



**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI CATANIA**  
Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale  
Dottorato di Ricerca Internazionale in  
“Medicina Sperimentale Clinica e Fisiopatologia Cellulare” – XXVI ciclo  
(Coordinatore: prof. Enzo S. Vicari)

**Tesi di Dottorato**

Valutazione degli effetti dei metalli pesanti e dei policlorobifenili (PCB) sui parametri seminali convenzionali e non convenzionali in soggetti residenti in area industriale ad elevato rischio di crisi ambientale della Sicilia Orientale ed in un gruppo di controllo (area rurale).

Dott.ssa Lucia Olga Vicari

**Relatore**

**Prof. Salvatore Travali**

**Coordinatore**

**Prof. Enzo Saretto Vicari**

Anno Accademico 2013/2014

# INDICE

- Introduzione (premesse generali)	pag.3
1. Segnali di allarme ambientale per la salute Riproduttiva: gli Endocrine Disruptors	pag.5
2. Interesse di approfondire linee di ricerca tossicologica riproduttiva in un'area di indagine della Sicilia Sud-Orientale	pag.9
3. Endocrine Disruptors con proprietà gonado-spermio-tossiche analizzati nella tesi.	
3a. METALLI PESANTI	
-Generalità	pag.12
-Metalli pesanti: rischi ambientali e per la salute	pag.14
- Cadmio (Cd)	pag.16
- Piombo (Pb)	pag.19
- Mercurio (Hg)	pag.20
- Arsenico (As)	pag.21
- Nichel (Ni)	pag.23
-Metalli pesanti: effetti sui parametri spermatici	pag.24
3b. Policlorobifenili (PCB)	pag.27
4. Scopo della tesi	pag.31
5. Materiali e metodi	
- Casistica, articolazione della ricerca e metodologie	pag.32
- Analisi statistica	pag.37
6. Risultati	pag.38
7. Conclusioni	pag.45
8. Considerazioni finali	pag.49
9- Ringraziamenti	pag.50
10.Bibliografia	pagg.51-60

# INTRODUZIONE

## Premesse generali

L'inquinamento ambientale ha subito un forte incremento in seguito al moderno sviluppo tecnologico e, come conseguenza, in aree ad elevato rischio di crisi ambientale si è registrato un aumento di incidenza di malattie, quali: malformazioni congenite, tumori a vari organi, malattie croniche-degenerative (cardiovascolari, broncopatia cronica ostruttiva, malattie a carico dell'apparato digerente, diabete, obesità) ed infertilità.

I processi di intensiva industrializzazione, urbanizzazione, sovra-popolazione e la "chimicalizzazione" nell'agricoltura contribuiscono a generare un intenso traffico di sostanze inquinanti presenti in varie matrici biologiche (aria, acqua, suolo, catena alimentare, bevande) (Joffe, 2003; Kumar, 2004; Lepecka-Klusek et al, 2011).

Nel corso di un convegno patrocinato dalla United States Environmental Protection Agency (US EPA, 1997), gli agenti chimici, presenti come contaminanti ambientali con provato ruolo gonadotossico (con un meccanismo d'azione per lo più simil-estrogenico o più raramente anti-androgenico) furono definiti Endocrine Disruptors (ED).

Numerosi studi indicano che i maggiori effetti tossici sull'apparato riproduttivo maschile sono legati all'esposizione ad ED in alcune fase critiche, quali sviluppo embrionale e fetale, gravidanza e allattamento.

Invece, l'esposizione ad ED, anche a basse-dosi, in età adulta può determinare effetti tossici subclinici, cioè senza altri segni clinici di intossicazione, verosimilmente come effetto tossico cumulativo (dovuto alla presenza di molteplici ED) nell'apparato riproduttivo maschile, che si esprimono come alterazioni dei parametri spermatici e/o del quadro ormonale, sebbene resti difficile stabilire una chiara correlazione di causa-effetto tra rischi occupazionali o espositivi ed infertilità maschile.

Una serie di evidenze epidemiologiche e sperimentali hanno fatto ipotizzare una eziologia ambientale comune, responsabile attraverso vari meccanismi sia di alterazioni dell'apparato riproduttivo (declino della quantità del seme umano, decremento della quantità degli spermatozoi) che di aumento di anomalie congenite del tratto genitourinario (aumento dell'incidenza di malformazioni quali criptorchidismo e ipospadia) che e tumori ormono-sensibili (a carico della mammella, prostata o testicolo).

# **1. I segnali di allarme ambientale per la salute riproduttiva: gli Endocrine Disruptors (ED)**

Il dibattito scientifico sul deterioramento temporale della qualità spermatica, culminato negli anni '90 con la meta-analisi di Carlsen (Carlsen et al, 1992), nel quale si mostrò un declino del 50% della densità (concentrazione/ml) degli spermatozoi tra gli uomini fertili negli ultimi 50 anni, continua a stimolare commenti, critiche e rianalisi (Olsen et al 1995; Saidi et al 1999). Tale trend negativo spermatico è stato confermato da alcuni autori (Auger et al, 1995; Irvine et al, 1996; Menchini-Fabris et al, 1996; Younglai et al, 1998; Bilotta et al, 1999; Gyllenborg et al, 1999;; Zorn et al, 1999; Vicari et al, 2003), ma non da altri (Guillette et al, 1994; Andolz et al, 1999; Paulsen et al, 1996; Handelsman, 1997). Al di là delle critiche ricevute, Carlsen e coll. (Carlsen et al, 1992) hanno il merito di aver sollevato due importanti quesiti, tuttora aperti, sul declino della qualità spermatica:

a) è un fenomeno reale?

b) (e in caso di risposta affermativa) quali sono le cause e le conseguenze?

Le prime risposte a tali quesiti vennero dal Congresso internazionale (promosso dal governo Danese) sul deterioramento della qualità spermatica (Ministry of Environment and Energy, Denmark, Miljøprojekt no. 290, 1995). In tale occasione emersero 2 momenti di “allarme ambientale”, destinati a promuovere altrettante linee di ricerca:

a) fattori chimici e fisici, presenti come inquinanti e/o contaminanti ambientali, inizialmente chiamati xeno-estrogeni, svolgono con meccanismo d'azione simil-estrogenico o antiandrogenico (Colborn et al, 1993; Choi et al, 2004) un'influenza negativa sulla spermatogenesi e/o sul quadro spermatico;

b) i livelli di tale deterioramento non sono geograficamente uniformi.

Successivamente, i termini Endocrine Disruptors (ED) o “endocrine disrupting chemicals” furono conati nel corso di un convegno patrocinato dalla United States Environmental Protection Agency (International Workshop On Endocrine Disruptors,1997). In questa occasione, gli ED sono stati definiti, per il loro meccanismo d’azione gonadotossico simil-estrogenico o anti-androgenico (Fisher et al, 2004), come “agenti esogeni che interferiscono con la produzione, il rilascio, il trasporto, il metabolismo, il legame, l’azione o eliminazione di ormoni che, naturalmente presenti nell’organismo, sono responsabili del mantenimento dell’omeostasi e della regolazione dei processi di sviluppo”.

La Commissione Europea (DG XII) ha organizzato, in collaborazione con la European Environmental Agency e lo European Centre for Environment and Health della WHO, un Workshop internazionale sull’impatto degli ED sulla salute umana e sull’ambiente (Weybrige, UK, 24 dicembre 1996). Nel corso dei lavori di questo Workshop, sono stati discussi i rischi potenziali dovuti agli ED. In tale occasione, furono valutate lo stato dell’arte, identificati i problemi epidemiologici emergenti, valutate le possibili relazioni con l’esposizione a inquinanti ambientali e identificate le necessità future sia per quanto riguarda le attività di monitoraggio che quelle di ricerca. La conclusione del Workshop è stata che il problema degli ED è fonte di preoccupazione e richiede l’adozione di misure di regolamentazione, pur non suscitando al momento particolari allarmi.

Sebbene i livelli del deterioramento non sono geograficamente uniformi, ed il peso delle noxae chimiche sembra limitato ad alcune aree geografiche del nostro pianeta (Swan et al, 2003; Vicari et al, 2004; Nordkap et al, 2012), tuttavia alcuni dati devono tener alto il segnale d’allarme ambientale, quali ad esempio: erogazione di acque potabili con residui di contaminanti nocivi per la salute riproduttiva, segnalata in un distretto di Londra (Ginsburg et al, 1994); persistenza di residui di fitofarmaci (meglio noti come pesticidi) nelle alghe

lungo la costa sud-orientale della Sicilia (Amico et al, 1979) e su specialità orto-frutticole (Araujo et al, 1999); momenti di apparente stabilità ambientale dei livelli di inquinazione di organo-clorurati per 5-6 anni coincidono con lo stabilizzarsi della densità nemaspermica (Loganathan et al, 1994).

Gli xenobiotici ambientali capaci di danneggiare l'apparato riproduttivo sono molti come per esempio: metalli pesanti, idrocarburi policiclici aromatici (PAH), policlorobifenili (PCB), e per essi sono stati evidenziati meccanismi d'azione comuni, quali competizione ormonale (è il caso appunto degli *endocrine disruptors*) o danno ossidativo da iperproduzione di radicali liberi dell'ossigeno (ROS). Inoltre, i PAH legano il DNA formando complessi (addotti del DNA), che danneggiano la struttura genomica. Tali sostanze possono agire sulla linea germinale, oppure direttamente sugli spermatozoi, causando anche danni genetici ed epigenetici che, se trasmessi, possono provocare tumori, malformazioni o danno sulla qualità spermatica della prole. A tal proposito, studi epidemiologici sull'incidenza delle malformazioni del tratto urogenitale e sulla riduzione della qualità spermatica nei soggetti residenti in aree ad elevato tasso di inquinamento o per motivi professionali esposti ad ED, in quanto sono di rilevanza a sostegno di questa conclusione.

Altri studi epidemiologici mostrano alterazioni quantitative dei parametri spermatici convenzionali (quali riduzione della densità e/o aumento delle atipie morfologiche nemaspermiche) e di alcune proprietà biofunzionali (parametri spermatici non convenzionali) in soggetti esposti per motivi professionali e negli abitanti di aree contaminate da vicini insediamenti industriali. A tal riguardo, studi condotti in un'area della Repubblica Ceca (Teplice), hanno mostrato un aumento della frammentazione della cromatina spermatica, un aumento della percentuale degli spermatozoi con atipie morfologiche ed un aumento del tasso di aneuploidie spermatiche che correla con un

aumento delle concentrazioni nell'aria di polveri PM10 e PAH, particolarmente evidente nei mesi invernali, conseguente ad un alto consumo di carbone per motivi industriali e per il riscaldamento delle abitazioni. Addotti del DNA prodotti dai PAH ambientali sono stati trovati nel sangue e nella placenta negli abitanti della stessa area. Pertanto Rubes et al. ipotizzano che i PAH- DNA addotti possono formarsi anche negli spermatozoi dei soggetti esposti, ed essere responsabili dell'aumento della frammentazione del DNA osservata.

Nello stesso arco temporale degli ultimi 50 anni, al trend secolare di peggioramento del quadro spermatico si è associato un parallelo aumento di frequenza del carcinoma testicolare: non è del tutto chiaro se questi due trend temporali sono fenomeni indipendenti o interconnessi tra loro (Adami et al, 1994; UK Testicular Cancer Study Group, 1994; Jørgensen et al, 2011).

I due trend biologici (aumentata frequenza di infertilità maschile da cause testicolari ed aumentata incidenza del carcinoma testicolare) specie in Danimarca ed in altri Paesi del Nord-Europa (Skakkebaek NE et al,2004; Boisen KA et al,2005; Boisen KA et al,2004). sembrano interconnessi dal momento che hanno in comune fattori eziologici predisponenti (estrogeni materni, ED) ed alcuni fenotipi (basso peso alla nascita, criptorchidismo, ipospadia) (Skakkebaek et al, 2003; Steinhardt et al, 2004).



## **2. Interesse di approfondire linee di ricerca tossicologica riproduttiva in un'area di indagine della Sicilia Sud-Orientale**

L'area d'indagine riguarda l'area ad elevato rischio di crisi ambientale di Siracusa. Il triangolo comprendente il polo industriale Priolo-Augusta-Melilli è stato, nel novembre del 1990, dichiarata "ad alto rischio di crisi ambientale", per i seguenti fattori di rischio:

- 1) la sismicità dell'area S12 (voto Comitato Regionale Urbanistico n°41/91);
- 2) la mancanza di distanza di sicurezza degli impianti e degli stoccaggi dai centri abitati;
- 3) frequenti fenomeni di inversione termica, formazione di smog per la fotosintesi di ozono e idrocarburi, presenza di polveri organiche ed inorganiche;
- 4) elevata produzione di rifiuti, circa 170.000 tonn. annue (di cui 1300 tonn. altamente pericolose).

