



Fondazione  
**FULVIO  
FRISONE**  
**FFF**

Centro per la Ricerca Scientifica



Regione Siciliana

# Ambiente e Salute

**PRIMO REPORT - 19 NOVEMBRE 2010**

**RISULTATI DELLA RICERCA DI SCREENING DEI FATTORI INQUINANTI  
NELLA POPOLAZIONE DEL TRIANGOLO INDUSTRIALE  
DI AUGUSTA-PRIOLO-MELLILLI**

CENTRO DI RICERCA SCIENTIFICA  
**FULVIO FRISONE**



**Melilli (Sr)**





## IMPATTO DELL'INQUINAMENTO AMBIENTALE SULLA FUNZIONE RIPRODUTTIVA MASCHILE NELL'AREA MELILLI-PRIOLO-AUGUSTA

Giuffrida MC, Asero P, Bonanno O, Altomare M, Romeo G, Condorelli R,  
Garrone F, Vicari E, Ferrante M, Calogero AE, Sciacca S, D'Agata R

Negli ultimi 50 anni, una riduzione della concentrazione nemaspermica si è verificata in molti Paesi.

In alcune nazioni, si è notato una riduzione delle nascite, non secondaria ad aumento dell'uso di contraccettivi o del numero degli aborti; imputabile quindi ad una riduzione della fertilità. Questo trend presenta comunque delle differenze regionali. Infatti, in altri Paesi e, fra questi USA e Finlandia, non si è verificato un calo della qualità spermatica. La notevole riduzione della conta nemaspermica osservata in Danimarca, è associata ad altre patologie dell'apparato riproduttivo maschile: ipospadie, criptorchidismo e tumori testicolari, la cui incidenza è tra le più alte del mondo comprese altre nazioni nord europee (Svezia). La differenza nell'incidenza di queste patologie dell'apparato riproduttivo può essere legata a fattori geografici specifici.

Dunque la variabilità geografica e il rapido aumento dell'infertilità maschile, pongono in causa fattori ambientali.

Il notevole aumento delle aree ad alta densità abitativa e l'industrializzazione con alta concentrazione di insediamenti inquinanti portano sicuramente ad una esposizione più alta agli xenobiotici ambientali. Gli xenobiotici ambientali capaci di danneggiare l'apparato riproduttivo sono molti: metalli pesanti, idrocarburi policiclici aromatici (PAH), diossine, ecc., e per essi sono stati evidenziati meccanismi d'azione comuni, quali competizione ormonale (endocrine disruptor) o danno ossidativo (iperproduzione di radicali liberi dell'O<sub>2</sub>). 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 secondo della gravità e del momento in cui si instaura il danno e delle strutture cellulari interessate, può comparire una di queste patologie come probabile conseguenza di un danno da xenobiotici a livello testicolare (sindrome della disgenesia testicolare)

Gli studi di tossicologia, in modelli animali, riportano danni sulla linea germinale e

sul DNA, quale conseguenza di esposizione a xenobiotici ambientali. Studi epidemiologici sull'incidenza delle malformazioni del tratto urogenitale e sulla riduzione della qualità spermatica nei cittadini esposti a xenobiotici, perché residenti in aree ad elevato tasso di inquinamento o per motivi professionali, sono di rilevanza a sostegno di questa conclusione. Essi infatti mostrano una riduzione della densità e/o un danno nemaspermico in soggetti esposti per motivi professionali e negli abitanti di aree contaminate da vicini insediamenti industriali. I tossici ambientali sono quindi in grado di alterare i parametri seminali (densità, motilità, morfologia) o di danneggiare il DNA dei gameti.

Studi condotti in un'area della Repubblica Ceca (Teplice), hanno mostrato un aumento della frammentazione della cromatina, un aumento delle forme anormali 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. I metalli pesanti invece provocano danno cellulare e del DNA attraverso la produzione di radicali liberi dell'ossigeno (ROS). La valutazione degli addotti del DNA negli spermatozoi è un ottimo biomarcatore di danno del DNA indotto da esposizione a tossici ambientali.

In tre comuni 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.

Per raggiungere tale obiettivo lo studio caso-controllo è stato condotto su circa cento uomini di età compresa tra i 20 ed i 46 anni residenti nel comune di Melilli (SR) e in uomini di età simile residenti nella città di Regalbuto (EN), sito a basso tasso di inquinamento ambientale.

