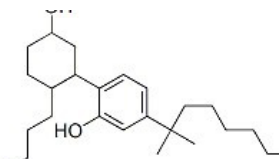
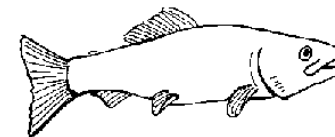


PREVIENI: il punto di vista delle Scienze Ambientali

Silvano Focardi
silvano.focardi@unisi.it

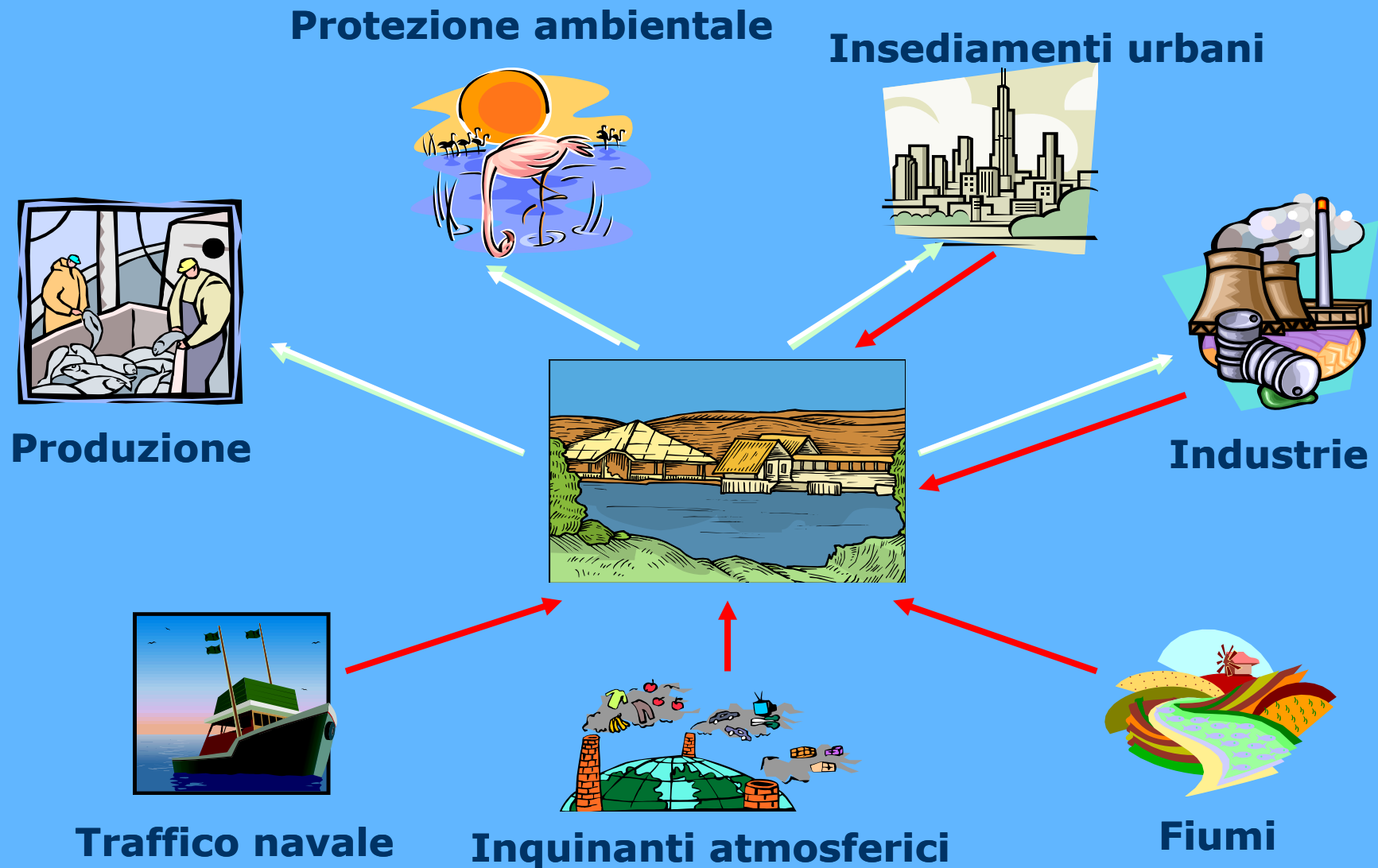


La struttura del progetto PREVIENI

Il progetto si articola in tre programmi di ricerca:

- 1- **Studio su popolazioni animali sentinella in due oasi del WWF**
- 2- Studio sull'infertilità *sine causa*
- 3- Studio *satellite* sull'esposizione transgenerazionale (trasferimento madre-neonato) a interferenti endocrini

Il primo programma di ricerca, oggetto di questa relazione, si propone di valutare l'entità dei riflessi ambientali di interferenti endocrini in due aree naturali pilota



Gli ecosistemi mostrano un forte incremento di fattori di stress che si riflettono sulle loro componenti più fragili, gli organismi.

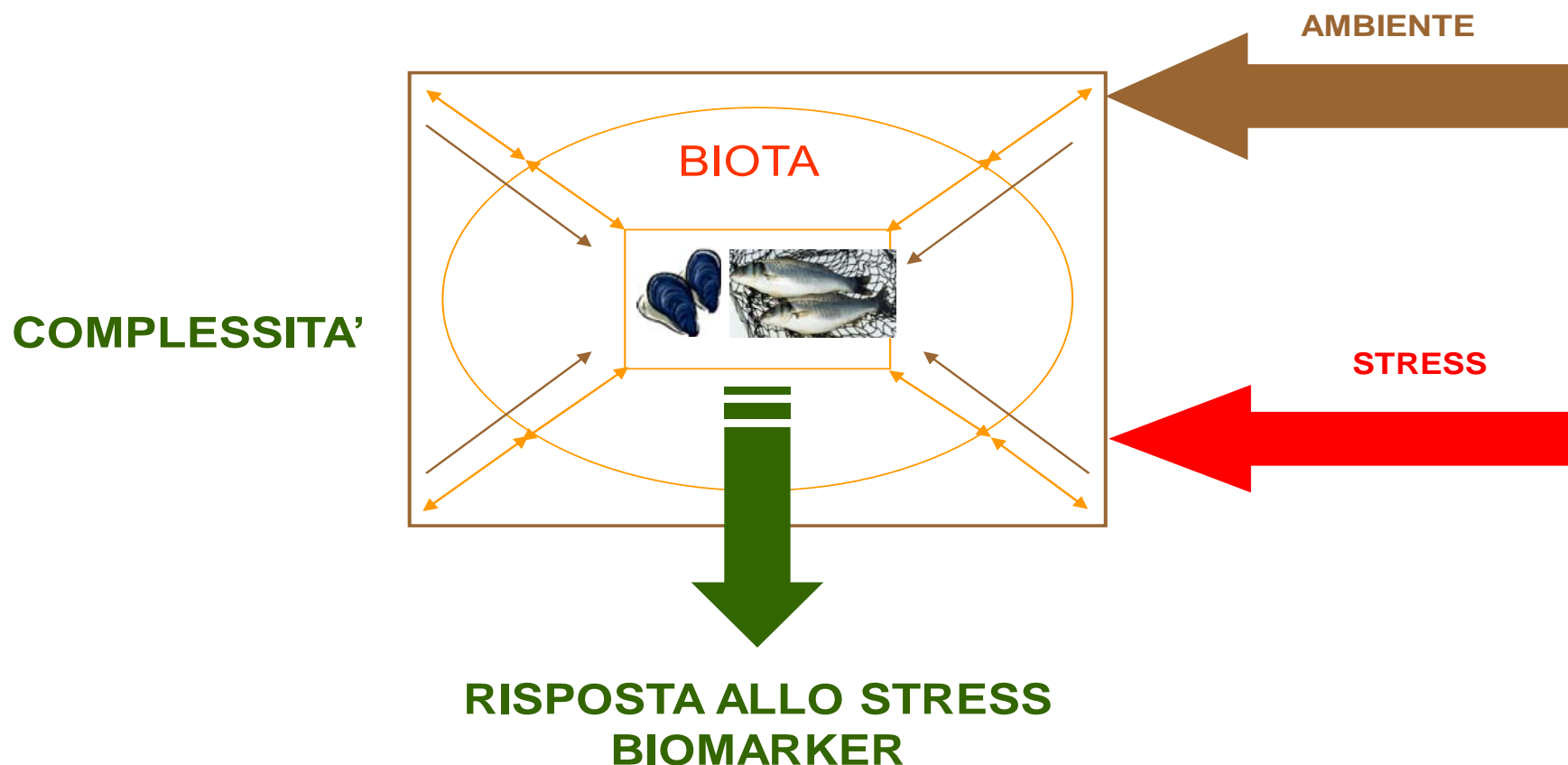


Da oltre 30 anni il biomonitoraggio rappresenta una strategia che cerca di rispondere a queste problematiche e di raggiungere obiettivi quali:

- identificare i composti inquinanti**
- controllare le fonti di inquinamento**
- valutare lo stato di salute dell'ecosistema in studio**
- monitorare e predire le conseguenze future (effetti)**

La necessità di valutare gli effetti: i biomarker

“..quella variazione biochimica, cellulare, fisiologica o comportamentale, che può essere misurata in un tessuto, in un fluido biologico o a livello dell'intero organismo (individuo o popolazione) la quale fornisce l'evidenza di un esposizione e/o effetto ad uno o più composti inquinanti” (NRC 1990)



CONSEGUENZE DELL'AZIONE TOSSICA DI CONTAMINANTI COME POPs, PAH ecc.

