioni non sono state osservate differenze

significative tra i due gruppi (casi-controlli).

Le covariate restando in modelli multivariati come l'età ed il BMI, sono state correlate positivamente con le concentrazioni di tutte le molecole. Tuttavia nessun coefficiente di correlazione fu  $> 0.50$

Tra tutti i composti DDT, la p,p DDE ( il principale metabolita del p,p DDT) ha la concentrazione media più alta ( 600-700 ng/g di lipidi). La concentrazione media degli altri pesticidi fu generalmente più bassa di 10 e più volte. Il range di concentrazioni per tutti i composti fu estremamente alto sia nei casi che nei controlli (tabella 2).

La concentrazione media del p.p DDT, p,p DDE e beta HCH è più alta tra i casi rispetto i controlli. Tuttavia dopo opportuni aggiustamenti per età e BMI con una regressione logistica, ORs era vicino all'unità (1).

Similmente non ci sono sostanziali differenze di rischio tra donne con valori maggiori o inferiori del limite di quantificazione per o,p DDT (OR aggiustato per età e BMI, 1.4; 95% CI, 0.6-3.5), p,p-DDT (OR aggiustato 0.9; 95% CI, 0.5-1.7), alfa-HCH (Or, 1.2; 95% CI, 0.4-3.7), gamma-HCH (OR 1.5; 95% CI, 0.8-2.8). Nella nostra analisi con le organoclorine come variabili continue, noi non troviamo associazione tra rischio di cancro endometriale e nessuno dei 10 pesticidi valutati.

Tra i 10 congeneri dei pesticidi, CB 153 ha la più alta concentrazione (media 236 ng/g di lipidi), mentre CB 28, CB 52e CB 101 spesso hanno concentrazioni sotto il limite di quantificazione ( 2 ng/g di

lipidi). Come per i pesticidi, abbiamo trovato un ampio range di concentrazioni per ognuno dei pesticidi analizzati (tabella 2).

La concentrazione media non aggiustata del CB 287 e del CB 118 è più alta tra i casi che tra i controlli (tabella 2). Tuttavia dopo l'aggiustamento non è stato trovato un incremento del rischio di cancro rispetto agli altri congeneri (tabella 4). Infine l'analisi dei 10 PBC come variabili continue non ha rilevato una associazione statisticamente significativa con il rischio di sviluppare cancro dell'endometrio.

Non sono state osservate significative associazioni comparando i quartili per ogni differente gruppo di composti (tabella 5). Le alte concentrazioni di CB 153 risultavano influenzare notevolmente i risultati del gruppo di molecole con effetto estrogenico per cui abbiamo deciso di escluderlo dal gruppo (tabella 5). Abbiamo poi effettuato una analisi stratificata considerando il BMI, l'allattamento al seno (si-no), parità (nullipara vs pluripare), uso di estradiolo topico (si vs no), stato menopausale (pre vs postmenopausa), fumo di sigaretta (si vs no). Anche in questo caso non abbiamo un aumento del rischio di cancro endometriale statisticamente significativo.

## **DISCUSSIONE**

Nel nostro studio caso-controllo, non sono state rilevate associazioni

statisticamente significative tra rischio di cancro endometriale e concentrazioni sieriche di pesticidi organoclorati, metaboliti organoclorati e congeneri PBC. Questi risultati negativi si ritrovano sia nelle analisi statistiche di ogni singolo composto che nel caso di analisi di gruppi di composti unificati in base alla loro attività ormonale. Secondo la nostra ipotesi iniziale, sostanze con effetto simil-estrogenico avrebbero dovuto determinare un incremento del rischio di sviluppare cancro dell'endometrio in relazione alla responsività di tale tessuto all'azione estrogenica e al contrario molecole con azione antiestrogenica avrebbero dovuto costituire un fattore di protezione. La mancanza di conferma di tale ipotesi potrebbe essere spiegata con alcune considerazioni di carattere tecnico, di analisi statistica e di carattere socio politico.

In considerazione di quanto affermato da Vom Sall (35) è molto probabile che pesticidi organoclorati e congeneri di PBC non siano rilevabili nell'uomo anni dopo l'esposizione. Molti dei composti da noi analizzati rientrano in tale categoria. Sarebbe auspicabile quindi allargare lo studio a molecole quali PBC idrossilati o policlorinati, dibenzofurani e non-oPBC che invece dimostrano di rimanere nel siero per periodi prolungati.

Alcuni tra i composto organo clorati e alcuni pesticidi presentano una debole attività ormonale per cui sarebbe necessario escludere dallo

studio sostanze la cui attività estrogenica risulta essere poco nota.

Studi precedenti hanno valutato le concentrazioni dei pesticidi estratti da tessuti biologici diversi dal siero (e.s tessuto adiposo). Nel nostro studio invece le molecole in esame sono state estratte esclusivamente dal siero che a differenza del tessuto adiposo potrebbe eliminare rapidamente pesticidi e metaboliti.

Comunque dopo aver effettuato una standardizzazione per contenuto lipidico nei differenti tessuti biologici, noi abbiamo rilevato concentrazioni medie più basse rispetto agli studi precedenti e ciò potrebbe essere spiegato con una graduale riduzione dell'esposizione a pesticidi e congeneri del PBC conseguente al divieto di usare tali sostanze nocive per la salute (e.s concentrazioni medie 1020-2200 ng/g di lipidi di p,p DDE. oppure 350-1300 ng/g di lipidi per PCBs) (18,37). Con il nostro studio possiamo concludere che contaminanti ambientali quali pesticidi e congeneri del PBC non sono associati ad un aumento dello sviluppo di cancro dell'endometrio quando presenti alle concentrazioni rilevate nella nostra popolazione.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Safe S.H. xeroestrogens and breast cancer. *N eng.j med.* 337: 1303-1304. 1997
2. Wassermanm et al. Organochlorine compounds in neoplastic and adjacent apparently normal breast tissue. *Bull environ contam toxicol.* 15: 478-484. 1976.

