

*Università degli studi di Napoli  
Federico II*

*Facoltà di Scienze Matematiche  
Fisiche e Naturali*



*Dottorato di ricerca in Biologia Avanzata  
XXII ciclo*

***Interferenza di estrogeni e xeno-estrogeni nel ciclo  
riproduttivo di un vertebrato terrestre***

***Tutor***

*Ch.ma Prof.ssa Ermelinda Limatola*

***Dottoranda:***

*Dott.ssa Mariaailaria Verderame*

***Coordinatore del dottorato:***

*Ch.mo Prof. Luciano Gaudio*

## *Indice*

<b><i>Introduzione</i></b>	<b>pag. 4</b>
Il ciclo riproduttivo del maschio di <i>Podarcis sicula</i>	pag. 5
Il ciclo riproduttivo della femmina di <i>Podarcis sicula</i>	pag. 8
<b><i>Capitolo 1</i></b>	
<b>I distruttori endocrini</b>	<b>pag. 10</b>
1.1 Classificazione dei distruttori endocrini	pag. 10
1.2 Impiego dei maggiori distruttori endocrini	pag. 12
1.3 Distribuzione di AP e sostanze estrogeno simili	pag. 15
1.4 Bioaccumulazione, bioconcentrazione e biomagnificazione	pag. 16
1.5 Modalità di esposizione	pag. 17
<b><i>Capitolo 2</i></b>	
<b>Il nonilfenolo</b>	<b>pag. 20</b>
2.1 Origine	pag. 22
2.2 Destino e insorgenza	pag. 23
<b><i>Capitolo 3</i></b>	
<b>Gli estrogeni e loro meccanismo d'azione: cenni di endocrinologia</b>	<b>pag. 25</b>
3.1 Estrogeni e ER nella femmina di mammifero	pag. 28
3.2 Estrogeni e ER durante la vitellogenesi nelle femmine dei vertebrati non mammiferi	pag. 29
3.3 Estrogeni e ER nel maschio	pag. 34
<b><i>Capitolo 4</i></b>	
<b>Estrogeni e NP come distruttori endocrini</b>	<b>pag. 39</b>
<b><i>Capitolo 5</i></b>	
<b>Scopo della ricerca</b>	<b>pag. 42</b>
<b><i>Capitolo 6</i></b>	
<b>Materiali e metodi</b>	<b>pag. 46</b>
6.1 Animali	pag. 46
6.2 Microscopia ottica	pag. 47
6.3 Immunocitochimica	pag. 48
6.4 SDS-PAGE	pag. 48
6.5 Western Blotting	pag. 49
6.6 ELISA	pag. 49
6.7 Studi biomolecolari	pag. 50
A- Isolamento cDNA ER $\alpha$ e ER $\beta$	pag. 50
B- Inserzione in vettore plasmidico	pag. 51
C- Trasformazione e crescita batterica	pag. 51

D- Estrazione di DNA plasmidico	pag. 52
E- Analisi d'espressione	pag. 52
F-Costruzione di sonda molecolare a cDNA	pag. 52
G-Ibridazione <i>in situ</i> (ISH)	pag. 52

***Capitolo 7***

**Risultati**

7.1 Vitellogenina come biomarker	pag. 55
7.2 Espressione dei recettori degli estrogeni	pag. 56
7.3 Alterazioni morfo-funzionali nel ciclo riproduttivo	pag. 57
7.4 Epididimo e ER $\alpha$	pag. 59

***Capitolo 8***

**Discussione**

**pag. 60**

***Bibliografia***

**pag. 70**

***Tavole***

**pag. 99**

## *Introduzione*

L'alterazione dell'omeostasi endocrina sta diventando una delle principali cause degli squilibri relativi ai cicli riproduttivi. A minacciare il delicato equilibrio endocrino sono stati evidenziati un gruppo di contaminanti dell'ambiente e degli alimenti che interferiscono con gli ormoni sessuali steroidei e chiamati per l'appunto distruttori endocrini (EDC).

I distruttori endocrini sono stati definiti dalla Commissione europea come “*sostanze esogene o miscele che alterano le funzioni del sistema endocrino e di conseguenza provocano effetti negativi per la salute di un organismo o della sua progenie*” (Amadasi et al., 2009). Possono quindi considerarsi potenziali bersagli degli EDC tutti quei tessuti/organi in cui siano presenti recettori specifici per gli ormoni steroidei.

Tra gli EDC, l'alchilfenolo nonilfenolo (NP) è il composto di maggiore utilizzo industriale adoperato principalmente in campo agricolo come diluente di pesticidi. L'allarme riguardo l'uso del NP nasce dal fatto che è persistente nei terreni e nei sedimenti ed essendo liposolubile ha una forte tendenza a bioaccumularsi. I maggiori studi, condotti essenzialmente sulla riproduzione dei maschi delle specie acquatiche e semiacquatiche, hanno identificato quale biomarker per inquinamento da xeno-estrogeni, la vitellogenina (VTG), una proteina epatica sintetizzata solo dalle femmine dei vertebrati ovipari e ovovivipari durante il periodo riproduttivo e che anche i maschi sono in grado di sintetizzare soltanto se sperimentalmente esposti ad estrogeni esogeni. Poco si conosce riguardo l'azione del NP sui vertebrati terrestri che possono essere esposti in natura all'azione dell'inquinante.

In tale ottica si inserisce il mio lavoro sperimentale che prende come modello proprio un vertebrato terrestre, la lucertola campestre *Podarcis sicula*, rettile oviparo con un noto ciclo riproduttivo annuale, che potrebbe essere naturalmente esposto ad un habitat inquinato.

### ***Il ciclo riproduttivo del maschio di Podarcis sicula***

Nei rettili si possono verificare due tipi di eventi spermatogenetici: la spermatogenesi continua (o aciclica) o stagionale (o ciclica) (Angelini e Picariello, 1975; Licht, 1984). La spermatogenesi continua è caratterizzata dalla produzione di cellule germinali durante tutta la vita di un adulto, in questo caso quindi, un accoppiamento fertile può avvenire continuamente durante tutto l'anno. Questa modalità di spermatogenesi è stata descritta per tutti quei rettili come agamidi, geconidi e iguanidi che abitano regioni tropicali, come le foreste pluviali del Borneo, dove le condizioni ambientali sono favorevoli nel corso dell'anno (Churc, 1962; Inger e Greenberg, 1966; Ficht, 1970). Invece molti rettili che vivono in regioni con marcate e prevedibili variazioni climatiche, come le regioni temperate e i deserti del Mediterraneo, si riproducono nel periodo più favorevole dell'anno, solitamente in primavera, mantenendo il loro apparato riproduttore quiescente durante il resto dell'anno. Pertanto nei maschi la spermatogenesi si verifica soltanto durante un ben preciso e breve periodo di tempo quando l'attività delle gonadi è stimolata da alcuni fattori ambientali quali il fotoperiodo e la temperatura.

*Podarcis sicula*, una lucertola che popola il centro e il sud Italia, si riproduce in primavera. Nelle lucertole il testicolo è formato di tubuli seminiferi abbondantemente anastomizzati e ramificati (Galgano e D'Amore, 1960). Il ciclo spermatogenetico è stato suddiviso in sei periodi (Galgano e D'Amore 1953):

*Un primo periodo di stasi* (estiva: fine giugno fino ai primi o la metà di agosto): durante il quale i testicoli sono piccolissimi e presentano nei tubuli seminiferi soltanto spermatogoni I.

*Un periodo di ripresa lieve* (fine dell'estate fino a ottobre / novembre): la ripresa della spermatogenesi è dapprima stentata, con degenerazioni fra le cellule germinali in meiosi e fra gli spermatozoi II. La ripresa regolare comincia verso la fine di agosto e può giungere fino ai primi pachiteni o fino ai primi spermatidi rotondi. In seguito si formano alcuni spermatozoi che non vengono rilasciati né nel lume del tubulo, né nei dotti, né nell'epididimo. Questa lieve

ripresa è da riferirsi al ricordo di un doppio periodo di attività riproduttiva, normalmente presente nelle specie di lacertidi che vivono in climi sub tropicali temperati e che alle nostre latitudini si sono adattati ad un unico periodo (Angelini e Ghiara, 1984).

*Un secondo periodo di stasi* (invernale: dai primi di novembre alla fine di febbraio al principio di marzo). Durante questo periodo il testicolo presenta tutti gli stadi della spermatogenesi, fino ad un modesto numero di spermatozoi di cui ben pochi liberi nel lume dei tubuli.

*Un periodo di ripresa definitiva* (primi di marzo): la spermatogenesi si riattiva e diventa via via più intensa raggiungendo il culmine in maggio; fortissima diventa la produzione di spermatozoi, e di essi un numero sempre maggiore si trova libero nel lume dei tubuli. A marzo/aprile si trovano degenerazioni soprattutto tra gli spermatozoi, che erano stati formati in autunno, o che hanno preso origine da spermatociti già presenti in inverno.

*Un periodo di massima attività* (da aprile fino ai primi di giugno): durante questo periodo la spermatogenesi è attivissima con produzione di molti spermatozoi.

*Un periodo di attività decrescente* (fino agli ultimi giorni di luglio): durante il quale l'attività spermatogenetica diminuisce in modo quasi brusco. Si verifica una specie di crisi che sorprende il testicolo colmo di cellule germinali a tutti gli stadi. In tal modo degenerano e cadono in disfacimento tutti o quasi gli spermatozoi II, gli spermatozoi e gli spermatozoi e perfino qualche raro spermatozoi I; queste cellule sono riassorbite in posto o sono evacuate in degenerazione. Gli spermatozoi sono evacuati. Il testicolo va diminuendo rapidamente di volume.

L'epididimo consiste di una serie di tubuli che formano un condotto per gli spermatozoi i quali passano dai duttuli efferenti ai vasi deferenti. L'epididimo è anatomicamente diviso in tre parti: la testa, una stretta porzione centrale definita corpo e la coda.

L'epididimo della lucertola *Podarcis* presenta un periodo di stasi (agosto/ottobre) durante il quale è completamente regredito. Questo periodo comincia oltre un mese dopo il testicolo e continua invece anche quando la spermatogenesi ha ripreso la sua attività. Le cellule ghiandolari del canale

dell'epididimo sono piccole, basse, con un unico nucleo situato alla base del citoplasma. Il lume dell'epididimo appare quasi assolutamente vuoto.

Durante la seconda metà di ottobre si nota una lieve ripresa che interessa però quasi esclusivamente i tubuli efferenti che è parallela alla lieve ripresa testicolare già descritta.

Da novembre a febbraio l'epididimo subisce un nuovo periodo di stasi, rimanendo nelle condizioni raggiunte alla fine di ottobre.

La ripresa definitiva dello sviluppo dell'epididimo comincia dalla fine di febbraio o dai primi di marzo. In marzo col riattivarsi della spermatogenesi, nei lumi del canale dell'epididimo si incomincia a trovare da un piccolo a un buon numero di spermatozoi. Alla fine di marzo, l'epididimo è ancora più sviluppato: le cellule ghiandolari sono divenute alquanto alte e contengono una quantità maggiore di granuli di secreto invacuolati.

Ai primi di aprile l'epididimo è pienamente funzionante: il canale dell'epididimo ha diametro molto grande e lume ampio pieno di spermatozoi e di granuli di secreto. Le cellule ghiandolari secernono in tutto l'epididimo. Nella parte più craniale le cellule ghiandolari sono altissime. Frequenti sono le cellule binucleate. Le cellule secernenti caudali si presentano basse con grossi granuli di secreto. Alla fine di aprile l'epididimo raggiunge il massimo dello sviluppo.

Durante il periodo di massima attività (fine marzo/primi luglio) l'epididimo è pienamente funzionante e del tutto sviluppato. Il lume del canale è pieno di spermatozoi e di granuli di secreto.

Il periodo di attività decrescente dell'epididimo comincia circa dai primi di luglio e dura circa fino alla metà di agosto. Il lume del canale dell'epididimo è ampio. Le cellule ghiandolari presentano ancora una notevole attività secretoria e spesso due nuclei. Nelle cellule binucleate i due nuclei sembrano rifondersi insieme in un unico nucleo.

Dal confronto del ciclo dell'epididimo con quello spermatogenetico, risulta chiaramente che si ha coincidenza solo per tre periodi (di stasi invernale, di ripresa definitiva e di massima attività) mentre per gli altri tre si verifica uno sfasamento parziale o totale (Galgano D'Amore, 1960).

Padoa ha dimostrato per primo che nei Rettili l'epididimo rappresenta un carattere sessuale secondario dipendente dalla secrezione interna del testicolo. Infatti la castrazione totale produce dopo 50-60 giorni una fortissima involuzione del canale dell'epididimo, maggiore che negli animali intatti durante l'inverno.

La forte riduzione del canale dell'epididimo è dunque da attribuire a una forte diminuzione delle secrezioni interne testicolari. Poiché l'epididimo presenta la massima riduzione circa da metà agosto a metà ottobre (I periodo di stasi estiva), risulta pure evidente che l'ormone maschile è prodotto in minima quantità durante questo periodo, malgrado l'attività spermatogenetica sia in ripresa.

Il periodo di massima attività dell'epididimo corrisponde al periodo degli amori e alla massima attività spermatogenetica, la produzione di ormone maschile deve essere pure al suo massimo [la produzione massima di testosterone è di 174,8 ng/ml (Andò et al., 1990)]. Poiché l'epididimo comincia a dar segni di attività nella seconda metà d'ottobre (periodo di ripresa lieve), la produzione di ormone testicolare deve ricominciare ad aumentare circa dalla metà di tale mese.

### ***Il ciclo riproduttivo della femmina di Podarcis sicula***

La femmina della lucertola *Podarcis sicula* depone le uova in 3 o 4 ondate ovulatorie, tra maggio e luglio. L'accrescimento ovocitario è stato diviso in due fasi: una fase lenta che va da agosto a marzo durante la quale gli ovociti crescono da circa 100 $\mu$ m a 2000 $\mu$ m di diametro e una fase rapida che copre un arco di tempo di 20-30 giorni in cui tre o quattro ovociti per ovario destinati all'ovulazione accumulano al loro interno grosse quantità di vitello raggiungendo anche un diametro di circa 9000 $\mu$ m (Ghiara et al., 1968-70; Filosa, 1973).

In relazione al diametro dell'ovocita in accrescimento e alla struttura dell'epitelio follicolare gli ovociti sono stati divisi in cinque classi (Filosa, 1973): gli ovociti previtellogenicici sono raggruppati nelle prime tre classi (A, B e C) ed

hanno un diametro compreso tra 100 e 1000 $\mu\text{m}$  di diametro, la quarta classe (D) comprende gli ovociti di 1000-2000 $\mu\text{m}$  ed infine la classe che comprende gli ovociti vitellati (E) raggruppa follicoli che raggiungono dimensioni di 6-9000 $\mu\text{m}$ .

Durante il periodo riproduttivo nell'ovario sono presenti sia ovociti piccoli bianchi previtellogeni sia ovociti di grosso diametro gialli destinati all'ovulazione (Filosa, 1973; Romano e Limatola, 2000).

I follicoli ovarici si differenziano, oltre che per le dimensioni, anche per lo spessore dell'epitelio follicolare che, parallelamente all'accrescimento ovocitario, subisce un tipico differenziamento: da monostratificato ed omomorfo negli ovociti più piccoli (40-100 $\mu\text{m}$  di diametro) diventa pluristratificato e polimorfo negli ovociti più grandi (500-1000 $\mu\text{m}$  di diametro) per la comparsa di cellule piriformi che sono in continuità con il citoplasma dell'ovocita mediante un ponte attraverso il quale passano nell'ovocita materiali di riserva (Taddei 1972; Andreuccetti et al., 1978). Tali cellule progressivamente scompaiono nei follicoli di circa 1000-2000 $\mu\text{m}$  per cui gli ovociti vitellati presentano un epitelio che torna ad essere monostratificato ed omomorfo (Andreuccetti et al., 1978; Limatola e Filosa, 1989).

## **Capitolo 1**

### *I distruttori endocrini*

Secondo la definizione adottata dalla Unione Europea “un Interferente Endocrino è una sostanza esogena, o una miscela, che altera la funzionalità del sistema endocrino, causando effetti avversi sulla salute di un organismo, oppure della sua progenie”.

I distruttori endocrini hanno carattere lipofilo e questo permette loro di diffondere attraverso la membrana cellulare e di legare eventualmente i recettori per gli ormoni steroidei. Essendo liposolubili inoltre, sono in grado di depositarsi nel tessuto adiposo e il loro bioaccumulo ha una notevole importanza dal punto di vista tossicologico anche se bisogna considerare che tale fenomeno non è riconducibile solo all'inquinamento ambientale ma può verificarsi anche attraverso la via alimentare (Daland, 1999).

Le valutazioni di diverse agenzie internazionali indicano che gli Interferenti Endocrini sono un ampio, eterogeneo e tuttora non ben conosciuto gruppo di sostanze che spazia da contaminanti ambientali persistenti a composti utilizzati come fitosanitari od antiparassitari a composti utilizzati in prodotti industriali e di consumo ed infine a composti naturali come i fitoestrogeni. Pertanto la valutazione dei possibili rischi associati all'esposizione ad Interferenti Endocrini riguarda diversi ambiti che vanno dall'ambiente, all'alimentazione, agli stili di vita.

#### ***Classificazione dei distruttori endocrini***

Svariati sono i composti in grado di interferire con il sistema endocrino e ciò non ne facilita la classificazione, in linea di massima è possibile però raggrupparli in cinque categorie principali:

a) **Farmaci o estrogeni sintetici** (come ad esempio il 17- $\beta$ estradiolo o l'estrogeno sintetico dietilstilbestrolo).

b) **Fitoestrogeni:**

➤ isoflavonoidi;

- cumestani;
- lignani;
- stilbeni.

c) **Pesticidi:**

- organofosforici;
- carbammati;
- ditiocarbammati;
- piretroidi sintetici;
- organoclorurati;
- fenossiacetici;
- erbicidi del gruppo dell'ammonio quaternario.

d) **Plastificanti** (in particolare, gli ftalati) e prodotti derivanti dalla combustione del PVC (policloruro di vinile) ma anche della carta e delle sostanze putrescibili come le diossine.

e) **Sostanze di origine industriale:**

- fenoli;
- ritardanti di fiamma;
- acido perfluorooctanico e suoi sali;
- alcuni metalli pesanti (piombo, cadmio e mercurio).

Sono stati dimostrati effetti estrogeno-simili (sia *in vivo* che *in vitro*) anche per alcune sostanze naturali (incluse alcune micotossine), potenzialmente presenti in diverse componenti della dieta (Jobling et al., 1995).

Un altro modo di classificare queste sostanze prende spunto dalla loro origine.

Si distinguono pertanto composti di origine:

- ✓ naturale (fitoestrogeni ed estrogeni),
- ✓ sintetica, ulteriormente suddivisibili in:
  - a. estrogeni sintetici, a loro volta distinti in:
    - farmaceutici (dietilstilbestrolo);
    - industriali tra cui: pesticidi, conservanti, solventi e plasticizzanti;
  - b. antiestrogeni sintetici, a loro volta suddivisi in:
    - farmaceutici (tamoxifen);
    - industriali (diossine).

## ***1.1 Impiego dei maggiori distruttori endocrini***

### **Farmaci**

In questa categoria si possono annoverare gli estrogeni di sintesi come il dietilstilbestrolo (DES), con una struttura, che pur non essendo steroidea, mima quella degli estrogeni naturali. È stato ampiamente usato dagli anni 40 agli anni 70 negli Stati Uniti per prevenire gli aborti in quanto è in grado di stimolare la sintesi di estrogeni e progesterone nella placenta; è usato come estrogeno per la terapia sostitutiva in menopausa, per sopprimere la lattazione e per prevenire il cancro alla prostata. Oggi è ormai assodato che il DES predispone ad una serie di tumori ginecologici che vanno dal carcinoma della vagina a quello dell'endometrio e non è quindi più utilizzato (Gill et al., 1979; Giusti et al., 1995).

### **Fitoestrogeni**

Viene classificata come fitoestrogeno qualsiasi molecola non steroidea (fenoli eterociclici) prodotta nel mondo vegetale che si lega al recettore degli estrogeni, ma con una capacità di attivazione mille volte inferiore (Kuiper et al., 1998). Elevate concentrazioni si riscontrano nella soia e, in quantità inferiori, in molti tipi di frutta, verdura e cereali integrali (Reinli e Block, 1996). A questa categoria appartengono gli isoflavoni che sono i più attivi e particolarmente rappresentati nella soia e in altre leguminose come lenticchie, fagioli, fave, ceci e nei cereali integrali come grano, riso, orzo, segale e avena. Gli isoflavoni possono avere sia azione estrogenica che anti-estrogenica modulando cioè insufficienze o eccessi di estrogeni endogeni. Sono infatti utilizzati sia quando i livelli di estrogeni endogeni sono bassi compensandone la funzione stimolando, anche se debolmente, i recettori specifici, e sia quando gli estrogeni endogeni sono alti in quanto, competendo con i recettori di questi ultimi, li sottraggono ad una energica stimolazione (essendo dotati di una capacità di stimolazione mille volte inferiore agli estrogeni endogeni) (Kuiper et al., 1998). I fitoestrogeni inoltre, svolgono la loro attività anti-estrogenica interferendo anche con il metabolismo degli estrogeni endogeni mediante l'inibizione dell'aromatasi e

aumento della sintesi della SHBG (Sex Hormon Binding Globulin) con riduzione della quota libera di estradiolo (Loukovaara et al.,1995).

### **Pesticidi**

I pesticidi occupano una posizione molto particolare fra le numerose sostanze chimiche cui l'uomo è esposto, poiché vengono deliberatamente sparse nell'ambiente con l'intento di eliminare alcune forme di vita. Ciò fa sì che essi divengano un rischio per la salute umana e per l'ambiente soprattutto in quei paesi laddove i controlli e le attività di sorveglianza non sono molto sviluppati. A differenza di altre sostanze chimiche, l'esposizione ai pesticidi interessa un vasto numero di persone, non soltanto i lavoratori esposti, poiché si possono trovare sia nell'acqua che nel cibo. Tra i pesticidi più noti che interagiscono con il sistema ormonale si ricordano il Methoxychlor e l'Atrazina. Il Methoxychlor è un idrocarburo clorurato usato correntemente negli Stati Uniti come pesticida di rimpiazzo del DDT che ha mostrato deboli proprietà estrogeniche. L'Atrazina, utilizzata per il controllo delle erbe infestanti quando assunta con la dieta, aumenta il rischio di sviluppare il carcinoma della mammella.

### **Ftalati**

I composti clororganici sono tra le sostanze maggiormente persistenti nell'ambiente. Esse possono conservarsi senza degradarsi ed accumularsi negli organismi viventi. Un ottimo esempio è rappresentato dal policloruro di vinile (PVC), un prodotto di consumo ritrovabile negli oggetti usati quotidianamente come imballaggi alimentari, giocattoli e cavi. Un gran numero di esteri di ftalati usati nella produzione del PVC hanno mostrato una debole attività estrogenica *in vitro*, suggerendo come essi possono rappresentare una minaccia per la salute riproduttiva umana. Alcuni ftalati sembrano esercitare un'azione che altera il funzionamento delle ghiandole endocrine ed influenzare gli ormoni androgeni attraverso altre vie che non siano quelle di legarsi ai loro recettori. Molti degli ftalati studiati mostrano di poter ridurre l'affinità di legame del  $17\beta$ -estradiolo al suo recettore; tra questi si ritrovano il Butil-Benzil-Ftalato, il benzofenone, il 4-nitrotoluene, capaci anche di indurre la proliferazione in cellule dotate di recettore estrogenico.

## Fenoli

I fenoli sono composti organici che presentano un gruppo ossidrilico direttamente legato a un anello aromatico. In natura sono molto diffusi e servono come intermedi nella sintesi industriale di prodotti che vanno dai collant agli antisettici. Il primo studio che ha dimostrato che alcuni composti fenolici producevano conseguenze estrogeniche è stato pubblicato nel 1936 (Dodds et al., 1936). Tra i fenoli esplicano attività estrogenica in particolare gli alchilfenoli (AP) che sono composti fenolici con catene alchiliche di varia lunghezza. Gli AP sono sostanze chimiche non alogenate usate quasi esclusivamente per produrre gli alchilfenoli etossilati (APE), un gruppo di tensioattivi non ionici. Quest'ultimi sono ottenuti per condensazione dell'ossido di etilene o di propilene con un alchilfenolo (come ad esempio i nonilfenoli) e presentano ottime proprietà emulsionanti e detergenti, impiegati anche come disperdenti nella formulazione di pesticidi ad uso agricolo e domestico e come emulsionante in diversi prodotti per l'igiene e di uso personale (Naylor, 1995; Tyl et al., 1999). Una volta rilasciati nell'ambiente, gli APE possono essere nuovamente degradati in AP, caratterizzati nell'essere più tossici e meno biodegradabili dei composti da cui originano. Gli alchilfenoli etossilati eliminati negli scarichi industriali e urbani giungono negli impianti di depurazione dove vengono anche in parte degradati dal metabolismo microbico. Il metabolismo microbico è caratterizzato da una degradazione biotica alla catena etossilata; questi gruppi vengono progressivamente rimossi, con la produzione di prodotti terminali quali gli alchilfenoli (Stephanou, 1982; Giger et al., 1984). Gli alchilfenoli, essendo caratterizzati da buone proprietà antiossidanti, vengono impiegati anche nella produzione delle plastiche trasparenti utilizzate nell'industria alimentare, al fine di ritardare l'ingiallimento o l'opacamento pertanto, le bevande e gli alimenti che ne vengono a contatto possono risultare contaminati (Inoue et al., 2001).

Due composti fenolici ampiamente usati, il bisfenolo A (BPA) e il nonilfenolo (NP), si ritengono sempre più responsabili della disfunzione delle ghiandole endocrine. Nel dicembre 2003, l'Unione Europea, considerando il BPA contenuto nelle rifiniture di plastica dei cibi in scatola, ne ha ridotto la

quantità e ha proposto un uso moderato di NP e rispettivi etossilati (NPE) nella lavorazione tessile, della carta, dei metalli e prodotti per la cura personale (EEC, 2003).

