“P.A.N. Prevenzione Alimentazione Nutrizione
La Salute vien mangiando … dalla nascita”
Roma, venerdì 9 novembre 2007
CAMERA DEI DEPUTATI



Alimentazione, ambiente e contaminanti: il caso dei killer degli spermatozoi

Claudio Minoia

FONDAZIONE SALVATORE MAUGERI
CLINICA DEL LAVORO E DELLA RIABILITAZIONE
I.R.C.C.S.

SSTOR

DDT
(DICLORODIFENILTRICLOROETANO)

Prodotto sintetizzato nel 1874

1939
Scoperte proprietà insetticide

1943
Produzione su scala industriale

1945: il DDT costa 1 $ per libbra

metà anni ’50: il DDT costa 0,25 $ per libbra

Primi anni ’60
consumo annuo 400000 t

70-80% impiegato in agricoltura

1970: la Svezia è il primo paese a bandire l’uso del DDT

Evidenza della tossicità del DDT sulle acque, i microrganismi marini, anfibi e uccelli

1970: la USSR vieta il DDT e i prodotti che lo contengono per impieghi come insetticidi

Persistenza, capacità di bioaccumularsi e cancerogenicità del DDT

1981: in URSS viene bandito l’uso del DDT in agricoltura

consentito ancora l’impiego per scopi sanitari (es. anti-malaria)

1989: il DDT è vietato anche per disinfestazioni e scopi sanitari

1972: molti paesi vietano l’uso del DDT a causa dell’impatto negativo sugli organismi viventi

Studi di cancerogenicità a lungo termine sui roditori

Vengono ritenuti maggiormante significativi gli studi epidemiologici che non hanno evidenziato effetti avversi a lungo termine

1973: gli USA vietano l’uso del DDT

1985: gli USA hanno esportato circa 300 tonn di DDT.
Non sono disponibili dati attuali sulla produzione.

1990: il DDT era prodotto in Italia, Indonesia, India
in quantità stimate
in 30 mln di libbre

Esposizione della popolazione generale a sostanze chimiche

Possibili strategie preventive per la protezione della salute umana

MONITORAGGIO AMBIENTALE

Livelli di xenobiotici in diverse matrici

ARIA SUOLO ACQUA ALIMENTI

MONITORAGGIO BIOLOGICO:

- indicatori di dose interna
- indicatori di effetto biochimico
- indicatori di effetto biologico

I. Disponibilità di matrici biologiche in grado di fornire dati su esposizione corrente e pregressa

II. Biomarkers significativi per rappresentare la dose interna di sostanze tossiche, eventuali effetti biochimici o biologici

III. Accessibilità di metodi analitici validati per l'incertezza estesa ai valori dell'intervallo di riferimento caratteristico degli analiti considerati nella matrice biologica esaminata

IV. Disponibilità di valori di riferimento, ma anche di valori limite per l'interpretazione dei dati ottenuti

Limiti e vantaggi di un confronto con l'esposizione in ambito professionale

Livelli espositivi a uno o più xenobiotici, sensibilmente più elevati della popolazione generale

Modalità di assorbimento della sostanza tossica diversa dalla popolazione generale
(per gli antiparassitari può prevalere la via dermica a quella digestiva)

ESPOSIZIONE a SOSTANZE TOSSICHE (POPOLAZIONE GENERALE)

1. Esposizione multipla a microinquinanti

- Simultanea o sequenziale
- Durata e variazioni storiche

2. Come caratterizzare l'esposizione

Quali microinquinanti nelle matrici ambientali e nella dieta?

Si dispone di metodi analitici adeguati, di serie storiche e di dati comparabili?

Quali microinquinanti nelle matrici biologiche?

3. Modellistica

Quali biomarcatori?