3. Mussalo-Rauhamaa et al. Occurrence of beta-hexachlohexane in breast cancer patients. *Cancer*. 66:2124-2128. 1990
4. Falck F. et al. pesticides and policlorinated biphenyl residues in human breast and their lipids. *Arch envir healt*. 47: 143-146. 1992
5. Wolf M.S et al.blood organiochlorine residues and rish of breast cancer. *J natl cancer inst*. 85:648-652. 1993
6. Dewally E et al.higt organochlorine body burden in women with estrogen receptor positive brest cancer. *J. natl cancer inst*. 86:232-234. 1994
7. Guttes S et al. chlororganic pesticides and polychlorinated bisfenyls in breast tissue of women with benign and malignant breast disease. *Arch environ contam toxicol*. 35: 140-147. 1998
8. Hunter DJ et al. Plasma organochlorine levels and the risk of breast cancer. *N engl j med*.337:1253-1258. 1997
9. Kriger et al B Breast cancer and serum organoclorine: a prospettive study. *J Natl canc inst*. 86:589-599.1994
10. Lopez-carrillo et al. Diclodiphenlietano serum levels and breast cancer risk. *Cancer res*. 57: 3728-3732. 1997
11. Van't veer et al. DDT and postmenopausal breast cancer. *Med J*. 315: 81-85. 1197
12. Moysich KB. Environmental organoclorine exposure and postmenopausal breast cancer. *Cancer epid..* 7.181-188. 1998
13. Collaborative group on Hormonal factors in breast cancer. *Lancet* 350.1047-1049.1997

# Bisphenol A and Congenital Development Defects in Humans

Di Iorio P<sup>1</sup>, Nappi C<sup>1</sup>,

<sup>1</sup>Dipartimento di Ostetricia e Ginecologia e Fisiopatologia della Riproduziobe Umana, Università degli studi di Napoli Federico II

\*Corresponding author: Paola Di Iorio, MD Dipartimento di Ostetricia e Ginecologia, Università degli Studi di Napoli Federico II - via Pansini n5 - Napoli - tel.081-7462903 email: diioripaola80@gmail.com

## Abstract

Over 50% of the causes of fetal malformations in humans are still unknown. Recent evidence suggests the relationship between environmental exposure to endocrine disruptors and fetal malformations. Our study proposed to establish the role of BPA in altering human reproduction.

We enrolled 151 pregnant women who were divided into two groups. Case group (CS): n=101, women with established diagnosis of fetopathy, of unknown etiology and Control group (CL): n=50, pregnant women with normally-developed fetus. The total, free and conjugated BPA was measured in their blood using GC- MS with isotopic dilution.

The results show a relationship between environmental exposure to BPA and the genesis of fetal malformations. Conjugated BPA, which was higher in CS, casts light on the hypothesis that a reduced ability to metabolize the chemical in the mother can concur to the occurrence of malformation. More in detail, in case of chromosomal fetopathy, the average value of free BPA appears to be nearly three times greater than the controls, while in central and peripheral nervous system malformations, the proportion of free BPA turned out to be 0.57 ng/mL in the CS to 0.36 ng/mL in the CL.

## 1. Introduction

Over the last decade, an increasing amount of evidence has focused attention on how the exposure in utero or in the early periods of extra uterine life to environmental chemicals, may interfere with the programming of complex endocrine pathways [1-3]. During intrauterine life, these endocrine pathways are involved with the various stages of embryo-fetal development, particularly the neurological, endocrine and immunological ones [4]. These chemicals are called exogenous endocrine disruptors (EDs) or xenon-hormones, for their ability to mimic or antagonize the biological activity of several hormones through interaction, as agonists or antagonists, with specific hormone receptors [5]. Originally, it was thought that the EDs exercised their action through nuclear hormone receptors exclusively, including estrogen receptors, androgen, progesterone, thyroid receptor and retinoid receptors [4]. However, recent studies [6] have shown that, in addition to altering the signaling of nuclear receptors, endocrine disruptors are also able to act through non-nuclear steroid receptors (membrane receptors and G-protein coupled receptors) [7], and through non-steroidal receptors (eg, receptors for neurotransmitters). In addition, an endocrine disrupter would also be able to interfere with hormone synthesis, transport and metabolism, altering their physiological concentrations and, consequently, corresponding endocrine function [8,9]. The EDs also act by promoting epigenetic modifications of micro-RNA expression, a new class of small non-coding RNA molecules involved in gene regulation [10]. The effects of EDs on human health were disclosed for the first time in 1962 by Rachel Carson [11], and, from this date, knowledge on the topic has greatly increased, and, with it, the concerns that derive. Currently, in the highly heterogeneous group of EDs, there are about 900 molecules, including ubiquitous and widely used substances, which are toxic and pollutant for the environment, to which the body undergoes uncontrolled