Lo stesso Ministero dell'Ambiente (Prof. Clini) in un documento della commissione ambiente del Senato del 23/07/02 riconosce come i siti di Priolo-Melilli-Augusta, non siano più un area a rischio di crisi ambientale, ma "un area in piena crisi ambientale per la quale si rendono indispensabili interventi legislativi e finanziari che consentano di affrontare con tempestività la drammatica emergenza".

Nella tesi, l'area di studio ricade in provincia di Siracusa (Italia) e comprende tutto il territorio comunale di Melilli, che si estende per una superficie di 136 Km<sup>2</sup> e conta 13304 abitanti, confina a nord con il territorio di Augusta, a sud con quelli di Priolo e Siracusa, a ovest con Carlentini e Sortino.

In realtà tra i territori di Augusta e Melilli esistono dei rapporti più complessi poiché varie isole e fasce di territorio si intersecano rendendo le due cittadine molto integrate tra loro.

I centri abitati del territorio melillese sono tre: Melilli e le due frazioni di Villasmundo e Città Giardino. La cittadina di Melilli si colloca sul settore orientale dei Monti Iblei e più precisamente in quella zona dove essi prendono la denominazione di “Monti Climiti” per la loro peculiarità morfologica di mostrare, lungo i pendii, numerosi “gradoni” (dal lat. Climax = gradazione).

La frazione di Villasmundo conta circa 4800 abitanti è posta a nord del territorio del Comune di Melilli, l'altra frazione Città Giardino ha circa 1800 abitanti ed è situata più a sud al confine con Siracusa.

L'area indagata è limitrofa ai territori adiacenti di Augusta e Priolo, nei quali insistono numerose industrie del polo petrol-chimico, un'azienda produttrice di materie prime per detersivi, una centrale termoelettrica, un cementificio, e una conceria.

Alcuni studi di bio-monitoraggio di metalli pesanti sulla zona Priolo-Augusta, utilizzando talli di *Xanthoria parietina* come bioindicatore della qualità dell'aria e quindi dell'inquinamento, hanno fatto riscontrare un livello elevato di metalli pesanti in queste zone (Alonzo et al, 2004; ARPA Sicilia – POR 2000-2006).

Inoltre, sempre negli stessi comuni del polo industriale della provincia di Siracusa, Priolo-Augusta-Melilli, già dichiarati siti di interesse nazionale poiché vicini ad un grande polo industriale ad elevato rischio ambientale, la coesistenza di inquinamento ambientale ed elevata incidenza di alcuni tipi di tumore (polmone, fegato, pancreas, colon, stomaco) e di malformazioni del tratto urogenitale maschile come l'ipospadia, riscontrata con una frequenza circa due volte superiore rispetto a quelle di aree non esposte, ci ha indotto a

valutare l'impatto dell'inquinamento ambientale sulla funzione riproduttiva maschile negli abitanti del comune di Melilli.

Nell'ambito del Progetto SENTIERI, coordinato dall'Istituto Superiore di Sanità relativo ad un recente progetto/studio epidemiologico a livello nazionale con riferimento anche all'area di Priolo-Augusta-Melilli si riscontrano, come era prevedibile, eccessi della mortalità generale per tutte le cause e per tutti i tumori tra gli uomini, per malattie dell'apparato digerente tra le donne (Pirastu et al, 2011).

Nei siti di interesse nazionale, secondo il Ministero dell'Ambiente e dei Territori, l'incidenza maggiore di contaminanti spetta ai metalli pesanti e si attesta sul 34% (v. fig. 1)

**Fig.1**



### **3. Endocrine Disruptors con proprietà gonado-spermio-tossiche analizzati nella Tesi.**

#### **3a. METALLI PESANTI**

##### **-Generalità**

Non esiste una definizione universalmente accettata di metallo pesante basata sulle proprietà chimico-fisiche di tali elementi chimici. In genere, vengono definiti metalli pesanti, gli elementi chimici che hanno le seguenti caratteristiche:

- densità  $>5 \text{ gr/cm}^3$
- peso atomico  $>20$ .
- si comportano in genere come cationi,
- presentano una bassa solubilità dei loro idrati: quando il pH dell'acqua diminuisce, la solubilità del metallo aumenta e le particelle del metallo diventano più mobili (ecco perché i metalli sono più tossici in acque dolci!);
- spiccata attitudine a formare complessi molecolari (specie nel citoplasma cellulare). Questa caratteristica fa includere nell'elenco dei metalli pesanti anche elementi, come il selenio (Se) e l'arsenico (As), che non sono metalli, sebbene siano dotati di proprietà fisiche e chimiche simili a quelle dei metalli in senso stretto;
- grande affinità per lo zolfo, formando complessi (cationi) metalli pesanti - gruppi sulfidrilici (-SH), disturbano la velocità delle reazioni enzimatiche (specie metaboliche) svolta normalmente dai gruppi -SH, causando danni alla salute dell'uomo;
- diversi stati di ossidazione, a seconda delle condizioni di pH.

Per questi motivi è stato talora proposto di abbandonare la classificazione in base alla densità o al peso atomico in favore di una nuova classificazione tripartita degli elementi chimici, a seconda che esibiscano una prevalente affinità per gli atomi di ossigeno, per quelli di azoto e zolfo, o infine un comportamento intermedio tra le due precedenti categorie (Hogan, 2010).

In *Biologia* e in *Medicina*, un sottogruppo particolarmente importante di metalli pesanti è costituito dai cosiddetti metalli in traccia (o elementi in traccia) (Underwood, 1977; Templeton, 2003; Rusyniak et al, 2010).

Sono presenti nei più comuni suoli e rocce della crosta terrestre in concentrazioni <0.1%: le concentrazioni nei suoli, nei sedimenti e nelle rocce sono solitamente di parti per milione (ppm) o per miliardo (ppb). Nei fluidi biologici dei vertebrati, i metalli in traccia sono presenti in concentrazioni <1 µg /gr. di peso (Templeton, 2003), e comunque se la loro concentrazione nel tessuto è inferiore a quella del Fe (Underwood, 1977). In base agli effetti fisiopatologici, i metalli in traccia possono essere suddivisi in due subgruppi:

a) il primo è costituito da 15 microelementi essenziali per la vita (arsenico, cobalto, cromo, rame, fluoro, ferro, iodio, manganese, molibdeno, nichel, selenio, silicio, stagno, vanadio e zinco) (Templeton, 2003) in quanto implicati in importanti processi metabolici.

b) il secondo comprende microelementi tossici, quali cadmio (Cd), mercurio (Hg), cromo (Cr) e piombo (Pb) (Rusyniak et al, 2010) per gli organismi viventi, anche a basse concentrazioni. Sono componenti naturali della crosta terrestre, non possono essere degradati, nè distrutti. In piccola misura, entrano nel nostro organismo attraverso alimenti, acqua ed aria.

I metalli pesanti sono pericolosi, essendo ecotossici e biotossici, in quanto tendono a bioaccumularsi. Si parla di bioaccumulazione allorquando si assiste ad un aumento di concentrazione di un prodotto chimico in un organismo biologico col tempo, confrontata

alla concentrazione dello stesso prodotto chimico nell'ambiente. I residui si bioaccumulano negli esseri viventi, ogni volta che sono assimilati ed immagazzinati più velocemente di quanto sono scomposti (metabolizzati) o espulsi.

## **Metalli pesanti: rischi ambientali e per la salute**

Una ricerca sistematica nella letteratura internazionale degli ultimi 10 anni su PubMedline, usando come parole-chiave “metalli pesanti ed ambiente”, ha portato alla identificazione di 27045 citazioni. Di essi, 208 citazioni focalizzano l'attenzione su “metalli pesanti e tossicità” ed il 74.5% (155 /208 items) è dedicato a citazioni su “metalli pesanti ed infertilità”.

Il contenuto di metalli pesanti e metalloidi nei suoli è dovuto a fattori naturali e all'attività dell'uomo; in assenza di apporti antropici il tenore rilevato è principalmente il risultato della composizione mineralogica e granulometrica dei sedimenti e della loro alterazione legata ai processi pedogenetici.

I metalli pesanti sono introdotti nei sistemi acquatici come conseguenza dell'erosione di terreni e di rocce, dalle eruzioni vulcaniche e da diverse attività umane (antropiche) che coinvolgono l'estrazione mineraria, trattamento, o uso di metalli o sostanze che contengono metalli inquinanti.

Quindi, le sorgenti di inquinamento da metalli pesanti possono essere: l'erosione naturale; gli impianti di combustione; l'estrazione mineraria.

I metalli pesanti come Cd, il Pb e Hg sono sostanze inquinanti spesso presenti nell'aria come risultato di diversi tipi di attività industriale. Anche quando la loro concentrazione nell'atmosfera è bassa, si possono accumulare nel terreno entrando nella catena alimentare (sia via terra che via acqua). All'esposizione ai metalli pesanti sono associati molteplici effetti sulla salute, con diversi gradi di gravità e condizioni: malattie

renali ed alle ossa, disordini neuro-comportamentali e dello sviluppo, ipertensione arteriosa e, potenzialmente, anche cancro al polmone.

Nonostante i miglioramenti tecnologici abbiano portato a una diminuzione nell'esposizione ambientale, Cd, Pb e Hg sono ancora presenti nell'atmosfera, spinti anche a grande distanza dalle loro fonti di emissione dal trasporto atmosferico.

Il rapporto "Health risks of heavy metals from long-range transboundary air pollution", pubblicato congiuntamente dall'OMS Europa e dalla Convention Task Force on the Health Aspects of Air Pollution, si basa sui contributi di un gruppo internazionale di esperti. Lo studio riesamina le informazioni disponibili sulle fonti, sulle proprietà chimiche e sulla distribuzione spaziale dell'inquinamento atmosferico provocato da Cd, Pb e Hg, valutando anche i rischi potenziali per l'Europa.

## Cadmio (Cd)

È un elemento chimico compreso nello stesso sottogruppo di Zn e Hg. Il solo ione formato dal Cd è  $2+$ . Si ottiene, per lo più, come sottoprodotto dalla fusione dello Zn, dato che in natura i due metalli si presentano in genere associati. Il Cd deriva le sue proprietà tossicologiche dalla somiglianza chimica con lo Zn, che viene considerato un micronutriente essenziale per piante, animali ed esseri umani; è bio-persistente ed una volta assorbito da un organismo permane per molti anni (nell'ordine di decine per l'uomo) prima di essere espulso.

L'assunzione quotidiana media per gli esseri umani è valutata intorno a  $0.15 \mu\text{g}$  dall'aria ed  $1 \mu\text{g}$  dall'acqua.

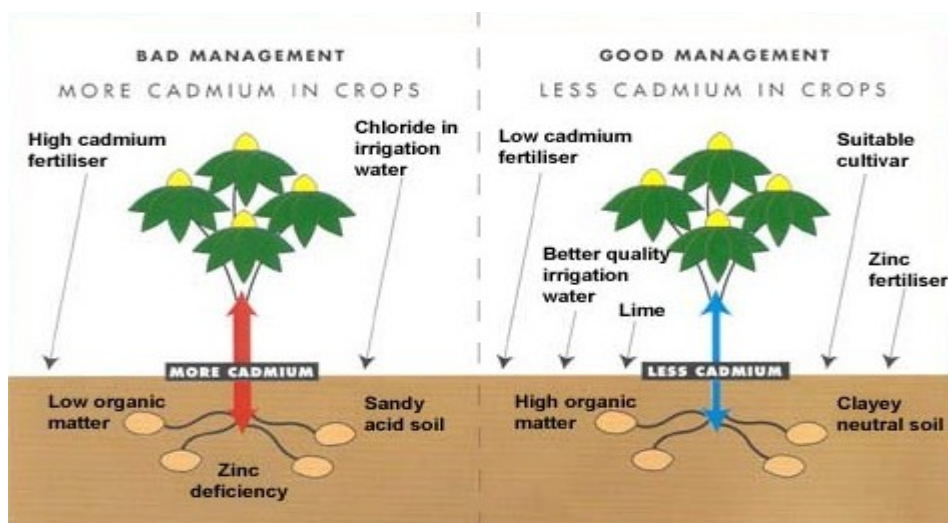
Le vie principali di esposizione al Cd per l'uomo sono:

a) il cibo. Gli alimenti rappresentano la via principale di esposizione al Cd per i non fumatori, dovuta all'aggiunta di Cd al terreno agricolo da varie fonti (deposizione in atmosfera e applicazione di fertilizzanti) e assorbimento da cibo e da produzioni di foraggio. Parte del Cd finisce nel terreno dopo che il fertilizzante viene applicato sul terreno coltivabile ed il resto del Cd finisce nell'acqua superficiale quando lo spreco dalle produzioni del fertilizzante è fatto uscire dalle aziende di produzione. Il Cd è fortemente assorbito dalla materia organica nel terreno.(v. Fig 2). I terreni acidificati aumentano l'assorbimento del Cd da parte delle piante: ciò costituisce un potenziale pericolo per gli animali (come bovini, ovini, suini e pollame) che dipendono dalle piante per sopravvivere. I vermi di terra ed altri organismi essenziali per il terreno sono estremamente suscettibili all'avvelenamento da Cd. Possono morire a concentrazioni molto basse con conseguenze sulla struttura del terreno stesso, concentrazioni di Cd più elevate possono influenzare i processi dei microrganismi e minacciare l'intero ecosistema del suolo.