### **1.3 Distribuzione di AP e sostanze estrogeno simili**

Gli AP sono composti idrofobici (Ahel et al., 1993) e sono caratterizzati da un'elevata persistenza ambientale (Brunner et al., 1988; Nimrod et al., 1996). Vengono considerati contaminanti ubiquitari dell'ambiente acquatico dove tendono in particolar modo ad associarsi ai sedimenti (Jobling e Sumpter, 1993). NP e NPE sono stati riscontrati in acque dolci e marine superficiali e sotterranee e in acque degli affluenti ed effluenti degli scarichi fognari. Per esempio, in diversi organismi di acqua dolce che popolano la Glatt Valley in Svizzera, sono state riscontrate differenti concentrazioni di NP, nonilfenolo monoetossilato (NP1EO) e nonilfenolo dietossilato (NP2EO). La maggiore concentrazione è stata riscontrata in alcune alghe macrofite come *Cladofora* mentre la minore concentrazione osservata nei pesci, indica il mancato avvento del processo di biomagnificazione (Ahel et al., 2003).

Molti sono gli studi che evidenziano diverse alterazioni del sistema riproduttivo e endocrino negli alligatori che vivono nel lago Apopka, al centro della Florida (USA) (Guillette et al., 1994; Guillette et al., 1999 a,b; Guillette et al., 2003). Alte concentrazioni di steroidi naturali (E1 e E3) e xeno-estrogeni (NP e OP) sono state ritrovate anche in Italia nelle acque del fiume Lambro, un affluente del Po (Viganò et al., 2006). Una significativa contaminazione da sostanze ormono-simili è stata inoltre saggiata utilizzando una linea ricombinante di lievito *Saccharomyces cerevisiae* (RMY326 ERERE) transfettata con il recettore estrogenico umano  $\alpha$ , in acque marine costiere provenienti dalla costa del Mar Tirreno Settentrionale tra il Golfo di La Spezia e la città di Livorno (isola Palmaria, all'interno di un impianto di allevamento off-shore di mitili; estuario del fiume Magra, a valle di un rimessaggio per nautica diporto; porto di Viareggio, in un'area di cantieristica navale; estuario del fiume Arno, in prossimità di un Parco Naturale regionale; porto industriale e commerciale di

Livorno, vicino ad industrie petrolchimiche) e in estratti di organismi marini edibili (Pinto et al., 2005).

#### **1.4 Bioaccumulazione, bioconcentrazione e biomagnificazione**

La bioaccumulazione di un inquinante è influenzata da numerosi fattori, sia estrinseci che intrinseci ad un organismo. Sia gli organismi appartenenti alla catena alimentare terrestre (Leita et al., 1991; Mclachlan, 1996) che a quella acquatica (Ekelund et al., 1990; Ahel; 1993), possono accumulare inquinanti. Nonostante ciò, la maggior parte degli studi sono focalizzati sulla catena alimentare acquatica. Ci sono almeno due motivi che spingono gli studiosi a enfatizzare questo aspetto. Per prima cosa, come notato da Clarkson (1995), si ha uno scarso controllo sui contaminanti che entrano nel sistema acquatico. In secondo luogo, le catene alimentari acquatiche sono generalmente più lunghe e molto più complesse di quelle terrestri. Per questo motivo la concentrazione di inquinante nei predatori al vertice risulta molte migliaia (o milioni, Colborn et al., 1993) di volte maggiore rispetto alla concentrazione nell'acqua o nei sedimenti. Pertanto, mentre la concentrazione di inquinante nell'acqua può essere inferiore al limite di rilevazione attualmente in uso, nei predatori al vertice della catena alimentare si possono riscontrare gravi danni o morte (Facemire et al., 1995; White e Hoffman, 1995; Henny et al., 1996).

Clarkson ha esposto tre speciali proprietà per il verificarsi di un significativo bioaccumulo (i.e. biomagnificazione). L'inquinante deve: a) essere lipofilo, b) essere chimicamente e metabolicamente stabile in acqua e negli organismi della catena alimentare rispettivamente, c) avere relativamente bassa tossicità negli organismi della fascia bassa della catena alimentare per consentire l'accumulo nei predatori al vertice.

La fauna ittica sembra maggiormente sensibile agli effetti negativi sulle ghiandole endocrine dovuti a NP (Jobling et al., 1996) e BPA (Sohoni et al., 2001). L'esposizione ad uno di questi agenti, può infatti indurre negli esemplari di sesso maschile la produzione di vitellogenina, una proteina regolata dagli estrogeni prodotta dalle femmine di vertebrati ovipari durante il periodo riproduttivo e, normalmente assente nei maschi o nelle femmine immature.

### **1.5 Modalità di esposizione**

I principali fattori abiotici che aumentano il processi di degradazione degli EDC sono le elevate temperature, l'aumento della luce del sole e le condizioni aerobiche, per cui la velocità di degradazione dovrebbe essere più veloce nelle zone calde. Altri processi (come reazioni di idrolisi, di ossidazione ecc.) possono trasformare i chimici nell'ambiente. In contrasto molti EDC non si degradano rapidamente nell'ambiente e possono accumularsi in diversi compartimenti (come i sedimenti) o essere trasportati a lunga distanza dalla loro sorgente originale. L'esposizione può avvenire attraverso l'aria, l'acqua, il suolo, i sedimenti, gli alimenti e i prodotti di consumo. Le sostanze possono quindi immettersi nell'organismo attraverso l'ingestione, l'inalazione o il contatto con la pelle (anche attraverso le branchie) e attraversare le membrane cellulari (Crosby, 1998).

**Aria:** la concentrazione di eventuali sostanze chimiche nell'aria dipende dalla loro volatilità quando sono a contatto con l'acqua, la vegetazione e il suolo. Le condizioni meteorologiche (temperatura, velocità del vento, umidità) ne influenzeranno quindi la concentrazione (International Program on Chemical Safety).

**Acqua:** è sia il mezzo che circonda un gran numero di specie acquatiche (come pesci e invertebrati acquatici) che consumata dagli esseri umani e dalle specie terrestri. Un gran varietà di pesticidi, prodotti chimici industriali e ormoni naturali sono stati rilevati nelle acque di superficie. Le sostanze chimiche possono essere disciolte in acqua e/o legate al particolato. Nelle specie acquatiche l'assorbimento può avvenire attraverso il contatto diretto attraverso le branchie e attraverso l'alimentazione. La bioconcentrazione di composti organici semipersistenti e persistenti dipende dall'equilibrio tra i lipidi del corpo e l'ambiente acquatico, dove la superficie delle branchie gioca un ruolo fondamentale (MacKay e Fraser, 2000). È stato dimostrato che pesci e/o cozze accumulano NPs (Wahlberg et al., 1990; Larsson et al., 1999; Lye et al., 1999), fenoli alogenati (Asplund et al., 1999), e etinil-estradiolo (Larsson et al., 1999).

L'acqua potabile è una potenziale fonte di esposizione umana agli EDC anche se non è la via di esposizione più importante infatti nei paesi sviluppati l'acqua potabile è generalmente trattata per eliminare le contaminazioni microbiche. In alcuni casi, altre contaminazioni chimiche vengono introdotte nel processo di trattamento delle acque (IPCS, 1999). Nei paesi in via di sviluppo, l'acqua da bere non è generalmente trattata, ed è spesso contaminata da prodotti chimici. Pertanto sono disponibili modelli per calcolare la dose di contaminanti assorbita dall'acqua (IPCS, 2000).

**Suolo:** un gran numero di EDC sono stati riscontrati nel suolo e/o nei fanghi di depurazione in differenti parti del mondo (Lega et al., 1997; Hale, 2001; Kocan et al., 2001; Stevens et al., 2001). Per alcune specie di fauna selvatica (ad esempio, vermi, lumache, insetti) che vivono in stretto contatto con il suolo, questa può essere un importante via di esposizione. Questi organismi sono una parte della catena alimentare di alcuni uccelli e animali terrestri, gli animali da fattoria possono quindi essere esposti al suolo contaminato attraverso il pascolo e contribuire in tal modo all'esposizione umana attraverso la catena alimentare.

**Sedimenti:** possono essere una via di esposizione per talune specie di fauna selvatica che vivono in stretto contatto con o nei sedimenti per tutto o parte del loro ciclo vitale. Sono disponibili diversi dati riguardo PCDDs/PCDFs, PCBs, e alcuni ritardanti di fiamma nei sedimenti di estuari europei (van Zeil, 1997; Sellström et al., 1999; Olsson et al., 2000). Anche sostanze chimiche meno persistenti come gli alchilfenoli etossilati e NP sono state riportate nei sedimenti (Bennett et al., 1998; Lye et al., 1999).

**Cibo:** l'ingestione di EDC attraverso l'assunzione di cibo è generalmente considerata la maggiore via di esposizione sia per il genere umano che per la maggior parte della fauna selvatica. Il contributo dell'esposizione attraverso la dieta varierà a seconda delle preferenze alimentari, posizione nella catena alimentare, specie e quantità consumate. Inquinanti organici persistenti e lipofilici spesso si bioaccumulano in specie al vertice della catena alimentare. In uccelli e mammiferi marini che si nutrono di pesci è stato trovato un livello di POPs molto più alto di quello ritrovato nei pesci di cui si nutrono o comparato

con i livelli delle acque in cui si trovano (SEPA, 2001). Ad esempio nel mar Baltico, le foche grigie hanno una concentrazione di DDT e PCB nei tessuti adiposi in media 100 volte superiori a quelli trovati nell'aringa, il loro alimento principale (Bignert et al., 1998). Gli orsi polari, che costituiscono l'anello finale della catena alimentare marina della regione Artica, hanno un totale di PCB 100 volte superiore a quello riscontrato nelle donne Scandinave (Henriksen et al., 2001). Gli elevati livelli di PCB in queste specie al vertice della catena alimentare sono dovuti alla bioaccumulazione di vari generi di PCB. In generale, i mammiferi marini, gli uccelli predatori e mangiatori di pesci, e i pesci predatori hanno una maggiore concentrazione di inquinanti organici persistenti rispetto al livello più basso della catena alimentare della fauna selvatica terrestre (Jansson et al., 1993). Ed è proprio tra questi animali che sono stati evidenziati effetti come il fallimento della riproduzione, teratogenicità e assottigliamento del guscio.

L'uomo tende a consumare vegetali e prodotti alimentari di origine animale, e poiché le scelte alimentari variano tra culture e popolazioni, l'esposizione EDC differiscono notevolmente da persona a persona (Borrell et al., 1993; Hansen et al., 1998; Lindström et al., 1999). Alcune delle più alte concentrazioni di inquinanti organici persistenti sono stati osservate nelle popolazioni inuit nel nord del Canada e della Groenlandia (Ayotte et al., 1997; Hansen et al., 1998) e nelle donne delle isole Faroe (Fängström et al., 2002).

**Prodotti di consumo:** per l'uomo, una vasta gamma di prodotti di consumo (ad esempio, prodotti per la pulizia, prodotti personali, cosmetici, prodotti chimici per giardino) determinano esposizione tramite inalazione, ingestione e contatto cutaneo. Di particolare preoccupazione è l'estere ftalato a cui sono esposti i bambini piccoli attraverso le gomme da masticare, i giocattoli e gli anelli da dentizione (Steiner et al., 1999).

## **Capitolo 2**

### *Il nonilfenolo*

Il nonilfenolo (NP) è un composto xeno-biotico usato nella produzione di antiossidanti, di additivi per oli lubrificanti e maggiormente nella produzione di nonilfenoli etossilati tensioattivi (USEPA, 1990). I NP etossilati sono efficaci tensioattivi molto costosi che danno risultati eccezionali e di conseguenza ampiamente utilizzati in campo industriale, istituzionale, commerciale e nelle applicazioni domestiche come nella formulazione di detersivi ed emulsionanti (Fiege et al., 2000; Langford e Lester, 2002; Lorenc et al., 2003). L' NP è stato sintetizzato per la prima volta nel 1940 e da allora il suo utilizzo e la sua produzione sono aumentati quasi esponenzialmente (Manzano et al., 1998; Anonymous, 2001). La produzione annuale di NP si aggira intorno alle 154,200 tonnellate in USA (Anonymous, 2001), 73,500 tonnellate in Europa (HELCOM, 2002), 16,500 tonnellate in Giappone (JME, 2001), e 16,000 tonnellate in Cina (Anonymous, 2004).

Gli effetti del NP e dei NP etossilati nell'ambiente sono estremamente controversi. Le prime preoccupazioni sono emerse nel 1983-84 dalla Svizzera, quando Giger e collaboratori hanno stabilito che i NP etossilati e i prodotti di degradazione sono più tossici per la vita acquatica rispetto ai loro precursori (Giger et al., 1984).

La prima prova dell'azione estrogenica del NP è stata pubblicata nel 1938 da Dodds e Lawson (1938) ma solo 60 anni dopo Soto e collaboratori (Soto et al., 1991) accidentalmente osservarono la capacità del NP di determinare la proliferazione di cellule tumorali nella stessa misura degli estrogeni.

L' NP è classificato tra i distruttori endocrini come sostanza xeno-estrogenica in quanto grazie alla sua somiglianza strutturale con il  $17\beta$ -estradiolo ne mima l'azione, competendo per il sito di legame del ligando del recettore degli estrogeni (ER) (White et al., 1994; Lee e Lee, 1996); inoltre è ampiamente riportato da studi *in vitro* e *in vivo* che la potenza nell'attività estrogenica del NP è minore di quella degli estrogeni naturali (Soto et al., 1995;

Jobling et al., 1996; Blom et al., 1998; Sohoni e Sumpter, 1998, Arukwe et al., 2000,2001; Laws et al., 2000; Gaido et al., 2000; Yoon et al., 2000; Thorpe et al., 2001; Kobayashi et al., 2005). È stato stimato inoltre che l'affinità di legame del NP al recettore degli estrogeni è approssimativamente di  $4.0 \times 10^{-5}$  inferiore rispetto agli estrogeni naturali (Villeneuve et al., 1997).

Poiché il NP è composto da una gamma di isomeri (Wheeler et al., 1997; Thiele et al., 2004; Guenther et al., 2006) è stata correlata la struttura molecolare degli isomeri con la sua attività endocrina (Routledge e Sumpter, 1997). Quello che ne è emerso è che per l'attività endocrina del NP appare determinante la posizione para del gruppo fenolico OH e la catena laterale ramificata alifatica (Odum et al., 1997; Tabira et al., 1999; Kim et al., 2004), pertanto non tutti gli isomeri del NP sono capaci di indurre attività estrogenica.

Nell'esplicare dunque la sua attività estrogenica, il NP si lega direttamente ai recettori degli estrogeni inducendo così la trascrizione dei geni a valle regolati da questa via (Celius et al., 1999). È inoltre riportato che il legame del NP al ER induce un cambio di conformazione nel recettore che è diverso da quello indotto a seguito del legame col ligando naturale, pertanto il differente cambio di conformazione indotto dal NP potrebbe determinare una posizione incorretta dell'elica H12 con la conseguente incompleta attivazione di ER (Madigou et al., 2001). Pertanto il fatto che il NP sia capace di indurre la trascrizione dai geni per ER e VTG negli epatociti a dosi molto alte e a livelli più bassi di quanto non facciano gli estrogeni naturali, è probabilmente dovuto e alla sua debole affinità per ER (Petit et al., 1997 da Madigou et al., 2001) ma anche alla non perfetta efficienza di trascrizione della conformazione del complesso NP-ER rispetto a E<sub>2</sub>-ER (Madigou et al., 2001).

Il NP è inoltre capace di incrementare i livelli endogeni del recettore steroideo (Thibaut e Porte, 2004; Acevedo et al., 2005; Soverchia et al., 2005), ciò ha aperto una questione sul modo in cui il NP può attivare i recettori: direttamente o indirettamente mediante l'incremento dei livelli di estrogeni nel sangue.

Per quanto concerne la metabolizzazione e l'escrezione, questa avviene attraverso le urine e soprattutto attraverso la bile come composti NP

glucoronidati e idrossilati, come documentato in diverse specie di pesci (Coldham et al., 1998; Arukwe et al., 2000; Sabo-Attwood et al., 2007).

I paesi europei hanno assunto un'azione contro i composti a base di NP, in primo luogo con l'introduzione di accordi volontari tra industria e governi per ridurre l'uso e la produzione di derivati del nonilfenolo (PARCOM 92/8, 2000). Successivamente il NP e i suoi composti etossilati sono stati designati come sostanze pericolose prioritarie nella Direttiva 2000/60/EC e molti dei loro usi sono stati correntemente regolati (Directive 2003/53/EC, 2003). Attualmente l'EPA (Environmental Protection Agency) ha accettato i rischi del NP e ha preparato una guida per la qualità delle acque nell'ambiente: raccomandano quindi concentrazioni di nonilfenolo in acqua dolce inferiori a  $6,6 \mu\text{g} / \text{l}$ , e in acqua salata al di sotto di  $1,7 \mu\text{g} / \text{l}$  (Brooke e Thursby, 2005). Nonostante molti altri paesi, tra cui Cina, India e alcuni paesi dell'America del Sud utilizzano e producono in grande quantità composti a base di NP, non è stato preso nessun provvedimento da nessuno di questi paesi per ridurre o eliminare il loro utilizzo. Gli NPs etossilati nella maggior parte dei mercati europei, canadesi e giapponesi sono sostituiti da altri tensioattivi, soprattutto da etossilati alcolici. Tali tensioattivi sono meno efficienti, ma più sicuri per l'ambiente dove si degradano più rapidamente (Campbell, 2002).

## **2.1 Origine**

Il NP è costituito da un anello fenolico e una catena di nove atomi di carbonio in posizione para. In natura, si presenta come un liquido viscoso con un pallido colore. E' prodotto industrialmente dall'alchilazione del fenolo con il nonene in condizioni di catalisi acida. La miscela finale è composta da più di 22 isomeri (Wheeler et al., 1997; Thiele et al., 2004). Il più comunemente utilizzato è il nonilfenolo etossilato che, rilasciato nell'ambiente, è nuovamente degradato in nonilfenolo che è persistente e bioaccumulabile. La temperatura ha una forte influenza sul tasso di biodegradazione dei nonilfenoli etossilati, è stato infatti dimostrato che la biotrasformazione di questi composti è 2-10 volte più alta a  $22.5 \text{ C}$  che a  $13 \text{ C}$  (Kravetz et al., 1983; Ahel et al., 1994b; Manzano et al., 1999).

Lo scarico diretto dei composti derivati dal NP dal settore industriale è stato stimato essere intorno allo 0.5% (96 tonnellate) della produzione totale in Canada nel 1996 (Servos et al., 2003). La maggiore fonte di NP nell'ambiente deriva dalla degradazione dei NP etossilati (Langford e Lester, 2002). I NP etossilati contengono una catena etossilata con una lunghezza che segue la distribuzione di Poisson (Hager, 1998), con una recalcitranza che aumenta al diminuire del numero di gruppo etossilati (Shao et al., 2003; Soares, 2005).

## **2.2 Destino e insorgenza**

Il destino del NP nei diversi compartimenti ambientali (acque di superficie, sedimenti, acque sotterranee, suolo e aria) è controllato principalmente dalle sue proprietà fisico-chimiche che a loro volta influenzano la sua degradazione (John et al., 2000; Langford e Lester, 2002). È dotato di una scarsa mobilità che non gli permette di diffondere nella fase acquosa del suolo e nei sedimenti (Barber et al., 1988). La pressione di vapore e la costante di Henry sono  $2.07 \times 10^{-2}$  Pa e  $8.39 \times 10^{-1}$  Pa m<sup>3</sup>/mol, rispettivamente, ciò suggerisce che è un composto semi-volatile capace di effettuare scambi acqua /aria (Ney, 1990). Una volta raggiunta l'atmosfera, il NP può essere trasportato agli ecosistemi acquatici e terrestri per mezzo dell'umidità (Fries e Puttmann, 2004). Nello strato superficiale delle acque naturali la concentrazione di NP può diminuire a causa della fotolisi indotta dal sole (Ahel et al., 1994b), ma nei sedimenti si considera una vita media di più di 60 anni (Shang et al., 1999). La biodegradazione del NP può avvenire anche attraverso i microorganismi, ma è limitata dalla presenza di ossigeno (Topp e Starratt, 2000; Hesselsoe et al., 2001) e dalla biodisponibilità (Bosma et al., 1997; Kelsey et al., 1997). Le zone contaminate dal NP quindi contengono microorganismi capaci di degradare il NP solo quando la microflora indigena si adatta alla presenza del contaminante (Ahmed et al., 2001; Saagua et al., 2002; Soares et al., 2003).

La maggior parte delle indagini focalizzate alla individuazione del NP in ambiente acquatico sono in accordo col fatto che la sua presenza è principalmente correlata con le attività antropiche. La principale sorgente di NP nelle acque di superficie (torrenti, fiumi, laghi ed estuari), oceani e sedimenti

sembra essere strettamente connessa con lo scarico di effluenti dal trattamento delle acque reflue (Ahel et al., 1994a; Hale et al., 2000; Corsi et al., 2003). La concentrazione di NP riscontrata nelle acque dei fiumi si aggira tra 0.7 ng/l e 15 µg/l (Bester et al., 2001; Petrovic et al., 2002), tali valori presentano variazioni stagionali con maggiori picchi in estate che determinano una maggiore degradazione degli NP etossilati a causa dell'incremento dell'attività microbica a temperature più calde (Li et al., 2004). È noto inoltre che l'assorbimento del NP è controllato da due maggiori interazioni: interazioni idrofiliche con i componenti minerali e interazioni idrofobiche con la materia organica (John et al., 2000). Si stima che una volta entrato nei sedimenti la vita media del NP sia superiore a 60 anni (Shang et al., 1999).

La presenza del NP nel suolo non è ben documentata come la sua presenza in ambiente acquatico. Comunque ancora una volta la sua presenza è legata alle attività antropiche come i fanghi di depurazione, discariche e fuoriuscite accidentali (CCME, 2002; Vikelsoe et al., 2002). L'attività che ha sollevato maggiore preoccupazione e ha ottenuto maggiore attenzione è il riciclaggio dei fanghi di depurazione per i terreni agricoli. Secondo uno studio danese, la frazione di fanghi riciclati dagli agricoltori nel 2002 è stata il 66% della produzione totale (Langford e Lester, 2002; Jensen e Jepsen, 2005).

Negli imballaggi alimentari il NP si origina dall'ossidazione dell'additivo antiossidante tris-nonilphenolo fosfito (McNeal et al., 2000). I livelli di NP in diversi materiali di imballaggio sono stati recentemente valutati e sono state stimate concentrazioni che vanno da 0.03 µg/g nelle bottiglie di acqua di PET a 287 µg/g nelle pellicole in PVC, 40 µg/kg nei cartoni per bevande di latte UHT e 32 µg/kg in bottiglie di latte HDPE (Casajuana e Lacorte, 2004; Fernandes et al., 2008).

### **Capitolo 3**

#### *Gli estrogeni e loro meccanismo d'azione: cenni di endocrinologia*

In tutti i vertebrati gli estrogeni sono essenziali per la regolazione dei processi riproduttivi. Sebbene siano stati considerati per lungo tempo come “ormoni femminili” è largamente documentata, seppur con un discusso ruolo fisiologico, la loro presenza nella gonade maschile (Zondek, 1934; Goldzieher e Roberts, 1952; Leach et al., 1956; Morse et al., 1962; Attal, 1969; Reside, 1969; Oh & Tamaoki, 1970; Kelch et al., 1972).

Gli estrogeni (C18) appartengono alla famiglia degli ormoni steroidei, un vasto gruppo di ormoni lipofili derivati dal colesterolo (C27) per taglio della catena laterale. In natura gli estrogeni sono essenzialmente rappresentati da 17 $\beta$ -estradiolo (E<sub>2</sub>), estrone, estriolo.

La sintesi degli estrogeni è catalizzata dall'aromatasi, un enzima appartenente alla superfamiglia del citocromo P450, che agisce sull'anello A degli androgeni determinando demetilazione e aromatizzazione dell'anello fenolico A caratteristico degli estrogeni (Nebert et al., 1987; Simpson et al., 1994).

L'attività degli estrogeni è mediata da due recettori che appartengono alla super-famiglia dei recettori nucleari dei fattori di trascrizione (Evans, 1988; Laudet et al., 1992). La prima proteina legante gli estrogeni è stata scoperta e caratterizzata nel 1950 da Elwood Jansen e oggi identificata come ER $\alpha$ . Gli ER sono stati clonati per la prima volta nell'uomo più di 20 anni fa (Walter et al., 1985, Green et al., 1986). Dieci anni dopo l'identificazione del primo recettore degli estrogeni, fu identificato un secondo recettore specifico (Kuiper et al., 1996). Questo nuovo ER, clonato per la prima volta da una libreria di cDNA di ratto, fu chiamato recettore  $\beta$  (ER $\beta$ ) (Kuiper e Gustafsson, 1997).

ER $\alpha$  e ER $\beta$  sono prodotti da geni separati localizzati nell'uomo sul cromosoma 6 e 14 rispettivamente (Menasce et al., 1993, Enmark et al., 1997).

Tutti i membri della famiglia dei recettori steroidei condividono una comune disposizione di cinque domini identificati da A a F, codificati da 9 esoni (Enmark et al., 1997). La regione più conservata sia della forma alpha che

beta del recettore degli estrogeni è il dominio che lega il DNA (C), che comprende due distinti motivi zinc fingers attraverso i quali il recettore interagisce con l'elica del DNA. La sequenza EGCKAF (hER $\beta$  a.a. 122-127) alla base del primo zinc finger, è essenziale per il legame allo specifico elemento di risposta agli estrogeni (ERE) sui geni bersaglio (Forman e Samuels, 1990), e la regione del secondo zinc finger contribuisce alla dimerizzazione del recettore sono identiche in entrambi ER $\alpha$  e ER $\beta$ . Il dominio E<sub>2</sub> che definisce la specificità del legame col ligando, è localizzato nella porzione C-terminale della proteina (Forman e Samuels, 1990).