Valori di riferimento

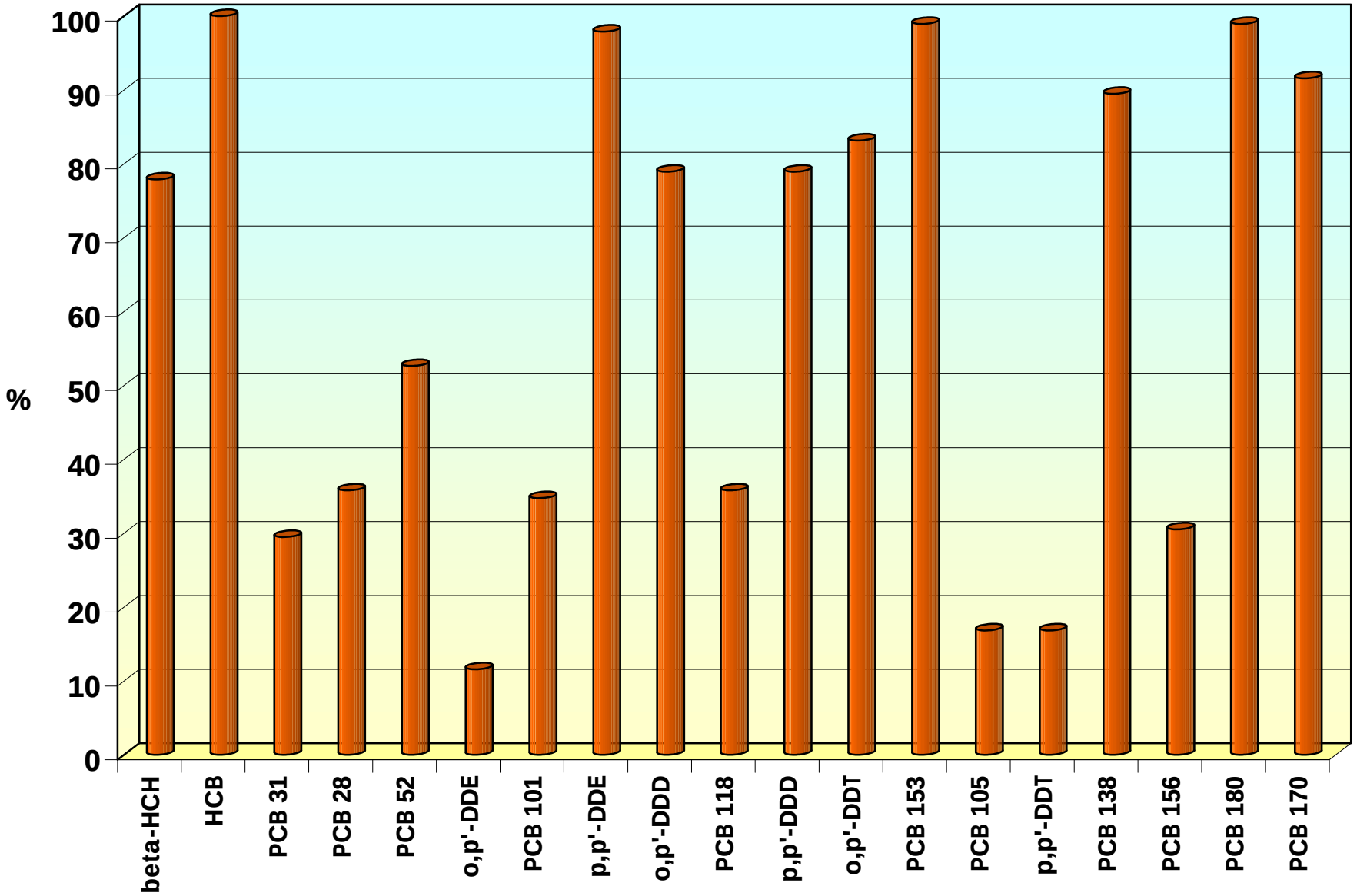
4. Stima probabili effetti tossici

Identificazione di gruppi o popolazioni a più elevata esposizione

Soggetti residenti in Italia (n= 95)