I cibi ricchi in Cd (ad esempio: fegato, funghi, crostacei, mitili, polvere di cacao ed alghe secche) possono notevolmente aumentare la concentrazione di Cd nel nostro organismo e esprimere varie forme di intossicazione cronica (v. oltre), dato che è bio-persistente anche per tempi dell'ordine di decine di anni.

**Fig.2**



b) il fumo di tabacco. Un pacchetto di 20 sigarette può portare all'inalazione di circa 2-4 µg di Cd, ma i livelli possono variare ampiamente. Il fumo di tabacco trasporta il Cd nei polmoni,. Il sangue lo trasporta con il resto del corpo dove può amplificare l'effetto rafforzando il Cd già presente negli alimenti ricchi di Cd.

c) per contatto (il Cd serve per fissare i colori sui tessuti)

L'uso più significativo è nelle batterie di Ni/Cd, come fonti di energia ricaricabile: durante la ricarica della batteria, l'idrossido solido che si era depositato sull'elettrodo metallico viene nuovamente trasformato in Cd metallico

d) un'altra esposizione ad alti livelli di Cd può avvenire per le persone che vivono in prossimità di discariche di rifiuti o di fabbriche che scaricano Cd nell'aria o per gli operai che operano nell'industria della raffinazione del metallo.

*Malattie legate alla esposizione al cadmio.* Il Cd è considerato uno dei principali responsabili di malattie associate con avvelenamento da metalli pesanti [Hu, 2000]. Deriva le sue proprietà tossicologiche proprio dalla sua somiglianza chimica allo Zn, un micronutriente essenziale per le piante, gli animali e gli esseri umani. Il Cd, trasportato nel fegato principalmente tramite il sangue, si lega con alcune proteine e forma complessi che sono trasportati ai reni dove si accumula e danneggia i sistemi di filtrazione. Il Cd è stato identificato come potenziale causa di cancro al polmone per gli esseri umani. I gruppi di popolazione più a rischio sono gli anziani, i diabetici, i fumatori e le donne in gravidanza..

Nel 1999, l'Agenzia per le sostanze tossiche e Registro di malattie (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, ATSDR) ha posto il Cd tra le 7 sostanze presenti nell'ambiente, che sono particolarmente pericolose per la salute umana. La lista completa incluse 275 voci in quel tempo (ATSDR, 1999). E' stato dimostrato negli animali in fase gestazionale che l'esposizione intrauterina al Cd determina nel neonato riduzione di peso alla nascita, e nelle fasi successive di crescita ridotto sviluppo di massa corporea, lento processo di ossificazione e disturbi neurocomportamentali di sviluppo (Baranski, 1984). Il Cd può danneggiare reni e ossa: tra gli effetti principali c'è un aumento della secrezione nell'urina di proteine a basso peso molecolare e un maggior rischio di osteoporosi.

## **Piombo (Pb)**

Il Pb non rappresenta un problema ambientale fintanto che non si dissolve nella sua forma ionica. Lo ione stabile del Pb è del tipo 2+; negli ambienti fortemente ossidanti il Pb può formare lo ione 4+. Il Pb non reagisce di per sé con gli acidi diluiti: in forma elementare è un elemento stabile, rimane tale persino se viene a contatto con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> abbastanza concentrato.

Il Pb è fra i metalli non ferrosi più riciclati e la sua produzione secondaria si è quindi sviluppata costantemente nonostante la discesa del suo costo. Si conoscono almeno 8 ampie categorie di uso: batterie, additivi per benzina (non più permessi nella UE), prodotti rotolati ed estrusi, leghe, pigmenti e composti, guainatura di cavi, colpi e munizioni.

Il Pb è immesso nell'ambiente sia da fonti naturali che antropogeniche.

Le vie di esposizione al Pb sono: acqua potabile, cibo in scatola, aria (inquinamento atmosferico, gas di scarico), terreno, polvere derivante da vernice vecchia a base di Pb, tinture. Attualmente, in Europa la media più bassa del livello di Pb è di circa 20 µg/l, ma mancano informazioni attendibili relative a molte zone.

Il Pb è una potente neurotossina. L'esposizione a questo metallo pesante può portare a effetti sul comportamento e sullo sviluppo del feto, di neonati e bambini, ed indurre ipertensione arteriosa negli adulti. Gli studi epidemiologici mostrano che gli effetti sulla salute dei bambini sono associati a livelli di Pb nel sangue di circa 100-150 µg/l, ma ci sono indicazioni della pericolosità del Pb anche a concentrazioni <100 µg/l.

## Mercurio (Hg)

Hg è l'unico metallo che si trova allo stato liquido a temperatura ambiente, con l'insolita proprietà di essere un ottimo conduttore di elettricità. Un composto di ione di Hg è il minerale HgS, insolubile in acqua.

Hg è una sostanza tossica e ha origini sia antropogeniche che naturali. In entrambi i casi viene emesso nell'aria nella sua forma elementare e inorganica, che può essere convertita biologicamente in composti organici. Nei sedimenti fangosi dei fiumi e dei laghi (condizioni anaerobiche) forma un composto covalente con l'anione metile: dimetilmercurio = Hg (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. Tale composto rappresenta la forma principale di assunzione attraverso la catena alimentare e non l'inalazione di Hg negli organismi viventi, specie nei pesci dove si bioaccumula.

Le vie principali di contaminazione per l'uomo sono: pesci di grossa taglia, cereali trattati con fungicidi, cosmetici, coloranti, detersivi per pavimenti, filtri dei condizionatori d'aria, conservanti per il legno, tatuaggi, alcune paste di otturazione per denti.

Hg è una sostanza tossica che non ha effetti noti sulla biochimica o fisiologia umana e non si trova naturalmente negli organismi viventi. L'avvelenamento inorganico da Hg è associato a tremori, gengiviti e/o cambiamenti psicologici secondari, insieme ad aborto spontaneo e malformazioni congenite (da monometilmercurio e dimetilmercurio). Contrariamente a quanto osservato nei Paesi extra-Europei, in Europa c'è stata una riduzione nel livello delle emissioni di Hg, scese intorno al ¾ fra il 1970 e il 1998 (NAEI), principalmente a causa del miglioramento dei controlli sulle celle a mercurio e sulla loro sostituzione e della riduzione del consumo di carbone. Le fonti principali di emissione di Hg nel Regno Unito, stimate da 13 a 36 tonnellate all'anno (DERA), sono la lavorazione del cloro nelle celle a Hg, la produzione di metalli non ferrosi, la combustione del carbone ed la cremazione.

## Arsenico (As)

As compare in tre forme allotropiche e presenta numeri di ossidazione -3,+3,+5; la forma stabile è un solido cristallino grigio-argento, fragile, che si appanna velocemente in aria e ad alte temperature brucia per formare una nube bianca di triossido di As. Fa parte del gruppo Va della tavola periodica che si lega rapidamente con molti elementi. Dal punto di vista chimico, As è molto simile al suo omologo, il fosforo (P), al punto che lo sostituisce parzialmente in alcune reazioni biochimiche, da cui il suo effetto tossico. Scaldato, si ossida rapidamente ad ossido arsenioso, dal tipico odore agliaceo.

As ed alcuni suoi composti sublimano, cioè passano direttamente dalla fase solida a quella gassosa. As si trova naturalmente sulla terra in piccole concentrazioni. As nell'atmosfera proviene da varie fonti: i vulcani liberano circa 3000 tonnellate all'anno ed i microorganismi liberano metilarsine volatili nella misura di 20.000 tonnellate all'anno, ma l'attività umana è responsabile di molto di più: 80.000 tonnellate di As all'anno sono liberate dalla combustione dei combustibili fossili.

La maggior parte del As si presenta combinato allo zolfo in minerali quali arsenopirite (AsFeS). Non è estratto come tale perchè è prodotto come sottoprodotto della raffinazione dei minerali di altri metalli, come rame e piombo. La produzione mondiale di As, sotto forma del relativo ossido, è intorno a 50.000 tonnellate all'anno, molto al di sopra della richiesta industriale. La Cina è il paese esportatore principale, seguito da Cile e Messico.

Il ciclo dell'arsenico si è ampliato come conseguenza dell'interferenza umana e a causa di ciò grandi quantità di As finiscono nell'ambiente e negli organismi viventi. As è principalmente emesso dalle industrie produttrici di rame, ma deriva anche dalla produzione di Pb e Zn e dall'agricoltura. *L'arseniato di Pb* è stato usato fino a buona parte

del XX secolo come pesticida sugli alberi da frutto, con gravi danni neurologici per i lavoratori che lo spargevano sulle colture.

As è uno degli elementi più tossici che esistano. Malgrado il loro effetto tossico, legami di arsenico inorganico si presentano naturalmente sulla terra in piccole quantità.

Gli esseri umani possono essere esposti ad As attraverso cibo, acqua ed aria; contatto della pelle con terreno o acqua contenente As. I livelli di As negli alimenti sono ragionevolmente bassi ma si possono trovare livelli elevati di As in pesci e frutti di mare, poichè i pesci assorbono As dall'acqua in cui vivono. Fortunatamente questa è principalmente una forma organica ragionevolmente inoffensiva di As, ma i pesci che contengono quantità significative di As inorganico possono essere un pericolo per la salute umana.

Esiste un gas a base di As chiamato *arsina* ( $AsH_3$ ), che può causare forme di tossicità acuta e cronica nell'uomo, e rappresenta anche una vera minaccia per l'ambiente (forte inquinante dell'acqua). In caso di *intossicazione acuta da arsina* insorgono disturbi gastrointestinali, aritmie e difficoltà nel trasporto del segnale nervoso. Se questa intossicazione non viene curata, la morte insorge nel giro di 24 ore o al massimo di 4 giorni. Nel caso di *intossicazione cronica da arsina* gli effetti provocati sono dei fenomeni di ipercheratosi ed iperpigmentazione, con malattia del "piede nero" (ridotta circolazione del sangue con principio di cancrena), degenerazione delle fibre sensitive, epatopatia e depressione del midollo osseo. As presenta spiccate proprietà cancerogene alla cute, al polmone ed al fegato; ha anche un meccanismo genotossico, quindi aumenta la proliferazione cellulare con rilascio di fattori di crescita, modifica la riparazione del DNA ed infine partecipa allo stress ossidativo con produzione di radicali liberi dell'ossigeno.

## Nichel (Ni)

Per le sue caratteristiche chimico-fisiche, il Ni è un metallo abbondantemente usato nell'industria, soprattutto per la preparazione delle leghe caratterizzate da resistenza al calore e alla corrosione. In particolare, il Ni è impiegato per la produzione della maggior parte degli oggetti di uso quotidiano con i quali siamo perennemente in contatto: bigiotteria, orologi, cellulari, maniglie, cerniere, stoviglie, pentole, accendini, forbici, aghi, batterie, coloranti, materiale elettrico, ceramiche, parti metalliche di occhiali. È un componente anche delle tinture per capelli e dei prodotti per le permanenti. Leggendo le etichette, possiamo constatare come il Ni sia un ingrediente usato anche in cosmesi, lo ritroviamo infatti, nello shampoo, prodotti per il make-up, smalti (in particolare quelli di colore verde), prodotti per la rasatura, dentifrici.