Il reclutamento è stato eseguito mediante invio di lettere ai cittadini che soddisfano i requisiti richiesti e la partecipazione è stata del tutto volontaria e gratuita.

Ogni soggetto arruolato è stato intervistato da un medico 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). Tutte queste informazioni sono indispensabili ai fini di una migliore interpretazione dei risultati conseguiti. Infatti, la valutazione quantitativa del rischio basato sugli studi epidemiologici è veramente complessa a causa dei numerosi fattori di confondimento, quali il fumo di sigaretta, l'esposizione

professionale e la suscettibilità individuale a patologie genetiche e/o tumorali.

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.). Infatti, numerosi agenti inquinanti ambientali esplicano un'attività estrogenica e/o anti-androgenica e potrebbero quindi perturbare l'equilibrio ormonale del feto, con ripercussioni negative sulla differenziazione sessuale del neonato maschio, da cui ipospadie, criptorchidismo e micropene.

I volontari sono stati quindi sottoposti ad un esame del liquido seminale per poter valutare: a) i parametri spermatici convenzionali (concentrazione, motilità, morfologia, vitalità seguendo i criteri della WHO); b) i seguenti parametri biofunzionali: funzione mitocondriale; esternalizzazione della fosfatidilserina (PS); integrità della cromatina; e frammentazione del DNA; c) i livelli di specie reattive dell'ossigeno (ROS); d) la concentrazione di sostanze inquinanti (Pb, Cd, Hg, V, Ni, PCB e IPA) nel plasma seminale e negli spermatozoi; e) la presenza di addotti del DNA negli spermatozoi; ed f) il pattern di metilazione di geni "imprantati" e "non imprantati".

L'esame del liquido seminale è considerato uno strumento basilare nella valutazione della fertilità maschile. Tuttavia le risposte fornite dallo spermioγραμμα sulla capacità riproduttiva non sono comunque definitive, poiché trattasi di uno studio in vitro che può non riflettere il comportamento del liquido seminale nell'apparato riproduttivo femminile.

Il liquido seminale, noto anche come sperma, è costituito da spermatozoi immersi in un mezzo liquido chiamato plasma seminale. Quest'ultimo è essenziale per la maturazione, il metabolismo e la vita degli spermatozoi, nonché per la sopravvivenza degli stessi dopo l'eiaculazione (emissione, al culmine dell'atto sessuale (orgasmo), del liquido seminale attraverso l'uretra). Gli spermatozoi, invece, rappresentano le cellule riproduttrici maschili, che una volta rilasciate in vagina, insieme alle altre componenti dello sperma, risalgono l'apparato riproduttivo femminile per fecondare la cellula uovo.

Nell'eiaculato, oltre alle componenti già elencate (spermatozoi più plasma seminale), si riscontrano anche cellule immature provenienti dalla spermatogenesi e cellule epiteliali di sfaldamento.

La sintesi degli spermatozoi avviene all'interno dei tubuli seminiferi dei testicoli (contributo del 2-5% al volume complessivo dello sperma), mentre il plasma viene prodotto dalle vescicole seminali (contributo del 60-70% al volume spermatico), dalla prostata (20/30%) e in misura inferiore dalle ghiandole bulbo-uretrali (< 1%).

In base alla valutazione dei parametri spermatici (concentrazione, motilità, morfologia e vitalità) si parla di normozoospermia, nel caso di un eiaculato normale, secondo i valori di riferimento; astenozoospermia, nel caso di alterazione della motilità degli spermatozoi; oligozoospermia (o semplicemente oligospermia) quando si osserva un ridotto numero di spermatozoi; criptospermia quando si ha un deficit severo di spermatozoi (assenza di spermatozoi nell'eiaculato ma presenza di spermatozoi nel centrifugato); azoospermia nel caso di assenza di spermatozoi nel liquido seminale;

teratozoospermia quando si ha un'alterazione della morfologia degli spermatozoi; e oligoastenoteratozoospermia quando si ha un'alterazione di tutte le variabili.