Come tutti i recettori per gli ormoni steroidei, gli ERs, in assenza del ligando sono associati nel citoplasma a heat-shock-proteins (hsp90, hsp70, hsp56) (Baulieu et al., 1990, Pratt et al., 1992,1993) formando un complesso oligomero che non è in grado di legare il DNA. In seguito al legame con gli estrogeni, tale complesso si dissocia e i recettori dimerizzano.

A seconda se uno o entrambi i recettori sono presenti nella cellula, a seguito dell'interazione col ligando, i sottotipi di ER possono formare omodimeri (ER $\alpha$ -ER $\alpha$  o ER $\beta$ -ER $\beta$ ) o eterodimeri (ER $\alpha$ -ER $\beta$ ) (Cowley et al., 1997; Pettersson et al., 1997). I dimeri si legano a specifiche sequenze di DNA, elementi di risposta agli estrogeni (ERE), presenti nella regione del promotore o negli enhancers di specifici geni bersaglio (Kumar e Chambon, 1988; Gronemeyer, 1991, 1992). L'affinità di legame dei dimeri ER $\alpha$ -ER $\alpha$  e ER $\alpha$ -ER $\beta$  agli ERE si ritiene sia più alta degli omodimeri ER $\beta$ -ER $\beta$  (Cowley et al., 1997).

La regione ERE consiste di due elementi palindromi separati dalle sequenze 5'AGGTCA3'. Il primo ERE è stato identificato nel gene della vitellogenina di *Xenopus* (Klein-Hitpass et al., 1986).

Quando i due sottotipi di recettore sono coespressi nella cellula, ER $\beta$  può antagonizzare la trascrizione ER $\alpha$ -dipendente (Matthews e Gustaffson, 2003) ma il meccanismo molecolare attraverso il quale ER $\beta$  media l'inibizione del segnale di ER $\alpha$  è ancora oggetto di ricerca. ER $\beta$ , in presenza di ER $\alpha$ , inibisce la trascrizione genica regolata da ER $\alpha$  (Lindberg et al., 2007) e, in una

linea cellulare T47D è stato dimostrato che l'espressione di ER $\beta$  e della variante ER $\beta$ 2 incrementa la degradazione proteolitica di ER $\alpha$  (Matthews et al., 2006).

Diversi gruppi di studio hanno evidenziato che l'espressione di ER $\alpha$  e ER $\beta$  può essere modulata dall'esposizione agli estrogeni (Castles et al., 1997; Nomura et al., 2003), ma poco si sa riguardo l'importanza biologica e il meccanismo molecolare coinvolto in questa autoregolazione. Nel caso di ER $\alpha$ , l'esposizione agli E<sub>2</sub> determina un incremento ligando-dipendente nell'attività delle due distinte regioni del promotore, sebbene non sia noto se tutti i distinti promotori di ER $\alpha$  siano responsivi agli estrogeni (Castles et al., 1997; Danger et al., 2001).

Per entrambi i recettori sono state inoltre descritte diverse isoforme, ma non è ben noto se tutte le isoforme sono espresse come proteine funzionali. Molte varianti di ER $\alpha$  differiscono nella loro 5'UTR. Molte delle isoforme più piccole di ER $\alpha$  sono state isolate e identificate in differenti linee cellulari (Flouriot et al., 2000; Wang et al., 2005).

È ampiamente noto che gli estrogeni sono in grado di autoregolare la stabilità del mRNA che codifica per il proprio recettore (Ing, 2005). La capacità degli E<sub>2</sub> di indurre l'espressione epatica del loro recettore è documentata nei maschi di pesci e in una tartaruga (Pakdel et al., 1997; Custodia-Lora et al., 2004a). Sembra inoltre che tale induzione sia differentemente regolata dagli E<sub>2</sub>: infatti in rainbow trout e in zebrafish l'espressione di *ERa* è up-regulated dagli E<sub>2</sub> (Menuet et al., 2004; Boyce-Derrocot et al., 2009) mentre nel fegato di tilapia, E<sub>2</sub> negativizzano l'espressione di ER $\beta$  (Davis et al., 2008).

I recettori degli estrogeni, al di là del loro ligando naturale, sono in grado di legare un'ampia gamma di composti con strutture diverse grazie alla presenza di un'ampia cavità che lega il ligando. Composti estrogen-like possono mostrare differenti preferenze di legame e relative affinità di legame per entrambi i sottotipi di ER (Kuiper et al., 1998) e per gli ERs di differenti specie (Flouriot et al., 1995; Nimrod e Benson, 1997; Loomis e Thomas, 1999; Kloas et al., 2000; Matthews et al., 2000; Tollefsen et al., 2002; Urushitani et al., 2003). Gli ERs del maiale per esempio mostrano una maggiore affinità per l' $\alpha$ -zearalenol rispetto a ER della gallina (Fitzpatrick et al., 1989). Queste differenze potrebbero

essere dovute alla variabilità tra le varie specie nella sequenza amminoacidica all'interno del dominio che lega il ligando (Fielden et al., 1997, Matthews et al., 2000). Relativamente agli  $E_2$  è stato dimostrato che il NP mostra un'affinità per  $ER\alpha$  100 volte minore e 10.000 volte inferiore per  $ER\beta$  (Gale et al., 2004).

Relativamente agli estrogeni naturali sembra che nel ratto e in channel catfish mostrino una maggiore affinità per  $ER\beta$  rispetto a  $ER\alpha$  (Kuiper et al., 1996, 1997; Gale et al., 2004).

### **3.1 Estrogeni e ER nella femmina di mammifero**

L'identificazione di una attività estrogenica prodotta nell'ovario risale agli studi di Allen e Doisy nel 1923. Anche in queste fasi iniziali è stato riconosciuto non solo che gli estrogeni sono sintetizzati dall'ovario, ma che l'ovario è esso stesso bersaglio dell'azione degli estrogeni (Pencharz, 1940, Williams, 1940). Tra i due tipi di recettore quello che predomina nell'ovario di ratto è il sottotipo  $\beta$  (Byers et al., 1997; Saunders et al., 1997).

Per molti aspetti, l'importanza della presenza di ER funzionanti è stata evidenziata nel topo mediante esperimenti di knockout per ER. I topi knockout per  $ER\alpha$  ( $\alpha$ ERKO) hanno il peggiore fenotipo ovarico, i follicoli non riescono a maturare o a ovulare, formano cisti emorragiche e gli individui risultano infertili (Lubahn et al., 1993; Dupont et al., 2000). Molti dei fenotipi ovarici  $\alpha$ ERKO sarebbero spiegati dal mancato feedback negativo mediato dagli estrogeni sulla secrezione del LH ipofisario, ciò determinerebbe un alto livello cronico di LH, e un conseguente aumento della steroidogenesi ovarica (Schomberg et al., 1999; Couse et al., 2003). Al contrario gli ovari dei topi  $\beta$ ERKO apparirebbero grosso modo normali, con follicoli a tutti gli stadi di sviluppo ma con pochi corpi lutei (Krege et al., 1998; Dupont et al., 2000). Inaspettatamente invece nei topi  $\alpha\beta$ ERKO le cellule della granulosa si transdifferenziano in cellule del Sertoli, un fenotipo questo evidente nei topi con una mirata alterazione del gene *cyp19* che codifica per l'aromatasi (Fisher et al., 1998; Britt et al., 2002).

Gli estrogeni sono ben noti avere un'azione morfogena, e il loro ruolo nella morfogenesi è evidente dalla struttura dell'utero (Couse et al., 1999), dell'ovario (Couse et al., 1999), della ghiandola mammaria (Forster et al., 2002)

di topi knockout per ER $\alpha$  e ER $\beta$ . ER $\alpha$  e ER $\beta$  possono avere azioni opposte sui promotori di molti geni, in particolare di quelli coinvolti nella proliferazione cellulare il che ha suggerito che la risposta proliferativa globale agli E<sub>2</sub> è il risultato di un bilancio tra il segnale di ER $\alpha$  e ER $\beta$  (Liu et al., 2002).

La regolazione dei livelli dell'mRNA per ER da parte degli estrogeni è variabile a seconda del tessuto in esame. In uno studio condotto nelle femmine di ratto i livelli del mRNA per ER incrementano nell'utero dopo l'ovariectomia, per cui gli ERs sono sotto il controllo negativo degli estrogeni, nel fegato invece i livelli di ER mRNA sono sotto la regolazione positiva degli E<sub>2</sub>, infatti i livelli epatici di ER mRNA si riducono a seguito di ovariectomia (Shupnik et al., 1989).

### ***3.2 Estrogeni e ER durante la vitellogenesi nelle femmine dei vertebrati non mammiferi***

La vitellogenesi è una strategia riproduttiva operata in tutti i vertebrati ovipari nei quali l'accumulo di vitello all'interno dell'uovo consente la nutrizione dell'embrione.

Il processo vitellogenetico che avviene dunque in tutte le femmine dei vertebrati ovipari a riproduzione stagionale, è innescato dall'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi. Infatti fattori ambientali quali la temperatura e il fotoperiodo stimolano il nucleo arcuato dell'ipotalamo a rilasciare un decapeptide, il GnRH (fattore di rilascio delle gonadotropine) il quale stimola le cellule gonadotrope dell'ipofisi a sintetizzare due ormoni glicoproteici (LH/FSH like) che per via ematica raggiungono l'ovocita in accrescimento stimolando la produzione di estrogeni (Wallace, 1985). Tra questi il 17 $\beta$ -estradiolo stimola le cellule epatiche a produrre la vitellogenina (VTG) (Tata, 1978; Wallace, 1985; Carnevali e Belvedere, 1991; Pakdell et al., 1991) che è il maggiore precursore delle proteine del tuorlo, è sintetizzata dal fegato delle femmine sessualmente mature solo nel periodo riproduttivo e, rilasciata in circolo, raggiunge gli ovociti dove penetra con un meccanismo di endocitosi mediata da recettori (Ghiara et al., 1968, Limatola e Filosa, 1989; Schneider, 1996). Nella lucertola *Podarcis* è stato evidenziato che il recettore per la VTG è presente nella compagine strutturale

della membrana plasmatica dell'ovocita solo durante il periodo riproduttivo, e la sua comparsa può essere indotta sperimentalmente dalla somministrazione di FSH anche nel periodo non riproduttivo (Romano e Limatola, 2000). In questa specie la membrana plasmatica degli ovociti reclutati per l'accrescimento e destinati all'ovulazione, subisce un notevole incremento di superficie finalizzato all'uptake dei precursori esogeni del vitello. All'interno del citoplasma ovocitario, la VTG si stacca dai suoi recettori, le vescicole perdono il loro rivestimento di clatrina e si fondono tra di loro per formare le placchette primordiali di vitello che si trasformano successivamente in globuli di vitello maturi (Ghiara et al., 1968; Limatola e Filosa, 1989). Una volta racchiusa nei globuli vitellini, la VTG viene proteoliticamente scissa in lipovitelline e fosvitine (Burley e Cook, 1961; Bergink e Wallace, 1974; Deeley et al., 1975; Wallace, 1985; Callard et al., 1990). In tutti i vertebrati studiati le lipovitelline sono proteine ad alto peso molecolare con una natura idrofobica, le fosvitine hanno un peso molecolare più basso e sono altamente fosforilate, con una sequenza amminoacidica costituita per circa il 60% da molecole di serina (Redshaw e Follett, 1971; Wallace, 1978). Le lipovitelline e le fosvitine costituiscono più dell'80% delle proteine totali del tuorlo negli ovociti vitellati, e rappresentano la fonte primaria di nutrienti quali lipidi, amminoacidi, carboidrati e fosfati durante lo sviluppo embrionale. Nelle uova pelagiche di alcuni teleostei è stato evidenziato un evento di proteolisi supplementare delle proteine del vitello che avviene già alla maturazione degli ovociti (Wallace et Selman, 1985; Matsubara et al., 1995), ed è accompagnato da un notevole incremento di volume degli stessi dovuto ad un processo di idratazione (Greeley et al., 1986; Carnevali et al., 1992,1993; Matsubara et al., 1995; Thorsen et al., 1996). Si ipotizza che questa seconda proteolisi produca nelle uova pelagiche un incremento nel contenuto di amminoacidi liberi che fungono da effettori osmotici necessari per l'influsso di acqua (Carnevali et al., 1991). Tale "hydration", tipica dei teleostei marini, rende le uova galleggianti e più facilmente trasportabili dalle correnti (Wallace e Selman, 1985; Carnevali et al., 1992); inoltre gli amminoacidi liberi prodotti rappresentano un substrato e per la sintesi di proteine durante l'embriogenesi e per il metabolismo aerobio (Matsubara et al., 1999).

Negli uccelli sono stati trovati almeno tre geni che codificano per la vitellogenina (VTGI, VTGII, VTGIII) e uno di questi, VTG II, è stato interamente clonato e sequenziato (Van het Ship et al., 1987). Studi condotti sul prodotto di VTGII evidenziano che dalla scissione proteolitica si ottengono LipI, LipII, fosvitina e, una glicoproteina di 40 kDa (YGP 40). Sulla base della sequenza amminoacidica dedotta, LipI è localizzata all'estremità N-terminale seguita dalla fosvitina, da LipII e da YGP 40 che corrisponde al dominio C-terminale (Yamamura et al., 1995).

Nella lucertola *Anolis pulchellus*, è stato proposto un meccanismo alternativo di sintesi delle proteine del tuorlo. In condizioni native sono state evidenziati nel plasma tre tipi diversi di VTG (VTG1, VTG2, VTG3). Secondo gli AA soltanto le forme di VTG ematiche di taglia elevata e intermedia daranno origine dopo scissione proteolitica nell'ovocita alle componenti fosforilate, mentre la più piccola fra le VTG plasmatiche, 116 kDa, verrebbe sintetizzata indipendentemente dal fegato, riversata in circolo e inglobata come tale (lipovitellina) negli ovociti (Morales et al., 1987).

Nel serpente tropicale *Bothrops jararaca* il processamento della VTG appare del tutto inusuale rispetto agli altri vertebrati. In questa specie la VTG plasmatica è composta da due subunità, la maggiore è ricca di fosfato e povera di carboidrati, la minore è altamente glicosilata e poco fosforilata. Le due subunità si originano da un precursore comune a più alto peso molecolare sintetizzato dal fegato (Janeiro-Cinquini et al., 1999).

Nelle femmine dei vertebrati non mammiferi, la produzione eterosintetica di vitellogenina è sicuramente quella preponderante (Ghiara et al., 1968; Wallace, 1968-85; Bergink et al., 1974; Limatola e Filosa, 1989) ma negli elasmobranchi (Prisco et al., 2004) e tra i rettili nella lucertola *Podarcis* (Limatola 1975) è stata evidenziata la presenza di granuli di vitello e/o di VTG nell'epitelio follicolare degli ovociti in accrescimento. In zebrafish, un ulteriore sito di sintesi per la VTG è stato evidenziato a livello degli adipociti presenti nell'intestino e nell'ovario (Wang et al., 2005). Pertanto alcuni tessuti adiposi potrebbero conservare la funzione di sintetizzare VTG come negli insetti.

In molti vertebrati ovipari è stato osservato che il controllo della sintesi del precursore delle proteine del tuorlo è più complesso e può coinvolgere non solo il  $17\beta$ -estradiolo, ma anche altri ormoni come l'ormone della crescita (GH), il testosterone, la prolattina e il progesterone (P). Nelle anguille sessualmente immature è stato osservato che somministrando GH contemporaneamente al  $17\beta$ -estradiolo, si ha un aumento della concentrazione di VTG plasmatica. Esperimenti di ipofisectomia condotti in una lucertola, in una tartaruga e in alcuni uccelli dimostrano un'alterazione dell'azione degli estrogeni sul fegato; in queste condizioni sperimentali sia nei rettili che negli uccelli somministrando GH viene ripristinata la normale risposta alle gonadotropine e agli estrogeni (Callard e Ziegler, 1970; Ho et al., 1982; Bohem et al., 1987).

Nella lucertola *Dipsosaurus dorsalis* è stato osservato che progesterone e prolattina esercitano un effetto inibitorio sul normale accrescimento ovocitario e sull'accrescimento follicolare associato all' "uptake" dei precursori esogeni del vitello (Callard et al., 1970-1972); nelle tartarughe l'effetto inibitorio è esercitato dal testosterone e dal progesterone (Ho et al., 1982). Nella lucertola *Podarcis sicula* il progesterone ha un effetto inibitorio sull'accumulo di vitello all'interno degli ovociti. Inoltre è stato ipotizzato che nel fegato il progesterone potrebbe essere coinvolto nel decremento stagionale della sintesi della VTG (Limatola et al., 1989). L'azione inibitoria, che si manifesta a livello degli epatociti, rappresenta un interessante modello di soppressione dell'espressione genica mediata da ormoni (Beato, 1989); in particolare alcuni fattori indotti dal progesterone potrebbero interagire con il gene che codifica per la VTG nella regione 5', la stessa che viene attivata dagli estrogeni. Tale interazione andrebbe a destabilizzare il legame degli estrogeni con il DNA impedendo un'efficiente trascrizione degli mRNA per la VTG (Callard et al., 1990).

Evidenze più dirette per la down regolazione della VTG sono state ottenute nei maschi della tartaruga *Chrysemys*, nei quali la VTG plasmatica  $E_2$  indotta è inibita dal trattamento con P (Ho et al., 1981). È probabile che la down-regulation dell'mRNA per ER sia responsabile della riduzione dell'mRNA per la VTG indotta dal P (un'azione indiretta del P).

La somministrazione di P diminuisce i livelli di mRNA per ER (Custodia Lora e Callard, 2002). Gli AA ipotizzano che la risposta vitellogenica del fegato agli E<sub>2</sub> possa essere il risultato di uno squilibrio nel rapporto tra PRA e PRB indotti che modulerebbero l'azione di E<sub>2</sub>. Infatti la somministrazione di E<sub>2</sub> incrementa i livelli di proteina e di mRNA per ER e per le due forme del recettore del progesterone (PRA e PRB).

In colture di cellule HeLa è nota la capacità degli estrogeni di up-regolare la trascrizione di mRNA per le due isoforme del recettore del progesterone e che solo ER $\alpha$  dopo trattamento con E<sub>2</sub> è in grado di aumentare di cinque volte l'attività del promotore di PRB (Flototto et al., 2004). Nell'utero di ratti ovariectomizzati e nell'ovidotto di tartarughe il recettore del progesterone è indotto da E<sub>2</sub> (Selcer e Leavitt, 1991).

In *Torpedo marmorata*, elasmobranco viviparo dove i piccoli sono nutriti nel corpo della madre dal tuorlo, è stato ipotizzato che il P potrebbe agire sulla sintesi di VTG in maniera bifasica: promuovendola a bassi livelli e inibendola a livelli elevati (i.e. quelli del periodo non riproduttivo) (Prisco et al., 2008).

Sebbene ER $\alpha$  e ER $\beta$  sono spesso coespressi (Soccorro et al., 2000; Xia et al., 2000; Menuet et al., 2002; Choi e Habibi 2003), il contributo di ciascun sottotipo nella regolazione della produzione epatica di VTG non è molto chiaro. Nella femmina di rainbow trout una piccola isoforma epatica di ER $\alpha$  è stata messa in relazione con lo sviluppo e/o il mantenimento della vitellogenesi (Menuet et al., 2001). Di contro invece, nella stessa specie la mancata inibizione della sintesi di VTG, determinata da un'antagonista selettivo di ER $\alpha$ , ha suggerito che la produzione di VTG sia mediata da ER $\beta$  (Leonos-Castaneda et al., 2007). In esemplari giovani di goldfish l'esposizione al 17 $\beta$ - estradiolo e al NP modula la quantità di VTG incrementando i livelli trascrizionali epatici di ER $\beta$ -1 (Soverchia et al., 2005). In un tritone sapgnolo studi di RT-PCR dimostrano la presenza del trascritto di ER $\alpha$  a livello epatico, suggerendo la sua implicazione nella vitellogenesi (Ko et al., 2008).

Nei maschi di rainbow trout il NP nella stessa misura degli estrogeni determina un' up-regolazione dell'espressione del gene per ER e per VTG sia *in vivo* che in una coltura primaria di epatociti (Pakdel et al., 1991; Flouriot et al.

1996). Per tutto quanto esposto la VTG oggi conquista il ruolo di biomarker dell'inquinamento ambientale da sostanze estrogeno simili.

### **3.3 Estrogeni e ER nel maschio**

La visione tradizionale che identifica l'estradiolo come "ormone femminile" e il testosterone come "ormone maschile" è stata contestata negli ultimi anni (Sharpe, 1997; Sharpe, 1998). L'identificazione della sintesi degli estrogeni nel maschio risale al 1930 (Zondek, 1934), ma il suo significato è stato ampiamente ignorato e il suo ruolo è stato considerato essere di piccola importanza per la fisiologia del testicolo e per la fertilità maschile. Ancora nel 1970 c'erano poche conoscenze riguardo i tipi cellulari all'interno del testicolo responsabili della sintesi e dell'azione degli estrogeni (O'Donnell et al., 2001).

L'interesse crescente del ruolo degli estrogeni nel maschio è dovuto alla scoperta che topi che mancano di ER $\alpha$  (Lubahn et al., 1993; Hess et al., 1997) o dell'aromatasi (Honda et al., 1998, Toda et al., 2001), hanno una ridotta fertilità. Tale interesse è cresciuto ancora di più allorché nel 1996 è stato scoperto il recettore ER $\beta$  (Kuiper et al., 1996; Enmark et al., 1997) che è largamente espresso nel tratto riproduttivo maschile (Saunders et al., 1997).

Gli estrogeni sono coinvolti in numerosi processi: sono indispensabili nella mineralizzazione dell'osso (Cutler, 1997), hanno un'importante azione protettiva nel sistema cardiovascolare (Mendelsohn e Karas, 1999), sono responsabili del comportamento sessuale nel maschio e nella femmina grazie alla distribuzione bifasica dei due recettori in particolari aree dell'encefalo (Ishunina et al., 2000).

La concentrazione di estrogeni nel sangue periferico del maschio può raggiungere da 2 a 180 pg/ml a seconda dalla specie. Il cavallo è un'eccezione: è stato trovato che la concentrazione dell'estrone solfato raggiunge 2447 pg/ml (Setchell e Cox, 1982; Claus et al., 1992). Nel maschio di ratto la concentrazione di estrogeni è approssimativamente di 250 pg/ml nei fluidi della rete testis (Free e Jaffe, 1979) ed è più alta della media dell'estradiolo presente nel siero delle femmine (Overpeck et al., 1978; Robaire e Hermo, 1988).

Nella lucertola *Podarcis sicula* il profilo annuale degli estrogeni plasmatici mostra un progressivo aumento durante l'attiva spermatogenesi (da maggio a giugno, da 0.8 a 1.8 ng/ml) con un picco ad agosto (durante le mitosi spermatogoniali). La concentrazione intragonadica di estrogeni ha una tendenza bifasica, sono stati riportati infatti due picchi a gennaio e a giugno-luglio (circa 20 pg/mg e circa 25 pg/mg) (Angelini e Botte, 1992)

È documentato che gli estrogeni endogeni possono avere effetti positivi più diretti sulla spermatogenesi e in particolare sulla sperioistogenesi (Eddy et al., 1996; Robertson et al., 1999, 2002).

Nel testicolo e nell'epididimo di *Trachemys scripta* sono presenti ER $\alpha$  e ER $\beta$  immunoreattivi durante l'inverno quando i testicoli sono quiescenti, e nella fase proliferativa precoce del ciclo spermatogenetico (Gist et al., 2007). Negli altri gruppi di vertebrati ER $\alpha$  è più uniformemente distribuito tra le cellule germinali e non, mentre ER $\beta$  è maggiormente presente nelle cellule germinali premeiotiche e meiotiche (Arenas et al., 2001; Bouma e Nagler, 2001; Wu et al., 2001; Choi e Habibi, 2003; Wu et al., 2003).

Nella lucertola *Podarcis sicula* è stato dimostrato che il recettore ER $\beta$  è presente durante tutto l'anno nei nuclei degli spermatogoni, spermatociti, spermatidi e Sertoli. Tale presenza ha suggerito che gli estrogeni potrebbero avere una diretta influenza sulla funzione e maturazione delle cellule germinali (Chieffi e Varriale, 2004). È stato inoltre osservato nella stessa specie che il trattamento con estrogeni induce proliferazione spermatogoniale probabilmente attraverso l'attivazione delle ERK1/2 (Chieffi et al., 2002). Gli estrogeni sono inoltre capaci di indurre, sempre nel testicolo di *Podarcis*, l'attivazione della Akt-1, una chinasi coinvolta nel controllo della proliferazione cellulare, nella sopravvivenza e nel metabolismo (Russo et al., 2005).

La gonade indifferenziata di topo presenta ER $\alpha$  (Greco et al., 1992; Nielsen et al., 2000), ciò attribuisce agli estrogeni un ruolo molto precoce nel processo di differenziamento. Infatti ER $\alpha$  sono espressi nelle cellule del Leydig ad uno stadio di sviluppo che precede l'espressione del recettore degli androgeni (Majdic et al., 1995).

Uno studio condotto da Rago e collaboratori (2007) ha dimostrato che ER $\alpha$  è presente nel pezzo centrale della coda dello spermatozoo con una possibile correlazione con la sopravvivenza e la motilità dello stesso, ER $\beta$  invece è limitato alla regione dell'acrosoma. Inoltre la localizzazione dell'aromatasi lungo la coda dello spermatozoo ha spinto gli AA a ipotizzare che il testicolo sia bersaglio degli ormoni che esso stesso sintetizza. Ciò è coerente con quanto trovato negli spermatozoi umani dove tra l'altro è stata ipotizzata una relazione tra la produzione locale di estrogeni e la motilità spermatica (Aquila et al., 2002; Lambard et al., 2003).