Ni, come solfato, è presente in moltissimi alimenti tra i quali lenticchie, fagioli, cacao, nocciole, liquirizia per citare quelli che ne contengono una buona quantità; molte verdure e frutti come gli asparagi, spinaci, cipolle, funghi, kiwi, pomodoro che comunque ne contengono quantità significative.

Un'*intossicazione da Ni* causa : dermatiti (che si manifestano con: eritemi, eczemi, psoriasi, prurito, perdita di capelli, alterazioni ungueali) e/o mucositi che colpiscono tutti gli apparati e organi cavi rivestiti da mucose, determinando più frequentemente: afte, esofagiti da reflusso, gastro-duodeniti, ulcere, coliti, ragadi anali, vaginiti, cistiti; riniti, laringiti, faringiti, tracheo-bronchiti.

## **Metalli pesanti: effetti sui parametri spermatici**

Il ruolo dei metalli pesanti quali “endocrine disruptors” (ED) è stato ampiamente dimostrato. Nel corso di questi anni, numerosi studi *in vitro* ed *in vivo* hanno dimostrato l’effetto nocivo dei seguenti metalli pesanti Pb, Cd, Hg, As, Ni sulla salute riproduttiva maschile e/o sui parametri spermatici (Benoff S et al,2000; Choy CM et al,2002; Dawson EB et al,1998; De Rosa M et al,2003; Jurasovic J et al,2004; Hernandez–Ochoa I et al,2005; Meeker JD et al,2008; Pant N et al,2003; Telisman S et al,2000; Telisman S et al,2007; Xu DX et al,2003).

L’esposizione a basse dosi è un fenomeno ubiquitario che si verifica in seguito alla contaminazione degli alimenti, delle acque e dell’aria.

Ecco perché, scopo della presente tesi è stato quello di determinare le concentrazioni di Pb, Cd, Hg, As e di Ni nel sangue e nel plasma seminale di soggetti residenti in aree della Sicilia con diverso inquinamento ambientale.

Sebbene rimangano problematiche aperte sul ruolo dell’esposizione ambientale ai metalli pesanti, diversi studi su esposizione professionale industriale ed infertilità maschile hanno dimostrato una relazione tra le alterazioni dei parametri spermatici e gli elevati livelli di metalli pesanti riscontrati nel sangue e nel plasma seminale.

D’altra parte l’epitelio dei tubuli seminiferi è uno dei tessuti più sensibili e vulnerabili all’azione di eventuali modifiche di fattori bio-geo-chimici e ambientali (Kabata-Pendias e Mukherjee, 2007).

L’esposizione a metalli pesanti è un fattore di rischio cruciale per la spermatogenesi (Marzec-Wróblewska et al., 2012). Ad alcuni metalli (Cr, Pb, Cd) è stato riconosciuto un effetto spermiotossico (Meeker et al, 2008), con riduzione di uno o più parametri spermatici convenzionali (motilità, morfologia e densità) e/o interferenza su alcuni processi



fisiologici bio-funzionali (capacitazione e reazione acrosomiale) (Cd e Pb), mentre altri metalli (Zn, Mg, Ca) sono necessari in tali processi (Marzec-Wróblewska et al., 2012).

Molti risultati convergono sull'impatto negativo di particolari metalli sui parametri spermatici, esplorando tali parametri in soggetti occupazionalmente esposti ai metalli pesanti. Per altro, la valutazione dei metalli pesanti sui parametri spermatici ha contribuito ancor più a precisare la definizione dei livelli "essenziali" o "critici" di tali elementi, ed il contributo relativo svolto dai singoli metalli sui parametri di studio. In particolare:

- alcuni metalli in tracce (Zn) ed alcuni elementi (Ca, Mg) sono riconosciuti come "essenziali", in quanto svolgono un ruolo indispensabile per le funzioni della cellula spermatica in condizioni fisiologiche (Marzec-Wróblewska et al., 2012);

- altri metalli (Cu, Mn, Co, Fe, Se) assicurano lo svolgimento di alcune proprietà funzionali del gamete maschile, ma con una "ristretta finestra di concentrazione tollerata": una loro concentrazione in "eccesso" e "carezza", può essere tossica per lo spermatozoo (Hoffman et al., 1985).

Altri metalli (Al, Cu, Ni) sembrano indurre alterazioni anatomo-strutturali del testicolo e dell'epididimo o influenzare i processi di interazione sperma-microambiente testicolare/epididimario (Marzec-Wróblewska et al., 2012).

Metalli pesanti tossici (Pb, Cd, Hg) inseriti nell'elenco degli ED, svolgono effetti dannosi e spermiotossici anche a basse concentrazioni, e/o interferenza su alcuni processi fisiologici bio-funzionali (capacitazione e reazione acrosomiale) (Cd e Pb) (Akinloye et al, 2006; Benoff et al, 2009; Grotto et al, 2010)

Infine, meritano un approfondimento di studi ed una rivalutazione futura:

- Al, Cr, Fe, in quanto sembrano svolgere effetti spermiotossici, con riduzione di uno o più parametri spermatici convenzionali (motilità, morfologia e densità) (Hovatta et al, 1998)

- Mn, Cu, Ni e Se, in quanto svolgono funzioni sugli spermatozoi ancora incerte, ambigue non del tutto note (Marzec-Wróblewska et al., 2012).

### **3b. Policlorobifenili (PCB)**

E' ormai ampiamente riconosciuto il ruolo di "distruttori endocrini" svolto dai policlorobifenili (PCB), idrocarburi di origine industriale caratterizzati da una struttura bifenilica (due anelli aromatici) a cui sono legati da 1 a 10 atomi di cloro.

I PCB sono una famiglia di 209 composti chimici sintetici, poliaromatici, lipofili, persistenti (emivita 1- >10 anni), con bioaccumulo ubiquitario su tutte le matrici biologiche (suolo, sedimenti,aria, acqua) segnalati in USA in una popolazione generale campione (Centers for Disease Control and Prevention, 2003).

Il termine PCB viene spesso utilizzato per definire, più che il singolo congenere, l'intera classe di composti o miscele commerciali tipo Aroclor. Nel corso degli anni, sono state proposte diverse classificazioni per i PCB: la più utilizzata è quella di Ballschmiter e Zell del 1980, che assegna un numero progressivo da 1 a 209 ai singoli congeneri a seconda del minor o maggior grado di clorazione (classificazione IUPAC).

Tali sostanze sono state ampiamente utilizzate, sin dai primi decenni del secolo scorso, nell'industria elettrica ed idraulica, come plastificanti nelle vernici, nella manifattura della plastica e della gomma, e in molte altre applicazioni. A differenza delle diossine, i PCB sono sostanze chimiche prodotte deliberatamente mediante processi industriali. Essi vengono ricavati a partire dal petrolio e dal catrame, dai quali si estrae il benzene, che viene poi trasformato in bifenile, e sono caratterizzati da un'elevata stabilità chimica, da proprietà isolanti, e da un'elevata resistenza alla degradazione.

Nonostante l'uso e la manifattura dei PCB negli USA sia stata bandita dagli anni '70, persistono nell'ambiente contaminando l'atmosfera, le acque e il suolo. Sono inoltre dotati di elevata lipofilia, pertanto si accumulano nei sistemi biologici per l'ingestione di lipidi contaminati nella catena alimentare (WHO Enviromental Health Criteria 140, 1993; Safe S et al, 1984), e la presenza di PCB nel sangue, nel tessuto adiposo

e nel latte materno della popolazione generale è indicativa di una notevole esposizione (Schechter A. et al, 1991).

Pertanto, i livelli sierici di  $\Sigma$ PCB continuano ad essere monitorati in quanto sono assunti come “misura integrata” che risente dell’esposizione a tutte le matrici inquinate in un ampio arco di tempo, e riflette l’ingestione di alimenti contaminati (pesce, carne, latticini)

I meccanismi d’azione dei PCB sono rappresentati dall’interferenza sui processi di sintesi, secrezione, azione ed eliminazione degli ormoni endogeni, specie steroidei, ma anche dalla capacità di legame con le proteine di trasporto e con il recettore per l’ormone tiroideo, e dall’alterazione del sistema neuroendocrino. Sebbene i PCB abbiano una tossicità acuta e cronica relativamente bassa, studi sperimentali sugli animali e di tipo epidemiologico sulla specie umana hanno dimostrato una loro azione preferenziale sul tessuto cerebrale e sugli organi endocrini (EPA/630/r-96/012,1997). La funzione riproduttiva e il comportamento sessuale sono alterati negli animali da laboratorio esposti a PCB e sono stati descritti numerosi effetti sulle funzioni riproduttive anche nella specie umana in ambo i sessi; danni di tipo neuro-comportamentale sono stati descritti sia negli animali da esperimento che negli studi epidemiologici nella specie umana. Gli effetti dannosi di un’esposizione ai PCB sulla riproduzione nei mammiferi sono stati descritti per la prima volta nel 1965 (Hartsough, G.R., 1965). Dati più recenti descrivono effetti sulla qualità del liquido seminale nell’uomo (Guo YL et al, 2000) e nell’animale (Fielden M.R. et al, 2001).

Allo scopo di precisare gli eventuali effetti endocrini, Wolff e coll. (Wolff MS et al, 1997) hanno proposto un sistema di classificazione basato su caratteristiche strutturali, biologiche e farmacocinetiche. In tal modo, i PCB vengono distinti in 3 gruppi: 1) estrogenici/neurotossici; 2) antiestrogenici/diossino-simili; 3) induttori enzimatici.

I congeneri diossino-simili più tossici su umani e mammiferi risultano essere il 126 e il 169, caratterizzati da più elevati fattori di tossicità equivalente (TEF) (Ahlborg et al, 1994; Van den Berg et al, 1998). Bush e collaboratori hanno riscontrato una relazione inversa tra i livelli di PCB 118 (gruppo 2), 138 (gruppo 2), 153 (gruppo 3), e la motilità spermatica (Bush et al, 1984). L'associazione negativa, statisticamente significativa, tra livelli di PCB 153 e motilità spermatica è stata confermata da Richthoff e colleghi (Richthoff et al, 2003). Hauser e collaboratori hanno dimostrato una relazione tra il congenere 138, dotato di limitata attività diossinica e altamente persistente, e le alterazioni di densità, motilità e morfologia spermatica (Hauser et al, 2003). Altri autori hanno infine dimostrato l'associazione tra livelli di PCB 153 e frammentazione del DNA (Rignell-Hydbom et al 2007; Spanò et al, 2005 ).

Una ricerca su PubMedline fornendo come parole chiave "PCB and male reproduction" ricava 411 items; mentre le citazioni su "PCB and semen" sono ridotte di numero (21 items).

In genere, le linee di ricerca si diversificano per: disegni di studio, aree geografiche di studio, metodi di determinazione, matrici di determinazione (per lo più ematica; poco indagato il plasma seminale), ma convergono su:

- **correlazione inversa tra PCB e motilità spermatica:** molte evidenze a sostegno (Duty et al, 2003; Hauser et al, 2003; Hsu et al, 2003, 2004; Bonde et al, 2008; Meeker & Hauser, 2010);
- **danno dell'integrità cromatinica:** numero inferiore di evidenze a sostegno, più frequente in popolazione-campione Europea rispetto ad una Eschimo-Groenlandese (Bonde et al, 2008).

Pertanto, tra gli inquinanti ambientali i PCB, a cui la popolazione, nonostante siano stati banditi nella maggior parte delle nazioni, continua ad esser esposta in conseguenza della

loro persistenza nell'ambiente e capacità di bioaccumulo, potrebbero essere associati con il peggioramento della qualità del seme, in particolare in rapporto alla motilità ed alla morfologia nemaspermica.

## **4. Scopo della tesi**

In uno studio sperimentale condotto su una casistica di soggetti residenti in un'area ad alto rischio ambientale della Sicilia Sud-Orientale abbiamo analizzato le differenze con due diverse popolazioni di controllo non esposte al rischio ambientale.

Centrata su una casistica totale di 207 soggetti suddivisi per area di residenza in: area industriale (n=96), area rurale (n= 83), area urbana (n= 28), la tesi riporta i risultati di una diagnostica di laboratorio seminologico di I e II livello (confronto di parametri spermatici convenzionali e non convenzionali nei soggetti residenti nelle 3 aree di studio) associata ad una contestuale determinazione dei metalli pesanti su sangue e plasma seminale nei soggetti residenti in 2 aree (area industriale e rurale) ed a determinazione dei PCB nel plasma seminale (nei soggetti residenti nelle 3 aree).