ng/g lipidi	N	N%	MEDIA	DS	MEDIANA	MIN	MAX	5° PERC	50°PERC	95°PERC
beta-HCH	74	78	111	64,6	94,5	15,8	297	33,3	94,5	236
HCB	95	100	54,4	80,5	29,9	1,92	573	15,8	29,9	179
PCB 31	28	29	30,7	21,1	26,1	7,71	116	10,7	26,1	64,7
PCB 28	34	36	30,0	14,1	27,0	10,7	92,1	13,8	27,0	49,3
PCB 52	50	53	57,9	59,7	31,3	10,5	284	12,5	31,3	180
o,p'-DDE	11	12	24,5	22,5	18,7	8,57	79,4	8,68	18,7	67,3
PCB 101	33	35	30,3	47,0	13,2	1,10	241	2,14	13,2	105
p,p'-DDE	93	98	115	112	68,9	10,4	590	24,1	68,9	379
o,p'-DDD	75	79	28,1	24,3	23,1	1,74	122	3,34	23,1	78,2
PCB 118	34	36	27,3	36,7	14,0	3,30	179	4,16	14,0	90,8
p,p'-DDD	75	79	65,1	80,4	40,3	2,11	394	4,51	40,3	290
o,p'-DDT	79	83	197	213	129	2,14	1198	15,8	129	599
PCB 153	94	99	131	95,9	117	2,34	573	20,7	117	290
PCB 105	16	17	24,0	11,3	23,3	8,57	40,3	9,35	23,3	39,7
p,p'-DDT	16	17	83,4	48,0	71,9	16,7	207	28,9	71,9	161
PCB 138	85	89	86,9	56,9	72,5	21,2	275	27,6	72,5	191
PCB 156	29	31	21,1	13,9	15,3	9,24	73,2	9,90	15,3	40,0
PCB 180	94	99	88,0	53,0	81,3	11,7	299	24,0	81,3	188
PCB 170	87	92	36,1	39,8	25,8	5,51	317	11,3	25,8	87,0

Soggetti residenti in Italia (n= 95)
% di positività



Studio: Hauser R., Singh N.P., Chen Z., Pothier L., Altshul L. (2003) *Hum. Reprod*, 18 (12): 2525-2533

Ipotesi: Associazione tra esposizione ambientale a PCB, HCB, DDT, DDE e integrità del DNA (liquido seminale)

Casistica: 212 maschi, partners di coppia subfertile

Metodi: Comet assay per la rilevazione del danno sullo spermatozoo (rottura sulla doppia elica del DNA)

Risultati: Non sono emerse associazioni statisticamente significative tra i parametri acquisiti con il comet assay e alcun singolo congenere di PCB, somma di PCB o *p,p'*-DDE

Conclusioni: Non si sono evidenziate associazioni significative tra i livelli di organoclorurati rilevati nei maschi ed eventuali alterazioni a carico del DNA valutate con il comet assay

Studio: Meeker J.D., Ryan L., Duty S.M., Barr D.B., Herrick R.F., Bennet D.H., Hauser R. (2004) *Hum. Reprod*, 19 (11): 2573-2580

Ipotesi: la popolazione generale è esposta a insetticidi non persistenti a basse concentrazioni. È stato quindi verificato se l'esposizione ambientale a Carbaryl e a Chlorpyrifos può indurre alterazioni del DNA (liquido seminale)

Casistica: 260 maschi, esaminati in ambiente ospedaliero. I soggetti sono stati sottoposti ad analisi di 3,5,6-tricloro-2-piridinolo urinario e di 1-naftolo urinario (rispettivamente metaboliti di Carbaryl e Chlorpyrifos)

Metodi: Comet assay per valutare l'integrità del DNA spermatico (estensione della cometa, percentuale di DNA nella coda della cometa [*tail* % e *tail distributed moment*, TDM])

Risultati: è stato osservato un aumento significativo del *tail* % per un intervallo interquartile (IQR) sia per 1-naftolo urinario, sia per 3,5,6-tricloro-2-piridinolo urinario. Una diminuzione del TDM e soprattutto una correlazione negativa tra il *tail* % e TDM suggeriscono che questi due parametri misurano due differenti tipi di danno al DNA

Conclusioni: l'esposizione ambientale a Carbaryl e Chlorpyrifos può essere associata ad alterazioni del DNA

Studio: Meeker J.D., Ryan L., Barr D.B., Herrick R.F., Bennet D.H., Bravo R., Hauser R. (2004) *Env. Healt Perspect*, 112 (17): 1655-1670