La somministrazione di un inibitore dell'aromatasi riduce il tempo di transito degli spermatozoi nell'epididimo della scimmia *Macaca radiata* e tali spermatozoi non sono poi in grado di fertilizzare (Meistrich et al., 1975; Shetty et al., 1998).

Da almeno 30 anni è nota la presenza di una proteina simile al recettore degli estrogeni nell'epididimo (Danzo et al., 1975). Un recettore per gli estrogeni nell'epididimo è stato descritto per diverse specie di mammiferi come: cane (Younes et al., 1979; Younes et al., 1981), uomo (Murphy et al., 1980), scimmia (Kamal et al., 1985; West et al., 1990), ariete (Tekpetey et al., 1988), maiale della guinea (Danzo et al., 1981), ratto (Kuiper et al., 1997) tartaruga (Dufaure et al., 1983).

Gli spermatozoi testicolari nei mammiferi sono incapaci di fertilizzare le uova. Il cambiamento da spermatozoi immaturi a maturi, unità funzionali capaci di una progressiva motilità e fertilità, si pensa sia frutto di una serie di complessi eventi altamente regolati che avvengono durante il loro passaggio attraverso i dotti epididimali.

L'epididimo consiste di una serie di tubuli che formano un condotto per gli spermatozoi i quali passano dai dotti dell'epididimo ai vasi deferenti. L'epididimo è anatomicamente diviso in tre parti: la testa, una stretta porzione centrale definita corpo e la coda. Il rivestimento epiteliale di questi tubuli riassume i fluidi testicolari e secerne proteine creando un ambiente luminale specializzato per la maturazione degli spermatozoi testicolari (Turner, 1995).

È importante notare che, tra le differenti regioni dell'epididimo, la testa è la più attiva nella sintesi e nella secrezione delle proteine (Cornwall e Hann, 1995). Inoltre la testa dell'epididimo è stato dimostrato essere la più sensibile all'azione degli estrogeni (McLachlan et al., 1975).

Nel dimostrare l'importanza degli estrogeni e di ER $\alpha$  nel mantenimento della maturazione degli spermatozoi e nel prevenire l'infertilità maschile, è stato dimostrato che una dieta inquinata da fitoestrogeni, che sono normalmente presenti nei mangimi per ratti da laboratorio, può influenzare il tratto riproduttivo maschile. È stato trovato che quando *ER $\alpha$*  è espresso, le funzioni dei duttuli efferenti e dell'epididimo sono promosse mentre queste stesse funzioni sono inibite quando *ER $\alpha$*  manca (Ruz et al., 2006).

Nei maschi di topi ERKO l'altezza delle cellule epiteliali dei duttuli efferenti risulta ridotta di circa il 48% e nelle cellule dei duttuli efferenti, il numero delle ciglia per cellula risulta diminuito (Hess et al., 2000) e il battito ciliare non presenta la normale onda metacronica (Wong et al., 1993).

Topi  $\alpha$ ERKO e  $\beta$ ERKO hanno favorito preziose intuizioni sul ruolo degli estrogeni nella fisiologia riproduttiva del maschio. I maschi  $\alpha$ ERKO risultano infertili (Lubahn et al., 1993; Eddy e Todd, 1996) con grossi cambiamenti morfologici, alterazioni della spermatogenesi, e dilatazione dei duttuli efferenti dovute all'incremento dell'accumulo di fluidi (Hess e Bunick, 2000). I maschi  $\beta$ ERKO si mostrano fertili e con un tratto riproduttivo apparentemente normale (Krege et al., 1998), mentre i maschi di topo  $\alpha\beta$ ERKO risultano infertili e il loro tratto riproduttivo è simile alla morfologia dei  $\alpha$ ERKO. Pertanto almeno nei roditori la funzione di ER $\alpha$  è necessaria a mantenere la fertilità e la normale morfologia dei duttuli epididimali. A supporto di ciò diversi studi mostrano che gli estrogeni potrebbero regolare l'espressione delle molecole chiave coinvolte nel trasporto degli ioni determinando una modulazione del riassorbimento dei fluidi nei duttuli efferenti (Lee et al., 2000).

La ridotta produzione di spermatozoi nei topi  $\alpha$ ERKO sembra essere dovuta alla alterazione determinata dall'azione degli estrogeni all'interno delle cellule somatiche del testicolo e del sistema dei dotti all'interno dei quali non avviene il riassorbimento dei fluidi (Shayu et al., 2005). Il trasporto dei fluidi è

principalmente facilitato da una famiglia di proteine canale per l'acqua definite aquaporine. Il movimento dell'acqua attraverso la membrana cellulare dipende dal gradiente di concentrazione che è mantenuto da uno scambiatore ionico come la pompa  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ , scambiatori  $\text{Na}^+\text{-H}^+$ , canali per il cloro, ecc. Studi sui duttuli efferenti di roditore suggeriscono che gli estrogeni possono essere coinvolti nella regolazione dell'espressione dell'aquaporina-I e della  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase-}\alpha 1$  (Lee et al., 2000; Zhou et al., 2001). Gli esperimenti di Shayu e collaboratori (2005) sulla scimmia rivelano una forte espressione dell'AQP-I,  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase-}\alpha 1$  in tutte le tre regioni dell'epididimo. Inoltre si è visto che incubando i duttuli efferenti con ICI182780 (un antagonista di ER che produce un effetto simile a  $\alpha\text{ERKO}$ ), si assiste ad un incremento del diametro del tubulo il che ha indicato il mancato coinvolgimento di fattori testicolari nella regolazione dell'assorbimento dei fluidi.

È stato ipotizzato nel topo da Zhou e collaboratori (2001) che gli estrogeni hanno una funzione nel controllo del trasporto dell'acqua e degli ioni con tre geni potenzialmente candidati NHE3, CAII e AQP1. Hanno quindi dimostrato che  $\text{ER}\alpha$  è responsabile dell'espressione di NHE3 nei duttuli efferenti e influenza il riassorbimento di  $\text{Na}^+$  e il trasporto passivo dell'acqua. Inoltre hanno osservato che l'azione degli estrogeni è richiesta per il mantenimento della citoarchitettura apicale in queste cellule epiteliali indipendentemente dal suo effetto sul trasporto del  $\text{Na}^+$ .

## **Capitolo 4**

### *Estrogeni e NP come distruttori endocrini*

La maggior parte degli studi sulle interferenze di estrogeni e xenoestrogeni sono condotti sulla riproduzione di specie acquatiche e semi-acquatiche, si considerano per la maggior parte esemplari maschi e si tende per lo più a identificare la presenza di vitellogenina nel fegato e nel plasma di specie naturalmente o sperimentalmente esposte ad ambienti inquinati (Hashimoto et al., 2000; Kobayashi et al., 2005). Tale proteina, essendo sintetizzata esclusivamente dalle femmine, è considerata la sentinella o, come oggi la si definisce, il biomarker per eccellenza dell'inquinamento ambientale da sostanze estrogeno simili (Palmer e Palmer, 1995; Sumpter e Jobling, 1995). È infatti ampiamente documentato come anche nei maschi è possibile indurre la trascrizione del gene della *VTG* a seguito dell'esposizione al 17 $\beta$ -estradiolo (Wallace 1985; Whali et al., 1988; Carnevali et al., 1991, 1995).

Un distruttore endocrino può incidere su una serie di siti bersaglio nel sistema riproduttivo. Il più importante di questi è il testicolo, la gonade maschile, sito della spermatogenesi e della produzione di androgeni. I vari compartimenti testicolari sono regolati da interazioni autocrine e paracrine che sono sotto l'influenza endocrina dell'ipotalamo e dell'ipofisi. Circa l'80% della massa del testicolo è costituita da tubuli seminiferi altamente avvolti all'interno dei quali avviene la spermatogenesi. Il restante 20% è costituito dalla componente endocrina, cellule di Leydig e del Sertoli le cui secrezioni permettono il verificarsi di una corretta funzione testicolare.

Come già detto gli E<sub>2</sub> e il NP determinano la sintesi di VTG anche nei maschi dove, diversamente dalla femmina, questa proteina non ha un ben preciso sito di accumulo anche se nei maschi di alcune specie il testicolo, alla stregua dell'ovario, ha la capacità di incorporare e accumulare una quota parte di VTG a livello degli spermatoцитi (Kobayashi et al., 2005)

Studi di microscopia ottica hanno evidenziato alterazioni nella struttura della gonade maschile e femminile in pesci esposti naturalmente o

sperimentalmente a NP o E<sub>2</sub> (Christiansen et al., 1998; Christiansen et al., 2000).

Un fenomeno comunemente osservato in diverse specie di pesci trattati con NP o con 17 $\beta$ -estradiolo è un aumento delle dimensioni delle cellule del Sertoli (Russell et al., 1990; Christiansen et al., 1998; Miles-Richardson et al., 1999; Bjerregaard et al., 2006; Kinnberg et al., 2000 a,b).

Per quanto nei mammiferi, i maggiori danni evidenziati in ratti esposti a NP sono principalmente a carico del sistema riproduttivo maschile, si è infatti osservata una riduzione della motilità degli spermatozoi, una perdita dell'integrità dell'acrosoma (Uguz et al., 2009), una riduzione del peso del testicolo e dell'epididimo (de Jager et al., 1999; Chitra et al., 2002), e un incremento di fenomeni apoptotici a carico delle cellule del Sertoli (Wang et al., 2003; Han et al., 2004).

In ratti trattati con NP si osserva inoltre un significativo decremento dei livelli degli enzimi antiossidanti superossido dismutasi, catalasi, glutadione reductasi e glutadione perossidasi. L'epididimo possiede infatti un sistema di difesa antiossidante per proteggere gli spermatozoi dallo stress ossidativo (Zini e Schlegel, 1997).

Un'altra conseguenza dell'esposizione al NP è la comparsa di strutture ovocita-simili nella compagine strutturale della gonade maschile, fenomeno questo riscontrato in molti pesci sottoposti a trattamento sperimentale con E<sub>2</sub> o NP (Shibata e Hamaguchi, 1988; Gray e Metcalfe, 1997; Kang et al., 2002; Zha et al., 2007) oppure in esemplari raccolti in natura in acque molto inquinate (Hashimoto et al., 2000; Viganò et al., 2001).

In maschi di rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) l'esposizione al 17 $\beta$ -estradiolo attraverso l'aggiunta di E<sub>2</sub> al cibo, altera fortemente la biosintesi di alcuni ormoni attraverso un considerevole decremento nell'espressione di alcuni enzimi chiave della steroidogenesi come *P450c17*, *3 $\beta$ HSD*, e *P45011 $\beta$*  (Govoroun et al., 2001), il medesimo effetto si osserva anche in ratti a cui stato somministrato oralmente NP (Kim et al., 2007).

È noto che la glucuronidazione e la solforazione sono i meccanismi di eliminazione degli ormoni attivi che generano un pool di ormoni coniugati che

possono essere escreti o riconvertiti nelle forme attive nei tessuti periferici. Il NP inibisce la glucoronidazione dell'estradiolo e del testosterone e la solforazione dell'estradiolo (Thibaut e Porte, 2004) aumentandone quindi la vita media.

In ratti esposti a NP è stato dimostrato che la secrezione di inibina dalle cellule del Sertoli e la secrezione di testosterone dalle cellule del Leydig risulterebbe inibita dal trattamento, e di conseguenza ciò provocherebbe un incremento di FSH e LH a causa dei mancati feedback negativi (Fan et al., 2001; Han et al., 2004).

È stato inoltre dimostrato che l'ingresso del NP nelle cellule del Sertoli potrebbe causare cambiamenti nelle caratteristiche biofisiche e nelle funzioni biochimiche della membrana. Infatti le cellule del Sertoli di ratto trattate con NP mostrano un potenziale di membrana anomalo con una precoce depolarizzazione per piccole dosi e un iperpolarizzazione dopo lunghi trattamenti con dosi più alte di NP. Inoltre studi sulle dinamiche di membrana indicano che il NP determina un incremento della fluidità della membrana e un decremento della viscosità e dell'ordine delle molecole. Per mezzo di saggi sulla lattato deidrogenasi e indagini condotte con un microscopio a forza atomica (AFM Atomic Force Microscope) è stato dimostrato che il NP incrementa la permeabilità della membrana e ne determina una disorganizzazione topografica (Gong et al., 2008).

Al di là del sistema riproduttivo sono riportate diverse istopatologie a carico del sistema epatico e renale. Negli epatociti dei maschi di pesce (rare minnow) esposti a NP e EE<sub>2</sub> è riportato un abbondante accumulo di lipidi (Zha et al., 2007). Le alterazioni più comuni riscontrate a seguito dell'esposizione a composti estrogenici nel rene sono la dilatazione dei glomeruli, degenerazione e fibrosi documentate in diverse specie di pesci (Wester e Canton 1986; Herman e Kincaid, 1988; Lange et al., 2001; Metcalfe et al., 2001; Weber et al., 2003). Inoltre l'esposizione a EE determina un accumulo di materiale amorfo e eosinofilo, il cui eccesso e accumulo nel plasma causa degenerazione in tutti gli organi e in particolare nei glomeruli dove il sangue viene filtrato (Van Den Belt et al., 2002; Weber et al., 2003; Zha et al., 2007).

## **Capitolo 5**

### *Scopo della ricerca*

I rettili hanno ricevuto recentemente poca attenzione riguardo gli effetti dell'esposizione agli inquinanti ambientali (Crain e Guillette, 1998; Guillette 2003) sebbene siano riconosciuti come indicatori della condizione dell'ecosistema e siano esposti ai contaminanti ambientali come le altre specie (Sparling et al., 2000; Guillette 2003). I rettili in generale rispetto agli altri vertebrati, non sembrano essere né più né meno colpiti da tali inquinanti, ma dal momento che la maggior parte di essi sono predatori o insettivori, possono essere esposti a elevati livelli di pesticidi che si bioaccumulano nella catena alimentare (Guillette et al., 2003).

Lo screening della vitellogenina (VTG) è ampiamente adoperato per monitorare lo stato dell'inquinamento da sostanze estrogeno-simili (Hashimoto et al., 2000; Bjerregaard et al., 2006). La VTG è una proteina che ben si presta a questo scopo: è infatti sintetizzata, sotto stimolo estrogenico, solo dal fegato dalle femmine dei vertebrati non mammiferi durante il periodo riproduttivo (Wallace, 1985). Pertanto, la sua comparsa nelle femmine durante il periodo non riproduttivo e nei maschi, è considerata biomarker dell'inquinamento ambientale (Palmer e Palmer, 1995; Sumpter e Jobling, 1995). È noto infatti che nei maschi il gene della *VTG* è silente, ma può essere attivato grazie alla somministrazione di estrogeni esogeni (Wallace 1985; Whali et al., 1988; Carnevali et al., 1991,1995; Cedrà et al., 1996; Kobayashi et al., 2005).

In tutti i vertebrati gli estrogeni sono essenziali per la regolazione dei processi riproduttivi ed il controllo di numerosi processi fisiologici; pertanto un'inconsueta presenza di estrogeni causa certamente un'alterazione dell'omeostasi endocrina.

La lucertola *Podarcis sicula* è un rettile oviparo, facilmente reperibile nelle regioni con clima temperato del centro e del sud Italia, che ben si presta allo scopo di tale ricerca. Gli esemplari si riproducono in primavera. Nel maschio la produzione di spermatozoi incomincia verso marzo e prosegue fino all'inizio di luglio, in tale periodo e in poche settimane, un grande quantitativo di

spermatozoi passano nei dotti dell'epididimo, dapprima nei duttuli e poi nel canale, per essere infine riversati all'esterno. Le cellule dei duttuli sono cubiche e ciliate; le cellule del canale dell'epididimo durante il periodo riproduttivo si presentano alte, spesso binucleate e secernenti, diversamente dal periodo non riproduttivo dove sono basse e non secernenti.

Nell'ovario della femmina durante il periodo riproduttivo (aprile-luglio) sono presenti ovociti previtellogenicici che a gruppi di 3 max 5 vengono di volta in volta reclutati per l'accrescimento vitellogenicico e l'ovulazione. Gli accoppiamenti avvengono in primavera e la femmina depone le uova in 3 o 4 ondate ovulatorie, tra aprile (fine) e luglio (inizio) (Ghiara et al.1968; Filosa, 1973; Romano e Limatola, 2000).

Partendo dalla conoscenza delle varie fasi della riproduzione del maschio e della femmina della lucertola *Podarcis sicula* e considerando che poco si conosce riguardo l'azione del NP sui vertebrati terrestri che possono essere esposti in natura all'azione dell'inquinante, ho formulato un'ipotesi di lavoro che ha avuto come obiettivo la valutazione delle interferenze di xeno-estrogeni e estrogeni durante il ciclo riproduttivo di tale vertebrato terrestre.

Primo passo è stato impostare un adeguato impianto sperimentale che permettesse di confrontare i risultati ottenuti trattando gli animali con estrogeni via i.p. con quelli ottenuti da animali alimentati da una dieta inquinata da NP. Tale impostazione sperimentale è stata ideata per cercare di riprodurre gli eventi naturali: pertanto gli animali sono stati alimentati con larve di *Tenebrio molitor* spruzzate con una soluzione acquosa di NP 0,25% e abbeverati con una soluzione di NP allo 0,05%. Per l'acqua da bere ho scelto di adoperare la stessa concentrazione consigliata come diluente di pesticidi in agricoltura. La preferenza di adoperare una concentrazione di NP più elevata per le larve è dettata dal fatto che i ripetuti trattamenti di terreni agricoli con pesticidi diluiti con NP, determinano certamente in natura un accumulo, con conseguente aumento della concentrazione cui sono esposti gli animali che vivono sullo stesso territorio. Ho inoltre considerato che le larve vive, essendo spruzzate fuori dai terrari, una volta dentro, strisciando sul terreno, si privano

parzialmente della soluzione di NP. Ho osservato che gli animali mangiassero e si abbeverassero regolarmente.

Mi sono quindi impegnata nel mettere a punto un protocollo ELISA che mi permettesse di quantizzare tale proteina nel plasma e di valutare il rapporto tra la concentrazione totale delle proteine plasmatiche e la VTG. È infatti noto nelle femmine dei vertebrati studiati, che gli estrogeni hanno un ruolo up-regolatorio per la sintesi di VTG nel periodo riproduttivo (breeding period) a discapito delle altre proteine plasmatiche (Follett e Redshaw, 1974; Gerstle e Callard, 1992; Selcer e Palmer, 1995).

La presenza del recettore degli estrogeni a livello epatico è una condizione indispensabile affinché si attui il processo vitellogenico. Gli estrogeni gonadici infatti, interagendo a livello epatico con i propri recettori citoplasmatici, determinano la trascrizione del gene che codifica per la VTG. Allo scopo quindi, di ottenere informazioni sulla localizzazione e comparsa temporale dei recettori degli estrogeni (ER) nel fegato di esemplari naturali e sperimentali, ho portato avanti indagini di immunocitochimica, utilizzando un anticorpo monoclonale contro tutta la forma  $\alpha$  del recettore degli estrogeni (disponibile in commercio), e indagini di tipo biomolecolare mediante analisi di espressione e reazioni di ibridazione *in situ*.

Nel maschio di *Podarvis* è noto il profilo degli estrogeni plasmatici fisiologicamente presenti nel ciclo riproduttivo naturale e il livello più elevato si riterrebbe responsabile della chiusura del periodo riproduttivo e dell'inizio della fase di refrattarietà.

È inoltre noto che gli estrogeni esogeni interferiscono con i cicli riproduttivi; i maggiori studi principalmente condotti su specie acquatiche o semi-acquatiche, naturalmente o sperimentalmente esposte a sostanze estrogeniche, hanno evidenziato un incremento di cellule germinali apoptotiche (Christiansen et al., 1998; Weber et al., 2002), un incremento del numero di Sertoli ipertrofiche (Kinnberg et al., 2000), e fenomeni di femminizzazione (Shibata e Hamaguchi, 1988; Gray e Metcalfe, 1997; Hashimoto et al., 2000; Viganò et al., 2001; Kang et al., 2002; Zha et al., 2007). In considerazione del fatto che gli estrogeni determinano alterazioni

morfologiche e fisiologiche delle gonadi, minacciando quindi la continuità della specie, ho rivolto l'attenzione alle gonadi dei maschi sperimentali.

Diversi studi condotti su topi ERKO dimostrano che la presenza di ER $\alpha$  nell'epididimo sia fondamentale per il riassorbimento dei fluidi provenienti dalla rete testis, ciò renderebbe gli spermatozoi più concentrati con un maggiore successo riproduttivo (Hess e Bunick, 2000). Allo scopo di ricercare se esiste una relazione tra ER e fertilità nell'epididimo, mediante indagini di immunocitochimica e di ibridazione *in situ* ho valutato la responsività dell'epididimo agli estrogeni durante il normale ciclo riproduttivo. Diverse evidenze dimostrano inoltre che gli estrogeni modulano l'espressione di ER $\alpha$  e ER $\beta$  (Castles et al., 1997). È stato osservato che per il recettore estrogeno  $\alpha$ , gli estrogeni determinano un incremento ligando dipendente nell'attività delle due distinte regioni del promotore (Castles et al., 1997). Considerando quindi che gli estrogeni e le sostanze estrogen-like inducono la sintesi del loro stesso recettore, ho valutato le variazioni dell'espressione del messaggero e della proteina di ER $\alpha$  a seguito dei trattamenti sperimentali.

## Capitolo 6

### Materiali e metodi

#### 6.1 Animali

Maschi e femmine di *Podarvis sicula* sono stati catturati nei dintorni di Napoli, mantenuti in terrari, alimentati *ad libitum* con larve di *Tenebrio molitor*, esposti a condizioni di temperatura ottimali, trattati sperimentalmente e sacrificati per decapitazione previa anestesia in ghiaccio. Prima del sacrificio, durante l'anestesia, sono stati prelevati, mediante puntura intracardiaca, campioni di sangue. Immediatamente dopo la decapitazione, da ciascun animale sono stati prelevati ovari, testicoli e fegato, una parte inclusa in paraffina per le analisi istologiche e una parte conservata a -80 C fino all'uso.

Il sangue, raccolto in eppendorf bagnate con citrato di sodio 3%, è stato centrifugato a 5000g per 10', separato il siero e conservato a -20 C previo aggiunta di cocktail di inibitore delle proteasi (5 $\mu$ M from Sigma Aldrich).

#### ✓ Maschi

Maschi adulti sono stati catturati all'inizio di maggio: alcuni trattati sperimentalmente con E<sub>2</sub> o NP come riportato in seguito, altri sono stati sacrificati come controllo alla fine del periodo sperimentale (Nm).

#### ➤ Trattamento con 17 $\beta$ -estradiolo (E<sub>2</sub>t)

Un gruppo di otto maschi è stato iniettato i.p. per due settimane a giorni alterni con 17 $\beta$ estradiolo (168ng/100 $\mu$ l) in soluzione fisiologica per rettili (NaCl 0.07‰): quattro animali sono stati sacrificati due giorni dopo due iniezioni, ricevendo una quantità minore di estrogeni (336 ng) (lE<sub>2</sub>t); gli altri quattro animali sono stati sacrificati due giorni dopo la settima iniezione, ricevendo così una quantità maggiore di estrogeni (hE<sub>2</sub>t) (1.178  $\mu$ g). Tre maschi sono stati iniettati con sola soluzione fisiologica come controllo.

#### ➤ Trattamento con nonilfenolo (NPt)

Otto maschi sono stati alimentati a giorni alterni per due settimane con larve di *Tenebrio molitor* spruzzate con una soluzione acquosa di nonilfenolo (NP) (Etravon-Syngenta, Italy) (0.25%) e abbeverati con acqua inquinata da una

soluzione di NP allo 0.05%. Tali animali sono stati sacrificati quindici giorni dopo l'inizio del trattamento.

Etravon è una soluzione commerciale acquosa di NP (20%). Parallelamente quattro animali hanno ricevuto acqua e cibo non inquinato e sacrificati come controllo.

#### ✓ **Femmine**

Un gruppo di otto femmine mature (Bf) e immature (If) (rispettivamente circa  $> 7$  e  $< 6$  centimetri muso-cloaca) sono state catturate all'inizio di maggio, nel pieno periodo riproduttivo. Un altro gruppo di otto femmine adulte è stato catturato a gennaio durante il periodo di stasi invernale (NBf) (Filosa, 1973).

#### ➤ **Trattamento con $17\beta$ -estradiolo ( $E_2f$ )**

Cinque femmine del periodo non riproduttivo (gennaio) sono state trattate con  $17\beta$ -estradiolo ( $10^{-3}M$ ) in soluzione fisiologica per rettili (NaCl 0.07‰) i.p. per due settimane a giorni alterni. Quattro femmine sono state iniettate con sola soluzione fisiologica come controllo.

#### ➤ **Trattamento con progesterone (Pf)**

Un gruppo di cinque femmine mature è stato iniettato i.p. nel pieno periodo riproduttivo con progesterone (P) ( $100\mu g/100\mu l$ ; Prontogest, IBSA, SW) in soluzione fisiologica per rettili (NaCl 0.07‰) a giorni alterni per due settimane. Quattro femmine sono state iniettate con sola soluzione fisiologica come controllo.

## **6.2 Microscopia ottica**

Testicoli e fegato appena prelevati sono immersi nel liquido di Bouin (71% Acido picrico, 24% Acido acetico, 5% Formaldeide) per circa 6h (Mazzi, 1974). Dopo lo schiarimento e la disidratazione i campioni vengono inclusi in paraffina a 55 C, affettati con un microtomo Reichert-Jung 2030 in sezioni di  $7\mu m$ . Alcune sezioni sono state colorate con la tricromica di Mallory modificata da Galgano (Mazzi, 1974).