La tesi è stata anche l'occasione per focalizzare se il plasma seminale potesse esprimere una promettente matrice biologica di bioaccumulo fin qui poco attenzionata di metalli pesanti e/o PCB, importante da integrare alle analisi di settore, al fine di intercettare eventuali riflessi negativi sui parametri convenzionali e non convenzionali spermatici.

## 5. MATERIALI E METODI

### Casistica

Lo studio è stato condotto in tre aree con diversa tipologia di inquinamento ambientale. In totale sono stati reclutati 207 soggetti in età fertile (range 18-46 anni), suddivisi in base all'area di residenza:

- Area industriale (Melilli – SR, nella Sicilia Sud- Orientale) dichiarata di “interesse nazionale” (Art. 1- L. 426/98), poiché situata in “un’area ad elevato rischio di crisi ambientale” (D.L. 30 Novembre 1990), 96 soggetti (età mediana 33 anni, range 21-46);
- Area rurale (Regalbuto –EN, nella Sicilia Centrale), 83 soggetti (età mediana 30 anni, range 18-45)
- Area urbana (Catania, nella Sicilia Orientale), 28 soggetti (età mediana 30 anni, 18-36)

I soggetti sono stati invitati a partecipare senza alcun criterio di esclusione.

Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico della AOU Policlinico-Vittorio Emanuele

Il reclutamento è stato eseguito mediante invio di lettere ai cittadini che soddisfano i requisiti richiesti (età fertile, motivato interesse per la loro salute riproduttiva, esposizione ad inquinanti ambientali) la partecipazione è stata del tutto volontaria e gratuita. Ogni soggetto arruolato è stato intervistato da un andrologo, il quale ha provveduto alla compilazione di un questionario standardizzato specificatamente allestito per poter dedurre patologie ereditarie e non, abitudini di vita, esposizione professionale, alimentazione, stato di fertilità, se coniugato, e il tempo intercorso per raggiungere una gravidanza (time-to-pregnancy). Ogni soggetto del gruppo di studio è stato sottoposto a valutazione clinico-laboratoristica. In dettaglio, è stato eseguito un esame obiettivo uro-andrologico al fine di considerare la presenza di eventuali malformazioni a carico dell'apparato urogenitale



(micropene, ipospadia, criptorchidismo, ecc.) e di altre alterazioni fenotipiche più comunemente correlate all'azione tossica mediata dagli endocrine disrupter (microrchidismo, ginecomastia, ecc.).

### **Articolazione della ricerca**

Previo consenso informato scritto allo studio i soggetti partecipanti allo studio sono stati sottoposti a:

- visita andrologica (raccolta dati anamnestici su cartella cartacea ed informatizzata; esame obiettivo)

- prelievo di sangue venoso periferico utile per la determinazione della concentrazione dei seguenti metalli pesanti: piombo (Pb), cadmio (Cd), mercurio (Hg), vanadio (V) nichel (Ni) e Arsenico (As), nonché dei policlorobifenili (PCB)

- raccolta di campione spermatico (ottenuto per ipsoazione dopo 3-5 giorni di riposo sessuale) utile per i seguenti parametri di valutazione:

a) *spermiogramma* (campione ottenuto dopo 3-5 giorni di riposo sessuale) con valutazione dei parametri spermatici convenzionali: a) concentrazione, conta nemaspermica totale, motilità progressiva e morfologia nemaspermica;

**Metodologia relativa:** criteri standard manuale WHO 2010 (v. tab. per i parametri ed i valori soglia).

Tab.1 Valori di riferimento dei parametri spermatici (manuale WHO, 2010)

PARAMETRI SEMINALI STANDARD	VALORI DI RIFERIMENTO
Volume plasma seminale	≥ 1.5 ml
pH	≥ 7.2
Concentrazione spermatozoi (milioni/ml)	≥ 15x 10 <sup>6</sup>
Numero totale spermatozoi (milioni/eiaculato)	≥ 39x 10 <sup>6</sup>
Motilità (% , dopo 1h)	
Totale (%)	≥ 40%
Motilità progressiva (%)	≥ 32% motilità progressiva (PR)
Morfologia (% forme normali)	≥ 4%
Vitalità (%)	≥ 58%
Leucociti	< 1x 10 <sup>6</sup> /ml
Immunobead test o MAR test	< 50% spermatozoi mobile con bead adese < 50% spermatozoi con particelle adese

b) *determinazione, mediante citometria a flusso, di alcuni parametri spermatici non convenzionali*, quali: potenziale di membrana mitocondriale, grado di compattazione della cromatina, esternalizzazione della fosfatidilserina e frammentazione del DNA.

#### **Metodologia relativa.**

##### Frammentazione del DNA (DNAF) nemaspermico mediante saggio TUNEL.

Il kit comunemente in uso è l'Apoptosis Mebstain kit (Beckman Coulter, IL, Milan, Italy).

Il test TUNEL è basato sulla capacità dell'enzima TdT di riconoscere e legare le estremità 3'OH libere che si trovano a livello dei filamenti di DNA liberi e quindi interrotti. Tale enzima viene omesso nel controllo negativo, che ci permette di rilevare la esatta percentuale di cellule con DNA frammentato. Due metodi possono essere adottati sulla base del controllo negativo:

- Threshold-setting (fissando una soglia sul controllo negativo)
- Subtraction-blank (sottraendo l'istogramma del controllo negativo dal quello del campione in esame).

Valutazione della vitalità, apoptosi precoce e apoptosi tardiva nemaspermica mediante marcatura con Annexina V e ioduro di propidio (PI). La fosfatidilserina (PS), (che possiede alta affinità con l'annexina V) si trova nella cellule vive nel compartimento interno della membrana plasmatica. Quando essa dal compartimento interno passa in quello esterno riflette l'avvio di un processo di apoptosi precoce. Lo PI, quando aggiunto invece, non è in grado di oltrepassare la membrana plasmatica della cellula vitale, mentre si accumula all'interno delle cellule che presentano membrana plasmatica danneggiata. Ciò permette inoltre, la suddivisione delle cellule non più vitali (PI positive) con PS esternalizzata (PSE) e quelle che si stanno avviando alla morte cellulare ma che ancora sono vitali.

Grado di compattazione della cromatina (CC) nemaspermica mediante colorazione con ioduro di propidio (PI). Lo PI entra all'interno delle cellule, dopo adeguata permeabilizzazione della membrana cellulare, e tanto più la cromatina è compatta tanto meno esso potrà legarsi ad essa. La fluorescenza viene dunque rilevata dallo citometro a flusso in proporzione alla quota non legata.

Valutazione del potenziale di membrana mitocondriale mediante colorazione con JC-1). Il JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide) è la sonda più affidabile e specifica per la valutazione del potenziale di membrana mitocondriale. Nelle cellule con potenziale di membrana conservato, si trova in forma monomerica nel citosol (verde) e si accumula inoltre come aggregato nei mitocondri (all'interno dei quali penetra grazie alla carica negativa del potenziale di membrana intatto ed essendo lipofila) dove emette in arancio. Nelle cellule con potenziale di membrana alterato (basso potenziale di membrana mitocondriale = LMMP), resta, invece, in forma monomerica nel citosol (verde) in quanto non può accumularsi all'interno del mitocondrio a causa del potenziale danneggiato

c) *determinazione nel plasma seminale* (ottenuto dopo centrifugazione del campione spermatico) *della concentrazione dei seguenti metalli pesanti*: piombo (Pb), cadmio (Cd), mercurio (Hg,) nichel (Ni) e Arsenico (As) .

#### **Metodologia relativa**

Un'aliquota di campione seminale è stata utilizzata per valutare le concentrazioni di Pb,Cd,Hg,As,Ni, Se su plasma seminale, pellet e sangue (ad eccezione del Se). La determinazione dei metalli è stata effettuata utilizzando la tecnica analitica spettrofotometria di massa (ICP-MS elan DRC-e Perkin Elmer), previa digestione acida tramite mineralizzatore a microonde (Star-D Milestone),per quel che riguarda i campioni di sangue intero, mentre con sola digestione acida dei campioni di plasma seminale e di pellet. La determinazione del mercurio è stata effettuata tramite spettrofotometria in assorbimento atomico associata alla tecnica dei vapori freddi (AAAnalist 800 Perkin Elemer e FIAS 100 Perkin Elmer e FIAS 100 Perkin Elmer). Per la valutazione dei metalli nel sangue intero sono stati assunti i seguenti valori di riferimento: Pb  $\leq 400\mu\text{g/l}$ ; Cd  $\leq 5\mu\text{g/l}$ ; Hg  $\leq 5\mu\text{g/l}$ ; As  $\leq 12\mu\text{g/l}$ ; Ni  $\leq 4\mu\text{g/l}$  .

d) *determinazione dei policlorobifenili (PCB) nel plasma seminale*

#### **Metodologia relativa**

Le concentrazioni di 35 congeneri di PCB nel plasma seminale sono state misurate mediante gas-cromatografia con detector di cattura di elettroni (GC-ECD), e confermate mediante lettura dei congeneri in doppia colonna. I valori sono stati espressi in  $\mu\text{g/L}$ .

## **Analisi Statistica**

I dati, sono stati inseriti in un database Access ed analizzati mediante il software S-PSS versione 10.0. A causa della distribuzione asimmetrica (non Gaussiana) di molti dei dati misurati (dati spermatici, livelli dei metalli pesanti, PCB) i risultati delle variabili in esame di ogni gruppo furono espressi come mediana e range, o mediana ed intervalli interquartili. Dopo log-trasformazione dei valori, per l'analisi statistica si è usato il Mann-Whitney U-test. o, dove necessario, l'analisi della varianza ad 1-via (ANOVA) seguito da Duncan's multiple test: un valore di  $p < 0.05$  è stato usato come livello di significatività

La correlazione tra le variabili spermatiche ed i livelli dei metalli pesanti è stata valutata mediante analisi di regressione logistica univariata e modello multivariato (corretto per fattori confondenti quali: età, fumo, patologie andrologiche).

## 6. RISULTATI

### *A) analisi dei parametri spermatici convenzionali e non convenzionali.*

Il confronto delle caratteristiche demografiche e le alterazioni dei parametri spermatici convenzionali e non-convenzionali riscontrate (espressi come numero di soggetti e percentuale tra paraentesi in cui risultarono alterati) tra i soggetti dell'area urbana (AI) vs i soggetti dell'area rurale o non industriale (ANI) sono riportati nella Tabella 2

**Tab.2 Caratteristiche demografiche e patologiche del gruppo di Melilli (AI) e di Regalbuto (ANI).**

<b>Caratteristiche demografiche e patologiche dei soggetti</b>	<b>AI (n=96)</b>	<b>ANI (n=83)</b>
Età, anni (Mediana, IIQ)	33.0 (29.5-38.0)*	30 (27-34)
Fumo di sigaretta (n,%)	36 (37.5)*	33 (53.2)
Attività lavorativa industriale (n,%)	51 (53.1%)	-
Oligozoospermia (n,%)	10 (10.4)	17 (20.5)
Astenozoospermia (n,%)	56 (58.3)*	31 (37.4)
Teratozoospermia(n,%)	3 (3.1)	5 (6.0)
Elevato LMMP (n,%)	46 (47.9)*	26 (31.3)
Elevata CC (n,%)	41 (42.7)*	19 (22.9)
Elevata PSE (n,%)	14 (15.0)*	3 (3.6)
Elevata DNAF (n,%)	9 (9.4)	8 (9.6)

IIQ intervallo interquantile; LMMP:basso potenziale di mb mitocondriale; CC: compattazione cromatina; PSE:esternalizzazione fosfatidilserina; DNAF:frammentazione DNA; \*p<0.05 vs.ANI

L'analisi descrittiva ed il numero di soggetti in cui essi sono risultati alterati sono riportati nella **Tabella 3**

Accettando come valore-soglia dei parametri spermatici, il cut-off adottato dal più recente manuale della WHO (manuale WHO, 2010) si osservarono le seguenti differenze significative tra gruppi di diversa area di residenza:

#### *riguardo i parametri spermatici convenzionali*

- il gruppo residente nell'area industriale (Melilli) esibì valori mediani di percentuale di motilità progressiva inferiori al gruppo dell'area rurale (Regalbuto) ed urbana (Catania), giustificati da una più alta percentuale

significativa di soggetti di Melilli con astenozoospermia (valori inferiori al cut-off della WHO 2010);

*riguardo i parametri spermatici non convenzionali*

- nel gruppo residente nell'area industriale (Melilli) sono state riscontrati livelli mediani di basso potenziale di membrana mitocondriale (LMMP) inferiori statisticamente ai livelli osservati tra i soggetti residenti nell'area rurale (Regalbuto) e nell'area urbana (Catania): questo dato osservazionale si giustificava per la elevata percentuale di soggetti con spermatozoi a basso potenziale di membrana mitocondriale (LMMP) (nell'area di Melilli), francamente superiore a quelle dei soggetti residenti nelle altre aree (v. Tab. 3) .
- un alterato grado di compattazione della cromatina (CC) è stato riscontrato maggiormente nei soggetti residenti nell'area industriale, con valori di mediana significativamente inferiori rispetto ai soggetti delle altre due aree.