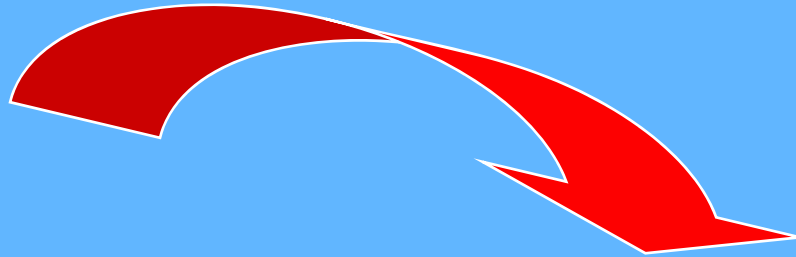
Bioaccumulo



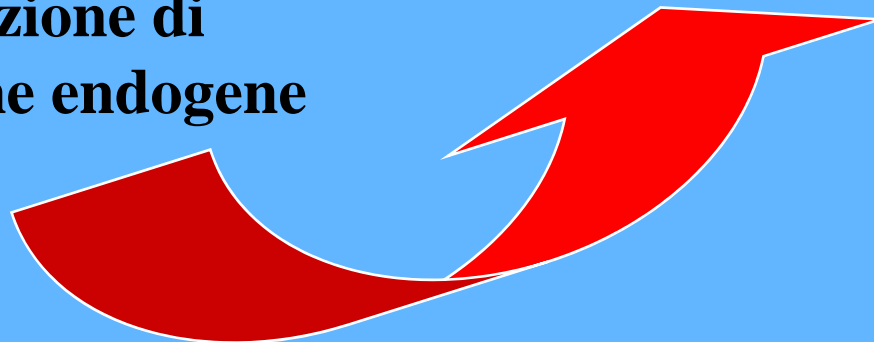
**Induzione di enzimi
farmaco-metabolizzanti
(Cyt P-450s, GSTs, UDP-GTs)**



**Metabolismo e attivazione di
xenobiotici e di tossine endogene**



**Alterazioni della riproduzione
Immunotossicità
Teratogenesi
Carcinogenesi
Alterazioni ormonali**





**Nel 1988 ci fu una
moria di massa
nelle popolazioni
di foche del Mare
del Nord e del
Mar Baltico:
almeno 20.000
foche furono
uccise da un
morbillivirus.**

A photograph of two dolphins leaping from the water, creating a large splash. The dolphins are captured in mid-air, with their bodies arched and their fins visible. The water is dark blue, and the dolphins have a light greyish-brown color with a lighter underbelly. The text is overlaid on the lower half of the image.

Mediterraneo Occidentale, 1990: un'epidemia di morbillivirus colpì la stenella striata (*Stenella coeruleoalba*), e morirono molte decine di migliaia di delfini; Mediterraneo Centrale, 1991: lo stesso tipo di epidemia colpì il tursiope (*Tursiops truncatus*) e morirono molte migliaia di delfini.

ENDOCRINE DISRUPTORS (DISTRUTTORI ENDOCRINI)

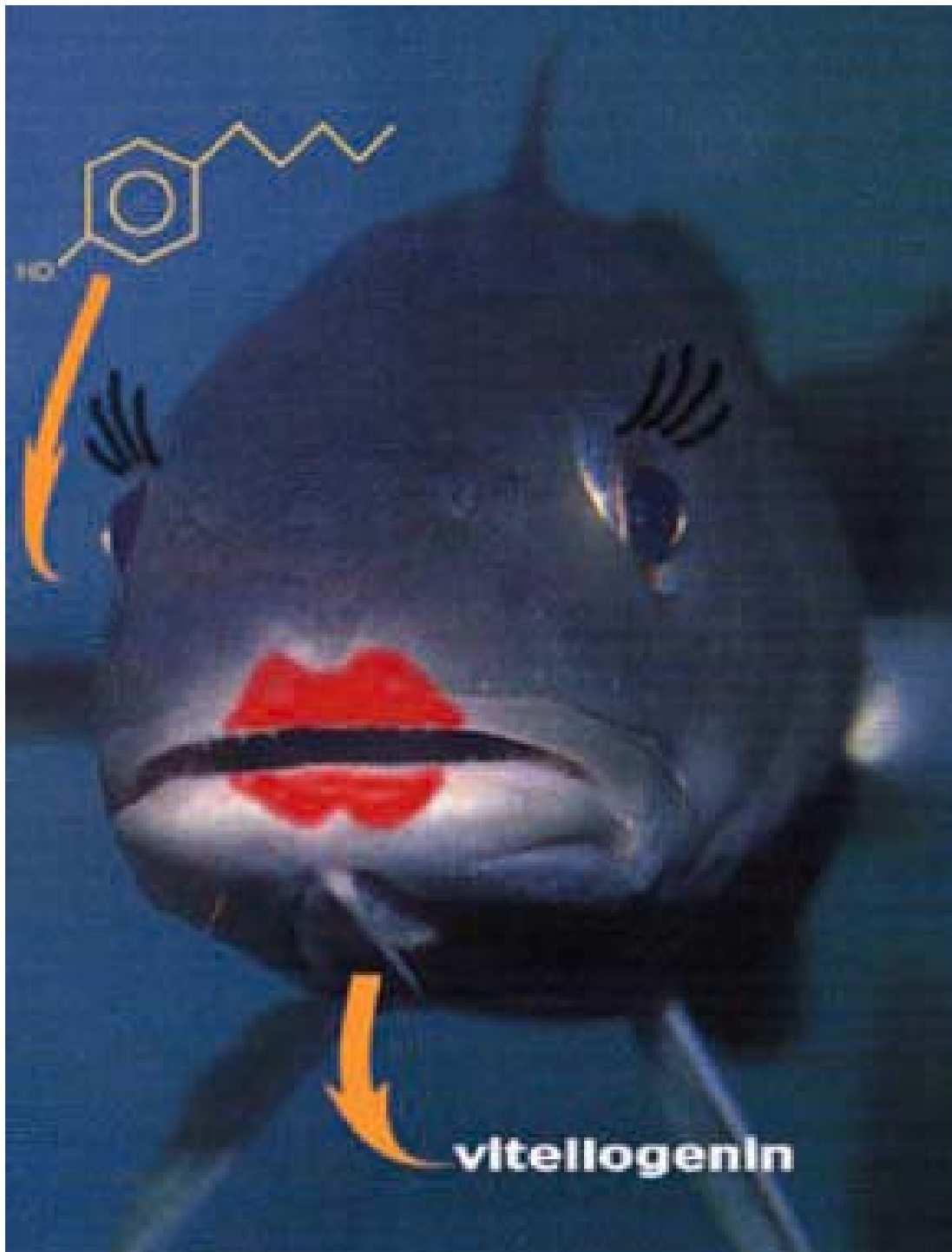
“un agente esogeno che interferisce con produzione, rilascio, trasporto, metabolizzazione, legame, azione o eliminazione di ormoni naturali nell’organismo, responsabili del mantenimento dell’omeostasi e della regolazione dei processi riproduttivi e di sviluppo”
(European Commission, 1996).

Alcune classi di contaminanti, tra cui, ad esempio, il DDT, i PCB e le diossine, sono state definite come “endocrine disruptor”, ovvero modulatori del sistema endocrino in grado di alterarne la funzionalità in molti organismi, uomo compreso.

NUOVA IDEA?



L'idea che alcuni prodotti chimici sintetici avessero effetti negativi sulla salute, compreso il sistema endocrino, non è nuova. Più di 40 anni fa Rachel Carson nel suo libro *Silent Spring* descrive come questi composti potessero essere potenziali contaminanti dell'acqua, dei suoli, degli animali e dell'uomo.



**INTERSEX:
caratteristiche
maschili e
femminili nella
gonade**

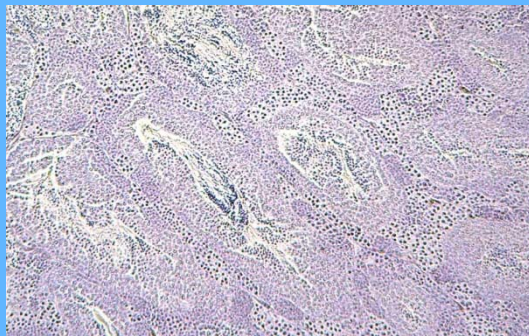
GONADAL HISTOLOGY



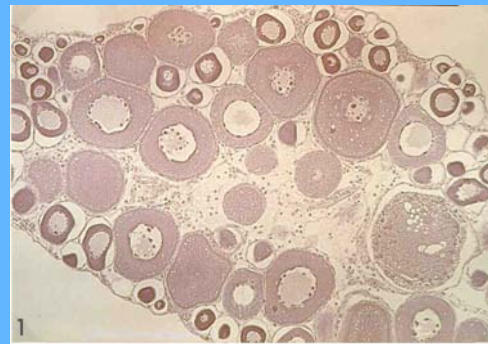
Reproduction



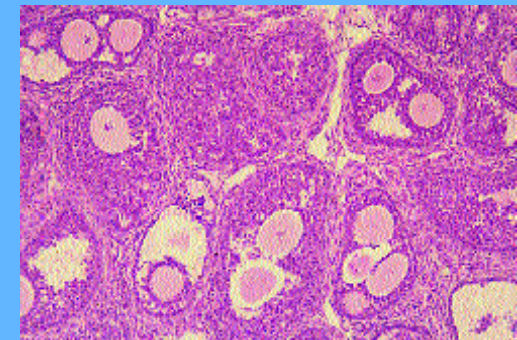
Uso dell'istologia della gonade come potenziale biomarker



Male spermatocytes



Female oocytes



Intersex gonads



UN ESEMPIO : GLI ORSI POLARI

- Rappresentano forse la specie più minacciata dalle sostanze tossiche
- Sono al vertice della catena trofica artica: nel loro organismo si accumulano le più alte dosi di molte sostanze pericolose
 - Le loro difese immunitarie sono ridotte e presentano squilibri ormonali (pseudoermafroditismo) che rende difficoltosa la riproduzione

FEMMINIZZAZIONE IN ANFIBI MASCHI



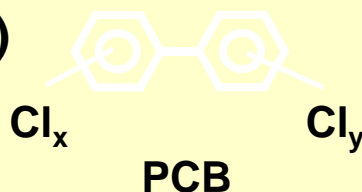
Nature, 2002, vol.419, pp. 895-896.

“In the light of growing evidence that these populations are in decline, the contribution of atrazine to this decline warrants further investigations.”