### **6.3 Immunocitochimica**

Sezioni di testicoli e fegato inclusi in paraffina, sono state distese su vetrini polilisinati, sparaffinate e reidratate. Dopo cerchiatura con la Pap-pen, le sezioni sono state trattate con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> allo 0.3% per 5', Normal Goat Serum (Pierce) per 30', incubate con anticorpo primario over-night (o/n) a 4 C e poi con anticorpo secondario biotinilato per 1h. Il legame antigene anticorpo è stato successivamente rivelato con il metodo Immunopure ABC complex (Pierce) e Diamminobenzidina (DAB 2,5 mg/ml).

Per verificare la specificità della reazione, alcune sezioni di controllo sono state incubate omettendo l'anticorpo primario e trattando le sezioni solo con PB (pH 7.4). L'osservazione e le fotografie sono state effettuate al Microscopio Nikon-Microphot FXA2.

La presenza della VTG nel fegato è stata indagata utilizzando un anticorpo policlonale di *Podarvis* anti-VTG (1:1000 in PB) già disponibile nel nostro laboratorio e un anticorpo secondario anti-Rabbit (Pierce). Tali sezioni sono state contrastate con emallume di Mayer's per evidenziare i nuclei.

La presenza di recettori degli estrogeni nel fegato e nel testicolo, è stata indagata utilizzando: un anticorpo primario monoclonale anti-ER $\alpha$  (1:80 in PB) (Novocastra) e un anticorpo secondario anti-Mouse (1:500 in PB) (Pierce).

### **6.4 SDS-PAGE**

I campioni di plasma sono stati analizzati su SDS-PAGE dopo averne valutato la concentrazione proteica (BCA Protein Assay, Pierce). L'analisi elettroforetica del siero degli animali nelle differenti condizioni sperimentali è stata effettuata su un gel di poliacrilammide al 7.5%. Per ogni lane sono stati caricati 20 $\mu$ g di proteina; per la corsa elettroforetica è stato utilizzato un voltaggio costante di circa 35 Volt per gel.

I gel sono calibrati con i seguenti standard molecolari: Miosina 205 kDa,  $\beta$ -galattosidasi 116 kDa, Fosforilasi b 97 kDa, Albumina bovina 66 kDa, Ovalbumina 45 kDa, Anidrasi carbonica 29 kDa (SIGMA).

### **6.5 Western Blotting**

Dopo la corsa elettroforetica i gel vengono trasferiti su carta di nitrocellulosa (Schleicher e Schuell) per un'intera notte con voltaggio costante di 200mA (Transfer Kit Biorad). Dopo vari lavaggi in buffer salino (TBS pH 7.3-7.5), le bande vengono evidenziate sulla nitrocellulosa con Rosso Ponceau (0.4 gr in 200 ml TCA 3%).

Le membrane sono poste per una notte in Blocking Buffer (5 gr di latte Milupa HN25 in 100 ml di TBS pH 7.3-7.5), lavate con TBS e incubate con anticorpo primario anti-VTG (1:2000) per 1h. Dopo ripetuti lavaggi in TBS le strisce di nitrocellulosa sono incubate per 1h con anticorpo secondario biotinilato anti-Rabbit (1:500)(Pierce), lavate più volte con TBS e incubate con Ultra-sensitive ABC Staining Reagent (PIERCE) per 1h. Le proteine sensibili sono evidenziate aggiungendo substrato (20ml TBS + 5mg di Diamminobenzidina (DAB) + 20  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%) fino alla comparsa del colore. La reazione viene bloccata in H<sub>2</sub>O.

### **6.6 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)**

Il saggio ELISA è stato condotto come descritto da Porta et al., (1999), usando VTG purificata di *Podarvis* (Carnevali et al., 1991) e l'anticorpo omologo anti-VTG. Piastre di 96-pozzetti (Nunc Maxisorp Immuno Plate) sono state incubate o/n a 4 C con 50  $\mu$ l di VTG diluita serialmente (100-1 ng/well) per ottenere la curva di calibratura, o con 50  $\mu$ l di plasma di femmine del periodo riproduttivo, maschi naturali o E<sub>2</sub>t o NPt. La purificazione della VTG è stata condotta come descritto da Wiley e Wallace (1978) e titolata con saggio proteico BCA (Pierce, Rockford, USA). Tutte le diluizioni sono state fatte in buffer carbonato (7.3 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; 17.4 mM NaHCO<sub>3</sub>; 3 mM NaNH<sub>3</sub>). Le piastre sono lavate tre volte con EWB (Tris 20 mM; NaCl 130mM; Tween 20 0,05%; pH 7.3) e tre volte con TBS (Tris 20 mM; NaCl 0.5 M; pH 7.3) e incubate con blocking solution (BSA 0.5% in EWB) a 37 C per 1h. Le piastre sono state quindi lavate tre volte con EWB e TBS e incubate per 1h a 37 C con 60 $\mu$ l di *anti*-VTG (1:10,000 in EWB + BSA 0.25%). Dopo il lavaggio le piastre sono state incubate con 70 $\mu$ l di goat anti-rabbit IgG coniugato alla perossidasi

(Sigma Aldrich) (1:15,000 in EWB + BSA 0.25%) per 1h a 37 C. Dopo il lavaggio, alle piastre è stato aggiunto 100µl del substrato dell'enzima: 0,4% o-phenylenediaminedihydrochloride (OPD) (Sigma) in buffer fosfato-citrato pH 5.0, pipettato nei pozzetti (100 µl/well) appena subito dopo l'aggiunta di 2.8 µl/ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%, Sigma). La reazione enzimatica è stata condotta al buio per 15-20' a 37 C. La reazione è stata stoppata aggiungendo 50 µl di 2.5M acido solforico. L'assorbanza è letta a 492 nm in Multiscan Ascent (Thermo Electron Corporation). Ogni saggio è stato condotto in triplicato. Dai dati ottenuti è stata calcolata la media e la deviazione standard; Student's *t*-test è stato adoperato per determinare quale dei valori differisce significativamente dai controlli mentre per i gruppi multipli è stata effettuata l'analisi ANOVA (GraphPad Prism 5 software). La significatività dei test è accettata con  $p < 0.05$ .

## 6.8 Studi biomolecolari

### A- Isolamento del cDNA di ER $\alpha$ , ER $\beta$

Campioni di ovario da femmine del periodo riproduttivo sono stati omogenati in Trizol (Sigma) in accordo con le istruzioni riportate dalla casa produttrice. L'integrità, la purezza e la concentrazione degli RNA totali sono state verificate allo spettrofotometro e mediante elettroforesi su gel di agarosio all'1%. Gli RNA totali sono stati retro-trascritti usando AffinityScript kit. La reazione di RT è condotta usando una mix di 25 pmol di primer, in accordo con la casa produttrice (Stratagene). Le sequenze dei primer che amplificano cDNA per ER $\alpha$  di *Podarcis* sono state disegnate sulle sequenze note dei rettili *Crocodylus niloticus* [GenBank accession number AB209933], *Cnemidophorus uniparens* [acc. numb. AB055221] e *Anolis carolinensis* [acc. numb AF095911]. Le sequenze dei primer senso e antisenso sono 5'ACTCCATGATCAGGTCC ATCTGCT3' e 5'TGCTCCATTCCTTTATTGCTCATGTGC3', rispettivamente.

I primer che amplificano cDNA per ER $\beta$  di *Podarcis* sono stati disegnati sulle sequenze di *Eublepharis maculatus* [acc. numb. AB240529] e *Trachemis scripta* [acc. numb DQ 848988]. Le sequenze dei primer senso e antisenso sono

5'ACTCCATGATCAGGTCCATCTGCT3' e 5'TGCTCCATTTCCTTTATTGCTCATGTGC3', rispettivamente.

Il cDNA è stato usato come template nella reazione di PCR (volume finale 25 µl). La mix di reazione contiene 0.5 µM di ogni primer, 1.5 unità di *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen), 1X PCR buffer, 0.2 mM di ogni dNTP e 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>. Il ciclo termico della PCR è il seguente: 4 min a 94 C; 38 cicli di 30 sec a 94 C, 40 sec a 55 C (*ERα*) o 40 sec a 48 C (*ERβ*), o 40 sec a 54 C (*VTG*) 1 min a 72 C; 7 min a 72 C. I prodotti di PCR sono stati valutati su gel di agarosio 0.8% e visualizzati con bromuro di etidio. I frammenti amplificati sono stati eluiti da gel (gel extract mini kit, 5-Prime) come da data-sheet, quantificati, sequenziati con BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) e processati con ABI PRISM 310 Genetic Analyzer. Le sequenze nucleotidiche ottenute sono state analizzate con BLASTN per individuare la similarità, e allineate con ClustalW2.

#### **B-** *Inserzione in vettore plasmidico*

I frammenti di *ERα* e *ERβ* sono stati clonati nel vettore p-GEM-Teasy (Promega). La reazione di ligasi è stata condotta o/n come da protocollo sperimentale.

#### **C-** *Trasformazione e crescita batterica*

Tutta la reazione di ligasi è stata aggiunta alle cellule batteriche (*E.coli* DH5α) scongelate per 15 min in ghiaccio. Per la trasformazione tale mix è stata lasciata 5 min a 37 C e per 2 min in ghiaccio. Sono stati quindi aggiunti 800 µl di LB e incubati per un'ora a 37 C a forte agitazione. La sospensione batterica è stata poi centrifugata per 5 min a 6000 g e il pellet batterico è stato risospeso in 100µl di LB. La crescita dei batteri trasformati è avvenuta su piastre di agar ampicillina, IPTG(isopropil-β-D-tio-galattopiranoside) X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galattopiranoside) a 37 C per circa 16 ore. Al termine dell'incubazione è stato fatto lo screening delle colonie bianche e blu. Sono state prelevate solo le colonie bianche (che potenzialmente presentano i

batteri che hanno inglobato il plasmide con l'inserto) e fatte crescere in 5ml di LB con ampicillina a 37 C per circa 16 ore a forte agitazione.

#### **D- Estrazione di DNA plasmidico: mini-prep**

L'estrazione del DNA plasmidico è stata effettuata prelevando 5ml di terreno di coltura e centrifugando a 13.000g per 2min. La reazione di mini-prep è stata condotta secondo le istruzioni della casa produttrice (Sigma). Per il controllo della lunghezza del frammento clonato un'aliquota di mini-prep è stata digerita con EcoRI per 1,30 h a 37 C. Il prodotto della digestione e parte della mini-prep è stato poi valutato su gel di agarosio all'1%. Il frammento clonato è stato purificato come da protocollo (BigDye Terminator v1.1; Applied Biosystems) e sequenziato con con BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems).

#### **E- Analisi di espressione**

RNA totale è stato estratto da fegato di maschi e femmine nelle diverse condizioni sperimentali. Tutti gli RNA sono stati retro-trascritti e amplificati per PCR come da protocollo descritto prima. La subunità 18S del ribosomale di *Podarcis* è stata usata come controllo interno del cDNA (senso 5'GGACACGGGAAAGGTTTGACA3' e antisenso 5'AGGGACTTAATCAACGCGAGC3'; gentilmente donati dalla Dot.ssa R. Scudiero).

Per escludere eventuali contaminazioni da DNA genomico, una reazione di RT di controllo è stata condotta omettendo l'enzima e successivamente amplificata per PCR nelle stesse condizioni precedenti.

#### **F- Costruzione della sonda molecolare a cDNA**

La sonda per *ERa* è stata marcata per PCR mediante l'utilizzo di nucleotidi marcati con digossigenina (Roche).

#### **G- Ibridazione in situ (ISH)**

Per l'ISH è stata utilizzata vetreria rigorosamente sterile e la preparazione delle soluzioni ha previsto l'utilizzo di acqua autoclavata con

aggiunta di Dietil-Ammino-Pirocarbonato (DEPC, 1:1000). Le osservazioni sono state effettuate al microscopio ottico Nikon microphot FXA.

Sezioni di fegato e testicolo di maschi naturali, NPt o E<sub>2</sub>t, sparaffinate e idratate sono state processate nel seguente modo:

- ✓ Lavaggio in Buffer Phosphato Salino (PBS 1X) (137mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Sodium Phosphate dibasic, 2 mM Potassium Phosphate monobasic, pH7,4) per 5';
- ✓ Fissazione in paraformaldeide 4% in PBS 1X per 30';
- ✓ Lavaggio in PBS 1X per 5';
- ✓ Incubazione con Proteinasi K 10 µg/mL in TrisHCl 20mM pH7,2, EDTA 1mM, a 37 C per 10';
- ✓ Lavaggio in PBS 1X per 5';
- ✓ Lavaggio in SSC 2X per 5';
- ✓ Lavaggio in Tris/glicina buffer per 30';

Preibridazione: le sezioni sono state incubate con il buffer di preibridazione (Formammide 50%, SSC 4X, t-RNA 100µg/mL, ss-DNA 100µg/mL, Denhardt's 1X) e mantenute in camera umida per 1h a 50 C per ER $\alpha$ .

Ibridazione: le sezioni sono state incubate con la sonda Dig-DNA-ER $\alpha$  diluita nel buffer di preibridazione e denaturata per 5' a 95 C. l'incubazione è stata effettuata o/n a 50 C per ER $\alpha$ .

Post-ibridazione: le sezioni vengono sottoposte ad una serie di lavaggi in:

- ✓ SSC 2X per 5';
- ✓ SSC 2X e Formammide 50% per 30';
- ✓ SSC 1X e Formammide 50% per 30';
- ✓ SSC 0,5X e Formammide 50% per 15';
- ✓ SSC 2X per 30'

Rivelazione:

Incubazione con Blocking Solution 2% in acido maleico 1X per 1h, incubazione con anti-Dig (1:2500) in Blocking Solution o/n a 4 C.

Lavaggio in buffer NTP (Tris-HCl 100mM pH 7.5, NaCl 150 mM) per 20'; lavaggio in buffer NTM (Tris-HCl 100mM pH 9.5, MgCl 50 mM, NaCl

100mM). Rivelazione con 50  $\mu$ L di BCIP e 37,5 $\mu$ L di NBT in 10 mL di NTM in camera buia.

La reazione è stata bloccata in Tris-HCl 0.1M pH 7.5 ed i vetrini sono stati montati con Aquovitrex (Carlo Erba).

Il controllo della reazione è stato effettuato su sezioni gemelle omettendo l'incubazione con la sonda molecolare.

## **Capitolo 7**

### *Risultati*

#### **7.1 Vitellogenina come biomarker**

##### *Immunocitochimica*

Le indagini di immunocitochimica dimostrano la presenza di irVTG nel fegato delle femmine del pieno periodo riproduttivo. Nelle femmine non riproduttive e/o immature e nei maschi non trattati non è presente nessuna positività. Nel maschi alimentati con NP si osserva immunoreattività all'anti-VTG nel fegato così come si verifica dopo somministrazione di E<sub>2</sub> (Fig.1)

##### *Western Blotting*

Tra le proteine plasmatiche risultano positive all'anti-VTG due bande con peso molecolare di circa 205 e 116 kDa sia negli animali sottoposti ad una dieta inquinata da NP sia, come atteso negli animali E<sub>2</sub>t e nelle femmine del pieno periodo riproduttivo (Fig.2). Nessuna reazione è evidente nei maschi non trattati, nelle femmine del periodo non riproduttivo e nelle femmine immature (Fig.2).

##### *ELISA*

La concentrazione di VTG, misurata con saggio ELISA nel plasma dei maschi NP<sub>t</sub>, è risultata circa la metà  $4.28 \pm 1.72 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  di quella presente negli animali E<sub>2</sub>t  $8.69 \pm 1.53 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  questi ultimi hanno mostrato una concentrazione di VTG quasi pari a quella rilevata per le femmine durante il pieno periodo riproduttivo (maggio)  $8.87 \pm 2.15 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Un piccolissima quantità di VTG è stata registrata anche nei maschi controllo  $0.34 \pm 0.08 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  (Fig. 3A). La sensibilità del saggio è  $0.01 \text{ ng}/\mu\text{L}$ . L'inter-assay misurato è 3.5% per NP<sub>t</sub>; 5.8% per E<sub>2</sub>t; 6% per le femmine del periodo riproduttivo; 1.7% per i maschi

controllo. L'intra-assay è 7%; NPt 3.4%; per E<sub>2</sub>t; 1% per le femmine del periodo riproduttivo; 4 % per i controlli.

La percentuale di VTG calcolata rispetto al totale delle proteine plasmatiche è circa 37% in NPt, 60% in E<sub>2</sub>t, 77% nelle femmine del periodo riproduttivo, 3% nei maschi controllo (Fig. 3B)

## **7.2 Espressione dei recettori degli estrogeni**

### *Immunocitochimica*

Sulle sezioni istologiche di fegato delle femmine del periodo riproduttivo è evidente immunopositività all'anti-ER $\alpha$  in tutte le cellule. Nessuna reazione è evidente nei maschi naturali. Nei maschi NPt e E<sub>2</sub>t è sempre visibile positività all' anti-ER $\alpha$  (Fig. 4).

### *Sequenziamento di ER $\alpha$ e ER $\beta$ da ovario di Podarcis*

Allo scopo di isolare il cDNA dei ERs di *Podarcis*, i primers disegnati sono stati saggiati sull'mRNA totale di ovario di una femmina del periodo riproduttivo. La reazione di amplificazione mostra la presenza di un frammento di 430bp per i primers ER $\alpha$  e 130bp per ER $\beta$  (Fig.5). L'analisi BLAST dei due frammenti rivela similarità (87% - 80%) con la maggior parte delle sequenze di ER $\alpha$  (Fig. 6A-B) e ER $\beta$  (Fig. 7A-B) note per altri rettili. Tali sequenze parziali sono state annotate in banca dati (Accession No. AB482182 per ER $\alpha$  e Accession No. AB482181 per ER $\beta$ ). Inoltre il confronto della dedotta sequenza amminoacidica del frammento ER $\alpha$  di *Podarcis* mostra un'elevata similarità (99% -91%) con il dominio che lega il ligando (E) di ER $\alpha$  di molti rettili e dell'uomo (Fig.8).

### *Analisi di espressione di ER $\alpha$ e ER $\beta$ nel fegato*

L'analisi di espressione di ER $\alpha$  e ER $\beta$  è stata condotta nel fegato dei maschi e delle femmine nelle differenti condizioni sperimentali. Ogni prodotto di PCR ottenuto nel fegato è stato sequenziato e ha mostrato la stessa identità

di sequenza trovata nell'ovario: il frammento di 430bp corrisponde a *ERa* e quello di 130bp a *ERβ*.

Nel fegato dei maschi naturali è espresso solo *ERβ*. Nei maschi trattati con una minore o maggiore quantità di estrogeni compare l'espressione di *ERa* accanto a *ERβ*. Lo stesso risultato è evidente per i maschi NPt (Fig.9).

Nel fegato delle femmine del pieno periodo riproduttivo (maggio) *ERa* e *ERβ* sono co-espressi, mentre nel periodo non riproduttivo così come nelle femmine immature è espresso esclusivamente *ERβ*. Nelle femmine trattate con  $E_2$  nel periodo non riproduttivo (gennaio), compare l'espressione *ERa* accanto a *ERβ*, mentre nelle femmine trattate con progesterone nel periodo riproduttivo *ERa* scompare e il fegato esprime esclusivamente *ERβ* (Fig.10).

#### *ISH fegato*

Le indagini di *ISH* condotte con la sonda omologa per *ERa* ha mostrato che il messaggero per *ERa* è assente nel fegato dei maschi naturali e compare solo dopo trattamento con NP o  $E_2$ (Fig. 11).

### **7.3 Alterazioni morfo-funzionali nel ciclo riproduttivo**

Le indagini di microscopia ottica su testicoli di *Podarcis* colorati con la tricromia di Mallory hanno evidenziato, come è noto durante il periodo riproduttivo, una forte attività spermatogenetica nei tubuli seminiferi dove sono evidenti quasi tutti gli stadi meiotici, spermatozoi liberi nel lume e spazi intertubulari popolati da numerose cellule di Leydig. All'inizio della stasi invernale i tubuli seminiferi presentano cellule germinali, con rari spermatozoi nel lume (Fig. 12).

L'epididimo parallelamente al testicolo, è molto attivo durante il periodo riproduttivo: le cellule dei duttuli appaiono ciliate, le cellule del canale si presentano alte, spesso binucleate e piene di granuli di secreto, e il lume del canale è pieno del secreto delle cellule misto a numerosi spermatozoi. Nel periodo non riproduttivo le cellule del canale sono basse, mono-nucleate e non secernenti (Fig. 12).

Il trattamento con NP nel periodo riproduttivo mostra un rallentamento della spermatogenesi con una netta diminuzione delle cellule germinali all'interno dei tubuli e una riduzione dello spessore dell'epitelio seminifero. Numerosi spazi vuoti sono inoltre evidenti tra le cellule germinali (Fig. 13A). Alcuni tubuli presentano un lume ampio, altri presentano all'interno cellule germinali immature e alcune cellule del Sertoli appaiono ipertrofiche. Diversi spermatidi rotondi si mostrano positivi alla Tunel e quindi apoptotici (Fig. 15A).

Le cellule del canale epididimale sono regredite, basse e completamente non secernenti; nel lume del canale sono presenti rari spermatozoi e nei duttuli cellule germinali immature in espulsione (Fig.13B).

Negli animali trattati con E<sub>2</sub> è alterata la struttura della maggior parte dei tubuli. I tubuli più danneggiati appaiono circondati da un abbondante tessuto connettivo (evidente iperplasia del connettivo) popolato da cellule immuno-like e l'epitelio seminifero è rappresentato quasi esclusivamente da spermatogoni e cellule del Sertoli talvolta ipertrofiche: frammiste alle poche cellule germinali, si evidenziano inoltre strutture oocyte-like che tra l'altro si presentano immunoreattive per ER $\alpha$  ma positive alla Tunel (apoptotiche). In altri tubuli il lume è ampio e alcuni spermatidi rotondi e allungati sono disordinatamente inframmezzati ad alcuni spermatociti (Fig 14A).

Nell'epididimo sono evidenti pochissimi spermatozoi e molte cellule germinali immature dai tubuli seminiferi; il canale è privo di secreto con cellule basse e non secernenti (Fig. 14B).

#### *ISH testicolo*

L'indagine di *ISH* condotta con la sonda omologa per *ER $\alpha$*  ha mostrato che mRNA-*ER $\alpha$*  è localizzato essenzialmente negli spoermatociti I e II durante il periodo riproduttivo; nel periodo di chiusura (fine giugno) si mostrano positivi spermatogoni e spermatociti I (Fig.16 A-B).

Il trattamento con NP o con E<sub>2</sub> nel pieno periodo riproduttivo induce la presenza di ER $\alpha$  anche a livello di tutte le cellule alla base del tubulo (i.e. spermatogoni, spermatociti I e II) (Fig. 16 C-D).

## **7.4 Epididimo e ER $\alpha$**

### *Immunocitochimica*

L'immunolocalizzazione di ER $\alpha$  nell'epididimo degli animali naturali nel pieno periodo riproduttivo (maggio) ha mostrato nelle cellule dei duttuli efferenti la presenza di irER $\alpha$ , assenti nel periodo di stasi invernale (novembre). Le cellule del canale e della coda appaiono leggermente positive soltanto a fine giugno-inizio luglio (fase di attività testicolare decrescente) (Fig.17).

L'epididimo di animali trattati con NP (Fig.19 A1) o con E<sub>2</sub> (Fig.19 B1) durante il periodo riproduttivo, mostra positività sia a livello dei duttuli efferenti sia del canale.

### *ISH epididimo*

mRNA per ER $\alpha$  è evidente nei duttuli e nella coda dell'epididimo durante il periodo riproduttivo, nessuna reazione è evidente nel canale (Fig 18 A-B). All'inizio del primo periodo di stasi (fine giugno) le tre regioni dell'epididimo appaiono positive (Fig. 18 C-D).

In NPt il canale dell'epididimo è positivo mentre alcuni duttuli appaiono privi di mRNA per ER $\alpha$  (Fig. 19 A2). In E<sub>2</sub>t il canale e i duttuli appaiono positivi (Fig. 19 B2).

## **Capitolo 8**

### *Discussione*

Gli estrogeni giocano un ruolo di rilievo tra gli ormoni richiesti per la sintesi della VTG. Tale proteina, è prodotta dal fegato delle femmine dei vertebrati non mammiferi solo durante il periodo riproduttivo, quando i livelli di estrogeni prodotti dalle gonadi sono molto elevati. Il gene della *VTG* nei maschi di tutte le specie studiate è assolutamente silente, ma può essere attivato solo dopo esposizione sperimentale a estrogeni (Wallace 1985; Whali et al., 1988; Carnevali et al., 1991, 1995; Cedrà et al., 1996; Kobayashi et al., 2005). È proprio per questo motivo che oggi, la presenza della VTG nel plasma di maschi e di femmine immature o del periodo non riproduttivo, è considerata biomarker dell'inquinamento ambientale da sostanze estrogeniche (Christiansen et al., 1998; Kloas, 1999; Kinnberg et al., 2000; Tada et al., 2004; Kobayashi et al., 2005; Lutz et al., 2005) e pertanto diverse specie, in particolare acquatiche, conquistano l'appellativo di bio-indicatori di habitat inquinati.

I risultati di questo lavoro di ricerca dimostrano che nei maschi della lucertola *Podarcis sicula*, una dieta inquinata da NP induce la presenza sia di irVTG nel plasma e nel fegato e la comparsa di ER $\alpha$  nel fegato dei maschi trattati sia con NP o con E<sub>2</sub>. Ciò conferma da un lato la capacità di E<sub>2</sub> di indurre la presenza della VTG nei maschi, come già precedentemente descritto per questa specie (Carnevali et al., 1999), dall'altro dimostra l'effetto estrogen-like del NP in questo animale terrestre ed evidenzia che la presenza della VTG immunoreattiva nelle cellule epatiche è parallela alla presenza di ER $\alpha$ . Pertanto la VTG può essere considerata come valido biomarker anche in *Podarcis*. È noto che nel fegato di maschi di pesci e anfibi, il NP è in grado di indurre la trascrizione dei geni responsivi agli estrogeni: è riportato infatti che il NP stimola la trascrizione del mRNA per *ER* e questa induzione è seguita dalla comparsa del mRNA per la *VTG* (Kloas, 1999; Yadetie et al., 1999; Lutz et al., 2005; Sabo-Attwood et al., 2007).