**Tab.3 Valori di mediana (ed intervalli interquartili in parentesi) dei parametri spermatici convenzionali e numero di soggetti con valori al di sotto del valore-soglia (cut-off) (sec. manuale WHO 2010).**

	Area industriale (n=96)		Area rurale (n=83)		Area urbana (n=28)	
	Mediana (IIQ)	n (%)	Mediana (IIQ)	n (%)	Mediana (IIQ)	n (%)
Convenzionali		< Cut-off		< Cut-off		< Cut-off
<b>Concentrazione (10<sup>6</sup>/mL)</b> (v.n. ≥15)	94,5 (43,5-145,5)	10 (10,4)	57,5 (21,5-95,0)	17 (20,5)	60 (37,7-82,2)	3 (10,7)
<b>Mot. Progr. (%)</b> (v.n. >32)	<b>30,0*</b> (18,0-42,0)	56 (58,3)	<b>35,0</b> (29,0-42,0)	31 (37,4)	<b>30,0*</b> (26,0-35,0)	19 (68)
<b>Forme normali (%)</b> (v.n. ≥4)	17,0 (13,0-22,0)	3 (3,1)	16,0 (14,0-18,0)	5 (6,0)	8 (6,7-9,2)	1 (3,6)
Non convenzionali		> Cut-off		> Cut-off		> Cut-off
<b>LMMP (%)</b> (v.n. 0-11.9)	<b>12,8**</b> (4,1-41,1)	46 (47,9)	<b>36,7</b> (10,0-58,5)	26 (31,3)	<b>43,6</b> (27,1-53,1)	17 (60,7)
<b>CC (%)</b> (v.n. 8.5-18.9)	<b>17,7**</b> (14,9-22,7)	41 (42,7)	<b>19,9</b> (14,1-22,7)	19 (22,9)	<b>18,3</b> (14,7-23,2)	9 (32,1)
<b>PSE (%)</b> (v.n. 0.7-10.7)	<b>2,5**</b> (1,3-5,8)	14 (15,0)	<b>2,0</b> (0,6-4,7)	3 (3,6)	<b>1,86</b> (1,2-2,3)	1 (3,6)
<b>DNAF (%)</b> (v.n. 0.1-4.6)	2,0 (0,8-3,0)	9 (9,4)	1,9 (1,0-5,5)	8 (9,6)	1,9 (1,0-3,6)	4 (14,3)

Legenda: IIQ: intervallo interquartile; LMMP: basso potenziale di membrana mitocondriale degli spermatozoi; CC: grado di compattazione della cromatina; PSE: esternalizzazione della fosfatidilserina; DNAF: frammentazione del DNA degli spermatozoi

\* p<0.05 vs matched-value del gruppo area rurale;

\*\*p<0.05 vs. matched-value dei gruppi area rurale e area urbana



B) *Analisi delle concentrazioni dei metalli pesanti*

I valori ematici di mediana di alcuni metalli pesanti (As, Ni) furono significativamente più elevati nei soggetti del gruppo di Melilli vs gruppo di Regalbuto. Invece, i valori ematici di mediana del Pb furono significativamente più elevati nei soggetti del gruppo di Regalbuto vs gruppo di Melilli (Tabella 4).

I valori di mediana di alcuni metalli pesanti (Pb, Cd) nel plasma seminale furono significativamente più elevati nei soggetti del gruppo di Melilli vs gruppo di Regalbuto. Invece, i valori di mediana del Hg nel plasma seminale furono significativamente più elevati nei soggetti del gruppo di Regalbuto vs gruppo di Melilli (Tabella 4)

**Tab.4 . Dati (espressi in mediana e range in parentesi) relativi a concentrazioni di metalli pesanti nel sangue e nel plasma seminale nelle 2 popolazioni esaminate.**

METALLO	SANGUE		PLASMA SEMINALE	
	Melilli (n=96)	Regalbuto (n=83)	Melilli (n=96)	Regalbuto (n=83)
<b>Pb</b>	9.9 (0.6-62)	14.6 *(0.57-71.6)	22.8* (0.4 -617)	0.45 (0.45-19.5)
<b>Cd</b>	0.26(0.04-23.84)	0.51(0.04-2.7)	1.27 *(0.0-32.24)	0.39(0.02-11.12)
<b>Hg</b>	5.36(0.10-53)	5.53 (0.10-49.5)	1.20 (1.20-9.85)	1.99^ (1.20-56.70)
<b>As</b>	7.34* (2.50-40.18)	2.81 (0.22-85.8)	2.85 (0.40-59.8)	1.54(0.40-131.12)
<b>Ni</b>	11.52*(2.75-191.5)	2.75 (0.0-623.2)	2.67 (2.67-35.70)	2.67(0.52-505)

valori di riferimento: Pb  $\leq$ 400 $\mu$ g/ l; Cd  $\leq$ 5 $\mu$ g/l; Hg  $\leq$ 5 $\mu$ g/l; As  $\leq$ 12  $\mu$ g/l; Ni  $\leq$ 4  $\mu$ g/l .

\*p<0.05 vs matched-values dei soggetti dell'area rurale di Regalbuto

^p<0.05 vs matched-values dei soggetti dell'area industriale di Melilli

In particolare, sono state riscontrate concentrazioni ematiche elevate di Ni nel 69.8%, Hg nel 53.1%, As nel 20.8% e Cd nel 2.1%; 2 o più metalli sono risultati elevati nel 45.8% dei soggetti esaminati (Tabella 5) Le concentrazioni dei metalli pesanti determinate nel

plasma seminale, pur non disponendo di valori di riferimento in questa matrice biologica, si attestavano su concentrazioni più elevate (assumendo come valori-soglia quelli ematici accettati in letteratura) in una percentuale variabile di soggetti: in ordine decrescente, Ni che è risultato elevato in 38 casi (39.6%), Cd in 14 casi (14.6%), As in 6, *le concentrazioni dei metalli pesanti* non hanno superato mai i livelli di riferimento (Tabella 5).

**Tab.5** Soggetti con elevate concentrazioni di metalli nel sangue (S) e nel plasma seminale (PS)..

<b>Metalli</b>	<b>AI (n=96)</b>	<b>ANI (n=83)</b>
Pb (S)	0	0
Pb (PS)	4 (4.2)	0
Cd (S)	2 (2.1)	0
Cd (PS)	13 (13.5)*	0
Hg (S)	50 (52.1)	40 (48.2)
Hg (PS)	2 (2.1)*	29 (34.9)
As (S)	68 (70.8)*	18 (21.7)
As (PS)	28 (29.2)*	13 (15.7)
Ni (S)	66 (68.8)*	27 (32.5)
Ni (PS)	39 (40.6)*	19 (22.9)

\*p<0.05 vs.ANI

valori di riferimento: Pb ≤400µg/l; Cd ≤5µg/l; Hg ≤5µg/l; As ≤12 µg/l; Ni ≤4 µg/l .

Inoltre, per quel che riguarda il Se (dati non mostrati), una percentuale significativamente maggiore (p<0.05) di soggetti residenti dell'area industriale (AI) vs. soggetti di controllo (residenti nell'area non industriale, ANI) ha mostrato basse concentrazioni nel PS.

L'analisi univariata evidenziò una correlazione negativa significativa i valori della motilità progressiva ed i livelli del plasma seminale di Pb (coefficiente b= -1.34; p=0.007), e di Hg (coefficiente b= -1.78, p=0.013). Tale correlazione rimase significativa anche all'analisi multivariata (corretta per età, fumo e patologie di interesse andrologico).

C) *Analisi dei PCB.*

I congeneri dei PCB più rappresentati (il valore percentuale in parentesi si riferisce ai soggetti con concentrazioni rilevabili di quel dato congenere), e i livelli mediani di concentrazione di tutti i congeneri nel plasma seminale dei soggetti delle tre aree sono riassunti nella tabella 6.

**Tab.6 Quadro schematico dei congeneri dei PCB più rappresentativi identificati nel plasma seminale dei soggetti di studio**

	Area industriale	Area rurale	Area urbana
<b>Raggruppamento PCB</b>	<b>Congenere (% soggetti con valori misurabili)</b>		
<b>PCB gruppo 1</b>	101 (29 %)	187 (39 %)	18 (20 %)
	187 (24 %)	49 (39 %)	
		70 (30 %)	
<b>PCB gruppo 2</b>	74 (90 %)	-	114 (20 %)
	118 (19 %)		
<b>PCB gruppo 3</b>	-	194 (31 %)	194 (20%)
<b>Concentrazione PCB</b>			
<b>Σ PCB (mediana, µg/L)</b>	5,2	1,2	1

Concentrazioni “misurabili” di due o più congeneri sono state riscontrate nel 46%, 52% e 40%, rispettivamente nell’area industriale, rurale e urbana. Per quanto concerne i congeneri 118, 138, 153, ritenuti tra i più tossici e maggiormente studiati in letteratura, il 118 è risultato presente maggiormente nell’area industriale (16,7%) che in quella rurale (13,2%), il contrario per il 138 (2,1% nell’area industriale e 3,6% nell’area rurale). Entrambi i congeneri 118 e 138 sono risultati assenti nell’area urbana. Il 153 è risultato presente solo nell’area rurale (4,8%). I due congeneri diossino-simili più tossici per un maggiore TEF (126, 169) sono così risultati: 126 (presente nel 9,4% dei soggetti dell’area industriale e nel

6% dei soggetti dell'area rurale; assente nell'area urbana), 169 (presente solo nell'area rurale, nel 3,6% dei casi).

## 7. Conclusioni

L'epitelio dei tubuli seminiferi è uno dei tessuti più sensibili e vulnerabili all'azione di eventuali modifiche di fattori bio-geo-chimici e ambientali (Kabata-Pendias & Mukherjee, 2007) e l'esposizione a metalli pesanti è un fattore di rischio cruciale per la spermatogenesi (Bonde, 2010; Marzec-Wróblewska et al., 2012). Si sostiene altresì che le differenze "geografiche" della qualità spermatica possono essere interpretate come secondarie a variazioni temporali dell'apparato riproduttivo maschile ("termometro" o specchio della salute ambientale) in risposta all'esposizione a sostanze tossiche di origine ambientale (Nordkap et al, 2012).

In quest'area affascinante di ricerca eco-tossicologica, le conoscenze sono incomplete, e risultati talvolta contrastanti dipendono da:

- a) differenti modelli di studio clinici e sperimentali in vitro (con spermatozoi di mammiferi differenti dal modello umano);
- b) metodologia rivolta alla determinazione dei metalli pesanti applicata in prevalenza ad una sola matrice biologica tra sangue in toto, plasma ematico nel plasma seminale; solo pochi studi hanno invece rivolto un'analisi sistemica dei metalli in tutte le suddette matrici (Fatima et al, 2010; Mendiola et al, 2011; Choy et al, 2002; Mínguez-Alarcón et al, 2012).

In una recente review (Minguel-Alarcón et al, 2012), dove sono state presi in esame una serie di lavori scientifici sulle concentrazioni del Pb, Cd, Hg in diverse matrici (sangue intero, plasma ematico e plasma seminale), usando metodiche spettroanalitiche e elettrochimiche, in relazione ai valori medi dei principali parametri spermatici (densità, motilità e morfologia), gli AA sottolineano le seguenti conclusioni:

- 1) non esiste correlazione tra le concentrazioni di Pb, Cd, Hg tra i 3 liquidi biologici studiati (sangue intero, plasma ematico e plasma seminale). Ci sono alcune ipotesi interpretative possibili per questo fenomeno. I tre metalli pesanti sono legati e trasportati

da eritrociti (ATSDR, 1999 Toxicological profile for mercury; ATSDR 2007: Toxicological profile for lead. 2007; ATSDR, 2008 Public health statement for cadmium) e le loro diverse concentrazioni nel sangue intero potrebbero essere dovute solo ad una diversa concentrazione di globuli rossi.