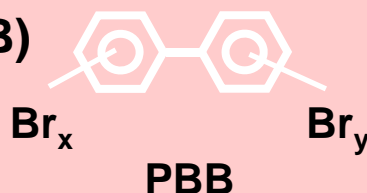
Composti organici persistenti

a) composti organici “vecchi”:

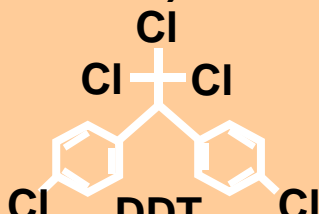
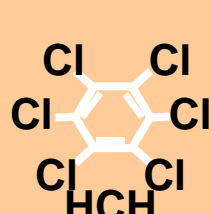
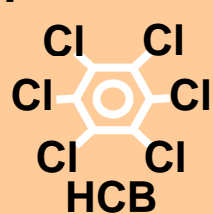
policlorobifenili (PCB)



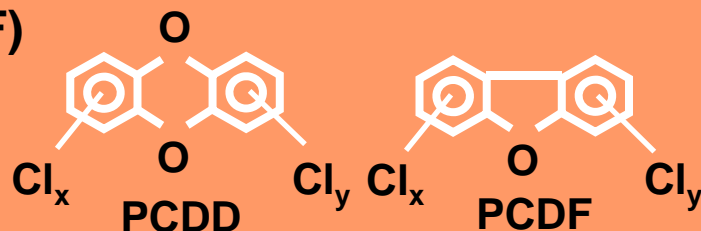
polibromobifenili (PBB)



pesticidi clorurati (HCB, HCH e *p,p'*-DDT e isomeri e metaboliti)

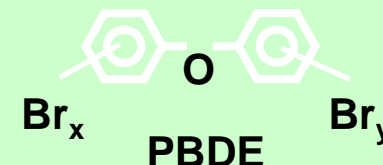


policlorodibenzo-diossine/furani (PCDD/F)

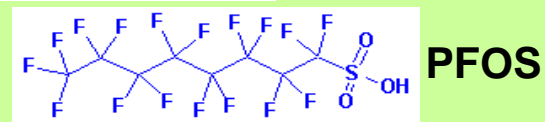
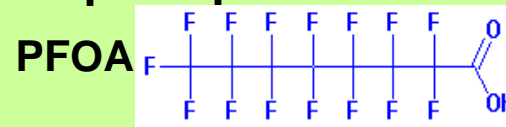


b) contaminanti emergenti:

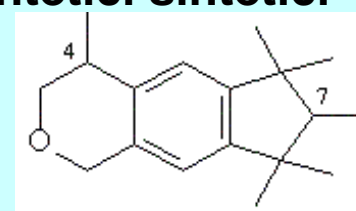
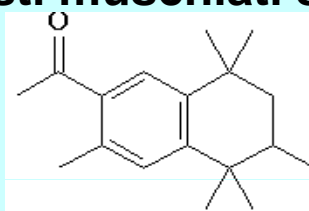
polibromo-difenileteri (PBDE)



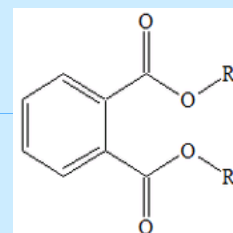
composti perfluorurati (PFC)



composti muschiati sintetici sintetici (SMC)



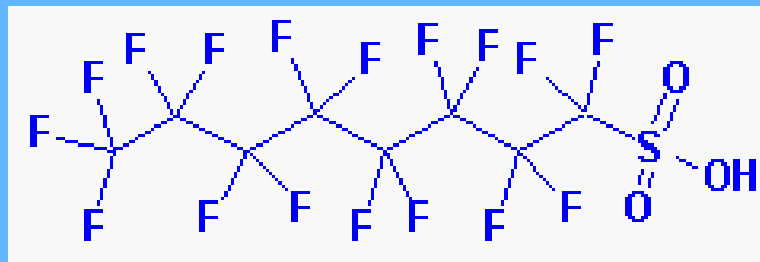
ftalati



Contaminanti emergenti: Composti perfluorurati

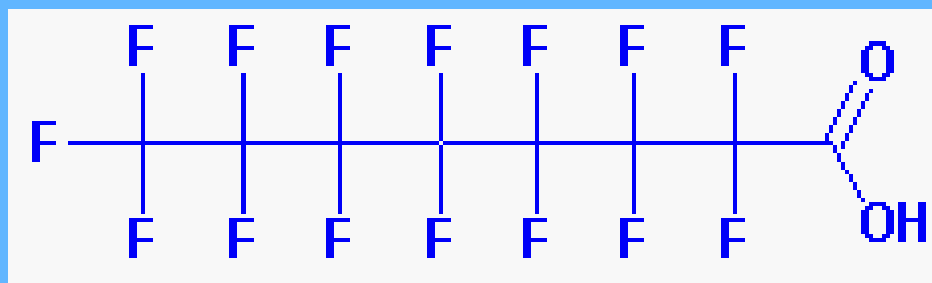
PFOS

perfluorottansulfonato



PFOA - acido

perfluorooctanoico



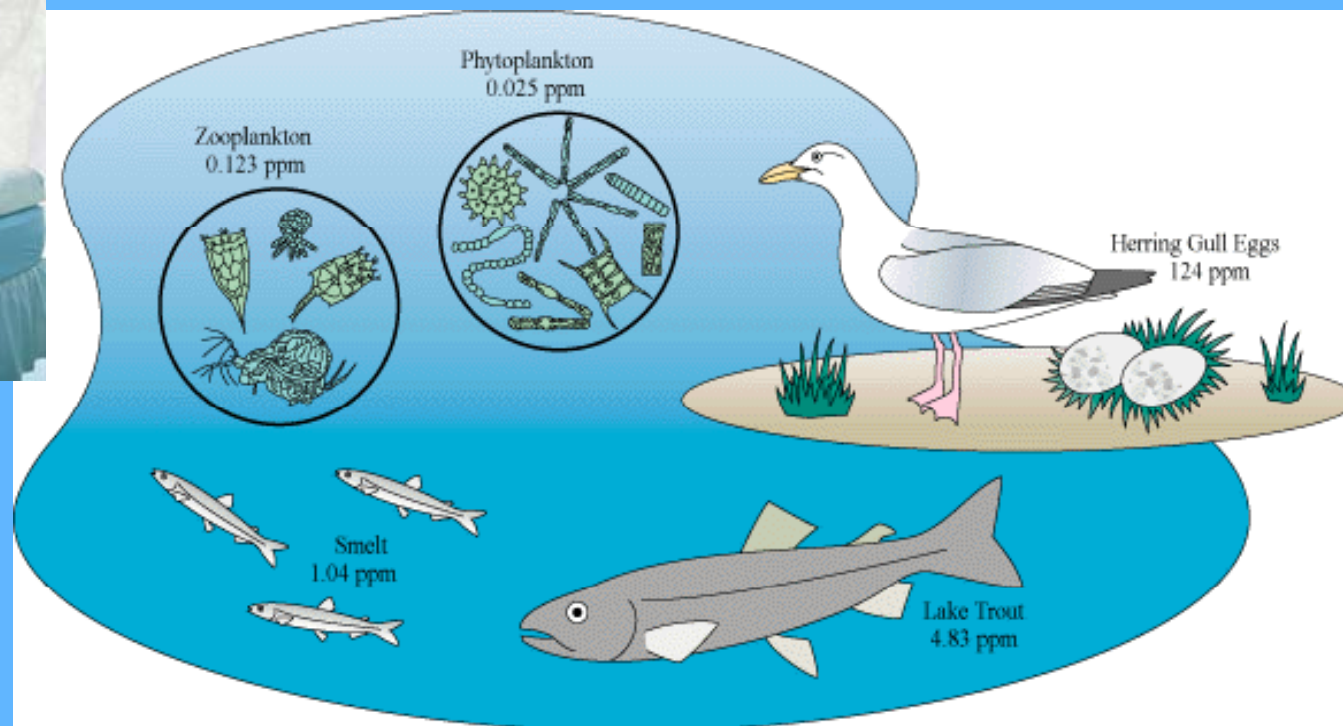
Usati in:

- Teflon,
- isolanti,
- componenti impiantistiche,
- presidi odontotecnici,
- tessuti tecnici come il Gore-Tex o il WindStopper



Contaminanti emergenti

I difenil eteri polibromurati (PBDE)



Drug Portal to the World



adapted by Daughton from Ternes (April 2000)

Area di studio

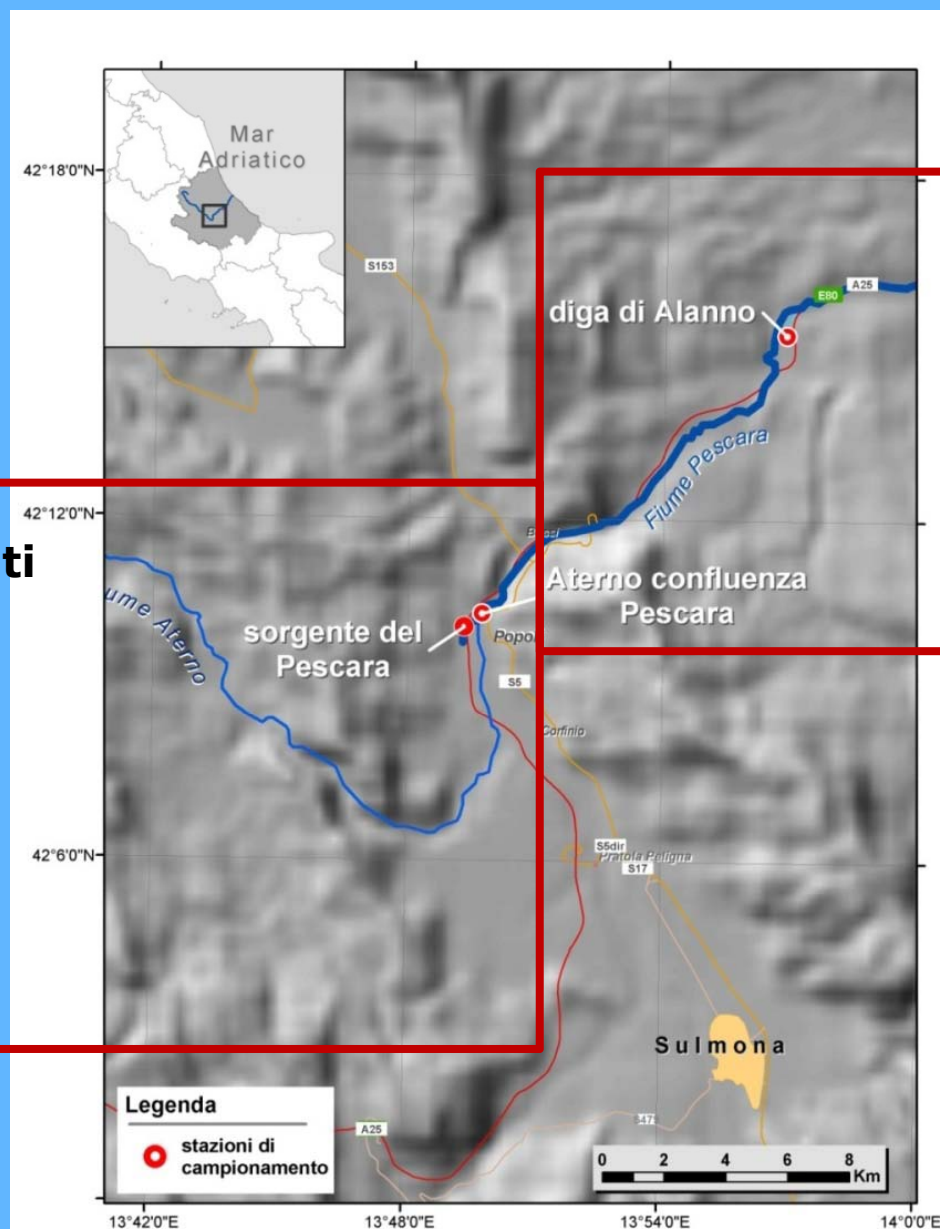
Due zone umide, Oasi WWF, lungo il corso del fiume Pescara