La concentrazione di VTG plasmatica, determinata per mezzo di un saggio ELISA, è risultata essere nei maschi NPt circa la metà di quella presente negli animali E<sub>2</sub>t e questi ultimi hanno mostrato una concentrazione di VTG quasi pari a quella misurata per le femmine del pieno periodo riproduttivo (maggio). Anche se l'impianto sperimentale non permette di fare un diretto confronto di dosi tra NP assunto con la dieta e E<sub>2</sub> iniettati, è evidente che il NP induce la presenza di VTG nel fegato e nel plasma dei maschi così come gli estrogeni; si potrebbe comunque ipotizzare che la differenza tra i valori di VTG registrati per gli animali NPt e E<sub>2</sub>t potrebbe essere ascritta alla differente potenza estrogenica NP < E<sub>2</sub> (da 1000 a 10000 volte minore degli estrogeni naturali) riportata in altre specie (Kuiper et al., 1998; Weber et al., 2003; Miura et al., 2005).

In *Podarcis* è stata documentata la presenza di due bande immunoreattive alla VTG di peso molecolare di circa 205 kDa nelle femmine del periodo riproduttivo e nei maschi trattati con estrogeni (Carnevali et al., 1991). Le due bande di peso molecolare di 116 kDa potrebbero invece rappresentare o un'accidentale rottura della VTG nativa essendo questa naturalmente sensibile ad una scissione proteolitica immediatamente dopo l'uptake da parte dell'ovocita (Limatola et al., 2001), oppure potrebbero suggerire che la VTG di 116 kDa potrebbe essere il prodotto dell'espressione di geni differenti come descritto in un'altra lucertola *Anolis pulchellus* (Morales et al., 1996).

I dati sperimentali in *Podarcis* dimostrano che il rapporto tra la concentrazione totale delle proteine plasmatiche e la VTG si sposta in favore della VTG nelle femmine naturali del pieno periodo riproduttivo e ciò si verifica anche nei maschi trattati sperimentalmente con NP o E<sub>2</sub>.

Nelle femmine dei vertebrati studiati, gli estrogeni hanno un ruolo up-regolatorio per la sintesi di VTG a discapito delle altre proteine plasmatiche (Follett e Redshaw, 1974; Gerstle e Callard, 1992; Selcer e Palmer, 1995). Gli estrogeni destabilizzano gli mRNA che codificano per le proteine seriche (come l'mRNA per l'albumina) mentre stabilizzano l'mRNA che codifica per le proteine che saranno impacchettate nelle uova (vitellogenina, apolipoproteina)

(McKnight e Palmiter, 1979; Margot e Williams, 1996; Dodson e Shapiro, 2000; Ratna e Oyeamalu, 2002).

Condizione indispensabile affinché avvenga la sintesi di VTG nelle femmine è la presenza del recettore degli estrogeni. Infatti il complesso estrogeno-recettore, interagendo con il responsive element presente sul gene che codifica per la VTG, ne determina la trascrizione. Nei vertebrati sono state identificate due forme di recettori degli estrogeni, ER $\alpha$  e ER $\beta$  che interagiscono a formare omodimeri o eterodimeri (Cowley et al., 1997; Pettersson et al., 1997). È noto anche che nel fegato dei maschi trattati con estrogeni l'attività trascrizionale dei geni per ERs precede quella del gene per la VTG (Pakdel et al., 1991; Flouriot et al., 1996) e i siti di legame degli estrogeni incrementano prima dell'accumulo della VTG (McKay e Lazier, 1993). Sebbene ER $\alpha$  e ER $\beta$  siano spesso co-espressi, non è univoco il contributo di ciascun tipo nella sintesi della VTG. In particolare nelle femmine di rainbow trout una piccola isoforma epatica di ER $\alpha$  è stata messa in relazione con la vitellogenesi (Menuet et al., 2001). Nelle stessa specie invece la mancata inibizione della sintesi di VTG, determinata da un'antagonista di ER $\alpha$ , ha suggerito che la produzione di VTG sia mediata da ER $\beta$  (Leonos-Castaneda et al., 2007). In esemplari immaturi di goldfish l'esposizione al 17 $\beta$ -estradiolo e al NP induce la presenza di VTG incrementando i livelli trascrizionali epatici di ER $\beta$ -1 (Soverchia et al., 2005), mentre in un tritone (Iberian ribbed), studi di RT-PCR hanno evidenziato il trascritto di ER $\alpha$  a livello epatico, suggerendo la sua implicazione nella vitellogenesi (Ko et al., 2008). In *Podarcis* dai risultati esposti è evidente la presenza di irER $\alpha$  nel fegato delle femmine vitellogeniche naturali e nei maschi trattati con E<sub>2</sub> o con NP. Nulla è noto in *Podarcis* riguardo l'espressione dei ERs. L'identificazione di sequenze parziali per entrambi ER $\alpha$  e ER $\beta$  dimostra che entrambi sono espressi in questa specie. Inoltre, l'osservazione che la sequenza ottenuta di ER $\alpha$  presenta un'omologia del 93% con la sequenza di ER $\alpha$  umano, valida l'utilizzo di anti-ER $\alpha$  umano nelle descritte indagini di immunocitochimica.

Il frammento riconosciuto come ER $\alpha$  è stato identificato come parte del dominio del recettore che lega il ligando, per ER $\beta$  invece l'esigua lunghezza

del frammento (130bp) non ha permesso di accertare il dominio di appartenenza.

Pur essendo noti in alcuni rettili i due tipi di recettori degli estrogeni e talune sequenze parziali di essi, in nessuna specie la loro presenza è stata relazionata al processo di sintesi della VTG.

I risultati sperimentali ottenuti dall'analisi di espressione rivelano che nella lucertola *Podarvis* *ERa* è necessario per la sintesi della VTG. Infatti nel fegato delle femmine, *ERa* è naturalmente espresso accanto ad *ERβ* solo durante il periodo riproduttivo ed è completamente assente nelle femmine non riproduttive, nelle immature e nei maschi naturali e la sua espressione è indotta nei maschi solo dopo il trattamento sperimentale con  $E_2$  o NP. *ERβ* invece è costantemente espresso sia nelle femmine sia nei maschi indipendentemente dal momento riproduttivo e dal trattamento. L'espressione differenziale di *ERa* è allineata con la presenza di VTG nel fegato e nel plasma degli stessi animali e suggerisce una netta correlazione tra il recettore *ERa* e la sintesi di VTG. È inoltre evidente che il NP al pari di  $E_2$  è responsabile dell'induzione dell'espressione di *ERa*. Anche l'ISH condotta con la sonda omologa per *ERa* su fegato di maschi ha dimostrato l'assenza del messaggero negli esemplari in natura (controllo) e la comparsa a seguito di trattamento con NP o  $E_2$ .

La capacità degli estrogeni di indurre l'espressione epatica del loro stesso recettore è documentata nei maschi di pesci e in una tartaruga (Pakdel et al., 1997; Custodia-Lora et al., 2004a). In *Podarvis* è noto da precedenti studi che nelle femmine del periodo riproduttivo, i livelli di  $E_2$  plasmatici raggiungono il loro massimo (circa 4 ng/mL) ad ogni ondata ovulatoria contemporaneamente al picco di VTG plasmatica, mentre nelle femmine del periodo non riproduttivo la quantità massima di  $E_2$  è circa 1.2 ng/mL (Carnevali et al., 1991); nei maschi il livello massimo di  $E_2$  è riportato essere circa 1.8 ng/mL ed è riscontrato solo nel periodo di refrattarietà (post-riproduttivo) (Angelini e Botte 1992). È possibile pertanto ipotizzare in via speculative che l'espressione di *ERa* sia regolata da elevati livelli di estrogeni circolanti e che l'espressione di *ERβ* possa essere costitutiva o indotta da un livello soglia di estrogeni.

Riguardo il ruolo di  $ER\beta$ , è possibile ipotizzare che questa forma di recettore sia implicata nella modulazione della risposta vitellogena. È infatti noto che quando  $ER\alpha$  e  $ER\beta$  sono co-espressi, l'eterodimero  $ER\alpha/ER\beta$  è in grado di antagonizzare la trascrizione dei geni  $ER\alpha$ -dipendente, o di incrementare la degradazione proteolitica di  $ER\alpha$  (Paech et al., 1997; Liu et al., 2002; Lindberg et al., 2003; Matthews et al., 2006), è possibile quindi che in questo modo sia modulata la trascrizione del gene della  $VTG$  e quindi ne sia regolata la sintesi in *Podarcis*; indagini di Real Time PCR o al limite valutazioni semi-quantitative potrebbero contribuire a chiarire tale aspetto.

Oltre al ruolo permissivo degli estrogeni nella sintesi di  $VTG$  è altrettanto noto il ruolo inibente del progesterone (P) in tale processo (Ho et al., 1981; Limatola et al., 1989; Prisco et al., 2008). I risultati sperimentali in *Podarcis* nelle femmine trattate con  $E_2$  nel periodo non riproduttivo, dimostrano che compare l'espressione di  $ER\alpha$  accanto a  $ER\beta$ , mentre nelle femmine trattate con P nel pieno periodo riproduttivo, l'espressione di  $ER\alpha$  scompare. La perdita dell'espressione di  $ER\alpha$  nelle femmine trattate con P durante il periodo riproduttivo, sottolinea ancora una volta che tale forma del recettore è necessaria per la sintesi epatica di  $VTG$  e indica il ruolo negativo operato dal P (Ho et al., 1981; Limatola et al., 1989; Prisco et al., 2008).

Questo lavoro sperimentale dimostra come sostanze xeno-estrogeniche al pari degli estrogeni inducano nel fegato e nel plasma la presenza di  $VTG$  nei maschi che si dimostra essere un biomarker anche in questa specie terricola. Nelle diverse specie studiate sono altrettanto noti i danni indotti dagli  $E_2$  o xeno-estrogeni nel ciclo spermatogenetico. Uno degli obiettivi di questo lavoro sperimentale è stato quello di valutare in che modo le interferenze estrogeniche nel ciclo riproduttivo della lucertola *Podarcis* potessero minacciare la continuità della specie. Il ciclo riproduttivo del maschio di *Podarcis* prevede un periodo di attiva spermatogenesi da aprile fino alla fine di giugno a cui fa seguito un periodo di attività decrescente e di stasi fino ai primi di agosto. A ottobre c'è una leggera ripresa senza rilascio di spermatozoi, ancestrale ricordo di una doppia attività spermatogenetica, seguita un periodo di quiescenza invernale

correlata anche al rallentamento metabolico cui questi rettili vanno incontro nei mesi invernali (Galgano e D'Amore, 1953).

Dai risultati esposti si evidenzia che il trattamento sperimentale con una dieta inquinata da NP determina alterazioni del testicolo della lucertola *Podarvis* durante il pieno periodo riproduttivo. Nei tubuli più danneggiati, si osserva un rallentamento della spermatogenesi, in particolare la struttura testicolare appare simile a quella degli animali che vanno verso la refrattarietà. I numerosi spazi vuoti evidenti tra le cellule germinali sono da riferirsi al mancato rimpiazzo di cellule dalla base del tubulo. Inoltre tra le poche cellule germinali presenti, gli spermatidi rotondi, apparentemente in buono stato, si mostrano invece apoptotici. E' stato suggerito che gli estrogeni sono responsabili della chiusura dei cicli riproduttivi e dell'instaurarsi della refrattarietà, agendo sia direttamente sulle gonadi che indirettamente sull'asse ipotalamo-ipofisi (Polzonetti-Magni et al., 1984; Varriale et al., 1986). Tali alterazioni appaiono dunque ascrivibili all'attività estrogen-like del NP.

La presenza di soli spermatozoi e Sertoli in molti tubuli, a seguito di trattamento con  $E_2$ , è indice del blocco della spermatogenesi come accade alla fine del periodo riproduttivo quando i livelli plasmatici di  $E_2$  sono al massimo riscontrabile nei maschi (Angelini e Botte, 1992). La presenza di strutture oocyte-like nella compagine strutturale della gonade maschile, è riportata in molti pesci sottoposti a trattamento sperimentale con  $E_2$  o NP (Shibata e Hamaguchi, 1988; Gray e Metcalfe, 1997; Blazquez et al., 1998; Kang et al., 2002; Zha et al., 2007) oppure in esemplari esposti in natura ad acque inquinate come in *Pleuronectes yokohamae* che popola le acque della Baia di Tokyo (Hashimoto et al., 2000) e in Italia nel ciprinide *Barbus plebejus* nel fiume Po (Viganò et al., 2001). La comparsa di strutture ovocita simili è stata descritta anche nel testicolo di *Podarvis* a seguito di trattamento con un antagonista del GnRH (Ciarcia et al., 1983). Un evento simile si è osservato anche in embrioni maschi di quaglia dove solo gli  $E_2$  diversamente dal NP ne inducono la presenza (Razia et al., 2006). È interessante notare che nei nostri esperimenti queste strutture sono apoptotiche e positive per  $ER\alpha$  e sono evidenziabili solo a

seguito di trattamento con E<sub>2</sub> e non con NP, cosa che potrebbe ulteriormente corroborare la minore azione estrogenica del NP rispetto agli E<sub>2</sub>.

Nelle specie studiate la comparsa di strutture oocyte-like, è comunque indice di squilibrio dell'omeostasi endocrina e l'espressione di geni determinanti per lo sviluppo della gonade è fortemente influenzata dagli ormoni. In un teleosteo (*Oreochromis niloticus*), è stato dimostrato che l'espressione di *tDMRT1* decresce in maschi cui è stata indotta inversione sessuale mediante E<sub>2</sub> (Kobayashi et al., 2008), ma molte specie di teleostei sono caratterizzati da ermafroditismo sincrono o sequenziale. Nei maschi di pulcino tra i vertebrati superiori a sessi separati, il trattamento con E<sub>2</sub> a tre giorni di età, favorisce la down-regulation dell'ormone anti-Mulleriano (AMH) e la comparsa di oocyte-like nel testicolo (Stoll et al., 1993). Al momento nella lucertola *Podarcis*, diventa piuttosto difficile sulla base delle sole osservazioni morfologiche dare una spiegazione della comparsa di tali strutture.

Un'osservazione costante negli esemplari trattati con NP o con E<sub>2</sub> è relativa alle dimensioni delle Sertoli che appaiono ipertrofiche. In molti teleostei, è stata descritta ipertrofia delle cellule del Sertoli indotta dal NP o dal 17β-estradiolo correlata ad un incremento della loro attività fagocitaria (Russell et al., 1990; Christiansen et al., 1998; Kinnberg et al., 2000 a,b; Miura et al., 2005; Bjerregaard et al., 2006).

Nel testicolo di svariati vertebrati compreso l'uomo è inoltre ampiamente documentata la presenza di ERs (Aquila et al., 2002; Choi e Habibi, 2003; Lambard et al., 2003; Wu et al., 2003; Gist et al., 2007).

Ad oggi l'unico recettore degli estrogeni immunolocalizzato nel testicolo di *Podarcis sicula* a livello di spermatogoni, spermatociti, spermatidi e Sertoli è il sottotipo β (Chieffi e Varriale, 2004). I risultati sperimentali di questo lavoro di tesi ottenuti mediante ISH dimostrano che durante il pieno periodo riproduttivo l'mRNA per ERα è localizzato solo a livello degli spermatociti I e II, mentre alla chiusura (giugno-luglio) mRNA-ERα è evidente oltre che negli spermatociti I anche nelle cellule basali del tubulo seminifero (i.e. spermatogoni). Il trattamento con NP o con E<sub>2</sub> nel pieno periodo riproduttivo induce la presenza di ERα anche a livello di tutte le cellule alla base del tubulo

(i.e. spermatogoni, spermatociti I e II). È noto in questa specie che gli estrogeni sono responsabili delle mitosi spermatogoniali (Angelini e Botte, 1992; Chieffi et al., 2002).

Appare dunque chiaro che entrambi i trattamenti inficiano sostanzialmente il delicato equilibrio endocrino della gonade maschile determinando in alcuni casi inibizione della spermatogenesi proprio durante il periodo degli accoppiamenti, ciò di conseguenza si traduce in un minore successo riproduttivo e quindi in una seria minaccia per la continuità delle singole specie.

L'epididimo è un dotto convoluto nel quale passano gli spermatozoi prima di essere riversati all'esterno e proprio nei rettili è stato per la prima volta identificato come un carattere sessuale secondario dipendente dalla secrezione interna del testicolo (Padoa, 1933). La morfologia delle cellule caratterizza i diversi tratti del dotto epididimale. In *Podarcis* i piccoli duttili efferenti presentano cellule cubiche e ciliate; di seguito le cellule del canale si presentano ciclicamente secernenti alte e spesso binucleate durante il periodo riproduttivo e basse e non secernenti durante il periodo non riproduttivo. Le cellule della coda sono larghe, basse e non secernenti e delimitano un lume molto ampio. Il periodo di massima attività dell'epididimo corrisponde al periodo degli amori e alla massima attività spermatogenetica, in particolare il lume del canale è pieno di spermatozoi e del secreto prodotto in gran quantità dalle cellule ghiandolari del canale (Galgano e D'Amore, 1960).

In conseguenza dei trattamenti sperimentali con NP o con E<sub>2</sub> si è osservata una regressione del canale epididimale paragonabile a quella del periodo non riproduttivo con cellule basse e completamente non secernenti.

Nel tratto riproduttivo maschile anche l'acqua gioca un ruolo importante. Nei tubuli seminiferi, l'acqua è secreta nel lume dalle cellule del Sertoli allo scopo di creare un ambiente fluido essenziale per il mantenimento della spermatogenesi e il trasporto degli spermatozoi fuori dal testicolo. Nei duttili efferenti, collegati alla rete testis dell'epididimo, più del 90% dei fluidi testicolari sono riassorbiti. Questo processo sembra indispensabile per concentrare gli spermatozoi come passo iniziale per promuovere la fertilità e la

motilità nel momento in cui gli spermatozoi attraversano l'epididimo (Hess et al., 2002). Nell'epididimo, l'acqua funge da veicolo per il passaggio degli spermatozoi attraverso i dotti convoluti (Setchell et al., 1969). Pare che una condizione indispensabile per il corretto funzionamento dell'epididimo sia da ascrivere alla presenza di ER $\alpha$  nei duttuli efferenti. I maggiori studi in tale direzione sono condotti in mammiferi e dimostrano come nei roditori gli estrogeni siano responsabili della regolazione dell'espressione delle aquaporine, ciò ha quindi lasciato ipotizzare che tali ormoni possano partecipare al riassorbimento dei fluidi nel tratto riproduttivo maschile. Tale ipotesi è confermata dal fatto che topi knockout per il gene *ER $\alpha$*  risultano sterili con una notevole riduzione della aquaporine nei duttuli efferenti (Rutz et al., 2006).

Dalle osservazioni di ICC e ISH nell'epididimo nel ciclo naturale, appare evidente che nei duttuli efferenti ER $\alpha$  è presente solo durante il periodo riproduttivo ed è assente nel periodo di stasi invernale (novembre); nel canale invece ER $\alpha$  è assente nel periodo riproduttivo e comincia ad essere presente nel periodo di attività decrescente del testicolo (fine giugno-inizio luglio) e la stessa situazione è riscontrata nelle cellule della coda. La differente comparsa temporale di ER $\alpha$  nell'epididimo di *Podarvis* suggerisce che tale forma del recettore possa giocare anche in questa specie, come osservato per i mammiferi (Krange et al., 1998; Lee et al., 2000), un ruolo di rilievo nel processo di rilascio degli spermatozoi, assicurando di conseguenza un migliore successo riproduttivo. Il trattamento sperimentale con NP durante il periodo riproduttivo induce la presenza di irER $\alpha$  nel canale, ciò che appare inficiato è invece la trascrizione del mRNA per ER $\alpha$  nei duttuli efferenti. Il trattamento con 17 $\beta$ -estradiolo nel periodo riproduttivo determina positività per l'anticorpo anti-ER $\alpha$  in tutto l'epididimo e non appare inficiata la trascrizione del mRNA-ER $\alpha$  che al contrario di quanto accade naturalmente, appare molto attiva nel canale. Pertanto è possibile ipotizzare che i ER $\alpha$  nel canale siano influenzati dalla quantità di estrogeni circolanti, che è fisiologicamente la più alta a fine giugno nei maschi naturali (Angelini e Botte, 1992) quando gli animali si avviano alla chiusura del loro periodo riproduttivo e che possano essere indotti sperimentalmente dal NP o da E<sub>2</sub> durante il periodo riproduttivo. Il quadro

indotto dal NP o da  $E_2$  è pertanto simile a quello osservato negli animali verso la fine del periodo riproduttivo naturale.

La comparsa di  $ER\alpha$  nelle cellule del canale nei maschi naturali è parallela al primo periodo di stasi (fine giugno) e la sua comparsa potrebbe essere messa in relazione con l'inibizione della capacità secernente delle cellule di tale compartimento. Infatti il trattamento con NP o con  $E_2$  nel pieno periodo riproduttivo, determina la comparsa di  $ER\alpha$  nel canale e inficia la secrezione delle cellule ghiandolari di tale compartimento.

In conclusione i risultati ottenuti dimostrano che:

- nel maschio della lucertola *Podarcis sicula* il NP ha un'azione estrogen-like e al pari degli  $E_2$  determina la comparsa nel fegato e nel plasma di irVTG e l'espressione di  $ER\alpha$  nelle cellule epatiche;
- nel fegato delle femmine durante il periodo riproduttivo e dei maschi sperimentali l'espressione differenziale di  $ER\alpha$  è sempre parallela alla sintesi di VTG nel fegato.  $ER\beta$  è invece sempre espresso in tutte le condizioni sperimentali e negli esemplari naturali maschi o femmine;
- nelle femmine durante il periodo non riproduttivo il trattamento con  $E_2$  induce il fegato a trascrivere  $ER\alpha$  mentre il trattamento con P durante il periodo riproduttivo ne inibisce la trascrizione;
- il NP o il  $17\beta$ -estradiolo interferiscono nel ciclo riproduttivo di *Podarcis*. In particolare entrambi i trattamenti durante il periodo riproduttivo determinano un rallentamento della spermatogenesi, con comparsa di cellule apoptotiche nei tubuli seminiferi; un quadro più drammatico si è osservato negli esemplari trattati con  $E_2$  dove si evidenzia la presenza di strutture oocyte-like all'interno del tubulo;
- anche la fisiologia dell'epididimo è alterata dai trattamenti: esso infatti si mostra inibito nella sua funzione secernente e assume l'aspetto tipico del periodo non riproduttivo.
- Contestualmente è stata dimostrata la presenza di  $ER\alpha$  nei duttuli efferenti solo durante il periodo riproduttivo e una possibile inibizione della secrezione del canale a seguito dei trattamenti sperimentali.

## Bibliografia

**Acevedo R, Parnell PG, Villanueva H, Chapman LM, Gimenez T, Gray SL, Baldwin WS.** The contribution of hepatic steroid metabolism to serum estradiol and estriol concentrations in nonylphenol treated MMTVneu mice and its potential effects on breast cancer incidence and latency. (2005). *J. Appl. Toxicol.* 25, 339-53.

**Ahel M., McEvoy J., Giger W.** Bioaccumulation of the lipophilic metabolites of non-ionic surfactants in freshwater organisms. (2003). *Environmental Pollution* 9, 244-56.

**Ahel M, Giger W, Koch M.** Behavior of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment 1. Occurrence and transformation in sewagetreatment. (1994a). *Water Res* 28, 1131–42.

**Ahel M, Scully FE, Hoigne J, Giger W.** Photochemical degradation of nonylphenol and nonylphenol polyethoxylates in natural-waters. (1994b). *Chemosphere* 28, 1361–8.

**Ahel M., Giger W.** Partitioning of alkylphenols and alkylphenol polyethoxylates between water and organic solvents. (1993). *Chemosphere*, 26, 1471-8.

**Ahmed S, Javed MA, Tanvir S, Hameed A.** Isolation and characterization of a *Pseudomonas* strain that degrades 4-acetamidophenol and 4-aminophenol. (2001). *Biodegradation* 12, 303–9.

**Allen E, Doisy EA.** An ovarian hormone. Preliminary report on its localization, extraction and partial purification, and action in test animals. (1923). *JAMA* 81, 819-21.

**Amadasi A., Mozzarelli A., Meda C., Maggi A., Cozzini P.** Identification of xenoestrogens in food additives by an integrated in silico and in vitro approach. (2009). *Chem Res Toxicol* 22, 52-63.

**Andreuccetti P, Taddei C, Filosa S.** Intercellular bridges between follicle cells and oocyte during the differentiation of follicular epithelium in *Lacerta sicula* Raf. (1978). *J Cell Sci* 33, 341-50.

**Angelini F., Botte V.** Spermatogenesis in reptiles, dynamic and regulatory aspect. (1992) In: Dallai, R, Eds. *Sex origin and Evolution*. Mucchi Selected Symposia and Monographs UZI, Modena, Italy, pp. 211–30.

**Angelini F., Picariello O.** The course of spermatogenesis in Reptilia. (1975). *Atti Accad. Sci. Fis mat., serie 3<sup>a</sup>, IX*, 61-108.