2) Le concentrazioni di metalli pesanti nei campioni di sangue non riflettono sempre le concentrazioni trovate nel plasma seminale, dal momento che le concentrazioni di metalli pesanti che raggiungono il plasma seminale può essere molto diversa.

3) Sembra esistere una correlazione tra le concentrazioni di Pb, Cd e Hg nella stessa matrice biologica, specie nel plasma seminale.

4) Le alterazioni di uno o più parametri spermatici possono associarsi sia ad alte concentrazioni di metalli pesanti nel plasma seminale, che a basse concentrazioni di metalli pesanti solo nel plasma seminale in alcuni soggetti.

In un recente studio (Altomare et al, 2012), condotto sulla stessa casistica del presente lavoro, fu osservata la presenza di concentrazioni di Pb e Cd più elevate nel plasma seminale rispetto a quelle ematiche, a differenza di altri metalli pesanti esaminati (Hg, As, Ni), a suggerire una condizione di esposizione cumulativa a questi due metalli pesanti. Tale osservazione, unitamente al riscontro di considerevoli percentuali di soggetti con elevati livelli di Ni (39.6%) e Cd (14.6%) nel plasma seminale, sottolinea l'importanza dell'utilizzo di una matrice quale il plasma seminale per studiare la contaminazione da tossici ambientali, con contestuale valutazione dei parametri spermatici convenzionali e/o con altri tests di approfondimento di valutazione di danno spermatico (analisi dello stress ossidativo) (Altomare et al, 2012).

D'altra parte, la presenza di alterazioni dei parametri spermatici convenzionali (densità, motilità e morfologia) non altrimenti giustificata, in soggetti esposti a metalli pesanti può essere un segno "sentinella" di stress ossidativo mediato appunto dai metalli

pesanti (con lipoperossidazione di membrana e danni al DNA spermatico) (Ercal et al, 2001; Grotto et al, 2010) sia per la suscettibilità della cellula spermatica a tale stress sia in quanto, come prova indiretta, è stato dimostrato che numerosi antiossidanti (vitamina C, vitamina E, glutatione, coenzima Q10), e alcuni tipi di frutta ricchi in antiossidanti possono diminuire lo stress ossidativo causato da metalli pesanti (Sheweita et, 2005; Tito et al, 2011).

I risultati più interessanti, emersi dalla presente tesi condotta su una popolazione di soggetti volontari residenti nel comune di Melilli (dichiarato “ad alto rischio di crisi ambientale”) e su 2 popolazioni di controllo comprendenti volontari residenti in un’area rurale (comune di Regalbuto) ed in un’area urbana (nel comune di Catania), si possono così riassumere:

- Nei soggetti dell’area urbana di Catania e in quelli residenti nell’area industriale (Melilli) sono state riscontrate elevate percentuali di soggetti con astenozoospermia e con spermatozoi con basso potenziale di membrana mitocondriale, superiori a quelle dei soggetti di controllo (residenti nell’area rurale). Un alterato grado di compattazione della cromatina è stato riscontrato maggiormente nei soggetti residenti nell’area industriale, rispetto ai soggetti di controllo delle altre due aree.
- L’esposizione ambientale a inquinanti determina la presenza di elevate concentrazioni di metalli pesanti sia nel sangue che nel plasma seminale, e alterazioni dei parametri spermatici convenzionali e nonconvenzionali, in modo significativamente maggiore in soggetti residenti in aree industriali rispetto ad area non-industriale.
- Sebbene tutte le aree esaminate presentino soggetti con livelli misurabili di PCB, i livelli mediani di tutti i congeneri e la percentuale di individui con concentrazioni rilevabili di almeno un congenere, sono risultati più elevati nell’area industriale rispetto alle altre due aree. Pertanto, una maggiore presenza di tali sostanze sembra essere legata

all'inquinamento di origine industriale. Tuttavia, risulta meritevole di attenzione e di ulteriori approfondimenti il riscontro di concentrazioni misurabili di PCB altamente tossici in un'area priva di insediamenti industriali quale quella rurale (Regalbuto).

I dati relativi alle concentrazioni di PCB nel plasma seminale di soggetti residenti in un'area urbana, se confermati su più ampia casistica, possono rappresentare valori di riferimento da usare su studi di popolazione a diverso rischio ambientale. Pertanto, i nostri dati suggeriscono che la contaminazione ambientale da PCB può svolgere un ruolo nelle alterazioni dei parametri di fertilità maschile.



## 8. Considerazioni finali

La valutazione delle concentrazioni di PCB nel plasma seminale può rappresentare un efficace metodo di stima degli effetti di tali contaminanti sull'apparato riproduttivo maschile, e offrire nuove acquisizioni dal confronto con i dati relativi alla misura ematica. Fra gli inquinanti ambientali i PCB, a cui la popolazione, nonostante siano stati banditi nella maggior parte delle nazioni, continua ad esser esposta in conseguenza della loro persistenza nell'ambiente e capacità di bioaccumulo, potrebbero essere associati con il peggioramento della qualità del seme, in particolare in rapporto alla motilità ed alla morfologia nemaspermica.

Il plasma seminale esprime una promettente matrice biologica fin qui poco attenzionata di bioaccumulo di metalli pesanti ed inquinanti come PCB, importante da integrare alle analisi di settore di tossicologia andrologica riproduttiva, al fine di intercettare eventuali riflessi negativi sui parametri convenzionali e non convenzionali spermatici. non altrimenti giustificati o semplicemente definiti idiopatici..

## 9. RINGRAZIAMENTI

Tale studio oggetto della tesi è stato realizzato con la stretta collaborazione della task-force comprendente:

- ❖ Dottorato di Ricerca in “Medicina Sperimentale Clinica e Fisiopatologia Cellulare” dell’Università di Catania, coordinato dal prof. Enzo Vicari.
- ❖ Oikos S.p.A. di Motta S. Anastasia (CT). Tale Ente per la sensibilità e l’interesse per lo svolgimento e lo sviluppo delle attività didattiche e di ricerca nei settori disciplinari (curriculum: Scienze Andrologiche, della Riproduzione Umana e Fisiopatologia Cellulare) del Dottorato di Ricerca “Medicina Sperimentale Clinica e Fisiopatologia Cellulare” dell’Università di Catania ha inteso finanziare 1 borsa aggiuntiva per il Dottorato di ricerca (XXVI ciclo) attraverso specifico atto di convenzione con l’Università di Catania. per l’attivazione di posti aggiuntivi.
- ❖ Comune di Melilli (SR) (opera di sensibilizzazione nella fase iniziale di invio lettera di invito a volontari residenti)
- ❖ Fondazione Frisone di Melilli, la quale ha messo a disposizione i propri laboratori nella prima fase di campionamento, ed ha fornito un generoso finanziamento (progetto “Ambiente e Salute”).

Per il supporto metodologico, statistico e bibliografico si ringraziano

- ❖ Prof. Margherita Ferrante, prof. Mariella Fiore e dott.ssa Caterina Ledda (Sezione di Igiene e Sanità Pubblica del Dipartimento di Scienze Mediche, Chirurgiche e Tecnologie Avanzate).
- ❖ Prof. Salvatore Travali (Sezione di Patologia Clinica ed Oncologia Molecolare, Dipartimento di Scienze Bio-mediche).

## 10. BIBLIOGRAFIA

Adami H., Bergstrom R., Mohner M. et al. A testicular cancer in nine Northern European Countries. *Intern. J.Cancer*, 59:33-38, 1994.

Ahlborg U.G., *et al.* Toxic equivalency factors for dioxinlike PCBs. *Chemosphere* 1994;28:1049–1067.

Akinloye O, Arowojolu AO, Shittu OB, Anetor JI. Cadmium toxicity: a possible cause of male infertility in Nigeria. *Reproductive Biology*. 6(1):17-30, 2006.

Alonzo G, Nardone G, Ottonello D, Saiano F. Biomonitoraggio di elementi in tracce mediante licheni come bioaccumulatori: Stato dell'arte in Sicilia – XIV Congresso della società do Ecologia (4-6 Ottobre 2004, Siena), 2004.

Altomare M, Vicari LO, Fiore M, Ferrante M, Condorelli RA, La Vignera S, Garrone F, Iacoviello L, Zafarana S, Sciacca L, Calogero C, D'Agata R, Calogero AE, Vicari E. Valutazione dei livelli dei metalli pesanti nel sangue, nel plasma seminale e negli spermatozoi di soggetti in età fertile in un'area ad elevato rischio ambientale della Sicilia sud-orientale. In: "Riproduzione e Sessualità dalla sperimentazione alla clinica" (editori: C. Foresta, A. Ferlin, A. Lenzi, A. Garolla), Cleup Padova 2012, pp.327-330, 2012.

Amico V., Oriente G., Piattelli M. et al. Concentrations of PCBs, BHCs and DDT residues in seaweeds of the east coast of Sicily. *Mar. Poll. Bull.*, 10: 177-179, 1979.

Andolz P., Bielsa M., Vila J. Evolution of semen quality in north-eastern Spain: a study in 22,759 infertile men over a 36 year period. *Hum. Reprod.*, 14: 731-735, 1999.

Araujo A., Telles D., Gorni R. et al. Endosulfan residues in and the environment. *Bull Environ Contamin Toxicol*, 62:671-676, 1999.

ARPA Sicilia - Rete regionale di Biomonitoraggio della qualità dell'aria – Bioaccumulo di metalli pesanti in talli di *Xanthoria parietina* - nell'ambito Misura 1.01 – Azione a.4-

Attività di Controllo e Monitoraggio Ambientale –sottoazione a.4.2. Monitoraggio dell'inquinamento atmosferico e biomonitoraggio completamento di programmazione del POR Sicilia 2000-2006.

ATSDR: agency for toxic substances & disease registry. Toxicological profile for mercury. 1999, <http://www.atsdr.cdc.gov/>

ATSDR: agency for toxic substances & disease registry. Toxicological profile for lead. 2007, <http://www.atsdr.cdc.gov/>

ATSDR: agency for toxic substances & disease registry. Public health statement for cadmium. 2008, <http://www.atsdr.cdc.gov/>

Auger J., Kunstmann JM, Czyglik F. et al. Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. *N. Engl. J. Med.*, 332,281-282, 1995.

Benoff S *et al.* Male infertility and environmental exposure to lead and cadmium. *Hum Reprod Update* 2000;6:107-21.

Benoff S, Hauser R, Marmar JL, Hurley IR, Napolitano B, Centola GM. Cadmium concentrations in blood and seminal plasma: correlations with sperm number and motility in three male populations (infertility patients, artificial insemination donors, and unselected volunteers) *Molecular Medicine* 15(7-8):248-262, 2009.

Bilotta P., Guglielmo R, Steffe M. Analysis of decline in seminal fluid in the Italian population during the past 15 years. *Minerva Ginecologica*, 51:223-231, 1999.

Boisen KA, Chellakooty M, Schimdt IM, et al. Hypospadias in a cohort of 1070 Danish newborn boys: prevalence and relationship to placental weight, anthropometrical measurements at birth, and reproductive hormone levels at 3 months of age. *J Clin Endocrin Metab* 90:4041-4026, 2005

Boisen KA, Kaleva M, Main Km, et al. Difference in prevalence of congenital cryptorchidism in infants between two Nordic countries. *Lancet* 363:1264-1269, 2004.

Bonde JP. Male reproductive organs are at risk from environmental hazards. *Asian J Androl*. 12(2):152-156, 2010. Review

Bush B., *et al.* Polychlorobiphenyl (PCB) congeners, *p,p'*-DDE, and hexachlorobenzene in maternal and fetal cord blood from mothers in upstate New York. *Arch Environ Contam Toxicol* 1984;13:517–527.

Carlsen E., Giwercman A., Keiding N. *et al.* Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *British Medical Journal*. 305(6854):609–613, 1992.

Carlsen E *et al.* Is human fecundity declining? *Int J Androl* 2006;29:2–11.

Choy CMY, Lam CWK, Cheung LTF, Briton-Jones CM, Cheung LP, Haines CJ. Infertility, blood mercury concentrations and dietary seafood consumption: a case-control study. *International Journal of Obstetrics and Gynaecology*. 109(10):1121-1125, 2002.

Choy CM *et al.* Relationship between semen parameters and mercury concentrations in blood and in seminal fluid from subfertile males in Hong Kong. *Fertil Steril* 2002;78:426-8.

Choi SM., Yoo SD., Lee BM. Toxicological characteristics of Endocrine-Distrupting Chemicals:developmental toxicity, carcinogenicity, and mutagenicity. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*, 7: 1-24, 2004.