1. Oasi di Protezione della Fauna Diga di Alanno

**Situata a valle dei
siti chimici Bussi
sul Tirino
e Piano d'Orta**

2. Riserva Naturale Regionale Sorgenti del Pescara

**Situata diversi
chilometri a monte
dal sito industriale
chimico di Bussi sul
Tirino**



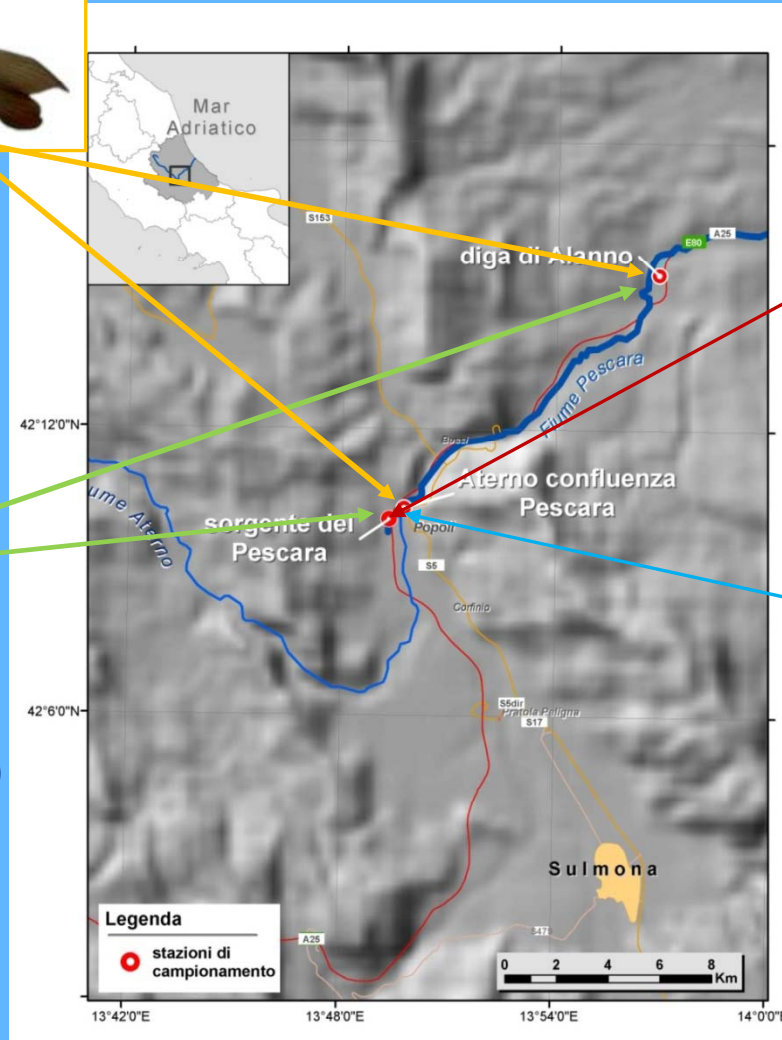
Bioindicatori



Barbo
(*Barbus tyberinus*)



Lombrico
(*Lumbricus terrestris*)



Trota
(*Salmo trutta*)



Folaga
(*Fulica atra*)

Parametri analizzati & matrici

Composti Perfluorurati (PFOS, PFOA)	fegato e muscolo barbo e trota; uova folaga; lombrico
Ftalati (DEHP, MEHP)	muscolo barbo e trota; uova folaga; lombrico
PCB, PBDE (polibromodifenileteri), IPA (idrocarburi policiclici aromtici) elementi in tracce (As, Cd, Hg, Pb)	fegato barbo e trota; uova folaga; lombrico
Bisfenolo A (BPA) e para-nonilfenolo (<i>p</i>NP)	muscolo barbo e trota; lombrico
EROD (7-etossi/7-metossi/7-benzossi/7-pentossiresorufina-O-deetilasi) UDPGT (uridin difosfato-glucoronisil transferasi)	frazione microsomiale epatica barbo
GST(glutatione-S-trasferasi)	frazione citosolica epatica barbo
AChE (acetilcolinesterasi)	cervello barbo
Metaboliti biliari IPA	bile barbo
Micronuclei	eritrociti barbo

Biondicatori: Metodi di analisi

PFC, ftalati e BPA

PFOS e PFOA, DEHP e MEHP, BPA: sono estratti utilizzando due diverse procedure di separazione liquido-liquido e determinati tramite LC-ESI-MS

PCB, PBDE, IPA e *p*-NP

Estrazione in ASE e successive purificazioni specifiche per ogni categoria di composti
Determinazione strumentale:

PCB→GC-ECD

IPA →HPLC-FL-PDA

p-NP e PBDE →GC-MS

Elementi in tracce

Campioni liofilizzati

Mineralizzazione con HNO_3

Determinazione strumentale:

Pb, As e Cd→spettrofotometria di assorbimento atomico

Hg→spettrofotometria di assorbimento atomico a vapori freddi (CV-AAS)

Biomarker: Metodi di analisi

Metaboliti biliari IPA

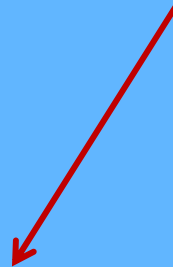
La quantità di metaboliti degli IPA contenuti nella bile è stata determinata con un metodo spettrofluorimetrico. I reagenti utilizzati sono stati etanolo e H₂O.

Micronuclei

La determinazione dei micronuclei negli eritrociti del barbo, preventivamente trattati con EDTA e poli-L-lisina, è stata effettuata al microscopio ottico.

Biomarker: Metodi di analisi

I campioni di fegato vengono centrifugati ottenendo un così un pellet ed un sovranatante; quest'ultimo centrifugato nuovamente così da ottenere un nuovo pellet ed un nuovo sovrinatante che sono rispettivamente le frazioni **microsomiale** e **citosolica**



EROD (7-etossiresoruffina-O-deetilasi)

Miscela di reazione costituita da: Tris-HCl e NADPH;
lettura spettrofluorimetria

UDPGT (uridin difosfato-glucuronosiltrasferasi)

Miscela di reazione costituita da: 4-metilumbelliferone e acido glucuronico;
lettura spettrofotometria

AChE (acetilcolinesterasi)

La miscela di reazione è costituita da: Tris-CaCl₂, DTNB, ATCI;
determinazione spettrofotometrica



GST (glutathione-S-trasferasi)

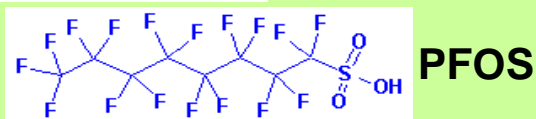
Miscela di reazione costituita da:
1-cloro-2,4-dinitrobenzene e glutathione;
lettura spettrofotometria

Risultati contenuto lipidico dei campioni

fegato barbo	11,8-12,5%
fegato trota	10,2-10,3%
muscolo barbo	1,1-1,9%
muscolo trota	6,5-7,0%
lombrico	1,1-1,2%
uova folaga	14,5-15,1%

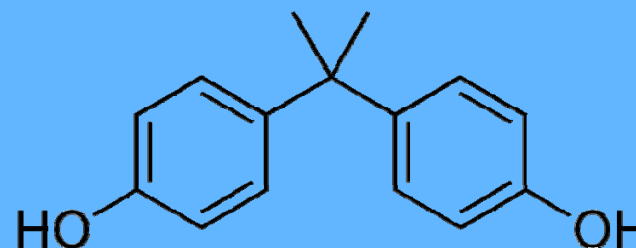
Risultati

composti perfluorurati (PFC)



I composti perfluorurati considerati (PFOS e PFOA) in fegato e muscolo di barbo, fegato e muscolo di trota, uova di folaga e lombrichi sono risultati sempre minori di 0,5 ng/g peso fresco (p.f.). Questi valori sono considerati valori di aree non inquinate da parte di questi contaminanti.

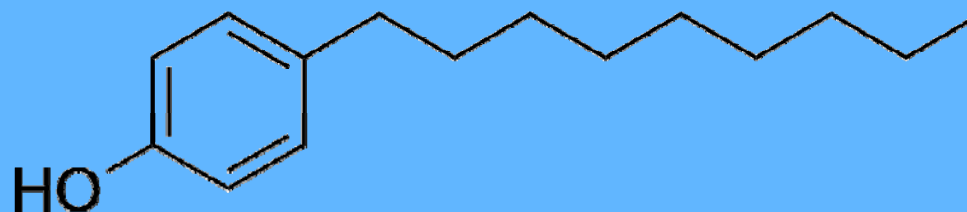
BPA, 4,4'-bisfenolo A



Il Bisfenolo A (BPA), analizzato nel muscolo di barbo e trota, è risultato inferiore a 0,5 ng/g p.f. Valori questi riferibili ad aree non inquinate da parte di questi contaminanti.

Risultati

p-nonilfenolo, 4-*n*-nonilfenolo

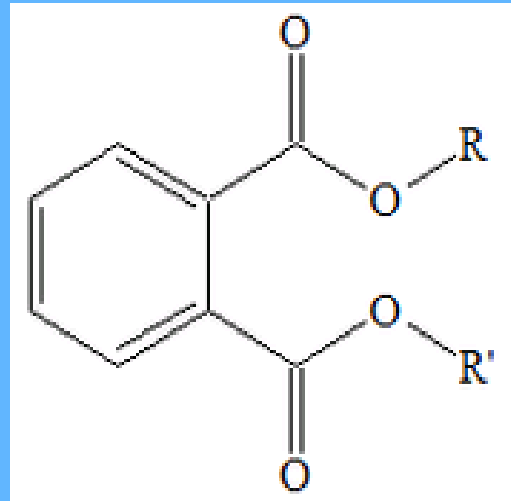


La determinazione di *p*-NP in campioni di lombrico ed in muscolo di barbo e di trota ha evidenziato solo una bassa contaminazione, per il lombrico, nell'area della sorgente del fiume Pescara (media $0,5 \pm 0,6$ ng/g p.f.) e concentrazioni di 1 ng/g p.f. nel resto dei campioni.

Si tratta di valori molto contenuti e riferibili ad aree non inquinate da parte di questi contaminanti.