**Anonymous.** Demand increase for nonylphenol in China. (2004). *Focus Surfactants*. 3.

- Anonymous.** Nonylphenol. (2001). Chem Mark Rep 260, 31.
- Aquila S, Sisci D, Gentile M, Middea E, Siciliano L, Andò S.** Human ejaculated spermatozoa contain active P450 aromatase.(2002). J Clin Endocrinol Metab 87, 3385-90.
- Arenas MI, Royuela M, Lobo MV, Alfaro JM, Fraile B, Paniagua R.** Androgen receptor (AR), estrogen receptor-alpha (ER-alpha) and estrogen receptor-beta (ER-beta) expression in the testis of the newt, *Triturus marmoratus marmoratus* during the annual cycle. (2001). J Anat. 199, 465-72.
- Arukwe A, Goksovr A, thibaut R, Cravedi JP.** Metabolism and organ distribution of nonylphenol in Atlantic salmon (*Salmo salar*). (2000). Mar. Environ Res 50, 141-45.
- Asplund L, Athanasiadou M, Sjödin A, Bergman Å & Börjesson H.** Organohalogen substances in muscle, egg and blood from healthy Baltic salmon (*Salmo salar*) and Baltic salmon that produced offspring with the M74 syndrome. (1999). Ambio, 28, 67-76.
- Attal J,** Levels of testosterone, androstenedione, estrone and oestradiol-17 $\beta$  in the testes of the fetal sheep. (1969). Endocrinology 85, 280-9.
- Ayotte P, Dewailly E, Ryan JJ, Bruneau S, Lebel G.** PCBs and dioxin-like compounds in plasma of adult Inuit living in Nunavik (Arctic Quebec). (1997). Chemosphere, 34, 1459-68.
- Barber LB, Thurman EM, Schroeder MP, Leblanc DR.** Long-term fate of organic micropollutants in sewage-contaminated groundwater. (1988). Environ Sci Technol 22, 205-11.
- Barton MC, Shapiro DJ.** Transient administration of estradiol-17 beta establishes an autoregulatory loop permanently inducing estrogen receptor mRNA. (1988). Proc Natl Acad Sci USA 85, 7119-23.
- Baulieu EE, Binart N. Cadepond F, Catelli MG, Chambraud B, garnier J, gasc JM, Groyer-Schweizer G, Oblin ME, Radanyi C, et al.** Receptor-associated nuclear proteins and steroid/antisteroid action. (1990). Ann NY Acad Sci 595, 300-15.
- Beato M.** Gene regulation by steroid hormones. (1989). Cell. 56, 335-44.
- Bennett ER, Metcalfe CD.** Distribution of alkylphenol compounds in Great Lakes sediments, United States and Canada. (1998). Environ Toxicol Chem, 17, 1230-35.
- Bergink E, Wallace RA.** Precursor product relationship between Amphibian vitellogenin and the yolk proteins, lipovitellin and phosvitin. (1974). J Biol Chem 249, 2897-03.

**Bester K, Theobald N, Schroder HF.** Nonylphenols, nonylphenol-ethoxylates, linear alkylbenzenesulfonates (LAS) and bis (4-chlorophenyl)-sulfone in the German Bight of the North Sea. (2001). *Chemosphere* 45, 817–26.

**Beyers M, Kuiper GG, Gustafsson JA, Park-Sarge OK.** Estrogen receptor beta mRNA expression in rat ovary: down-regulation by gonadotropins. (1997). *Mol Endocrinol* 11, 172-82.

**Bignert A, Olsson M, Persson W, Jensen S, Zakrisson S, Litzén K, Eriksson U, Håggberg L, Alsberg T.** Temporal trends of organochlorines in Northern Europe, 1967-1995. Relation to global fractionation, leakage from sediments and international measures. (1998). *Environ Pollut*, 99, 177-98.

**Bjerregaard LB., Madsen AH., Korsgaard B., Bjerregaard P.** Gonad histology and vitellogenin concentrations in brown trout (*Salmo trutta*) from Danish streams impacted by sewage effluents. (2006). *Ecotoxicology* 15, 315-27.

**Boehm KD, Hood RL and Ilan J.** Induction of vitellogenin in primary monolayer cultures cockerel hepatocytes. (1987). *Proc Natl Anat Sci USA* 8, 3450-54.

**Borrell A, Aguilar A.** DDT and PCB pollution in blubber and muscle of long-finned pilot whales from the Faroe Islands. (1993). In: Donovan GP, Lockyer CH, Martin AR, Eds. *Biology of Northern Hemisphere Pilot Whales*. Cambridge, U.K. International Whaling Commission, pp. 351-58.

**Bosma TNP, Middeldorp PJM, Schraa G, Zehnder AJB.** Mass transfer limitation of biotransformation: quantifying bioavailability. (1997). *Environ Sci Technol* 31, 248–52.

**Bouma J, Nagler JJ.** Estrogen receptor-alpha protein localization in the testis of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during different stages of the reproductive cycle. (2001). *Biol Reprod* 65, 60-5

**Boyce-Derricot, J., Nagler, J.J., Cloud, J.G.** Regulation of hepatic estrogen receptor isoform mRNA expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). (2009). *Gen Comp Endocrinol* 161,73-8.

**Britt KL, Kerr J, O'Donnell L, Jones ME, Drummond AE, Davis SR, Simpson ER, Findlay JK.** Estrogen regulates development of the somatic cell phenotype in the eutherian ovary. (2002). *FASEB* 16, 1389-97.

**Brooke, L.; Thursby, G.** Ambient aquatic life water quality criteria for nonylphenol. (2005). Washington DC, USA: Report for the United States EPA, Office of Water, Office of Science and Technology.

**Brunner P.H., Capri S., Marcomini A., Giger W.** Occurrence and behavior of linear alkylbenzenesulphonates, nonylphenol, nonylphenol mono- and

nonylphenol diethoxylates in sewage and sewage sludge treatment. (1988). *Water Res*, 22, 1465.

**Burley RW, Cook WH.** Isolation and composition of avian egg yolk granules and their constituent alpha and beta lipovitelline. (1961). *Can J Biochem Physiol* 39, 1295-07.

**Callard IP, Doolittle WL and Chan SW.** Recent studies on the control of reptilian ovarian cycle. (1972). *Comp. Biochem. Physiol. Supp.*3, 65-75.

**Callard IP, Riley D, Perez L.** Vertebrate vitellogenesis: molecular model for multihormonal control of gene regulation. (1990). *Progress in Comp Endocrinol* 342, 343-48.

**Callard IP, Ziegler H.** Inhibitory effects of prolactin upon gonadotropin-stimulated ovarian growth on the iguanid lizard, *Disosaurus dorsalis*. (1970). *J. Endocrinol.* 47, 131-32.

**Campbell P.** Alternatives to nonylphenol ethoxylates. Review of toxicity, biodegradation & technical-economic aspects. (2002). *Tox Ecology Environmental Consulting*, Vancouver, B.C., Canada. Report for Environment Canada.

**Carnevali O., Sabbietti MG., Mosconi G., Polzonetti-Magni AM.** Multihormonal control of vitellogenin mRNA expression in the liver of frog, *Rana esculenta*. (1995). *Mol. Cell. Endocrinol.* 114: 19-25.

**Carnevali O, Mosconi G, Yamamoto K, Kobayashi T, Kikuyama S, Polzonetti-Magni AM.** In-vitro effects of mammalian and amphibian prolactins on hepatic vitellogenin synthesis in *Rana esculenta*. (1993). *J Endocrinol* 137(3):383-89.

**Carnevali O, Mosconi G, Roncarati A, Belvedere P, Romano M, Limatola E.** Changes in the electrophoresis pattern of yolk proteins during vitellogenesis in the Gilthead sea bream, *Sparus aurata* L. (1992). *Comp Biochem Physiol* 103, 955-62.

**Carnevali O, Belvedere P.** Comparative studies of Fish, Amphibian and Reptilian vitellogenins. (1991). *J Exp Zool* 259, 18-25.

**Carson-Jurica MA, Schrader WT, O'Malley BW.** Steroid receptor family: structure and functions. (1990). *Endocr Rev* 11, 201-220.

**Casajuana N, Lacorte S.** New methodology for the determination of phthalate esters, bisphenol A, bisphenol A diglycidyl ether, and nonylphenol in commercial whole milk samples. (2004). *J. Agric Food Chem* 52, 3702-3707.

**Castles CG, Oesterreich S, Hansen R, Fuqua SA.** Auto-regulation of the estrogen receptor promoter. (1997). *J steroid Biochem Mol Biol* 62, 155-63.

**CCME** (Canadian Council of Ministers of the Environment). Canadian soil quality guidelines for the protection of environment and human health: nonylphenol and its ethoxylates. (2002). Canada: Quebec.

**Cedrà J, Bruce BG, LaFleur GJ Jr, Limesand S.** Pattern of vitellogenin and follicle maturational competence during the ovarian follicular cycle of *Fundulus Heteroclitus*. (1996). Gen. Comp. Endocrinol. 103: 24-35.

**Celius T, haugen TB, Grotmol T, Walther BT.** A sensitive zonagenetic assay for rapid in vitro assessment of estrogenic potency of xenobiotics and mycotoxins. (1999). Environ Health Perspect. 107, 63-68.

**Chieffi P, Varriale B.** Estrogen receptor beta localization in the lizard (*Podarcis s. sicula*) testis. (2004) Zygote. 12, 39-42.

**Chieffi P, Colucci D'Amato L, Guarino F, Salvatore G, Angelini F.** 17 beta-estradiol induces spermatogonial proliferation through mitogen-activated protein kinase (extracellular signal-regulated kinase 1/2) activity in the lizard (*Podarcis s. sicula*). (2002). Mol Reprod Dev.61, 218-25.

**Chitra KC, Latchoumycandane C, Mathur PP.** Effect of nonylphenol on the antioxidant system in epididymal sperm of rats. (2002). Arch Toxicol. 76, 545-51.

**Choi CY, Habibi HR.** Molecular cloning of estrogen receptor alpha and expression pattern of estrogen receptor subtypes in male and female goldfish. (2003). Mol. Cell. Endocrinol. 204, 169-177.

**Christiansen T, Kinnberg K, Bjerregaard P, Korsgaard B.** Gamma-Glutamyl transpeptidase as a possible marker of Sertoli cells in fish testes for studies of xenoestrogens. (2000). Mar Environ Res. 50, 213-6.

**Christiansen T, Korsgaard B, Jespersen A.** Effects of nonylphenol and 17 $\beta$ -oestradiol on vitellogenin synthesis, testicular structure and cytology in male eelpout *Zoarces viviparous*. (1998). Journal of Experimental Biology 201, 179-92.

**Churc G.** The reproductive cycles of the javanese house geckos *Cosimbotus platyurus*, *Hemidactylus frenatus* and *Peroptus mutilates*. (1962). Copeia, 262-69.

**Ciarcia G, Angelini F, Botte V.** Effects of a chronic treatment with the luteinizing hormone-releasing hormone agonist, buserlin, on the gonads of the lizard *Podarcis sicula* Raf. (1983). Atti della Accademia nazionale dei lincei.425-29.

**Clarkson TW.** Environmental contaminants in the food chain. (1995). Am J Clin Nutr.61, 682-6S.

**Claus R, Dimmick MA, Gimenez T, Hudson LW.** Estrogens and prostaglandin F(2)alpha in the semen and blood plasma of stallions. (1992). Theriogenology 38, 687-93.

**Colburn T.** Animal health connection. (1993). In: Proceeding of the US Environmental Protection Agency's National Technical Workshop "PCBs" in Fish Tissue," EPA/823-R-93-003" U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC.

**Coldham NG, Sivapathasundaram S, Dave M, Ashfield LA, Pottinger TG, Goodall C, et al.** Biotransformation, tissue distribution, and persistence of 4-nonylphenol residues in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). (1998). Drug Metab Dispos 26, 347-54.

**Cornwall GA, Hann SR.** Specialized gene expression in the epididymis. (1995). J Androl. 16, 379-83. Review.

**Corsi SR, Zitomer DH, Field JA, Cancilla DA.** Nonylphenol ethoxylates and other additives in aircraft de-icers, anti-icers, and waters receiving airport runoff. (2003). Environ Sci Technol 37, 4031-7.

**Couse JF, Yats MM, Walker VR, Korach KS.** Characterization of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in estrogen receptor (ER) null mice reveals hypergonadism and endocrine sex reversal in females lacking ER $\alpha$  but not ER $\beta$ . (2003). 17, 1039-53.

**Couse JF, Korach KS.** Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? (1999). Endocr Rev 20, 358-17.

**Coweley SM, Hoare S, Mosselman S, Parker MG.** Estrogen receptors alpha and beta form heterodimers on DNA. (1997). J Biol Chem 272, 19858-62.

**Crain DA, Guillette LJ Jr.** Reptiles as models of contaminant-induced endocrine disruption. (1998). Anim Reprod Sci 53: 77-86.

**Custodia-Lora N, Novillo A, Callard IP.** Effect of gonadal steroids on progesterone receptor, estrogen receptor, and vitellogenin expression in male turtles (*Chrysemys picta*). (2004). J. Exp. Zool. A Comp. Exp. Biol. 301, 15-25

**Custodia-Lora N, Novillo A, Callard I.P.** Regulation of hepatic progesterone and estrogen receptors in the female turtle, *Chrysemys picta*: relationship to vitellogenesis. (2004). Gen Comp Endocrinol 136, 232-240.

**Custodia-Lora N, Callard I.P.** Seasonal changes in hepatic progesterone receptor mRNA, estrogen receptor mRNA, and vitellogenin mRNA in the painted turtle, *Chrysemys picta*. (2002). Gen Comp Endocrinol 128, 193-04

**Cutler GB Jr.** The role of estrogen in bone growth and maturation during childhood and adolescence. (1997). J Steroid Biochem Mol Biol.61, 141-4. Review.

**Daland R. Juberg A.** An evaluation of Endocrine Modulators: Implications for Human Health. (1999). Ecotoxicology and Environmental Safety, 45, 93-05.

**Danzo BJ, Eller BC, Judy LA, Trautman JR, Orgebin-Crist MC.** Estradiol binding in cytosol from epididymides of immature rabbits. (1975). *Mol Cell Endocrinol.* 2, 91-05.

**Danzo BJ, St Raymond PA, Davies J.** Hormonally responsive areas of the reproductive system of the male guinea pig III. Presence of cytoplasmic estrogen receptors. (1981) *Biol Reprod.* 25,1159-68.

**Davis LK, Pierce A.L, Hiramatsu N, Sullivan C.V.** Gender-specific expression of multiple estrogen receptors, growth hormone receptors, insulin-like growth factor and vitellogenins, and effects of 17 $\beta$ -estradiol in the male tilapia (*Oreochromis massambicus*). (2008). *Gen Comp Endocrinol* 156, 544-51.

**de Jager C, Bornman MS, van der Horst G.** The effect of p-nonylphenol, an environmental toxicant with oestrogenic properties, on fertility potential in adult male rats. (1999). *Andrologia.* 31, 99-06.

**Dechering K, Boersma C, Mosselman S.** Estrogen receptors alpha and beta: two receptors of a kind? (2000) *current med chem.* 7(5), 561-76.

**Deeley RG, Mullinix KP, Wetekam W, Kronenberg HM, Meyers M, Eldridge JD, Goldberger RF.** Vitellogenin synthesis in the avian liver: vitellogenin is the precursor of the egg yolk phosphoproteins. (1975). *J Biol Chem* 250:9060-66.

**Denger S, Reid G, Brand H, Kos M, Gannon F.** Tissue-specific expression of human ER $\alpha$  and ER $\beta$  in the male. (2001). *Mol Cell Endocrinol* 178, 155-60.

**Directive 2000/60/EC.** Establishment and framework for community action in the field of water policy. Luxembourg, Luxembourg; European Parliament and the Council of the European Union; 2000

**Directive 2003/53/EC.** Amending for the 26th time the Council directive 76/769/EEC relating to restrictions on the marketing and use of certain dangerous substances and preparations (nonylphenol, nonylphenol ethoxylate and cement). Luxembourg, Luxembourg; European Parliament and the Council of the European Union; 2003.

**Dodson RE, Shapiro DJ.** Regulation of pathway of mRNA destabilization and stabilization. (2002). *Prog Nucleic Acids Res* 72, 129-64.

**Dodds E.C, Lawson W.** Synthetic estrogenic agents without the phenanthrene nucleus. (1936). *Nature.* 137, 996.

**Dufaure JP, Mak P, Callard IP.** Estradiol binding activity in epididymal cytosol of the turtle, *Chrysemys picta*. (1983) *Gen Comp Endocrinol.* 51, 61-5.

**Dupont S, Krust A, Gansmuller A, Dierich A, Chambon P, Mark M.** Effect of single and compound knockouts of estrogen receptors  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) and  $\beta$  (ER $\beta$ ) on mouse reproductive phenotypes. (2000). *Development* 127, 4277-91.

**Eddy EM, Todd F.** Targeted disruption of the estrogen receptor gene in male mice causes alteration of spermatogenesis and infertility. (1996). *Endocrinology* 137, 4796-05.

**Eddy EM, Washburn TF, Bunch DO, Goulding EH, Gladen BC, Lubahn DB, Korach KS.** Targeted disruption of the estrogen receptor gene in male mice causes alteration of spermatogenesis and infertility. (1996). *Endocrinology* 137, 4796-805.

**EEC directive 2003/53/ec** of the European parliament and of the council of 18 June 2003 amending for the 26th time Council Directive 76/769/EEC relating to restrictions on the marketing and use of certain dangerous substances and preparations (nonylphenol, nonylphenol ethoxylate and cement), Official Journal L 178 17-7-2003 .

**Ekelund R, Bergman A, Granmo A, Berggren M.** Bioaccumulation of 4-nonylphenol in marine animals a re-evaluation. (1990). *Environ. Pollut.* 64, 107-20.

**Enmark E, Huikko P, Grandien K, Lagercrantz S, Lagercrantz J, Fried G, Nordenskjold M, Gustafsson JA.** Human estrogen receptor  $\beta$ -gene structure, chromosomal localization and expression pattern. (1997). *Journal of clinical Endocrinology and Metabolism.* 82, 4258-65.

**Evans RM.** The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. (1988). *Science* 240, 889-95.

**Facemire CF.** The impact of agricultural chemicals on wetland habitats and associated biota with special reference to migratory birds: A selected and annotated bibliography. (1991) *Agric. Exp. Sta. Publ. No. 708*, South Dakota State University, Brookings, pp. 65.

**Fan Q, Li W, Shen L, Din X.** The effects of nonylphenol on the reproductive functions of male SD rats. (2001). *J Health Toxicol* 15, 225-51.

**Fängström B, Athanasiadou M, Grandjean P, Weihe P & Bergman Å.** Hydroxylated PBC metabolites in serum from pregnant Faroese women. (2002). *Environ Health Perspect* (In press).

**Fernandes AR, Rose M, Charlton C.** 4-Nonylphenol (NP) in food contact materials: analytical methodology and occurrence. (2008). *Food Addit Contam* 25, 364-72.

**Ficht HS.** Reproductive cycles in lizard and snakes. (1970). *Misc. Publ. Univ. Kansas Mus. nat. Hist.*, 52, 1-247.

**Fiege H, Voges H-W, Hamamoto T, Umemura S, Iwata T, Miki H, et al.** **Phenol derivatives.** *Ullmann's Encyclopaedia of Industrial Chemistry* (2000). John-Wiley and Sons Inc. ([http://www.mrw.interscience.wiley.com/emrw/9783527306732/ueic/article/a19\\_313/current/html](http://www.mrw.interscience.wiley.com/emrw/9783527306732/ueic/article/a19_313/current/html)).

**Fielden MR, Chen I, Chittim B, safe SH, Zacharewski TR.** Examination of the estrogenicity of 2,4,6,2',6'-pentachlorobiphenyl (PCB 104), its hydroxylated metabolite 2,4,6,2',6'-pentacloro-4biphenylol (HO-PCB 104), and a further chlorinated derivate, 2,4,6,2',4',6',-hexachlorobiphenyl (PCB 155). (1997). Environ Health Perspect 105, 1238-48.

**Filosa S.** Biological and cytological aspects of the ovarian cycle in *Lacerta s. Raf.* (1973). Monitore zoologico italiano. 7,151-65.

**Fisher CR, Graves KH, Parlow AF, Simpson ER.** Characterization of mice deficient in aromatase (ArKO) because of targeted disruption of the cyp19 gene. (1998). Proc Natl Acad Sci USA 85, 6965-70.

**Fitzpatrick DW, Picken CA, Murphy LC, Buhr MM.** Measurement of the relative binding affinity of zearalenone, alpha-zearalenol and beta-zearalenol for uterine and oviduct estrogen receptors in swine, rats and chickens: an indicator of estrogenic potencies. (1989). Comp Biochem physiol C 94, 691-4.

**Flötotto T, Niederacher D, Hohmann D, Heimerzheim T, Dall P, Djahansouzi S, Bender HG, Hanstein B.** Molecular mechanism of estrogen receptor (ER)alpha-specific, estradiol-dependent expression of the progesterone receptor (PR) B-isoform. (2004). 88, 131-42.

**Flouriot G, Brand H, denger S, Metiver R, Kos M, Reid G, Sonntag-Buck V, Gannon F.** Identification of a new isoform of the human estrogen receptor-alpha (HER-alpha) that is encoded by distinct transcripts and that is able to repress hER-alpha activation function 1. (2000). 19, 4688-00.

**Flouriot, G., Pakdel, F., Voltaire, Y.** Transcriptional and post-transcriptional regulation of rainbow trout estrogen receptor and vitellogenina gene expression. (1996). Mol Cell Endocrinol 124, 173-83.

**Flouriot, G., Pakdel, F., Ducouret, B., Voltaire, Y.** Influence of xenobiotics on rainbow trout liver estrogen receptor and vitellogenin gene expression. (1995). J Mol Endocrinol 15,143-51.

**Follett B.K. and Redshaw M.R.** The physiology of vitellogenesis. In "physiology of Amphibian". (1974). (B. Loft, Ed.), Vol II, 218-308. Academic Press, New Yprk.

**Forman BM, Samuels HH.** Dimerization among nuclear hormone receptors. (1990). New boil 2, 587-94.

**Forster C, Makela S, Warri A, Kiets S, becker D, Hultenby K, Warner M, Gustafsson JA.** Involvement of estrogen receptor beta in terminal differentiation of mammary gland epithelium. (2002). Proc Natl Acad Sci 26, 15578-83.

**Free MJ, Jaffe RA.** Collection of rete testis fluid from rats without previous efferent duct ligation. (1979). Biol Reprod. 20, 269-78.

**Fries E, Puttmann W.** Occurrence of 4-nonylphenol in rain and snow. *Atmos Environ.* (2004). 38, 2013–6.

**Gale WL, Patino R, Maule AG.** Interaction of xenobiotics with estrogen receptors alpha and beta and a putative plasma sex hormone-binding globulin from channel catfish (*Ictalurus punctatus*). (2004). *Gen Comp Endocrinol* 136, 338-45.

**Galgano M, D'Amore C.** Il ciclo sessuale annuale nel maschio di *Lacerta s. scicula* Raf. (1954). *Atti Soc. ital Anat.*, 15, 1-6.

**Gerstle J.F. and Callard I.P.** Reproduction and estrogen-induced vitellogenesis in *Dipsosaurus dorsalis*. (1972). *Comp. Biochem Physiol.* 42A, 791-01

**Ghiara G, Limatola E, Filosa S.** Micropinocytosis and vitellogenesis in oocytes of a lizard. (1970). *Micr Eletr Grenoble* 3, 661-62.

**Ghiara G, Limatola E, Filosa S.** Ultrastructural aspects of nutritive process in growing oocytes of Lizard. (1968). In D.S. Bocelli editor. *Electron Microscopy Roma* 2, 331-32.

**Giger W, Brunner PH, Schaffner C.** 4-Nonylphenol in sewage-sludge: accumulation of toxic metabolites from nonionic surfactants. (1984). *Science.* 225, 623–5.

**Gill W.B., Schumacher G.F., Bibbo M., Straus F.H., Schoenberg H.W.** Association of diethylstilbestrol exposure in utero with cryptorchidism, testicular hypoplasia and semen abnormalities. (1979). *J. Urol.* 122, 36-39.

**Gist DH, Bradshaw S, Morrow CM, Congdon JD, Hess RA.** Estrogen response system in the reproductive tract of the male turtle: an immunocytochemical study. (2007). *Gen Comp Endocrinol.* 151, 27-33.

**Giusti R.M., Iwamoto K., Hatch EE.** Diethylstilbestrol revisited. A review of the long term health effects. (1995). *Ann. Intern Med.* 15, 778-88.

**Goldzieher JW, Roberts IS.** Identification of oestrogen in the human testis. (1952). *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* 12, 143-50.

**Gong Y, Pan X, Huang Y, Gao Z, Yu H, Han X.** NP-induced biophysical and biochemical alterations of rat testicular Sertoli cell membranes related to disturbed intracellular Ca(2<sup>+</sup>) homeostasis. (2008). *Toxicol Lett.* 15, 10-20.

**Govoroun M, McMeel OM, Mecherouki H, Smith TJ, Guiguen Y.** 17beta-estradiol treatment decreases steroidogenic enzyme messenger ribonucleic acid levels in the rainbow trout testis. (2001). *Endocrinology* 142, 1841-8.

**Graham JD, Clarke CL.** Physiological action of progesterone in target tissues. (1997). *Endocr Rev* 18, 502-19.

**Greco TL, Furlow JD, Duello TM, Gorski J.** Immunodetection of estrogen receptors in fetal and neonatal male mouse reproductive tracts. (1992). *Endocrinology* 130, 421-9.

**Greeley MS Jr, Calder DR, Wallace RA.** Changes in teleost yolk proteins during oocyte maturation: correlation of yolk proteolysis with oocyte hydration. (1986) *Comp Biochem Physiol B* 84, 1-9.

**Gronemeyer H.** Control of transcription activation by steroid hormone receptors. (1992). *FASEB J* 6, 2524-29.

**Gronemeyer H.** Transcription activation by estrogen and progesterone receptors. (1991). *Annu Rev* 25, 89-123.

**Guenther K, Kleist E, Thiele B.** Estrogen-active nonylphenols from an isomerspecific viewpoint: a systematic numbering system and future trends. (2006). *Anal Bioanal Chem* 384, 542-6.

**Guillette LJ, Iguchi T.** Contaminant-induced endocrine and reproductive alterations in reptiles (2003). *Pure Appl. Chem.* 75, 2275-86.

**Guillette LJ Jr, Woodward AR, Crain DA, Pickford DB, Rooney AA, Percival HF.** Plasma steroid concentrations and male phallus size in juvenile alligators from seven Florida lakes (1999a). *Gen Comp Endocrinol* 116, 356-72.