L'esternalizzazione della fosfatidilserina (PS), è indice precoce di apoptosi (che rappresenta una forma di morte cellulare programmata). Infatti, durante i primi stadi dell'apoptosi, la membrana citoplasmatica va incontro a profonde modificazioni che hanno il compito di segnalare lo "stato apoptotico" della cellula ai macrofagi che provvederanno a fagocitarla. Sulla superficie cellulare esterna si osserva, oltre ad altri fenomeni, l'esposizione della PS. Questa è un aminofosfolipide a carica negativa che normalmente è presente solo nello strato interno della membrana citoplasmatica ma che, per motivi probabilmente legati all'attività mitocondriale, viene esposta sulla superficie esterna della cellula. Il riconoscimento dell'esternalizzazione della PS è stato effettuato utilizzando l'annexina V, una proteina anticoagulante che si lega selettivamente alla PS in presenza di ioni calcio.

La funzione mitocondriale anch'esso indice precoce di apoptosi, comporta la valutazione del potenziale di membrana mitocondriale (MMP) degli spermatozoi. Durante le prime fasi dell'apoptosi, infatti, le cellule subiscono un'alterazione dell'MMP, prima che la fosfatidilserina (PS) venga esposta sul lato esterno della membrana citoplasmatica. La valutazione della funzionalità mitocondriale è stata effettuata utilizzando il fluorocromo JC-1 (una molecola che penetra selettivamente nei mitocondri) ed analisi citofluorimetrica.

L'integrità della cromatina comporta la valutazione del grado di compattazione della cromatina degli spermatozoi, i quali vengono colorati con ioduro di propidio (PI), che è una sostanza fluorescente per la marcatura del DNA.

La frammentazione del DNA (segno tardivo di apoptosi) è caratterizzata dalla presenza di tagli non-random nei filamenti di DNA causati dall'attivazione di endonucleasi Ca/Mg-dipendenti specifiche per le regioni linker del DNA. Il risultato finale è la frammentazione e la degradazione del DNA. La valutazione della frammentazione del DNA è stata effettuata mediante saggio TUNEL. Questa tecnica utilizza la terminal deoxynucleotidyl transferase (TDT), un enzima che polimerizza nucleotidi modificati coniugati con un fluorocromo a livello delle rotture del DNA.

La valutazione dei livelli di specie reattive dell'ossigeno (ROS) nel liquido seminale è molto importante in quanto i metalli pesanti agiscono a livello testicolare aumentando lo stress ossidativo. Inoltre, è stato ipotizzato che il particolato PM10 potrebbe avere un forte effetto genotossico con meccanismo ossidativo.

I volontari che hanno aderito allo studio sono stati inoltre sottoposti a prelievi di sangue per valutare: a) la presenza e la misurazione della concentrazione dei seguenti metalli pesanti: piombo (Pb), cadmio (Cd), mercurio (Hg), vanadio (V) e nichel (Ni); b) la presenza di polimorfismi di geni fondamentali per la riparazione del danno del DNA (XRCC1, XRCC3, GST, GSTM1, GSTT1); e c) i livelli sierici degli ormoni che controllano la funzione riproduttiva (LH, FSH e testosterone).

Campionamenti di aria per la ricerca del particolato totale sospeso (PTS) dei metalli pesanti (Pb, Cd, Hg, Ni, B), PAH e policlorobifenili (PCB) sono stati effettuati presso le due località (Melilli e Regalbuto).

Inoltre sono in corso studi in vitro, in cui gli spermatozoi ottenuti da volontari sani

non esposti a tossici ambientali vengono, dopo solubilizzazione, incubati con estratto d'aria di Priolo-Augusta-Melilli o di Regalbuto, a concentrazioni e per tempi variabili, per valutare l'eventuale tossicità diretta. Anche in questo caso vengono valutati la motilità nemaspermica e gli indici di danno mitocondriale e del DNA già indicati. Al fine di conoscere così l'effetto diretto dei costituenti dell'aria sui gameti maschili.

Risultati ancora preliminari mostrano che le polveri, i metalli e i PCB nell'aria atmosferica rientrano ampiamente entro i limiti di legge, mentre gli IPA sono costantemente presenti nell'atmosfera. Nei campioni biologici, gli IPA sono risultati assenti sia nei casi che nei controlli. Ciò potrebbe però essere dovuto alla rapida volatilizzazione degli IPA per cui ci si propone di continuare l'indagine valutando la presenza di marcatori biologici di esposizione. La maggior parte dei metalli pesanti presenti nei liquidi biologici è ampiamente entro i valori di riferimento, mentre alcuni superano tali valori, ma non essendo presenti nell'aria atmosferica va per questi valutata la sorgente di rischio. I PCB sono costantemente presenti nei campioni biologici sia dei casi che dei controlli e ciò riflette la contaminazione biologica diffusa a livello mondiale.