Risultati: Ftalati

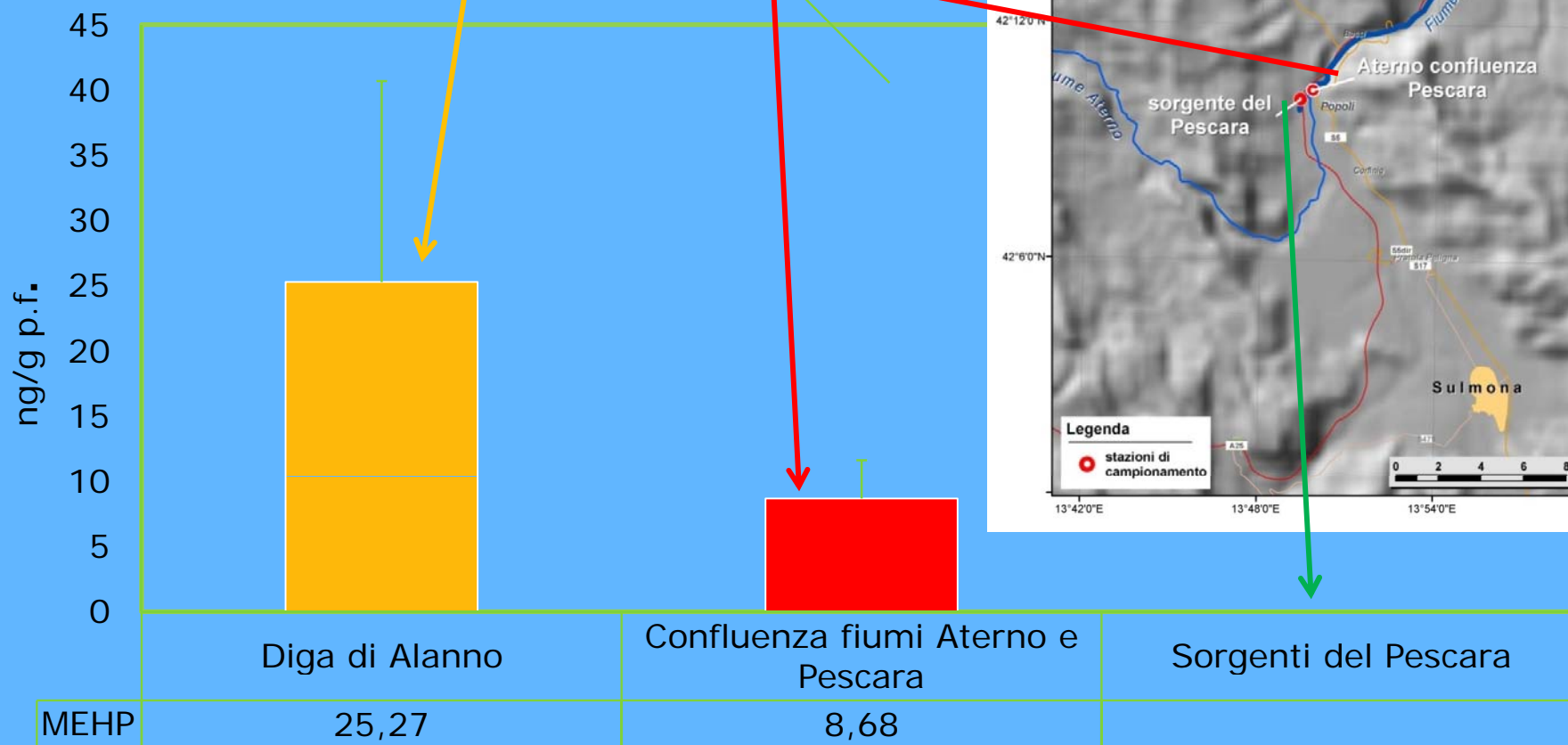
DEHP: di-2-etilesilftalato



Le concentrazioni del DEHP sono risultate in tutti i campioni inferiori alla Low Observed Dose (10 ng/g p.f.). Occorre considerare che il DEHP viene rapidamente metabolizzato a MEHP.

Le concentrazioni del metabolita persistente MEHP (mono-2-etilesilftalato) sono risultate inferiori a 2 ng/g p.f. (LOD) in uova di folaga e lombrico, mentre nel muscolo dei pesci analizzati i valori variano da <2 ng/g p.f. alle sorgenti del Pescara, a 8,68 alla confluenza dei fiumi Aterno e Pescara, fino a 25,27 ng/g p.f. nella diga di Alanno.

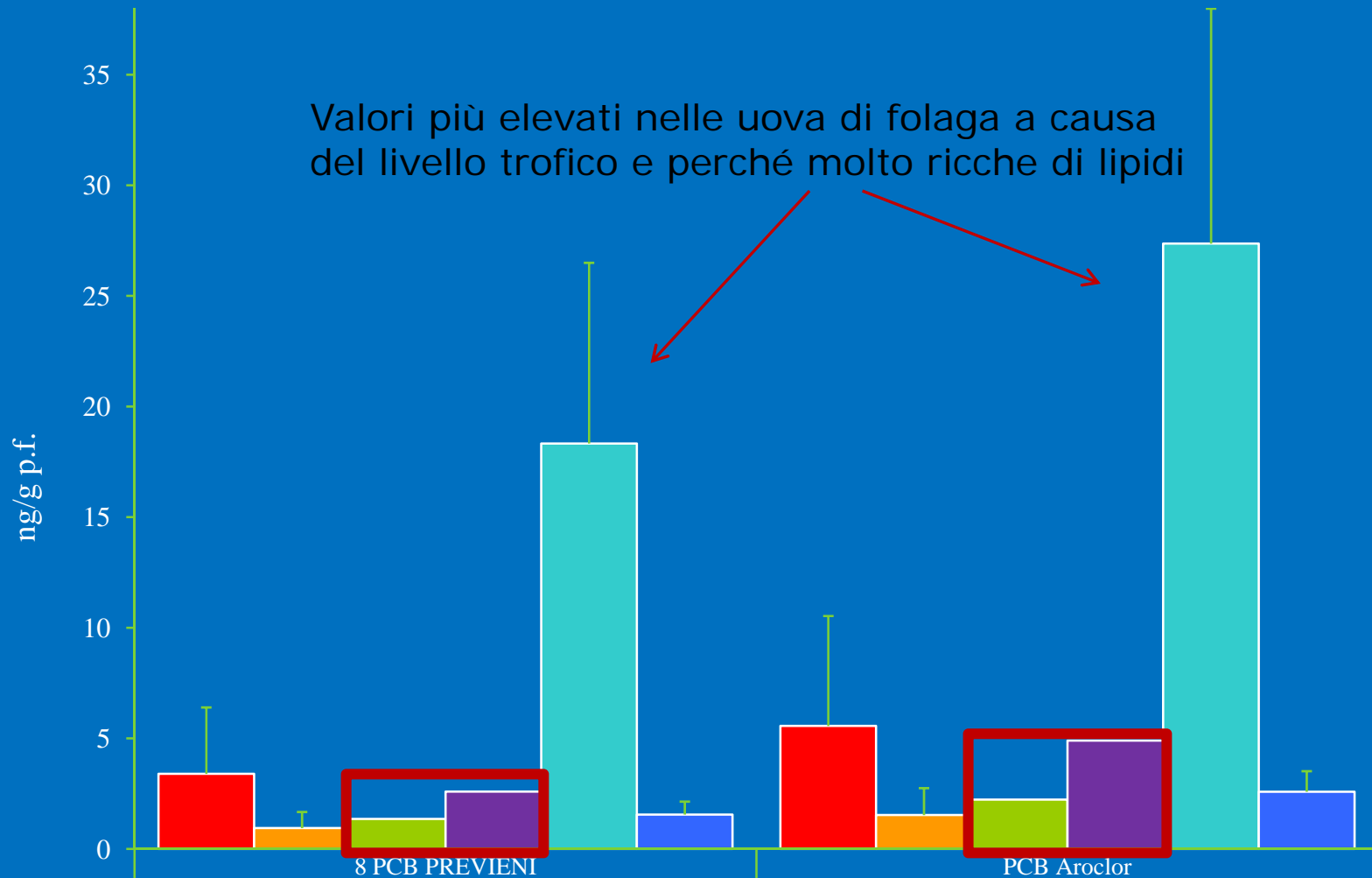
Risultati accumulo MEHP



L'European Food Safety Authority (EFSA) ha stabilito un TDI (tolerable daily intake) di 0,05 mg di MEHP per chilogrammo di peso corporeo al giorno.

Risultati accumulo Σ PCB

Valori più elevati nelle uova di folaga a causa
del livello trofico e perché molto ricche di lipidi



- fegato barbo confluenza Pescara
- fegato barbo diga di Alanno
- lombrichi sorgenti Pescara
- lombrico diga Alanno
- uova folaga sorgenti Pescara
- fegato trota sorgenti Pescara