exposure [12]. Indeed, among the EDs are synthetic chemicals used as: industrial solvents/lubricants and their by-products, plastics and plastic additives, pesticides, pharmaceuticals, heavy metals, etc. It is intuitive to imagine how the stage of life of exposure to an EDs has important implications for the resulting consequences for health, due to the different susceptibility of the individual himself to the toxic environment. In this regard, it should be noted that the exposure of an organism to an EDs can indirectly occur as early as during intrauterine life, when hundreds of toxic chemicals can reach the embryo/fetus through the placental-blood barrier [4]. In this phase, called the "critical window of development" the product of conception appears extremely sensitive to chemicals with hormone-like activity, the effects of which will be much more pronounced, starting at much lower concentrations than those which would be harmful in adulthood [13]. This increased susceptibility is mainly due to the immaturity of all the systems of "protection" available to the adult, including: enzymatic mechanisms of DNA repair, hepatic, but not only, enzymatic mechanisms of detoxification and metabolism, a competent immune system, the impenetrability of the blood-brain barrier, etc. [4]. In addition, the developing organism has an increased metabolic rate than the adult one: this fact may generate a higher amount of toxic metabolite, paradoxically increase the toxicity [13]. Among the adverse effects induced by endocrine disruptors on the embryo/fetus, all due to the alteration of cell and tissue development, notable anomalies of morphogenesis, such as cryptorchidism, hypospadias and other have been reported [14]. Sometimes, prenatal exposure will not give rise to any manifestations of the damage suffered at birth and/or in childhood, but later in life. We speak, therefore, of "fetal basis of adult disease" in order to describe the interactions between organism development and the environment, which will determine the propensity of the individual to develop a given disease (usually reproductive diseases, metabolic and hormonal disorders) later in life [15,5]. Bisphenol A is one of the most common endocrine disruptors: it is a ubiquitous organic compound, essential the plastic synthesis (polycarbonates and epoxy resins) and plastic additive synthesis, whose production is spread around the world [16]. Polycarbonate has got many applications, including the production of bottles, dishes, compact discs, paper used in some purchase receipts, self-adhesive labels, paper de fax and dental sealants. [17,18]. Epoxy resins, however, are used as the internal linings of metal products (for example, cans for food and beverages) and in the water pipes. Despite the spread of the compound, it is thought that food is the main source of human exposure [19], with the contamination of food and beverages contained in polycarbonate bottles and cans which are internally coated with epoxy resin [20], following phenomena of "migration" of BPA unbound monomers [21]. Indeed, prolonged contact between plastic containers containing BPA and acid or base, or even exposure to high temperatures (especially with microwave heating) favor the phenomenon of migration [22,23]. In the body, BPA can be found in two forms: free, i.e. the proportion with endocrine-like activity and conjugated, which is free of xeno-hormonal activity. Studies on BPA pharmacokinetics [24,25] have shown that the BPA metabolism mainly occurs via hepatic glucuronosyltransferase (GT), with the formation of BPA-glucuronide, water-soluble and, therefore, eliminated by the kidney. To a lesser percentage, the breakdown is performed by a sulfotransferase, with the formation of BPA-sulfate. The two metabolites, BPA-glucuronide and BPA-sulfate, do not interfere with the biological processes of the body. The results of Matsumoto et al. have shown

that GT activity is age-dependent and, in particular, much lower in fetal and neonatal age [24]. In contrast, in the fetal and neonatal life, the major route of BPA metabolism would seem to be that of sulfation [26]. Indeed, a number of enzymes involved in BPA metabolism to BPA-sulfate are known and have already been shown to be active during intrauterine life [27,28]. Bisphenol A can be detected: in the blood of pregnant women, in the amniotic fluid, in the placental tissue and in the umbilical cord blood [29-31]. Due to its estrogen-like properties, which mimic the hormone 17- $\beta$ -estradiol, BPA can bind the estrogen receptor (ER $\alpha$ , and ER $\beta$ ), triggering activation through atypical pathway. However, the National Toxicology Program - U.S. Department of Health and Human Services considers it appropriate not to consider the biological effects of BPA, which exclusively refer to its action through estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  binding [32]; a growing number of in vitro studies, in fact, suggests that it would be too simplistic to merely attribute to BPA the classical mechanism of estrogen action. In addition to binding the estrogen receptors and nuclear ER $\alpha$  ER $\beta$ , bisphenol A has the ability to interact with "non classical membrane estrogen receptors"(ncmER) [33,34], a seven transmembrane domain receptor (GPR30) [35], an "estrogen-related receptor- $\gamma$  " (ERR- $\gamma$ ), an orphan nuclear receptor, [36,37], and the aryl hydrocarbon receptor (AhR) [38,39], the androgen receptor, acting as an antagonist [38,40].

Most of the information about the role of BPA in the genesis of malformations derived from studies in animal models, but the results in this regard are still fragmentary and conflicting. A clear influence of BPA on the development processes was inferred from studies in laboratory mice subjected to high doses of BPA during pregnancy. Exposure to BPA has shown to be capable of reducing the embryo- fetal survival [41,42], the birth weight and the growth of the offspring in the first years of life [41-43]. In addition to these "high dose" effects on survival and growth, other studies have shown a variety of effects induced by much lower doses of BPA, which reproduce better the actual human exposure. The adverse effects induced by the "low dose" of BPA include: neuronal and behavioral alterations [44-46], potentially pre-cancerous lesions of prostate and mammary gland [47]; malformation of male urinary tract (increased anogenital distance) [48,49], and vagina [50]. In contrast to the harmful effects induced by high doses of BPA, there is a dispute about the interpretation of the effects induced by low doses, for which the evidence is limited and conflicting, even in laboratory animals. The limited number of studies in humans [51,52], exposed to BPA, it is not sufficient, however, to reach conclusions about the possible risks of developmental abnormalities.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1 Sample collection**

The samples were collected during years 2011-2013. One hundred seventy healthy pregnant women, who visited the hospital for voluntary interruption of pregnancy due to diagnosis of fetal malformation (CS), or visited the hospital for routine analyses during their normally conducted pregnancy (CL) and accepted to participate in the study, were enrolled. Human tissue collection strictly adhered to the guidelines outlined in