Colborn T., Vom Saal F., Soto A. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ Health Perspect*, 101:378-384, 1993.

Danadevi K *et al.* Semen quality of Indian welders occupationally exposed to nickel and chromium. *Reprod Toxicol* 2003;17: 1-6.

Dawson EB *et al.* Comparison of sperm viability with seminal plasma metal levels. *Biol Trace Elem Res* 1998;64:215-9.

De Rosa M *et al.* Traffic pollutants affect fertility in men. *Hum Reprod* 2003;18:1055-61

EPA/630/r-96/012. Special report on environmental endocrine disruption: an effects assessment and analysis. Environmental Protection Agency, Washington, February 1997.

Ercal N, Gurer-Orhan H, Aykin-Burns N. Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 1(6):529–539, 2001.

Fatima P, Debnath BC, Hossain MM, et al. Relationship of blood and semen lead level with semen parameter. *Mymensingh Medical Journal* 19(3):405–414, 2010..

Fielden M.R., *et al.* Effects of gestational and lactational exposure to Aroclor 1242 on sperm quality and in vitro fertility in early adult and middle-aged mice. *Reprod Toxicol* 2001;15:281-92.

Fisher JS. Environmental anti-androgens and male reproductive health focus on phthalates and testicular dysgenesis syndrome. *Reproduction* 127: 305-315, 2004.

Ginsburg J., Okola S., Prelicvic G. et al. Residence in the London area and sperm density. *Lancet*, 343:230, 1994.

Grotto D, Valentini J, Fillion M, et al. Mercury exposure and oxidative stress in communities of the Brazilian Amazon. *Science of the Total Environment* 408(4):806–811, 2010.

Guillette L., Gross, T., Masson G. et al. Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida. *Environ Health Perspect*, 102:680-688, 1994.

Guo YL, *et al.* Semen quality after prenatal exposure to polychlorinated biphenyls and dibenzofurans. *Lancet* 2000;356:1240-1241.

Gyllenborg J., Skakkebaek N., Nielsen N. et al. A secular and seasonal changes in semen quality among young Danish men: a statistical analysis of semen samples from 1927 donor candidates during 1977-1995. *Intern. J. Androl.*, 22:28-36, 1999.

Handelsman D. Sperm output of healthy men in Australia: magnitude of bias due to self-selected volunteers. *Hum Reprod*, 12:2701-2705, 1997.

Hartsough, G.R.. Great Lakes fish now suspect as mink food. *Am. Fur Breeder* 1965;38: 25-27.

Hauser R., *et al.* The relationship between human semen parameters and environmental exposure to polychlorinated biphenyls and p,p-DDE. *Environ Health Perspect* 2003;12:1505-11.

Hernández-Ochoa I *et al.* Low lead environmental exposure alters semen quality and sperm chromatin condensation in northern Mexico. *Reprod Toxicol* 2005;20:221-8.

Hogan MC. Heavy metal. *Encyclopedia of Earth*. National Council for Science and the Environment. Eds E.Monosson & C.Cleveland. Washington DC, 2010

Hoffman FA Micronutrient requirements of cancer patients. *Cancer* 1 (55 (Suppl 1) 295-300,1985.

Hovatta O, Venalainen ER, Kuusimaki L, Heikkila J, Hirvi T, Reima I. Aluminium, lead and cadmium concentrations in seminal plasma and spermatozoa, and semen quality in Finnish men. *Human Reproduction* 13(1):115-119, 1998.

Kabata-Pendias A, Mukherjee A.B. *Trace Elements from Soil to Human*. Springer, Heidelberg, Germany, 2007.

International Workshop On Endocrine Disruptors -Washington, D.C., U.S.A, January 23-24, 1997 – This workshop was sponsored by the United Nations Environment Programme, United States Environmental Protection Agency Irvine S, Cawood E, Richardson D, MacDonald E, Aitken J. Evidence of deteriorating semen quality in the United Kingdom:

birth cohort study in 577 men in Scotland over 11 years. *British Medical Journal*. 312(7029):467–471, 1996.

Italian Society of Reference Values. 4th National Congress. *G Ital Med Lav Ergon* 2003;25-113.

Joffe M. Infertility and environmental pollutants. *Br Med Bull* 68(1):47-70, 2003.

Jorgensen N, Vierula M, Jacobsen R, Pukkala E, Perheentupa A, Virtanen HE, Skakkebaek NE, Toppari J. Recent adverse trends in semen quality and testis cancer incidence among Finnish men. *Int J Androl*. 34(4 Pt 2):e37-48, 2011.

Jurasović J *et al.* Semen quality and reproductive endocrine function with regard to blood cadmium in Croatian male subjects. *Biometals* 2004;17:735-43.

Kabata-Pendias A, Mukherjee A.B. *Trace Elements from Soil to Human*. Springer, Heidelberg, Germany, 2007.

Kumar S. Occupational exposure associated with reproductive dysfunction. *J Occup Health* 46(1):1-19, 2004.

Łepecka-Klusek C, Wdowiak A, Pilewska-Kozak AB, Syty K, Jakiel G. The role of age, environmental and occupational factors on semen density. *Ann Agric Environ Med*. 18(2):437-40, 2011.

Loganathan BG., Kannan K. Global organochlorine contamination trend: an overview. *Ambio* 23, 187-191, 1994.

Marzec-Wroblewska U, Kamiński P, Lakota P. Influence of chemical elements on mammalian spermatozoa. *Folia Biol (Praha)* 58(1):7-15, 2012.



Meeker JD, Rossano MG, Protas B, et al. Cadmium, lead, and other metals in relation to semen quality: human evidence for molybdenum as a malereproductive toxicant. *Environmental Health Perspectives* 116(11):1473-1479, 2008.

Meeker JD *et al.* Cadmium, lead, and other metals in relation to semen quality: human evidence for molybdenum as a male reproductive toxicant. *Environ Health Perspect* 2008;116:1473-9.

Menchini-Fabris F., Rossi P., Palego P. et al. Declining sperm counts in Italy during the past 20 years. *Andrologia*, 28:304, 1996.

Mendiola J, Moreno JM, Roca M, Vergara-Juarez N et al. Relationships between heavy metal concentrations in three different body fluids and male reproductive parameters: a pilot study. *Environ Health*. 19;10(1):6, 2011.

Minguez-Alarcon L, Mendiola J, Roca M, Lopez-Espin JJ et al Correlations between Different Heavy Metals in Diverse Body Fluids: Studies of Human Semen Quality. *Adv Urol*. 2012:420893. Epub 2012 Jan 24, 2012.

Ministry of Enviroment and Energy, Denmark. Male reproductive health and environmental chemicals with estrogenic effect. Miljøprojekt No.290. Copenhagen: Danish Environmental Protection Agency, 1995.

Nordberg GF. Effects of long-term cadmium exposure on the seminal vesicles of mice. *J Reprod Fertil* 1975;45:165-7.

Nordkap L, Joensen UN, Blomberg Jensen M, Jorgensen N. Regional differences and temporal trends in male reproductive health disorders: semen quality may be a sensitive marker of environmental exposures *Mol Cell Endocrinol*. 22;355(2):221-30, 2012. Review.

Olsen G., Bodner K., Ramlow J. et al. Have sperm counts been reduced 50 percent in 50 years? A statistical model revisited. *Fertil.Steril*.63:887-893, 1995.

Pant N *et al.* Lead and cadmium concentration in the seminal plasma of men in the general population: correlation with sperm quality. *Reprod Toxicol* 2003;17:447-50.

Paulsen C., Berman N., Wang C. Data from men in greater Seattle area reveals no downward trend in semen quality: further evidence that deterioration of semen quality is not geographically uniform. *Fertil. Steril.*, 65:1015-1020, 1996.

Pirastu R, Iavarone I, Pasetto R, Zona A, Comba P e Gruppo di lavoro SENTIERI. SENTIERI - Studio epidemiologico nazionale dei territori e degli insediamenti esposti a rischio da inquinamento. *Epidemiol. Prev* 35(5-6) Suppl. 4: 1-204, 2011.

Richthoff J., *et al.* Serum levels of 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl (CB-153) in relation to markers of reproductive function in young males from the the general Swedish population. *Environ Health Perspect* 2003;111:409–413.

Rignell-Hydbom A., *et al.* Dietary exposure to methylmercury and PCB and the associations with semen parameters among Swedish fishermen. *Environmental Health* 2007;6:14.

Rusyniak DE, Arroyo A, Acciani J, *et al.* Heavy metal poisoning: management of intoxication and antidotes. *EXS.* 100:365-396, 2010.

Safe S., *et al.* Polychlorinated Biphenils (PCBs) Mammalian and Environmental Toxicology. *Environmental Toxin Series*, 1987, vol 1, Springer-Verlag, Heidelberg.

Saidi J., Chang D., Goluboff E. *et al.* Declining sperm counts in the United States? A critical review. *J. Urol.*, 161:460-462, 1999.

Schechter A. Dioxins and Related Chemicals in Humans and in the Environment. In: Gallo, M.; Scheuplein, R.; Van der Heijden, K. eds. *Biological basis for risk assessment of dioxins and related compounds*. 1991 Banbury Report #35. Plainview, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sheweita SA, Tilmisany AM, Al-Sawaf H. Mechanisms of male infertility: role of antioxidants. *Current Drug Metabolism*. 6(5):495–501, 2005.

Skakkebaek NE Testicular dysgenesis syndrome. *Horm Res* 60 (Suppl 3): 49, 2003.

Symanski H.J. *Encyclopaedia of occupational health and safety*. Vol. 2, pag. 2240-2241, 1983..

Spanò M., *et al.* Exposure to PCB and p,p'-DDE in European and Inuit populations: impact on human sperm chromatin integrity. *Hum Reprod* 2005;20:3488-99.

Steinhardt GF. Endocrine disruption and hypospadias. *Adv Exp Med Biol*. 545:203-215, 2004.

Swan SH, Brazil C, Drobnis EZ, *et al.* Geographic differences in semen quality of fertile U.S. males. *Environmental Health Perspectives* 111(4):414–420, 2003.

Telisman S *et al.* Semen quality and reproductive endocrine function in relation to biomarkers of lead, cadmium, zinc and copper in men. *Environ Health Perspect* 2000;108:45-53.

Telisman S *et al.* Reproductive toxicity of low-level lead exposure in men. *Environ Res* 2007;105:256-66.

Templeton DM. The importance of trace element speciation in biomedical science. *Anal Bioanal Chem*. 375(8):1062-1066, 2003.

Tito A, Carola A, Bimonte M. A tomato stem cell extract, containing antioxidant compounds and metal chelating factors, protects skin cells from heavy metal-induced damages. *International Journal Cosmetic Science* 33 (6) :543–552, 2011.

Underwood, EJ *Trace Elements in Human and Animal Nutrition*. 4th ed. Academic Press, New York, USA,1977.

United Kingdom Testicular Cancer Study Group. Aetiology of testicular cancer: association with congenital abnormalities, age of puberty, infertility, and exercise. *BMJ*, 308:1393-1399, 1994.

Van den Berg M., *et al.* Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. *Environ Health Perspect* 1998;106:775-92.

Vicari E., Conticello A., Battiato C. *et al.* Sperm characteristics in fertile men and healthy men of the south-east Sicily from year 1982 to 1999. *Arch Ital Urol Androl* 75: 28-24, 2003.

Vicari E., Castiglione R., La Vignera S., Calogero AE. Ambiente e Fertilità.. In “*Andrologia 2004*”, CIC Ed.Intern., pp.130-139, 2004.

Xu DX *et al.* The associations among semen quality, oxidative DNA damage in human spermatozoa and concentrations of cadmium, lead and selenium in seminal plasma. *Mutation Res* 2003;534:155–63.

WHO Environmental Health Criteria 140: Polychlorinated Biphenils and Terphenils. WHO Ginevra, 1993.

WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen ,fifth edition , OMS 2010

Wolff MS. Proposed PCB congener groupings for epidemiological studies. *Environ Health Perspect* 1997;105:13-4.

Younglai E, Collins J., Foster W. Canadian semen quality: an analysis of sperm density among eleven academic fertility centers. *Fertil.Steril.*, 70:76-80, 1998.

Zorn B., Virant-Klun I., Verdenik I. *et al.* Semen quality changes among 2343 healthy Slovenian men included in an IVF-ET programme from 1983 to 1996. *Intern. J. Androl.*, 22:178-183, 1999.