3,39

0,94

1,36

2,59

18,33

1,56

5,56

1,53

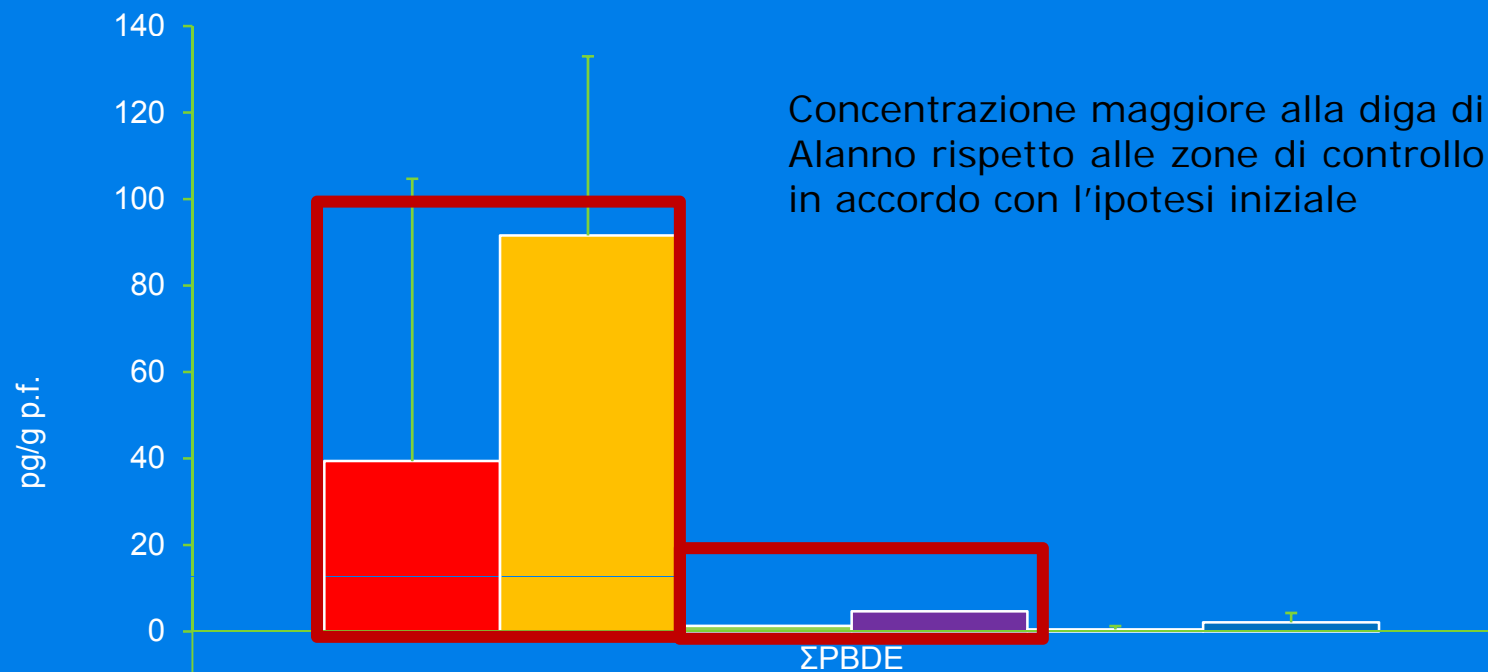
2,23

4,90

27,36

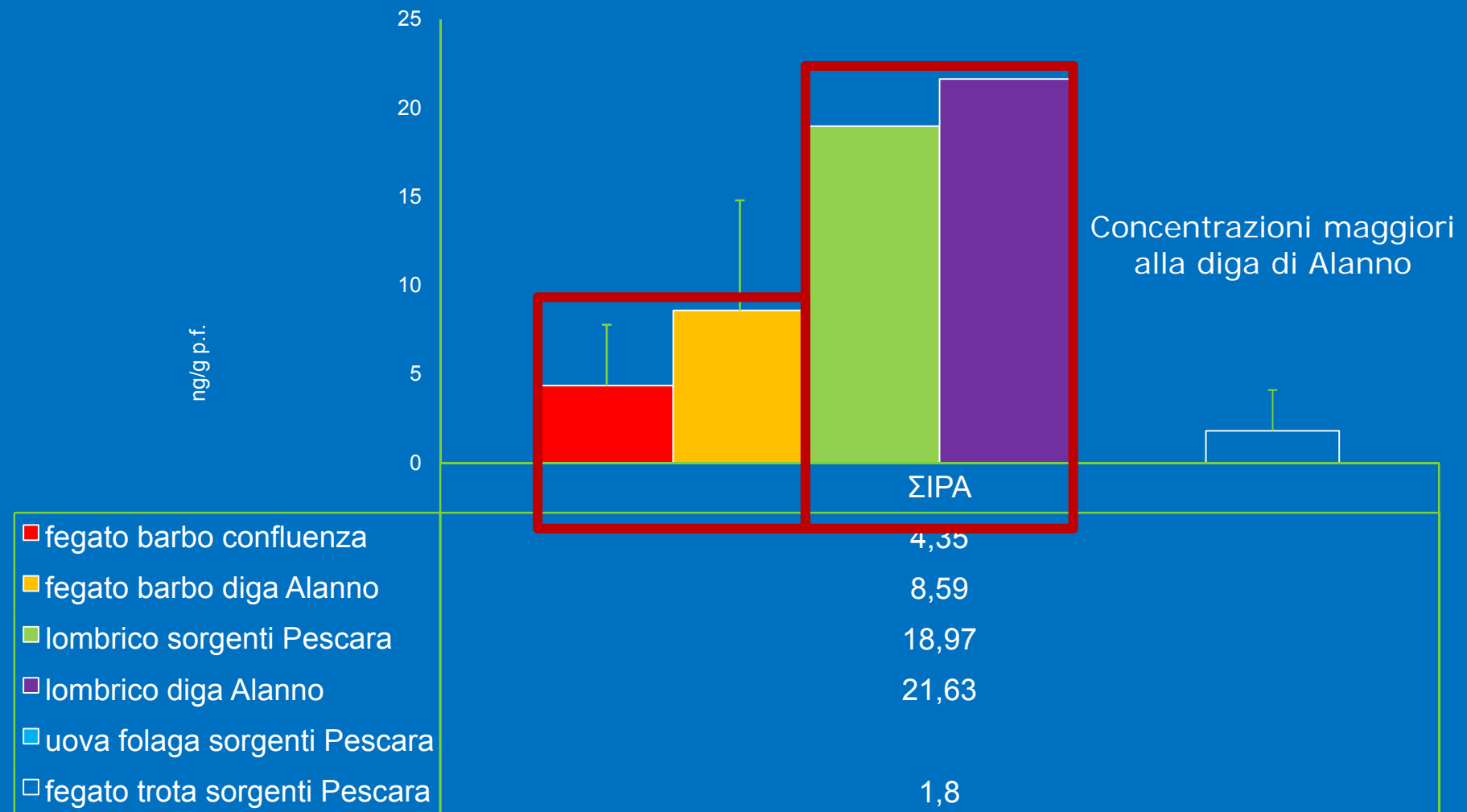
2,59

Risultati accumulo Σ PBDE

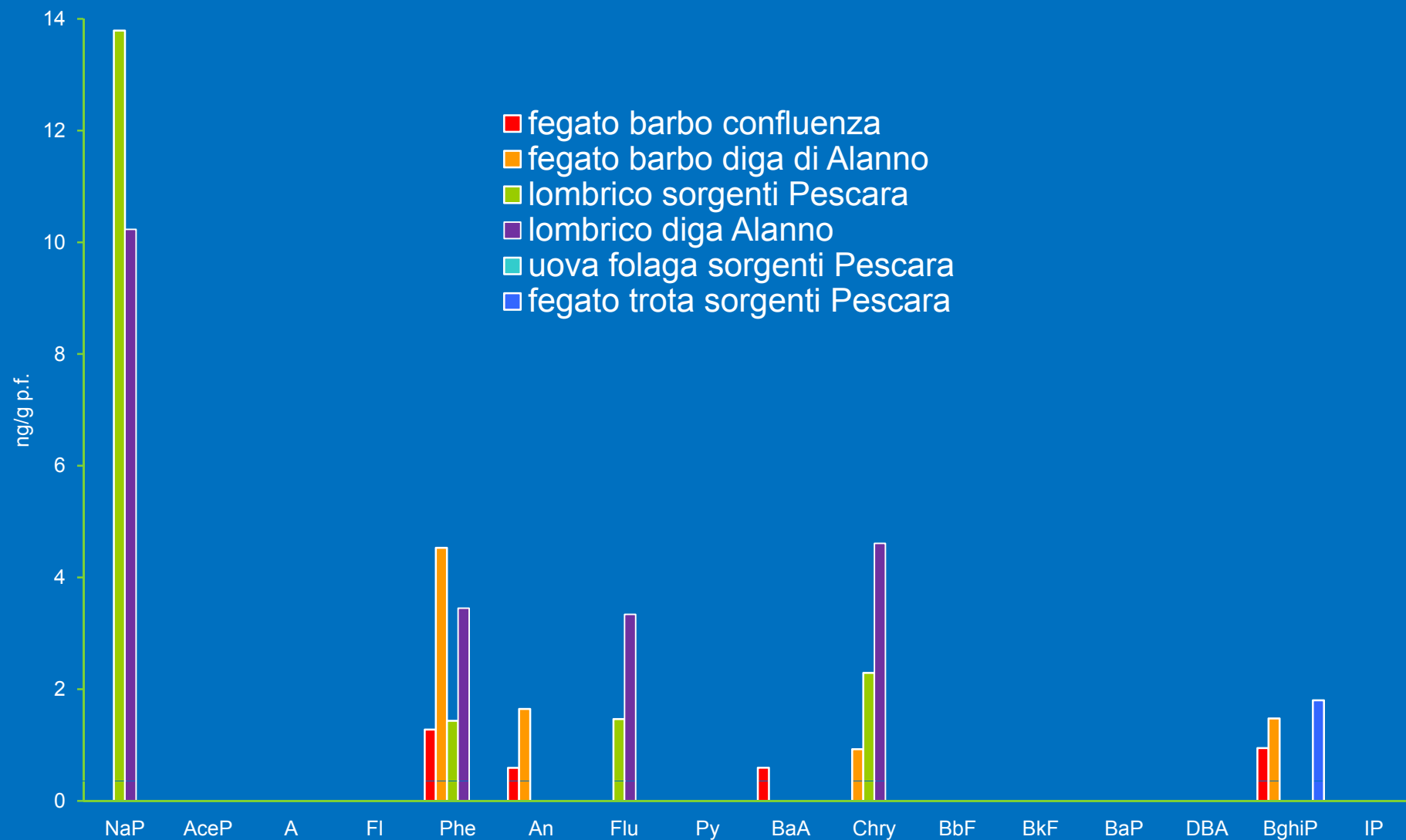


fegato barbo confluenza	39,42
fegato barbo diga Alanno	91,59
lombrico sorgente Pescara	1,27
lombrico diga Alanno	4,65
uova folaga sorgente Pescara	0,49
fegato trota sorgente Pescara	2,11