the Declaration of Helsinki and the relevant ethic committees approved the study. Informed consent was obtained from all blood donors. Subjects completed a questionnaire addressing physical characteristics and health and pregnancy-related properties and were subjected to a complete gynecological visit. Blood samples were collected immediately before surgery for pregnancy interruption using a BD vacutainer (BPA free) (Becton Dickinson UK Limited, Oxfordshire, UK) blood collection red tube (with no additives) and immediately frozen to  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  until analysis. Diagnostic suspect of fetal malformation subsequent to US examination or amniocentesis was confirmed by autopic post explant fetal examination. The criteria of inclusion/exclusion used were different for the two groups. In the CS group, we included patients meeting the following inclusion criteria: age $<40$  years; established diagnosis of fetopathy of unknown etiology. The women of the CS group were selected from those relating to the Hospital VIP (Voluntary interruption of pregnancy) Center, to perform an abortion in the 2nd trimester, according to Article 6 of Law 194/78. Women of age $>40$  years (criterion of risk for chromosomal malformation) [53] and women with known etiology of fetopathy were excluded from the CS group. In CL group we included patients meeting the following inclusion criteria: age $<40$  years, normo-conducted pregnancy with normally-developed fetus. The women of the CL group were selected from those afferent to the Hospital for ambulatory monitoring during normal pregnancy. From an initial number of 170 patients enrolled, 9 controls (CL) did not show up at the time of blood sampling, while 10 case patients (CS) preferred, despite the fetopathy, to carry on their pregnancy. Eventually, the sample of our study consisted of: CS  $n=101$ , CL  $n=50$ . The women included in the study were subjected to a thorough medical history, with particular attention to gynecological anamnesis. Through this phase of medical history, it was possible to investigate, in a comprehensive manner, the presence of any known etiological factors of malformation (the patient shall be excluded from the study), including: a history of infection (eg TORCH complex); states of malnutrition or metabolic diseases (eg diabetes), drugs (eg, thalidomide, anticoagulants, chemotherapeutic agents) and drugs (eg, cannabis, cocaine, heroin); radiological investigations (eg X-rays, CT); familiarity to genetic syndromes. All the women in our sample were subjected to routine laboratory tests ordinarily carried on to detect trisomy 21, including: tri-test, assay of  $\alpha$ -fetoprotein,  $\beta$ HCG and estradiol. As a result, the prenatal diagnosis of fetopathy was ascertained by the following two diagnostic techniques: obstetric ultrasound and trans-abdominal amniocentesis. In the CS group, the diagnosis of malformation was then confirmed by fetal autopsies, following VIP.

## 2.2 BPA dosage

The determination of BPA and its conjugated metabolite was conducted as reported by Kosarac [54], with some minor modifications. Briefly, 2 aliquots of 0.5 mL were taken from each blood sample, one for total BPA measurement (free BPA plus BPA glucuronide and sulfate), one for free BPA. BPA conjugate levels were worked out from the difference between the two determinations. For free BPA determination, 20  $\mu\text{l}$  of d16-BPA at a concentration of 100  $\mu\text{g/L}$ , 1 mL of a saturated solution of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2 mL of ethanol and 4 mL of hexane were added. The sample was then vortex agitated for 30 seconds and then left at rest to allow

the two phases to separate from each other. The upper organic phase (containing the lipids) was removed. The non-polar phase was further defatted with 4 mL of hexane. After agitating again, separating the two phases left and eliminating the non-polar phase, 3 mL of dichloromethane were added. The sample, vortex agitated for 30 seconds, was sonicated at 30 °C for 10 minutes. The lower organic phase was transferred to a new vial, the solvent removed by a stream of nitrogen in a water bath at 40 °C and the sample reconstituted with 2 mL of ultrapure water grade. The extracted sample was purified in two successive SPE steps, one with a Florisil solid phase and the other with a C18 solid phase. The Florisil column (1 g, 6 mL) was conditioned with 10 mL of dichloromethane followed by 10 mL of hexane. The extracted sample (2 mL) was loaded, and then 10 mL of hexane were eluted (this fraction containing fatty residue was discarded), then the BPA was eluted with 25 mL of dichloromethane. The fraction collected was brought to dryness with a stream of nitrogen in a bath at 40 °C and then reconstituted with 3 mL of ultrapure water. In the second step, the C18 SPE cartridge (0.5 g, 6 mL) was conditioned with 9 mL of acetone, 9 mL of methanol and 5 mL of ultrapure water. After uploading the 3 mL of sample, the column was dried under vacuum and then eluted with 6 mL of methanol followed by 5 mL of acetone. The eluate was dried in a stream of nitrogen in a bath at 40 °C and redissolved in 50 µl of pyridine. 50 µl of BSTFA were added for the derivatization and the reaction was conducted for 4 hours at 70 °C. One µl of derivatized sample was then analyzed by GC-MS/MS. The deconjugation reaction was carried out on an aliquot of 0.5 mL of sample. Before the enzymatic reaction, 20 µl of d16-BPA at a concentration of 100 µg/L were added as an internal standard. Then 50 µl of β-glucuronidase/sulfatase (4,414/168 U/L) were added. The deconjugation reaction was conducted for 3 hours in a shaking water bath at 37 °C. After the hydrolysis, 100 µl of 2N HCl were added to deactivate the enzymes and the BPA was extracted and purified in the same way as free BPA. The instrumental analysis method is based on a gas chromatographic column Supleco SLB-5ms with a length of 10 m and an internal diameter of 0.1 mm, with a film thickness of 0.1 µm. The GC oven program includes an initial phase of 1.5 minutes at 160 °C and two ramps: the first at 20 °C/min up to 260 °C, the second at 40 °C/min up to 320 °C. The injection temperature was set at 260 °C and the linear velocity of the carrier gas (He) was 70 cm/sec. This approach requires an initial pressure of 654 kPa and a linear flow of 1.12 mL/min. The total analytical time is 8 min. These quick analyses require high-speed data acquisition. Were used two acquisition channels, one in SCAN mode between  $m/z=50$  and  $m/z=500$  and one in MRM mode:  $357.10>191.20$   $m/z$  for BPA and  $370.50>73.10$   $m/z$  for the d16-BPA. The event time for the SCAN mode was set to 0.07 seconds (corresponding to a scan speed of 10000 amu/sec, the maximum obtainable using the TQ-8030). Calibration was carried out using nine standard solutions and a blank at a concentration from 0.01 µg/L up to 100 µg/L. Each standard was analyzed in triplicate. Quantization was conducted with the isotopic dilution method using d16-BPA as an internal standard. Every 10 samples, a blank sample and two calibration solutions: 25 µg/L, and 0.01µg/L were analyzed. The tolerance criteria adopted were <LOQ for blank, ± 30% for the solution of 0.01 µg/L and ± 10% for the 25 µg/L.

### 2.3 Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Statistica software (StatSoft, Oklahoma, USA) and Minitab (Minitab Inc, Pennsylvania, USA). The comparison between groups was made with the Rank Sum Test according to Mann-Whitney or by means of analysis of variance on rank preformed single way (according to Kruskal-Wallis), also using the post-hoc test of Dunn. The normal distribution of data was verified using the Shapiro-Wilks test. The alpha value was set to 0.05 unless otherwise specified.