Ipotesi: valutare se l'esposizione ambientale a Carbaryl e a Chlorpyrifos è associata ad una diminuita qualità del seme umano

Casistica: 272 soggetti esaminati in ambiente ospedaliero. Sono stati prelevati campioni spot di urine per la determinazione di 3,5,6-tricloro-2-piridinolo urinario e di 1-naftolo urinario

Metodi: per valutare la quantità del liquido spermatico sono stati considerati i seguenti parametri: concentrazione spermatozoi, % mobili, % mobili morfologicamente normali (oltre a velocità *straight line*, velocità *curvilinear* e *linearity*)

Risultati: **la concentrazione media di 3,5,6-tricloro-2-piridinolo urinario e di 1-naftolo urinario erano pari a 3,22 e 3,19 μg/l. La velocità *straight line* è risultata fortemente correlata con 1-N. Sono emerse associazioni *border line* tra TCPY, concentrazione spermatica e motilità. Non sono state evidenziate associazioni tra 1N, TCPY in urina e morfologia degli spermatozoi**

Conclusioni: **le alterazioni della qualità del seme riconducibili su base statistica al Carbaryl confermano studi precedenti. I dati ottenuti per TCPY sono suggestivi, ma difficili da interpretare, anche a causa del numero limitato di studi condotti sull'uomo e sugli animali**

Studio: Hauser R., Meeker J.D., Singh N.P., Silvia M.J., Ryan L., Duty S.M., Calafat A.M. (2007) *Hum. Reprod*, 22 (3): 688-695

Ipotesi: la distribuzione ubiquitaria degli ftalati ha determinato una significativa esposizione ambientale della popolazione generale. Viene valutata l'eventuale relazione tra ftalati e alterazioni del DNA spermatico

Casistica: 379 soggetti maschi con infertilità clinica monitorati per la determinazione di 2-etil-5-idrossiesilftalato (MEHHP) e 2-etil-5-oxoesilftalato (MEOHP) che rappresentano due metaboliti del DEHP
(2-etilesilftalato)

Metodi: comet assay per la rilevazione del danno sullo spermatozoo (rotture sulla doppia elica del DNA) utilizzando i seguenti parametri: CE, estensione della cometa; percentuale di DNA nella coda (*tail* %); TDM, *tail distributed moment.*

Risultati: il MEP (monoetilftalato), un metabolita del DEHP è stato associato con alterazioni del DNA. Il MEHP (monoetilesilftalato) è stato associato con alterazione dopo correzione per i metaboliti del DEHP (MEHHP e MEOHP)

Conclusioni: alterazione del DNA sono state associate con MEP e MEHP. Da rilevare che i valori osservati dei metaboliti degli ftalati sono risultati simili a quelli della popolazione in generale.

Studio: **Spanò M., Toft G., Hagmar L., Eleuteri P., Rescia M., Rignell-Hydbom, Tyrkiel E., Zvyezday V., Bonde J.P. (2005) *Hum. Reprod*, 20 (12): 3488-3499**

Ipotesi: **diversi studi portano a ritenere l'esistenza di un'associazione tra esposizione ambientale a POPs ed effetti sulla riproduzione. Tra questi i PCB e il *p,p'*-DDE sono considerati potenziali interferenti endocrini.**

Casistica: **707 maschi adulti (193 Inuits, Groenlandia; 173 pescatori svedesi; 141 soggetti residenti a Varsavia, POLONIA; 195 individui residenti a Kharkiv, UCRAINA)**

Metodi: **è stato valutato lo *Sperm Cromatin Structure Assay* (SCSA) per valutare l'integrità DNA/cromatina dello sperma umano. È stato anche determinato il livello nel siero del PCB 153 e del *p,p'*-DDE**

Risultati: **è stato evidenziato un forte incremento dell'indice di frammentazione (DFI) che corrisponde ad un'elevata denaturabilità del DNA, all'aumentare dei livelli sierici del PCB 153. Nessuna relazione è emersa tra i parametri ottenuti con SCSA e le concentrazioni sieriche del *p,p'*-DDE.**