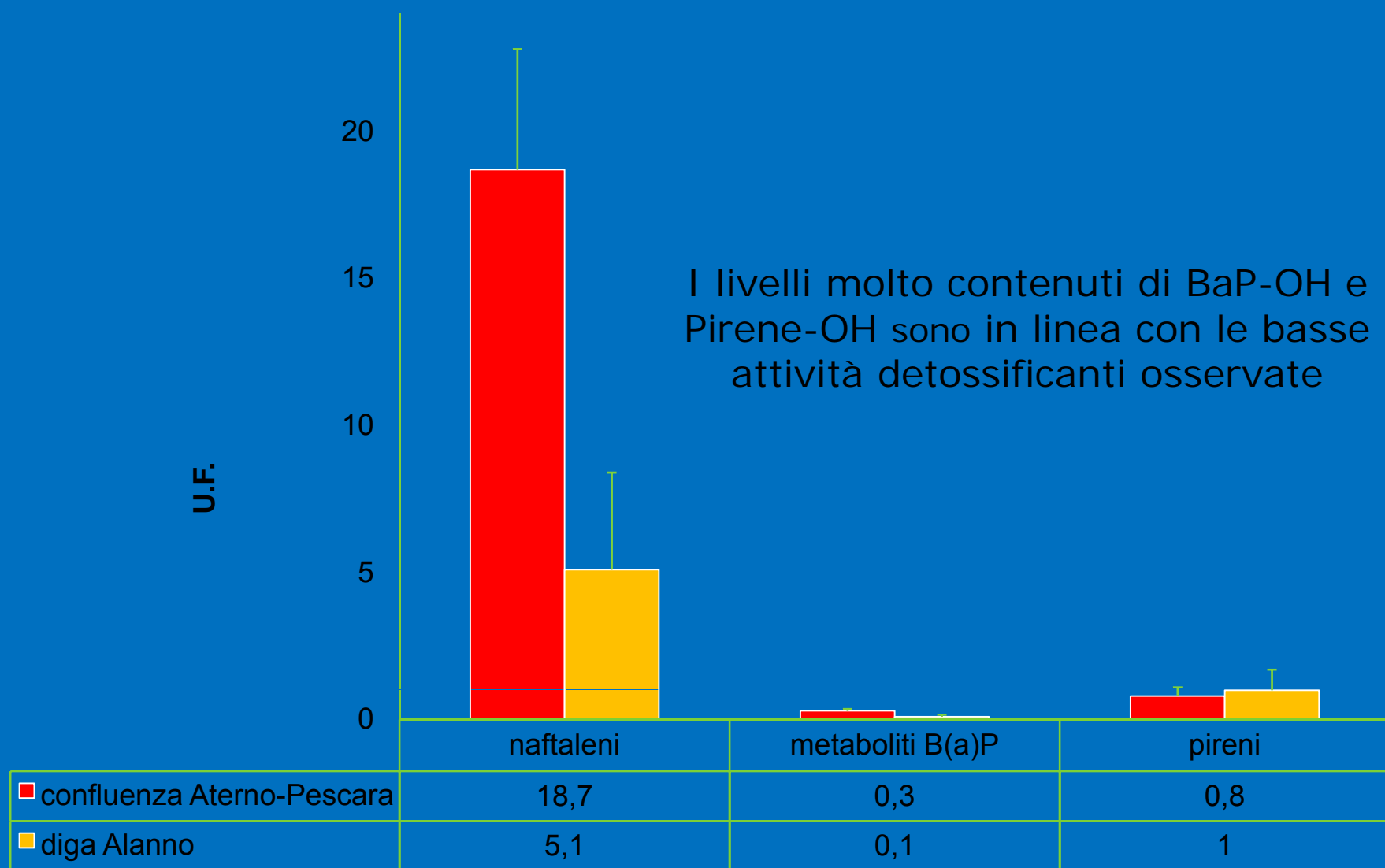
Risultati accumulo ΣIPA



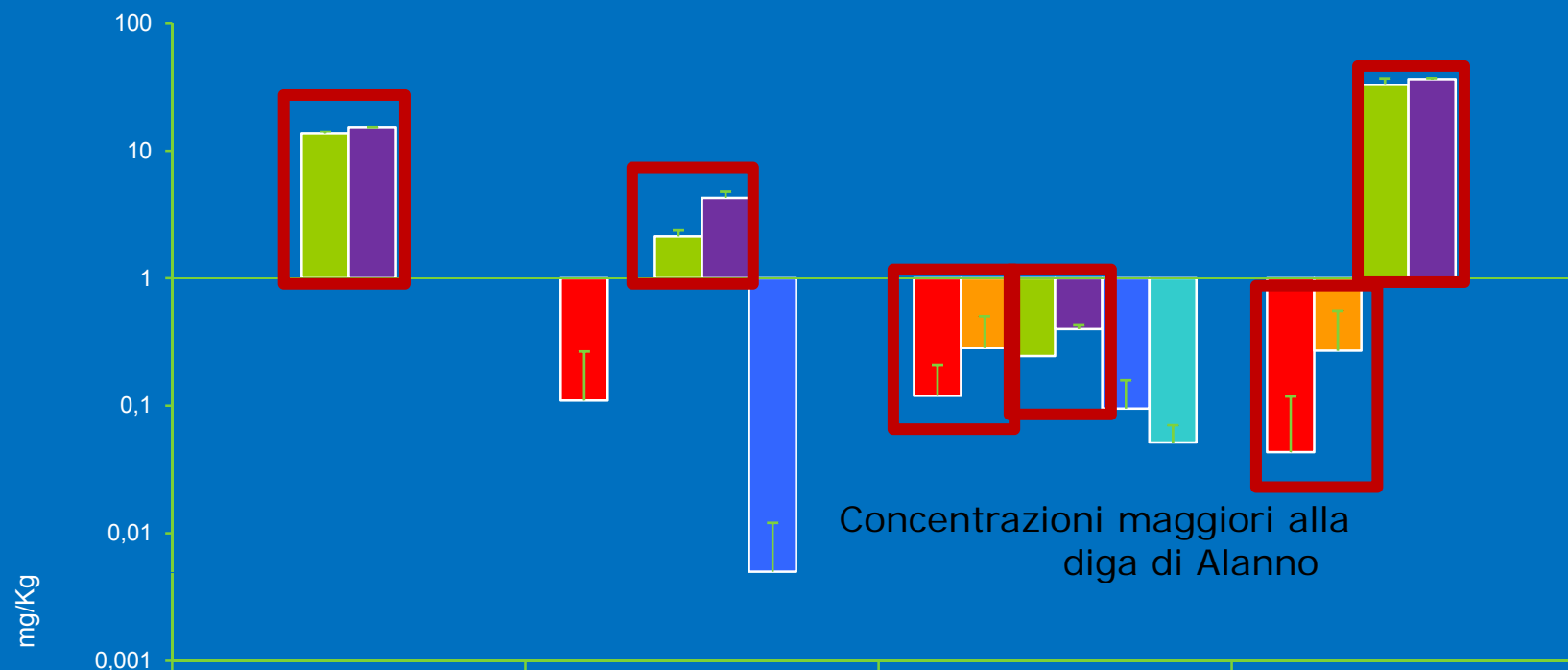
Risultati accumulo singoli IPA



Risultati metaboliti biliari IPA



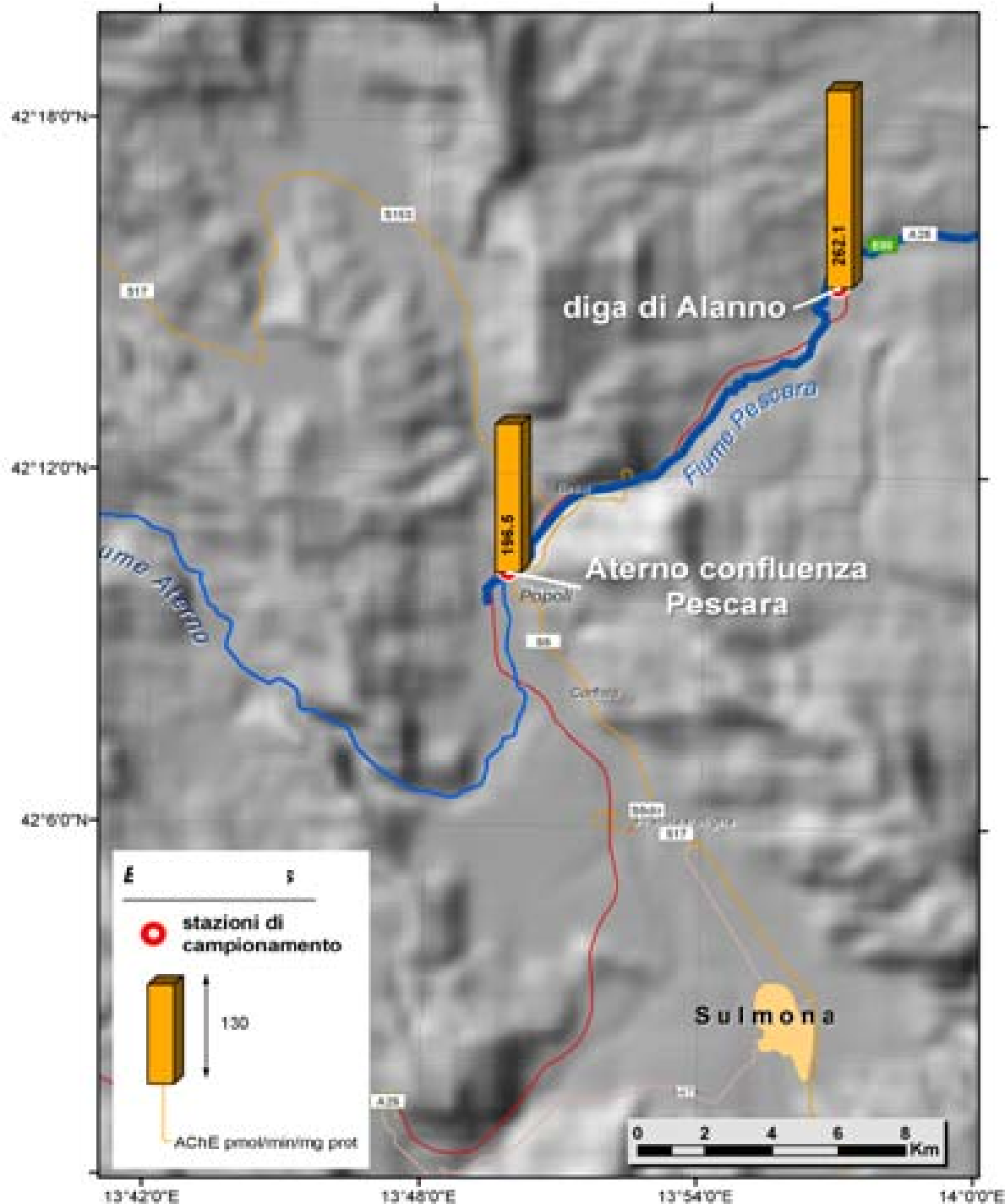
Risultati accumulo elementi in tracce



	As	Cd	Hg	Pb
fegato barbo confluenza		0,11	0,12	0,04
fegato barbo diga Alanno			0,28	0,27
lombrichi sorgenti Pescara	13,60	2,13	0,25	32,97
lombrico diga Alanno	15,36	4,29	0,40	36,45
fegato trota sorgenti Pescara		0,01	0,10	
uova folaga sorgenti Pescara			0,05	