### 3. Results

#### 3.1 Groups composition

At the end of enrollment, the sample was made up of n=101 women with malformed fetus (CS) and n=50 women with normally-developed fetus (CL). The average age is 2.25 years higher in the CS group, compared to that of control group (CL) (33.82 Vs 31.57). The average gestational age at which abortion is performed corresponds to the 19<sup>th</sup> week. Table 1 shows a comparison of the characteristics of the CS patients divided by class of malformation. The analysis of the different classes of malformations shows that the highest frequency of abortion is found for chromosomal defects (45%), followed by CNS and PNS malformations (28%). The lower frequency occurs, instead, for poly-malformations (2%).

#### 3.2 Total BPA

Blood BPA dosage shows that the average concentration of total BPA (ng/mL) ranges from  $2.39 \pm 0.73$  ng/mL (min=1.19, max=3.52) in the CL to  $2.14 \pm 0.87$  ng/mL (min=0.99, max=4.23) in the CS. Figure 1a allows a better appreciation of the variability of blood concentration of total BPA in the 2 groups. The median of the distribution is greater in the CL group, although non-statistically significant ( $p=0.076$ ). The values of free total and conjugate BPA were also analyzed within each single malformation class (Figure 2a). The total, free and conjugated BPA resulted higher in chromosomal and central and peripheral nervous system malformations, compared to other classes and to the control.

#### 3.3 Free BPA

The average concentration of free BPA was higher in the CS compared with CL, with a value of  $0.64 \pm 0.32$  ng/mL in CS group (min=0.23, max=1.54) versus a value of  $0.36 \pm 0.08$  ng/mL in the CL (min=0.22, max=0.50) ( $p<0.001$ ). The comparison of the amount of free BPA between CL and subclasses of CS, shows a statistically significant gap for malformations of the CNS/PNS Vs CL ( $p<0.001$ ) and for the chromosomal malformations. CL ( $p<0.001$ ) (Figure 2b).

#### 3.4 Conjugate BPA

The percentage of conjugate BPA in CS is  $70.7\% \pm 4.5\%$  (min=62.0%, max=78.2%) while  $77.8\% \pm 0.4\%$  (min=77.2%, max=78.5%) is the percentage in the CL group ( $p < 0.001$ ). Thus, the CL group has got a higher concentration of inactive BPA, showing better metabolism compared to the CS (Figure 1b). The percentage of conjugate BPA was also analyzed in the context of single malformations, and results lower in the class of chromosomal abnormalities. The comparison between the % of conjugate BPA in each subclass of malformation and controls is statistically significant ( $p < 0.001$ ) not only for the chromosomal, but also for malformations of the CNS.

### 3.5 Maternal age influence

As far as chromosomal malformations are concerned, a confounding factor appears to be the age of the mother, which, as confirmed by the data in the literature, if greater of 35 years would increase the risk of the phenomenon. Figure 3a shows that in both age groups with a fetus with a chromosomal malformation, the concentration of BPA (both total and free) is greater than the in CL. Figure 3b shows, instead, the percentage of conjugated BPA in function of age.

## 4. Discussion

As already elucidated in the introductory section, increasing attention is giving to the influence of BPA with the early develop, but most of the information, still incomplete and contradicting, results from studies in animal models [41-50]. Our study is one of the first whose aim is to assess the role of BPA in the genesis of human embryo-fetal malformations. For this purpose, BPA levels were measured in blood samples of pregnant women, with the purpose of obtaining a sensitive index of the degree of fetal exposure. By making a comparison of the values of circulating BPA in women with malformed fetus Vs women with normally-developed fetus, probably the most interesting observation is that the proportion of conjugate BPA mirrors the ability to metabolize endocrine interferer.

As previously stated, the conjugated BPA represents the inactive portion from the point of view of its endocrine-like activity [55]. Its two metabolites, BPA-glucuronide and BPA-sulfate, do not alter the biological processes of the organism; on the contrary, non-conjugated BPA binds to plasma proteins, and interferes with the biological processes already elucidated.

The percentage of conjugate BPA reflects the ability to metabolize this molecule. We have not found a clear variation between the different classes, with the exception of chromosomal malformations. In this case, indeed, the percentage turns out to be much lower, compared to the controls. We can therefore hypothesize that the reduced ability to metabolize, may predispose the woman to pregnancies with fetal chromosomal abnormalities. In our sample, the percentage of conjugated BPA is reduced in the CS group compared with the CL group, laying the foundation for the hypothesis that a reduced ability to metabolize the chemical in the mother is implicated in the onset of the fetal malformation. These 'poor metabolizers' pregnant women are

more susceptible to the hormone-like effects of BPA. Consistent with the reduced ability to metabolize, the average concentration of free BPA active quota is almost doubled in the CL than in CS. In contrast, however, total BPA (conjugated + free) is lower in the CS group compared with CL group, although not statistically significant.

Our results confirms the correlation between blood concentrations of total BPA in women with a fetus with a chromosomal anomaly compared to women with a normally-developed fetus found by Yamada, [56]. Here, however, we put more attention on the ability to metabolize the BPA rather than on the total concentration of BPA, suggesting an increased susceptibility to the development of a fetus with chromosomal malformations among ‘poor metabolizers’. Moreover, it has been recently demonstrated the ability of BPA in determining interference in the progression of meiotic maturation [57]; disturbances in the organization of the spindle and the disturbance in the alignment of chromosomes. In addition, a long-term exposure to BPA has been linked to a decrease in the percentage of oocytes that develop in meiosis II; this well correlates with the reported decrease in fertility in recent decades [58-59]. The mechanism of action of BPA on meiosis, however, remains unknown and only conceivable. Taken together, the current studies [60-61] indicate that the mechanism of action of BPA on oocyte maturation deserves further investigation, including, for example, the receptor way with which BPA acts on the oocytes. The presence of a statistically significant alteration of free BPA levels in cases of malformations of the Central and Peripheral Nervous System is the first result of the ability of the molecule to cause such abnormalities in humans. BPA can easily pass the blood-brain barrier and therefore can affect the growth and development of the Central and Peripheral Nervous System, as already demonstrated in other studies conducted in animal models. Up till now, documented effects of prenatal exposure to BPA are: abnormal development of the neocortex in terms of differentiation and neuronal migration [62], aberrant positions and connections between thalamus and cortex [63], inhibition of the proliferation of neural progenitor cells [64], loss of sexual dimorphism in terms of brain structure and behavior [65], increased anxiety and cognitive deficits [66,67]. Part of these results are justified by the strong affinity of BPA to the dopamine receptor, estrogen-like receptor- $\beta$  type [68] and to the estrogen-like receptor- $\gamma$  type present in hippocampal neurons [69]. In all these hypotheses the normal synaptic communication was altered. Studies in humans are still meager and fragmentary, mainly reporting effects on neurobehavioral development [70-71]. Therefore, the evidence that BPA exposure can be related to an abnormal development of the Central and Peripheral Nervous System is an absolute novelty in the field of human reproduction worth of further analysis and investigation.