Per quanto attiene ai parametri del liquido seminale, le frequenze delle alterazioni dei parametri convenzionale del liquido seminale negli uomini residenti a Melilli e in quelli residenti a Regalbuto sono riportati nella tabella seguente:

<b>Parametro</b>	<b>Melilli</b>	<b>Regalbuto</b>
Oligozoospermia (riduzione del numero degli spermatozoi)	7%	8%
Azoospermia (assenza di spermatozoi nell'ejaculato)	2%	0%
Astenozoospermia (riduzione delle percentuale di spermatozoi mobili)	57%	8%
Teratozoospermia (riduzione del numero di spermatozoi con forma normale)	40%	40%
Leucocitospermia (elevato numero di leucociti nel liquido seminale)	25%	23%

Si può constatare che la frequenza di uomini con alterazioni del numero e della morfologia degli spermatozoi o con leucocitospermia è simile tra casi e controlli, mentre la frequenza di uomini con astenozoospermia è risultata nettamente superiore a Melilli rispetto a Regalbuto. Si evidenzia inoltre che l'8,5% dei casi di Mellili ha riferito la presenza di infertilità della durata compresa tra 18 e 168 mesi.

Per quanto attiene ai parametri non convenzionali del liquido seminale, i risultati indicano che nei casi di Melilli il 48% presenta spermatozoi con un danno a livello mitocondriale (un organello intracellulare fondamentale per l'approvvigionamento energetico dello spermatozoo); il 45% presenta danno della cromatina e il 9% frammentazione del DNA nel nucleo dello spermatozoo. Nei controlli di Regalbuto si riscontra invece che il 66,7% presenta spermatozoi con un danno a livello mitocondriale, il 41,7% un danno della cromatina e il 25% frammentazione del DNA nel nucleo dello spermatozoo. La frequenza delle alterazioni biofunzionali nemaspermiche nei maschi residenti nell'area di Melilli sembra dunque essere simile a quella riscontrata in una zona a bassa industrializzazione.





Fondazione  
**FULVIO  
FRISONE**  
**FFF**  
Centro per la Ricerca Scientifica



Regione Siciliana

# Ambiente e Salute

## ALCUNI MOMENTI DEL CONVEGNO





A sx il sindaco di Melilli G. Sorbello, S. Fleres, il Giornalista di telejonica A. Zitelli, Maria Giuffrida ricercatrice della Fondazione F. Frisone, E.Vicari



R. D'Agata e S. Fleres



E.Giannazo e S. Fleres



foto di gruppo



S.Sciacca e S. Fleres



E.Vicari e S. Fleres



A. Calogero e S. Fleres



F. Mallamace



S. Truglio, S. Fleres e Zitelli

**SEDE DI RAPPRESENTANZA**  
**VIA ETNEA, 73 - PALAZZO MINORITI - 95125 CATANIA**

**UFFICI AMMINISTRATIVI E RECAPITI POSTALI**  
**VIA VITTORIO EMANUELE DA BORMIDA, 45 - TEL/FAX (0039) 095 335 490**

**LABORATORI SCIENTIFICI**  
**TRAVERSA VIA S.GIOVANNI - 96010 MELILLI (SR)**  
**TEL/FAX 0931551118**

**WWW.FONDAZIONEFRISONE.IT**  
**E-MAIL: INFO@FONDAZIONEFRISONE.IT**  
**COD. FISC. 93135620875**

**CONTRIBUTI ALLA FONDAZIONE FRISONE**  
**CONTRIBUTI ED ELARGIZIONI A FAVORE DELLA FONDAZIONE POSSONO ESSERE**  
**EFFETTUATI MEDIANTE VERSAMENTO O BONIFICO SUL**  
**c/c N. IT 45 D 05036 16901 CC0561400708**  
**ABI 05036 CAB 16901**  
**PRESSO BANCA AGRICOLA POPOLARE DI RAGUSA AG. 1 - CATANIA**

**IL PRESENTE LAVORO È STATO REALIZZATO CON IL CONTRIBUTO**  
**DELLA PRESIDENZA DELLA REGIONE SICILIANA**

FRA  
FEA

Centro per la Ricerca Scientifica



Regio

ve e su