Conclusioni: **l'apporto di PCB con la dieta può avere un impatto negativo sull'integrità della cromatina, per cui sono necessarie ulteriori indagini per confermare tali ipotesi.**

Possibile effetto del ***p,p'*-DDE** sulla fertilità

Studio caso/controllo

73 maschi giovani considerati fertili
GRUPPO DI CONTROLLO

82 maschi giovani considerati subfertili o infertili CASISTICA

analisi standard del seme e determinazione del *p,p'*-DDE nel siero e nel liquido seminale

Il *p,p'*-DDE < LR nei due gruppi per quanto riguarda il liquido seminale

In 23 madri dei soggetti del gruppo di controllo e in 19 madri della casistica, giovani subfertili, il *p,p'*-DDE era *significativamente* più elevato

L'ipotesi è che l'infertilità maschile sia associabile con l'esposizione delle madri al *p,p'*-DDE

EFFETTI SULLA VITA INTRAUTERINA NON RILEVABILI DALL'ANALISI DEL SIERO E DEL LIQUIDO SEMINALE DEI SOGGETTI SUBFERTILI.

Rif.: Charlier C.J., Foidart J.M. (2005) Reprod. Toxicol., 20 (2): 215-220

Valutazione dell'associazione tra fecondazione *in vitro* non riuscita ed esposizione di entrambi i partners a contaminanti ambientali

21 coppie sottoposte a programma "fecondazione *in vitro*" (18 fecondazioni e 3 gravidanze a termine)

Analisi del liquido seminale

Analisi del siero e del fluido follicolare

PCB, antiparassitari, elementi in traccia, cotinina, ma anche progesterone ed estradiolo

Plasma seminale: in 7 campioni su 21 (33,3%) presenza di Mirex

Liquido follicolare: il 50% soggetti *p,p'*-DDE, Mirex, esacloroetano, 1,2,4-triclorobenzene, PCB153 e PCB180; il 38% dei soggetti (8 su 21) presenza di Cd; l'85% dei soggetti (18 su 21) presenza di cotinina

Siero: *p,p'*-DDE, endosulfan I, PCB99-138-153-180 nel 50% dei campioni esaminati

CONCLUSIONI

→ **il Mirex era presente nel plasma seminale dei maschi di tutte le coppie che avevano avuto una gravidanza**

→ **il Cadmio era presente nel liquido follicolare dei soggetti che avevano avuto una gravidanza**