## Reference

- [1] Suk WA, Murray K, Avakian MD. Environmental hazards to children's health in the modern world. *Mutat. Res.* 2003; 544: 235-242.
- [2] Wang MH, Baskin LS. Endocrine disruptors, genital development, and hypospadias. *J. Androl.* 2008; 29: 499-505.
- [3] Lee MM. Endocrine Disrupters. *A Current Review of Ped. Endoc.* 2007; 109-118.

- [4] [Unüvar T](#), [Büyükgebiz A](#). Fetal and neonatal endocrine disruptors. *J. Clin. Res. Pediatr. Endocrinol.* 2012; 4: 51-60.
- [5] Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon JP, Giudice LC, Hauser R, Prins GS, Soto AM, Zoeller RT, Gore AC. Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocr. Rev.* 2009 Jun; 30(4): 293-342.
- [6] Phillips KP, Foster WG. Key developments in endocrine disrupter research and human health. *J. Toxicol. Environ. Health. B. Crit. Rev.* 2008; 11: 322-344.
- [7] Heldring N, Pike A, Andersson S, Matthews J, Cheng G, Hartman J, et al., Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiol. Rev.* 87 (3) 2007; 905–931.
- [8] Borgioli A. L'inquinamento ambientale da sostanze nocive per il sistema ormonale: i distruttori endocrini (endocrine disruptors, EDs). *Ig. San. Pubbl.* 2000; LVI 3-4: 263-272.
- [9] Papaleo B, Caporossi L, De Rosa M, et al. Esposizione professionale a distruttori endocrini: stato dell'arte. *G. Ital. Med. Lav. Erg.* 2004; 26:3, 171-179.
- [10] Singh S, Li SS. Epigenetic effects of environmental chemicals bisphenol A and phthalates. *Int. J. Mol. Sci.* 2012; 13:10 143-53.
- [11] Carson R, Darling L, Darling L. *Silent Spring*. 1962 Boston: Houghton Mifflin; Cambridge, Mass.: Riverside Press.
- [12] De Coster S, van Larebeke N. Endocrine-disrupting chemicals: associated disorders and mechanisms of action. *J Environ Public Health* 2012; 2012: 713696.
- [13] Newbold RR, Jefferson WN, Padilla-Banks E. Long-term adverse effect of neonatal exposure to bisphenol A on the murine femal reproductive tract. *Reprod. Toxicol.* 2007; 24(2): 253-258.
- [14] Bay K, Asklund C, Skakkebaek SK, Andresson AM. Testicular dysgenesis syndrome: possible role of endocrine disrupters. *Best Pract. Clin. Endocrinol Metab.* 2006; 20(1): 77-90.
- [15] Barker DJ. The developmental origins of adult disease. *Eur. J. Epidemiol* 2003; 18:733-736.
- [16] Vandenberg LN, Chahoud I, Heindel JJ et al. Urinary, circulating, and tissue biomonitoring studies indicate widespread exposure to bisphenol A. *Environ. Health Perspect.* 2010; 118, 1055-1070.
- [17] European-Union. Updated European Risk Assessment Report 4,4'-Isopropylidenediphenol (bisphenol-A). Environment Addendum of February 2008 (to be read in conjunction with published EU RAR of Bisphenol A, 2003).
- [18] Lopez-Espinosa MJ, Granada A, Araque P, Molina-Molina JM, Puertollano MC, Rivas A, Fernandez M, Cerrillo I, Olea-Serrano MF, Lopez C, Olea N. Oestrogenicity of paper and cardboard extracts used as food containers. *Food Addit. Contam.* 2007; 24:95-102.
- [19] Wilson NK, Chuang JC, Morgan MK et al. An observational study of the potential exposures of preschool children to pentachlorophenol, bisphenol-A, and nonylphenol at home and daycare. *Environ Res.* 2007; 103: 9-20.
- [20] Kang J, Kondo F, Katayama Y: Human exposure to bisphenol A. *Toxicology* 2006, 226: 79-89.
- [21] Hoekstra EG, Simoneau C. Release of Bisphenol A from Polycarbonate: a review. *Crit Rev Food Sci. Nutr.* 2013; 53(4): 386-402.
- [22] Welshons WV, Nagel SC, vom Saal FS. Large effects from small exposures III Endocrine mechanisms mediating effects of BPA at levels of human exposure. *Endocrinology* 2006; 147:56-69.
- [23] Le HH, Carlson EM, Chua JP, Belcher SM. Bisphenol A is released from polycarbonate drinking bottles and mimics the neurotoxic actions of estrogen in developing cerebellar neurons. *Toxicol. Lett.* 2008; 176: 149-156.