Risultati Biomarker AChE

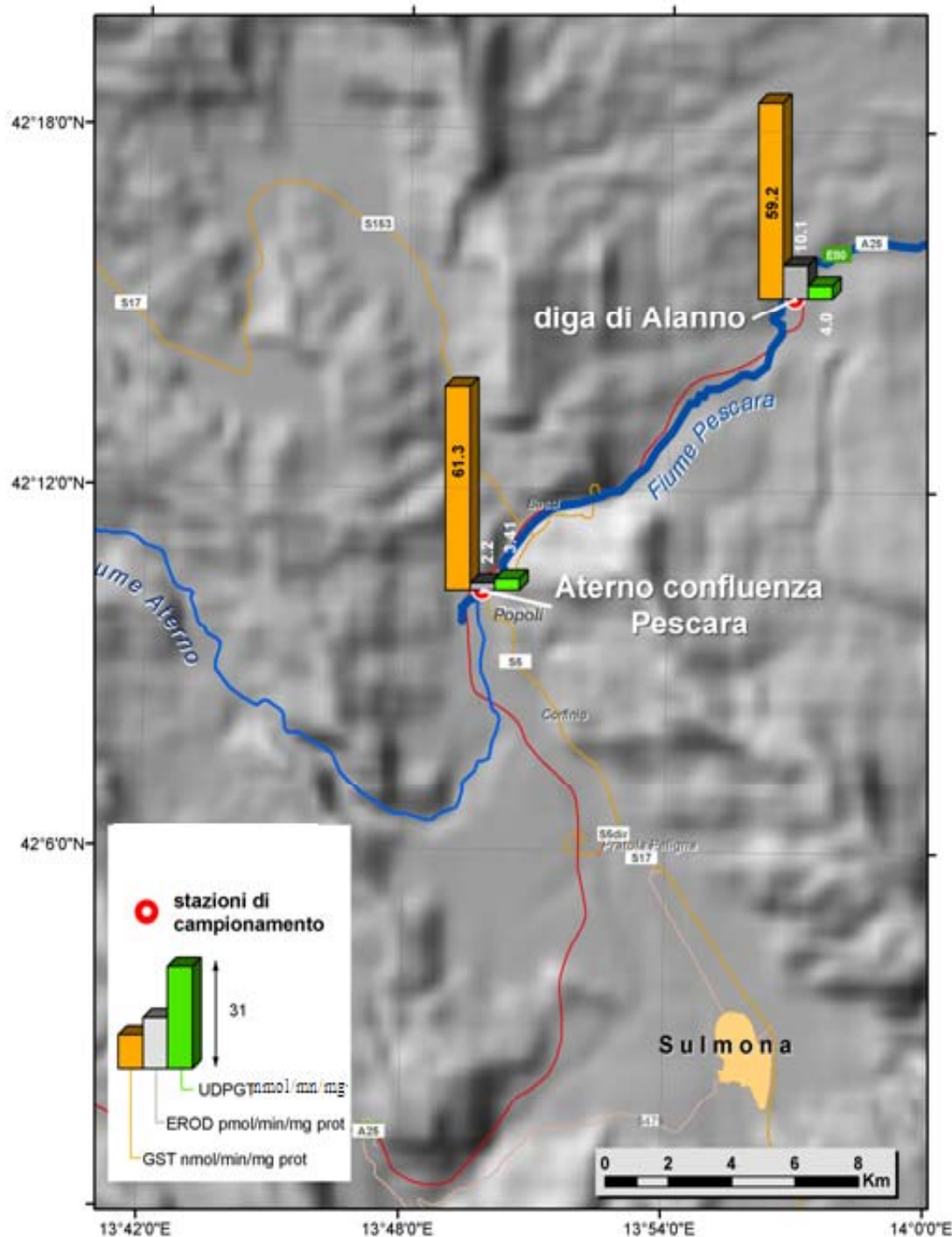
Il livello di AChE
nel barbo
escludono
l'esposizione a
concentrazioni
rilevanti di
composti
neurotossici



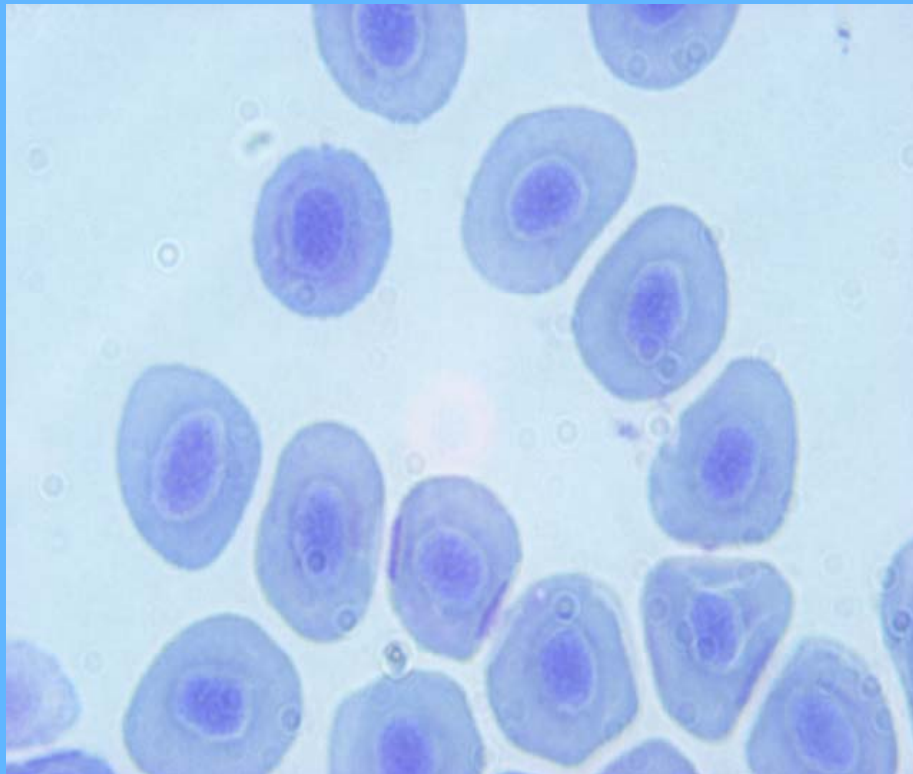
Risultati Biomarker UPDG, EROD, GST

Il livello di questi tre biomarker nel barbo sono molto bassi e non indicano criticità.

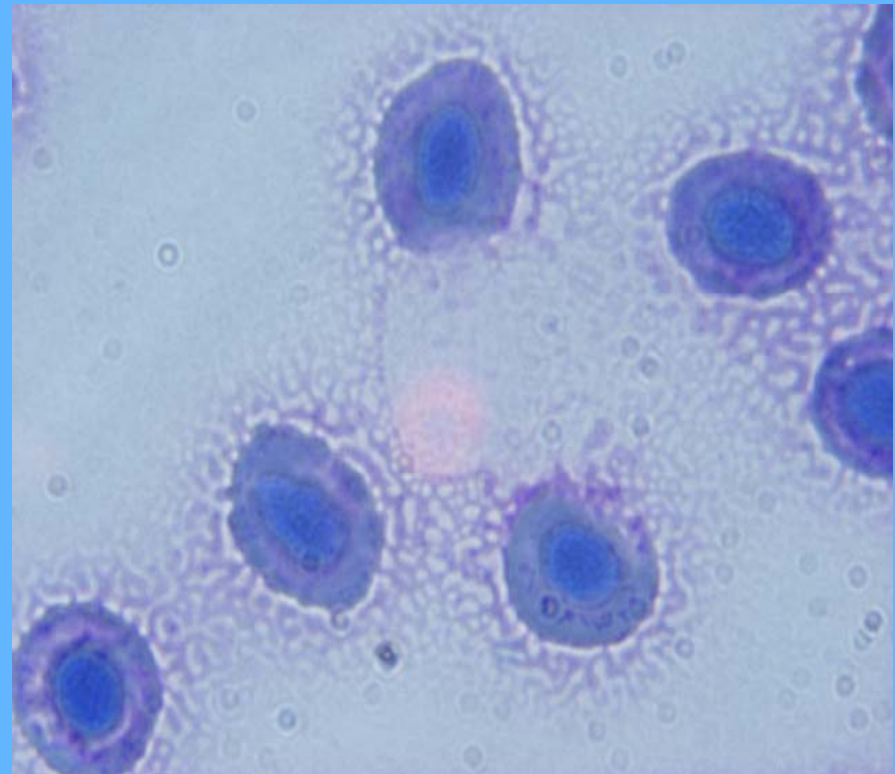
La EROD è più elevata alla diga di Alanno in accordo con i maggiori valori di IPA osservati.



Risultati micronuclei



Cellule di sangue di esemplari di *Barbus tyberinus* campionati alla Diga di Alanno



Cellule di sangue di esemplari di *Barbus tyberinus* campionati alla confluenza Aterno-Pescara

L'assenza di micronuclei esclude esposizioni rilevanti a sostanze genotossiche negli esemplari studiati.

Considerazioni conclusive

Pur nella limitatezza del piano sperimentale, questa parte di PREVIENI si configura come una sorta di “progetto pilota”, che ha fornito comunque un’importante indicazione circa la qualità dell’ambiente oggetto di questa indagine, validando la metodologia impiegata.

I risultati del biomonitoraggio mostrano come i livelli di contaminazione, siano molto bassi per la quasi totalità dei bioindicatori e dei contaminanti considerati.

I bassi livelli di accumulo di interferenti endocrini sono confermati dalle risposte enzimatiche, e non risultano in grado di disturbare il sistema ormonale e la riproduzione degli organismi che vivono in questi habitat.

Considerazioni conclusive

Le due aree scelte per studio sono aree umide protette dal WWF, poste lungo il corso del Fiume Pescara, in Abruzzo: la Riserva Naturale Regionale Sorgenti del Pescara e l'Oasi di Protezione della Fauna della Diga di Alanno.

Le Sorgenti del Pescara sono tra le più importanti sorgenti carsiche appenniniche; l'area ospita diverse risorgive nell'ambito di un Sito di Interesse Comunitario, facente parte della Rete Europea Natura 2000.

Questa indagine ci porta ad ipotizzare per queste zone e per le aree circostanti, almeno per quanto riguarda i contaminanti oggetto di studio, una ottima conservazione dell'ambiente naturale, che non mette a rischio la biodiversità nel suo complesso, uomo compreso.

Cristiana Guerranti¹, Emiliano L. Fanello¹, Guido Perra¹, Michela Mariottini¹, Costanza Burroni¹, Davide Baroni¹, Nicoletta Borghesi¹, Camilla Della Torre¹, Ilaria Corsi¹, Valerio Volpi¹, Francesca Borghini¹, Dante Caserta², Augusto De Sanctis², Silvano E. Focardi¹

**1- Dipartimento di Scienze Ambientali
"G.Sarfatti", Università degli Studi di Siena
2- WWF Sezione Abruzzo, Pescara**

GRAZIE PER L'ATTENZIONE