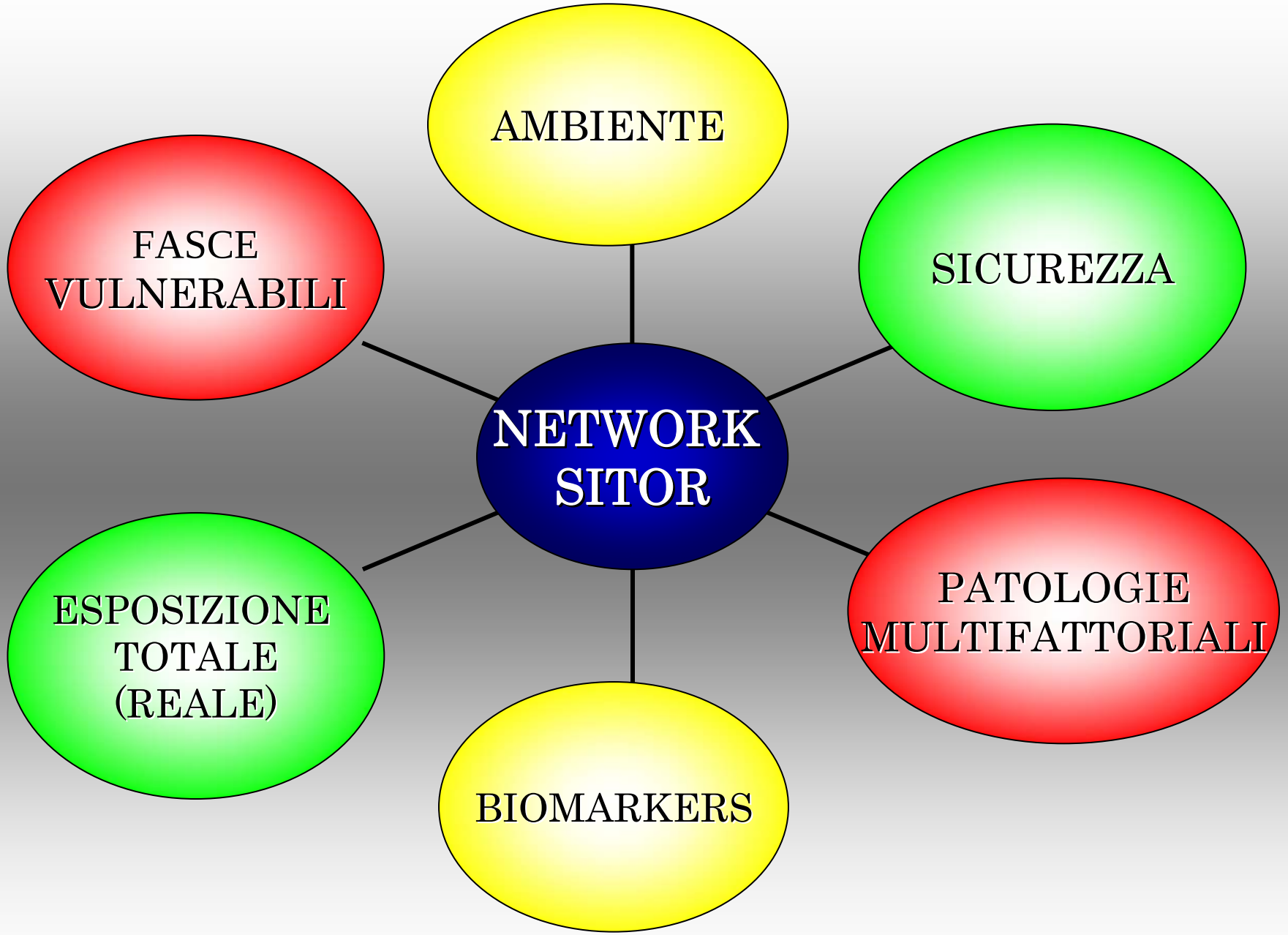
→ **nessuna relazione è emersa tra cotinina nel liquido follicolare in donne gravide e non**

→ **nei soggetti dove i contaminanti erano presenti nel siero e nel liquido follicolare la concentrazione sierica era circa doppia e risultava correlata tra le due matrici biologiche**

→ **la fecondazione è risultata negativamente correlata con il *p,p'*-DDE nel siero e nel liquido follicolare. Era invece positiva per il PCB 49 nel liquido follicolare**

→ **lo studio ha evidenziato che il 50% delle donne sottoposte a IVF presentava un'esposizione "misurabile" a contaminanti nel siero e nel liquido follicolare. Il *p,p'*-DDE era il composto presente più frequentemente ed è stato associato con fecondazione non riuscita**

Rif.: Younglai E.V., Foster V.G., Huges E.G., Trim K., Jarrell J.F. (2002) *Arc. Eut. Cont. Toxicol.* 43 (1): 121-126



VALUTAZIONE DEL RISCHIO DI EFFETTI SULLA SALUTE DA ECDs

OBIETTIVI DEL NETWORK SITOR

- **Studio integrato effetti tossici di microinquinanti (ECDs) presenti nella catena alimentare e in ambienti di vita (priorità definite dalla strategia Europea *Environmental & Health*)**

- **Studio di fattori che possono modulare il rischio tossicologico (dieta, stili di vita, componenti socio-economiche e culturali)**

- **Approfondimento delle conseguenze per fasi vulnerabili della vita (gravidanza e infanzia) relativamente a possibili effetti sul sistema nervoso, endocrino, immunitario e riproduttivo**

- **Caratterizzazione e validazione di *biomarkers* e modelli per l'analisi del rischio (inclusi approcci innovativi quali poliformismi genetici, impiego di biosensori e degli sviluppi recenti della post-genetica)**