- [24] Matsumoto J, Yokota H, Yuasa A. Developmental increases in rat hepatic microsomal UDP-glucuronosyltransferase activities toward xenoestrogens and decreases during pregnancy. *Environ Health Perspect.* 2002; 110: 193-196.
- [25] Domoradzki JY, Thornton CM, Pottenger LH, Hansen SC, Card TL, Markham DA, Dryzga MD, Shiotsuka RN, Waechter JM, Jr. Age and dose dependency of the pharmacokinetics and metabolism of bisphenol A in neonatal Sprague-Dawley rats following oral administration. *Toxicol. Sci.* 2004; 77: 230-242.
- [26] Chapin RE, Adams J, Boekelheide K, Gray LE, Jr., Hayward SW, Lees PS, McIntyre BS, Portier KM, Schnorr TM, Selevan SG, Vandenberg JG, Woskie SR. Birth Defects Res B Dev Reprod. Toxicol. NTP-CERHR Expert Panel Report on the Reproductive and Developmental Toxicity of Bisphenol A 2008; 83:157-395.
- [27] Suiko M, Sakakibara Y, Liu MC. Sulfation of environmental estrogen-like chemicals by human cytosolic sulfotransferases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000; 267: 80-84.
- [28] Hines RN. The ontogeny of drug metabolism enzymes and implications for adverse drug events. *Pharmacol. Ther.* 2008; 118: 250-267.
- [29] Padmanabhan V, Siefert K, Ransom S, Johnson T, Pinkerton J, Anderson L, Tao L, Kannan K. Maternal bisphenol-A levels at delivery: a looming problem? *J. Perinatol.* 2008; 28:258-263.
- [30] Engel SM, Levy B, Liu Z, Kaplan D, Wolff MS. Xenobiotic phenols in early pregnancy amniotic fluid. *Reprod. Toxicol.* 2006; 21:110-112.
- [31] Kuroda N, Kinoshita Y, Sun Y, Wada M, Kishikawa N, Nakashima K, Makino T, Nakazawa H. Measurement of bisphenol A levels in human blood serum and ascitic fluid by HPLC using a fluorescent labeling reagent. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2003; 30: 1743-1749.
- [32] [Shelby MD](#). NTP-CERHR monograph on the potential human reproductive and developmental effects of bisphenol A. NTP CERHR MON. 2008 (22):v , vii-ix, 1-64 passim.
- [33] Nadal A, Ropero AB, Fuentes E, Soria B, Ripoll C. Estrogen and xenoestrogen actions on endocrine pancreas: from ion channel modulation to activation of nuclear function. *Steroids* 2004; 69: 531-536.
- [34] Alonso-Magdalena P, Laribi O, Ropero AB, Fuentes E, Ripoll C, Soria B, Nadal A. Low doses of bisphenol A and diethylstilbestrol impair  $Ca^{2+}$  signals in pancreatic alpha-cells through a nonclassical membrane estrogen receptor within intact islets of Langerhans. *Environ. Health Perspect.* 2005; 113: 969-977.
- [35] Thomas P, Dong J. Binding and activation of the seven-transmembrane estrogen receptor GPR30 by environmental estrogens: a potential novel mechanism of endocrine disruption. *J Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2006; 102: 175-179.
- [36] Matsushima A, Kakuta Y, Teramoto T, Koshihara T, Liu X, Okada H, Tokunaga T, Kawabata S, Kimura M, Shimohigashi Y. Structural evidence for endocrine disruptor bisphenol A binding to human nuclear receptor ERR gamma. *J. Biochem.* 2007; 142: 517-524.
- [37] Abad MC, Askari H, O'Neill J, Klinger AL, Milligan C, Lewandowski F, Springer B, Spurlino J, Rentzperis D. Structural determination of estrogen-related receptor gamma in the presence of phenol derivative compounds. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2008; 108: 44-54.
- [38] Bonefeld-Jorgensen EC, Long M, Hofmeister MV, Vinggaard AM. Endocrine-disrupting potential of bisphenol A, bisphenol A dimethacrylate, 4-n-nonylphenol, and 4-n-octylphenol in vitro: new data and a brief review. *Environ. Health Perspect.* 2007; 115 Suppl 1: 69-76.
- [39] Kruger T, Long M, Bonefeld-Jorgensen EC. Plastic components affect the activation of the aryl hydrocarbon and the androgen receptor. *Toxicology* 2008; 246: 112-123.
- [40] Paris F, Balaguer P, Terouanne B, Servant N, Lacoste C, Cravedi JP, Nicolas JC, Sultan C. Phenylphenols, biphenols, bisphenol-A and 4-tert-octylphenol exhibit alpha and beta estrogen activities and antiandrogen activity in reporter cell lines. *Mol. Cell Endocrinol.* 2002; 193: 43-49.

- [41] Morrissey RE, George JD, Price CJ, Tyl RW, Marr MC, Kimmel CA. The Developmental Toxicity of bisphenol A in Rats and Mice. *Fundam. Appl. Toxicol.* 1987; 8: 571-582.
- [42] Tyl R, Myers CB, Marr MC. Abbreviated one-generation study of dietary bisphenol A (Bisphenol A) in CD-1® (Swiss) mice. In: *Research*. Triangle Park, NC: RTI (sponsored by the Society of the Plastics Industry, Inc.); 2002.
- [43] Tyl RW, Myers CB, Marr MC, Sloan CS, Castillo NP, Veselica MM, Seely JC, Dimond SS, Van Miller JP, Shiotsuka RN, Beyer D, Hentges SG, Waechter JM, Jr. Two-generation reproductive toxicity study of dietary bisphenol A in CD-1(R) (Swiss) mice. *Toxicol. Sci.* 2008; 104: 362-384.
- [44] Ryan BC, Vandenberg JG. Developmental exposure to environmental estrogens alters anxiety and spatial memory in female mice. *Horm. Behav.* 2006; 50: 85-93.
- [45] Della Seta D, Minder I, Belloni V, Aloisi AM, Dessi-Fulgheri F, Farabollini F. Pubertal exposure to estrogenic chemicals affects behavior in juvenile and adult male rats. *Horm. Behav.* 2006; 50: 301-307.
- [46] Negishi T, Kawasaki K, Suzaki S, Maeda H, Ishii Y, Kyuwa S, Kuroda Y, Yoshikawa Y. Behavioral alterations in response to fear-provoking stimuli and tranylcypromine induced by perinatal exposure to bisphenol A and nonylphenol in male rats. *Environ. Health Perspect.* 2004; 112: 1159 – 1164.
- [47] Murray TJ, Maffini MV, Ucci AA, Sonnenschein C, Soto AM. Induction of mammary gland ductal hyperplasias and carcinoma in situ following fetal bisphenol A exposure. *Reprod. Toxicol.* 2007; 23: 383-390.
- [48] Gupta C. Reproductive malformation of the male offspring following maternal exposure to estrogenic chemicals. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 2000; 224(2): 61-8.
- [49] Timms BG, Howdeshell KL, Barton L, Bradley S, Richter CA, Vom Saal. Estrogenic chemicals in plastic and oral contraceptives disrupt development of the fetal mouse prostate and urethra. *FS Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 2005; 102: 7014-7019.
- [50] Markey CM, Wadia PR, Rubin BS, Sonnenschein C, Soto AM. Long-term effects of fetal exposure to low doses of the xenoestrogen bisphenol-A in the female mouse genital tract. *Biol. Reprod.* 2005; 72(6): 1344-51.
- [51] Itoh H, Iwasaki M, Hanaoka T, Sasaki H, Tanaka T, Tsugane S. Urinary bisphenol-A concentration in infertile Japanese women and its association with endometriosis: A cross-sectional study. *Environ Health Prev. Med.* 2007; 12: 258-264.
- [52] Wolff M, Engel S, Berkowitz G, Ye X SM, Zhu C, Wetmur J, Calafat A. Prenatal phenol and phthalate exposures and birth outcomes *Environ. Health Perspect.* 2008; 116:1092-1097.
- [53] Savva GM, Walker K, Morris JK, The maternal age-specific live birth prevalence of trisomies 13 and 18 compared to trisomy 21 (Down syndrome), *Prenat. Diagn.* 2010; 30(1): 57-64.
- [54] Kosarac I, Kubwabo C, Lalonde K, Foster W. A novel method for the quantitative determination of free and conjugated bisphenol A in human maternal and umbilical cord blood serum using a two-step solid phase extraction and gas chromatography/tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 2012(1); 898: 90-4.
- [55] Matthews JB, Twomey K, Zacharewski TR. In vitro and in vivo interactions of bisphenol A and its metabolite, bisphenol A glucuronide, with estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$ . *Chemical Research in Toxicology* 2001;14:149-157.
- [56] Yamada H, Furuta I, Kato EH, Kataoka S, Usuki Y, Kobashi G, Sata F, Kishi R, Fujimoto S. Maternal serum and amniotic fluid bisphenol A concentrations in the early second trimester. *Reprod Toxicol* 2002; 16: 735-739.
- [57] Machtinger R, Combelles CM, Missmer SA, Correia KF, Williams P, Hauser R, Racowsky C. Bisphenol-A and human oocyte maturation in vitro. *Hum Reprod.* 2013; 28(10):2735-45.
- [58] Guzick DS, Swan S. The decline of infertility: apparent or real? *Fertil Steril* 2006; 86:524-526.
- [59] Hamilton BE, Ventura SJ. Fertility and abortion rates in the United States, 1960–2002. *Int J Androl* 2006; 29: 34-45.

- [60] Dong S, Terasaka S, Kiyama R. Bisphenol A induces a rapid activation of Erk1/2 through GPR30 in human breast cancer cells. *Environ Pollut* 201; 1159: 212-218.
- [61] Peretz J, Craig ZR, Flaws JA. Bisphenol A inhibits follicle growth and induces atresia in cultured mouse antral follicles independently of the genomic estrogenic pathway. *Biol Reprod*. 2012 Sep 21; 87(3):63.
- [62] Nakamura K, Itoh K, Yaai T, Fujiwara Y, Sugimoto T, Fushiki S. Murine neocortical histogenesis is perturbed by prenatal exposure to low doses of Bisphenol A. *J Neurosci Res*. 2006; 84(6): 1197-205.
- [63] Nakamura K, Itoh K, Sugimoto T, Fushiki S. Prenatal exposure to bisphenol A affects adult murine neocortical structure. *Neurosci Lett* 2007; 420(2):100-5.
- [64] Kim K., Son T.G., Kim S.J., Kim H.S., Kim T.S., Han S.Y., Lee J. Suppressive effects of bisphenol A on the proliferation of neural progenitor cells. *J Toxicol Environ Health A* 2007; 70:1288-1295.
- [65] Kubo K, Arai O, Omura M, Watanabe R, Ogata R, Aou S. Low dose effects of bisphenol A on sexual differentiation of the brain and behavior in rats. *Neurosci Res* 2003 Mar; 45(3):345-56.
- [66] Poimenova A, Markaki E, Rahiotis C, Kitraki E. Corticosterone-regulated actions in the rat brain are affected by perinatal exposure to low dose of bisphenol A. *Neurosci*. 2010 167(3):741-9.
- [67] Tian Y, Baek J, Lee S, Jang C. Prenatal and postnatal exposure to bisphenol a induces anxiolytic behaviors and cognitive deficits in mice. *Synapse*. 2010; 6:432-439.
- [68] Cox KH, Gatewood JD, Howeth C, Rissman EF. Gestational exposure to bisphenol A and cross-fostering affect behaviors in juvenile mice. *Horm Behav* 2010 58(5):754-761.
- [69] Tanabe N., Yoshino H., Kimoto T., Hojo Y., Ogiue-Ikeda M., Shimohigashi Y., Kawato S.: Nanomolar dose of bisphenol A rapidly modulates spinogenesis in adult hippocampal neurons. *Mol Cell Endocrinol* 2012; 351: 317-325.
- [70] Sathyanarayana S, Braun JM, Yolton K, Liddy S, Lanphear BP. Case report: high prenatal bisphenol a exposure and infant neonatal neurobehavior. *Environ Health Perspect*. 2011; 119(8):1170-5.
- [71] Braun JM, Yolton K, Dietrich KN, Hornung R, Ye X, Calafat AM, Lanphear BP. Prenatal bisphenol A exposure and early childhood behavior. *Environ Health Perspect*. 2009; 117(12):1945-52.