**Guillette LJ Jr, Brock JW, Rooney AA, Woodward AR.** Serum concentrations of various environmental contaminants and their relationship to sex steroid concentrations and phallus size in juvenile *American alligators*. (1999b). *Arch Environ Contam Toxicol.* 36, 447-55.

**Guillette LJ Jr, Gross TS, Masson GR, Matter JM, Percival HF, Woodward AR.** Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida. (1994). *Environ Health Perspect.* 102, 680-8.

**Hager CD.** Alkylphenol ethoxylates-biodegradability, aquatic toxicity and environmental activity. (1998). In: Karsa DR, editor. *Annual surfactant review*. Sheffield, UK: Sheffield Academic Press.

**Hale RC, La Guardia MJ, Harvey EP, Gaylor MO, Matteson Mainor T, Duff WH.** Persistent pollutants in land-applied sludges. (2001). *Nature* 412, 140-41.

**Hale RC, Smith CL, de Fur PO, Harvey E, Bush EO.** Nonylphenols in sediments and effluents associated with diverse wastewater outfalls. (2000). *Environ Toxicol Chem* 19, 946-52.

**Han XD, Tu ZG, Gong Y, Shen SN, Wang XY, Kang LN, Hou YY, Chen JX.** The toxic effects of nonylphenol on the reproductive system of male rats. (2004). *Reprod Toxicol* 19, 215-21.

**Hansen P-D, Dizer H, Hock B, Marx A, Sherry J, McMaster M, Blaise C.** Vitellogenin- a biomarker for endocrine disruptors. (1998). Trends Anal Chem 17, 448-51.

**Hashimoto S, Bessho H, Hara A, Nakamura M, Iguchi T, Fujita K.** Elevated serum vitellogenin levels and gonadal abnormalities in wild male flounder (*Pleuronectes yokohamae*) from Tokyo Bay, Japan. (2000). Mar. Environ. Res 49, 37-53.

**HELCOM** (Helsinki Commission). Guidance document on nonylphenol/nonylphenol ethoxylates (Np/NPEs). (2002). Baltic Marine Environment Protection Commission. Finland: Helsinki.

**Henny CJ, Grove RA, Hedstrom OR.** A field evaluation of mink and river otter on the Lower Columbia River and the influence of environmental contaminants. (1996). Final Report to the Lower Columbia River Bi-State Water Quality Program, national Biological Science Forest and Rangeland Ecosystem Science center, Northwest Research Station, Corvallis, OR.

**Henriksen EO, Wiig O, Skaare JU, Gabrielsen GW, Derocher AE.** Monitoring PCBs in polar bears: Lessons learned from Svalbard. (2001). J Environ Monitor 3, 493-98.

**Herman RL, Kincaid HL.** Pathological effects of orally administered estradiol to rainbow trout. (1988). Aquaculture 72, 165-72.

**Hess RA, Bunick D, Lubahn DB, Zhou Q, Bouma J.** Morphologic changes in efferent ductules and epididymis in estrogen receptor-alpha knockout mice. (2000) J Androl 21, 107-21.

**Hess RA, Bunick D, Lee KH, Bahr J, Taylor JA, Korach KS, Lubahn DB.** A role for oestrogens in the male reproductive system. (1997). Nature 4, 509-12.

**Hesselsoe M, Jensen D, Skals K, Olesen T, Moldrup P, Roslev P, et al.** Degradation of 4-nonylphenol in homogeneous and nonhomogeneous mixtures of soil and sewage sludge. (2001). Environ Sci Technol 35, 3695-00.

**Ho SM, Kleis S, Mc Pherson R, Heisermann GJ, Callard IP.** Regulation of vitellogenesis in Reptiles. (1982). Herpetologica 1, 40-50.

**Honda S, Harada N, Ito S, Takagi Y, Maeda S.** Disruption of sexual behavior in male aromatase-deficient mice lacking exons 1 and 2 of the cyp19 gene. (1998). Biochem Biophys Res Commun. Nov 18, 445-9.

**Ing NH.** Steroid hormones regulate gene expression posttranscriptionally by altering the stabilities of messenger RNAs. (2005). Biology of reproduction 72, 1290-96.

**Inger RF, Greenberg B.** Annual reproductive patterns of lizards from a Bornean rain forest. (1966). *Ecology* 47, 1007-21.

**Inoue K., Kondo S., Yoshie Y., Kato K., Yoshimura Y., Horie M., Nakazawa H.** Migration of 4-nonylphenol from polyvinyl chloride food packaging films into food simulants and food. (2001). *Food Add Cont* 18, 157-64.

**IPCS** Human Exposure Assessment. Environmental Health Criteria 214. (2000). International Programme on Chemical Safety, World Health Organization, Geneva, Switzerland.

**IPCS** Principles and Methods for Assessing Allergic Hypersensitization Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria 212. (1999). International Programme on Chemical Safety, World Health Organization, Geneva, Switzerland.

**Ishunina TA, Kruijver FP, Balesar R, Swaab DF.** Differential expression of estrogen receptor alpha and beta immunoreactivity in the human supraoptic nucleus in relation to sex and aging. (2000). *J Clin Endocrinol Metab* 85, 3283-91.

**Janeiro-Cinquini TRF, Ribolla PEM, Capurro M de L, Winter CE.** Vitellogenin and yolk protein processing in *Bothrops Jararaca* (Wied), a tropical venomous snake. (1999). *Comp Biochem Physiol* 122B, 189-98.

**Jansson B, Andersson R, Asplund L, Litzén K, Nylund K, Sellström U, Uvemo U-B, Wahlberg C, Wideqvist U, Odsjö T, Olsson M.** Chlorinated and brominated persistent organic compounds in biological samples from the environment. (1993). *Environ Toxicol Chem*, 12, 1163-74.

**Jensen EV.** On the mechanism of estrogen action. (1962). *Perspect Biol Med* 6; 47-54.

**Jensen J, Jepsen S-E.** The production, use and quality of sewage sludge in Denmark. (2005). *Waste Manage* 25, 239-47.

**JME** (Japanese Ministry of Environment) Report on the test results of endocrine disrupting effects of nonylphenol on fish (draft). (2001). Tokyo, Japan; Environmental Health Department, Government of Japan.

**Jobling S., Sumpter JP.** Detergent components in sawage effluent are weakly estrogenic to fish: an in vivo study using rainbow trout (*Onchoruncus mykiss*) hepatocytes. (1993). *Acqua Toxicol* 27, 361-72.

**John DM, House WA, White GF.** Environmental fate of nonylphenol ethoxylates: differential adsorption of homologs to components of river sediment. (2000). *Environ Toxicol Chem* 19, 293-00.

**Kamal N, Agarwal AK, Jehan Q, Setty BS.** Biological action of estrogen on the epididymis of prepubertal rhesus monkey. (1985). *Andrologia* 17, 339-45.

**Kang IJ, Yokota H, Oshima Y, Tsuruda Y, Yamaguchi T, Maeda M, Imada N, Tadokoro H, Honjo T.** Effect of 17 $\beta$ -estradiol on the reproduction of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). (2002). *Chemosphere* 47, 71-80.

**Kelch RP, Jenner MA, Weinstein R, Kaaplan SL, Grumbach MM.** Estradiol and testosterone secretion by human, simian and canine testes in males with hypogonadism and in male pseudohermaphrodites with the feminizing testes syndrome. (1972). *Journal of Clinical Investigation* 51, 824-30.

**Kelsey JW, Kottler BD, Alexander M.** Selective chemical extractants to predict bioavailability of soil-aged organic chemicals. (1997). *Environ Sci Technol* 31, 214-7.

**Kim HH, Kwak DH, Yon J, Baek IJ, lee SR, Lee JE, Nahm SS, Jeong JH, Lee BJ, Yun YW, Nam SY.** Differential expression of 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase mRNA in rat testes exposed to endocrine disruptors. (2007). *J Reprod Dev* 53, 465-71.

**Kim Y-S, Katase T, Sekine S, Inoue T, Makino M, Uchiyama T, et al.** Variation in estrogenic activity among fractions of a commercial nonylphenol by high performance liquid chromatography. (2004). *Chemosphere* 54, 1127-34.

**Klein-Hitpass L, Schorpp M, Wagner U, Ryffel G.U.** An estrogen-responsive element derived from the 5' flanking region of the *Xenopus* vitellogenin A2 gene functions in transfected human cells. (1986). *Cell* 46, 1053-61.

**Kloas W, Lutz I, and Einspanier R.** Amphibians as model to study endocrine disruptors: II estrogenic activity of environmental chemicals *in vitro* and *in vivo*. (1999). *Sci Total Environ* 225, 59-68.

**Ko CL, Chesne, A, Mazerbourg S, Kuntz S, Flament S, Chardard D.** Female-enriched expression of ER-alpha during gonad differentiation of the urodele amphibian *Pleurodeles waltl*. (2008). *Gen Comp Endocrinol* 156, 234-45.

**Kobayashi T, Kajiura-Kobayashi H, Guan G, Nagahama Y.** Sexual dimorphic expression of DMRT1 and Sox9a during gonadal differentiation and hormone-induced sex reversal in the teleost fish Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). (2008). *Dev Dyn* 237, 297-306

**Kobayashi K, Tamotsu S, Yasuda K, Oishi T.** Vitellogenin-immunohistochemistry in the liver and the testis of the Medaka, *Oryzias latipes*, exposed to 17 $\beta$ -estradiol and p-nonylphenol. (2005). *Zool. Sci.* 22, 453-461.

**Kocan A, Petrik J, Jursa S, Chovancova J, Drobna B.** Environmental contamination with polychlorinated biphenyls in the area of former manufacture in Slovakia (2001). *Chemosphere* 43, 595-00.

**Krege JH, Hodgins JB, Couse JF, Enmark E, Warner M, Mahler JF, Sar M, Korach KS, Gustafsson JA, Smithies O.** Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor  $\beta$ . *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 15677-82.

**Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B, Gustafsson JA.** Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. (1998). *Endocrinology*. 139, 4252-4263.

**Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA.** Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. (1997). *Endocrinology*. 138, 863-70.

**Kuiper GG, Gustafsson JA.** The novel estrogen receptor-beta subtype: potential role in the cell- and promoter-specific actions of estrogens and anti estrogens. (1997). *FEBS Lett.* 23, 87-90.

**Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA.** Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. (1996). *Proc. Natl Acad Sci USA* 11, 5925-30.

**Kumar V, Chambon P.** The estrogen receptor binds tightly to its responsive element as a ligand-induced homodimer. (1988). *Cell* 55, 145-56.

**Lambard S, Galeraud-Denis I, Bouraïma H, Bourguiba S, Chocat A, Carreau S.** Expression of aromatase in human ejaculated spermatozoa: a putative marker of motility. (2003) *Mol Hum Reprod.* 9, 117-24.

**Länge R, Hutchinson TH, Croudace CP, Siegmund F, Schweinfurth H, Hampe P, Panter GH, Sumpter JP.** Effects of the synthetic estrogen 17 alpha-ethinylestradiol on the life-cycle of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). (2001). *Environ Toxicol Chem* 20, 1216-27.

**Langford KH, Lester JN.** Fate and behaviour of endocrine disrupters in wastewater treatment processes. (2002). In: Birkett JW, Lester JN, editors. *Endocrine disrupters in wastewater and sludge treatment processes*. Boca Raton, USA: CRC Press Inc.

**Larsson DGJ, Adolfsson-Erici M, Parkkonen J, Pettersson M, Berg AH, Olsson P-E, Förlin L.** Ethinylloestradiol- an undesired fish contraceptive? (1999). *Aquat Toxicol* 45, 91-97.

**Laudet V, Hanni C, Coll J, Catzeflis F, Stehelin D.** Evolution of the nuclear receptor gene superfamily. (1992). *EMBO J* 11, 1003-1013.

**Laws SC, Carey SA, Ferrell JM, Bodman GJ, Cooper RL.** Estrogenic activity of octylphenol, nonylphenol, bisphenol A and methoxychlor in rats. (2000). *Toxicol Sci* 54, 154-67.

**Le Drean Y, Kern L, Pakdel F, Valotaire Y.** Rainbow trout estrogen receptor an equal specificity but a differential sensitivity for estrogens than human estrogen receptor. (1995). *Mol cell endocrinol* 109, 27-35.

**Leach R B, Maddock WO, Tokuyama I, Pulsen CA, Nelson WO.** Clinical studies of testicular hormone production. (1956). *Recent Progress in Hormone Research* 12, 377-97.

**Leammli UK.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. (1970). *Nature* 227, 680-85.

**Leanos-Castaneda O, Van der Kraak G.** Functional characterization of estrogen receptor subtypes, ER-alpha and ER-beta, mediating vitellogenin production in the liver of rainbow trout. (2007). *Toxicol Appl Pharmacol* 224, 116-25.

**Lee KH, Hess RA, Bahr JM, Lubahn DB, Taylor J, Bunick D.** Estrogen receptor alpha has a functional role in the mouse rete testis and efferent ductules. (2000). *Biol Reprod* 63, 1873-80.

**Lee PC, Lee W.** In vivo estrogenic action of nonylphenol in immature female rats. (1996). *Bull Environ Contam Toxicol* 57, 341-8.

**Lega L, Ladwig G, Meresz O, Clement RE, Crawford G, Salemi R, Jones Y.** Quantitative determination of organic priority pollutants in sewage sludge by GC/MS. (1997) *Chemosphere* 34, 1705-12.

**Leung YK, Mak P, Hassan S, Ho SM.** Estrogen receptor (ER)-beta isoform: a key to understanding ER-beta signaling. (2006). *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 13162-67.

**Leygue E, Dotzlaw H, Lu B, Glor C, Watson PH, Murphy LC.** Estrogen receptor beta: mine is longer than yours? (1988). *J Clin Endocrinol Metab* 83, 3754-55.

**Li D, Kim M, Shim WJ, Yim UH, Oh J-R, Kwon Y-J.** Seasonal flux of nonylphenol in Han River, Korea. (2004). *Chemosphere* 56, 1-6.

**Licht P.** Reptiles. In: Marshall's Physiology of reproduction. (1984). 1, G.E. Lamming, ed. Churchill Livingstone, pp. 206-282.

**Limatola E, Angelini F, Restucci E, Boccia A.** Progesterone effects on oocyte growth in *Podarcis sicula* Raf. (1989). First World Congress of Herpetology, 11-19 Sept. 1989. Univ. of Kent at Canterbury, U.K.- P.

**Limatola E, Filosa S.** Exogenous vitellogenesis and micropinocytosis in the lizard *Podarcis sicula* treated with follicle-stimulating hormone. (1989). Gen Comp Endocrinol 75, 165-76.

**Limatola E.** Micropinocitosi e vitellogenesi in *Lacerta s. Raf.* (1975). Bollettino zoologico 42.

**Lindberg MK, Moverare S, Skrtic S, Gao H, Dahlman-Wright K, Gustafsson JA, Ohlsson C.** Estrogen receptor (ER)-beta reduces ERalpha-regulated gene transcription, supporting a “ying yang” relationship between ERalpha and ERbeta in mice. (2003). Mol Endocrinol 17, 203-8

**Lindström G, Wingfors H, Dam M, von Bavel B.** Identification of 19 polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in long-finned pilot whale (*Globicephala melas*) from the atlantic. (1999). Arch Environ Contam Toxicol, 36, 355-63.

**Liu MM, Albanese C, Anderson CM, Hilty K, Webb P, Uht RM, Price RH Jr, Pestell RG, Kushner PJ.** Opposing action of estrogen receptors alpha and beta on cyclin D1 gene expression. (2002). J Biol Chem 277, 24353-60.

**Loomis, AK., Thomas, P.** Binding characteristics of estrogen receptor (ER) in Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*) testis: different affinity for estrogen and xenobiotics from that hepatic ER. (1999). Biol Reprod 61, 51-60.

**Lorenc JL, Scheffer G.** Alkylphenols W. Kirk–Othmer encyclopaedia of chemical technology. (2003). John Wiley and Sons Inc. (<http://www.mrw.interscience.wiley.com/emrw/9780471238966/kirk/article/alkylore.a01/currenrent/html>).

**Loukovaara M, Carson M, Palotie A, Adlercreutz H.** Regulation of sex hormone-binding globulin production by isoflavonoids and patterns of isoflavonoid conjugation in HepG2 cell cultures. (1995). Steroids. 60, 656-61.

**Lubahn DB, Moyer JS, Golding TS, Couse JF, Korach KS, Smithies O.** Alteration of reproductive functions but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. (1993). Proc Natl Acad Sci USA 90, 11162-66.

**Lutz I, Blodt S, Kloas W.** Regulation of estrogen receptors in primary cultured hepatocytes of the amphibian *Xenopus laevis* as estrogenic biomarker and its application in environmental monitoring. (2005). Comp Biochem Physiol Part C 141, 384-92.

**Lye CM, Frid CLJ, Gill ME, Cooper DW, Jones DM.** Estrogenic alkylphenols in fish tissues, sediments and waters from the U.K. Tyne and Tees estuaries (1999). Environ Sci Technol 33, 1009-14.

**Mackay D, Fraser A.** Bioaccumulation of persistent organic chemicals: Mechanisms and models. (2000). Environmental Pollution 110(3), 375-91.

**Madigou T, Le Goff P, Salbert G, Cravedi JP, Segner H, Pakdel F, Valotaire Y.** Effects of nonylphenol on estrogen receptor conformation, transcriptional activity and sexual reversion in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). (2002). *Aquatic Toxicology* 53, 173-86.

**Majdic G, Millar MR, Saunders PT.** Immunolocalisation of androgen receptor to interstitial cells in fetal rat testes and to mesenchymal and epithelial cells of associated ducts. (1995). *J Endocrinol* 147(2), 285-93.

**Manzano MA, Perales JA, Sales D, Quiroga JM.** Effect of concentration on the biodegradation of a nonylphenol polyethoxylate in river water. (1998). *Bull Environ Contam Toxicol* 61, 489-96.

**Margot JB, Williams DL.** Estrogen induces the assembly of a multi-protein messenger ribonucleoprotein complex on the 3'-untranslated region of chicken apolipoprotein II mRNA. (1996). *J Biol Chem* 271, 4452-60.

**Matsubara T, Ohcubo N, Andoh T, Sullivan CV, Hara A.** Two form of vitellogenin, yielding two distinct lipovitellins, play different roles during oocyte maturation and early development of Barfin Flounder, *Verasper moseri*, a marine teleost that spawns pelagic eggs. (1999). *Dev Biol* 213, 18-32.

**Matthews J, Gustafsson JA.** Estrogen signaling: a subtle balance between ER $\alpha$  and ER $\beta$ . (2003). *Molecular Interventions* 281-92.

**Matthews J, Celius T, Halgren R, Zacharewski T.** Differential estrogen receptor binding of estrogenic substances: a species comparison. (2000). *J Steroid Biochem Mol Biol* 74, 223-34.

**Matthews J, Wihlèn B, Ujague M, Wan J, Strom A, Gustafsson JA.** Estrogen receptor (ER) beta modulates ERalpha-mediated transcriptional activation by altering the recruitment of c-Fos and c-Jun to estrogen-responsive promoters. (2006). *Mol. Endocrinol* 20, 534-43.

**Mazzi V.** Manuale di tecniche istologiche e istochimiche. (1977). In Mazzi V., editor Padova (Italy). pp. 63, 278.

**McKnight GS, Palmiter RD.** Transcriptional regulation of the ovalbumin and conalbumin genes by steroid hormones in chick oviduct. (1979). *J Biol Chem* 254, 9050-58.

**McLachlan JA, Newbold RR, Bullock B.** Reproductive tract lesions in male mice exposed prenatally to diethylstilbestrol. (1975). *Science* 190, 991-2

**McNeal TP, Biles JE, Begley TH, Craun JC, Hopper ML, Sack CA.** Determination of suspected endocrine disruptors in foods and food packaging. (2000). In: McNeal TP, Biles JE, Begley TH, Craun JC, Hopper ML, Sack CA, editors. *Analysis of Environmental Endocrine Disruptors*, 747. Washington, DC: American Chemical Society, pp. 33-52.

**Meistrich ML, Hughes TH, Bruce WR.** Alteration of epididymal sperm transport and maturation in mice by oestrogen and testosterone. (1975) *Nature* 13, 145-7.

**Menasce LP, White GR, Harrison CJ, Boyle JM.** Localization of the estrogen receptor locus (ESR) to chromosome 6q25.1 by FISH and a simple post FISH banding technique. (1993). *Genomics* 17, 263-65.

**Mendelsohn ME, Karas RH.** The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. (1999). *N Engl J Med.* Jun 10, 1801-11.

**Menuet A, Le Page Y, Torres O, Kern L, Kah O, Pakde, F.** Analysis of the estrogen regulation of the zebrafish estrogen receptor (ER) reveals distinct effects of ERalpha, ERbeta1 and ERbeta2. (2004). *J Mol Endocrinol* 32, 975-86.

**Menuet MN, Pellegrini E, Anglade I, Blaise O, Laudet V, Kah O, Pakde, F.** Molecular characterization of three estrogen receptor forms in zebrafish: binding characteristics, transactivation properties, and tissue distributions. (2002). *Boil Reprod* 66, 1881-92.

**Menuet MN, Anglade I, Flouriot G, Pakdel F, Kah O.** Tissue-specific expression of two structurally different estrogen receptor alpha isoforms along the female reproductive axis of an oviparous species, the rainbow trout. (2001). *Biol Reprod* 5, 1548-57.

**Metcalf CD, Metcalf TL, Kiparissis Y, Koenig BG, Khan C, Hughes RJ, Croley TR, March RE, Potter T.** Estrogenic potency of chemicals detected in sewage treatment plant effluents as determined by in vivo assays with Japanese medaka (*Oryzias latipes*). (2001). *Environ Toxicol Chem* 20, 297-08.

**Miles-Richardson SR, Pierens SL, Nichols KM, Kramer VJ, Snyder EM, Snyder SA, Render JA, Fitzgerald SD, Giesy JP.** Effects of waterborne exposure to 4-Nonylphenol and Nonylphenol Ethoxylate on secondary sex characteristics and gonads of Fathead Minnows (*Pimephales promelas*). (1999) *Environmental Research Section A* 80, 122-37

**Montano MM, Muller V, Trogaugh A, Katzenellenbogen BS.** The carboxy-terminal F domain of the human estrogen receptor: role in the transcriptional activity of the receptor and the effectiveness of antiestrogens as estrogen antagonists. (1995). *Mol Endocrinol* 9, 814-25.

**Morales MH, Bearga-Santini C, Cordero-Lopez N.** Synthesis of vitellogenin and deposit of yolk proteins in *Anolis pulchellus*. (1996). *Comp Biochem Physiol* 114B, 225-31.

**Morse WI, Clark AF, MecLeod SC, Ernst WA, Grossee CL.** Urine oestrogen responses to human chorionic gonadotropine in gonad of old and

hypogonadal men. (1962). *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 22, 678-5.

**Murphy JB, Emmott RC, Hicks LL, Walsh PC.** Estrogen receptors in the human prostate, seminal vesicle, epididymis, testis, and genital skin: a marker for estrogen-responsive tissues? (1980) *J Clin Endocrinol Metab* 50, 938-48.

**Nebert DW, Gonzales FJ.** P450 genes: structure, evolution, and regulation (1987). *Annu Rev Biochem* 56, 945-93.

**Ney RE.** Where did that chemical go: a practical guide to chemical fate and transport in the environment. (1990). New York: Van Nostrand Reinhold-Verlag.

**Nielsen M, Björnsdóttir S, Høyer PE, Byskov AG.** Ontogeny of oestrogen receptor alpha in gonads and sex ducts of fetal and newborn mice. (2000) *J Reprod Fertil* 118, 195-04.

**Nimrod, A.C., Benson, W.H.** Xenobiotic interaction with and alteration of channel catfish estrogen receptor. (1997). *Toxicol Appl Pharmacol* 147, 381-90.

**Nimrod A.C., Benson W.H.** Environmental estrogenic effect of alkylphenol ethoxylates. (1996). *Crit Rev Toxicol* 26, 335-64.

**Nomura M, Korach KS, Plaff DW, Ogawa S.** Estrogen receptor  $\beta$  (ER $\beta$ ) protein levels in neurons depend on estrogen receptor alpha (ER $\alpha$ ) gene expression and on its ligand in a brain region-specific manner. (2003). *Brain Res Mol Biol* 110, 7-14.

**O'Donnell L, Robertson KM, Jones ME, Simpson ER.** Estrogen and spermatogenesis. (2001). *Endocr Rev* 22, 289-318.

**Odum J, Lefevre PA, Tittensor S, Paton D, Routledge EJ, Beresford NA, et al.** The rodent uterotrophic assay: critical protocol features, studies with nonyl phenols, and comparison with a yeast estrogenicity assay. (1997). *Regul Toxicol Pharmacol* 25, 176-88.

**Oh R, Tamaoki B.** Steroidogenesis in equine testis. (1970). *Acta Endocrinologica (Copenh)* 64, 1-16.

**Olsson M, Bignert A, Eckh ll J, Jonsson P.** Comparison of temporal trends (1940s-1990s) of DDT and PCB in Baltic sediment and biota in relation to eutrophication. (2000) *Ambio*, 29, 195-01.

**Overpeck JG, Colson SH, Hohmann JR, Applestine MS, Reilly JF.** Concentrations of circulating steroids in normal prepubertal and adult male and female humans, chimpanzees, rhesus monkeys, rats, mice, and hamsters: a literature survey. (1978). *J Toxicol Environ Health* 4, 785-03.

**Paech K, Webb P, Kuiper GG, Nilsson S, Gustafsson JA, Kushner PJ, Scanlan TS.** Differential ligand activation of estrogen receptors ER $\alpha$  and ER $\beta$  at AP1 sites. (1997). *Science* 277, 1508-1510.

**Pakdel F, Delaunay F, Ducouret B, Flouriot G, Kern L, Lazennec G, Le Drèan Y, Petit F, Salbert G, Saligaut D, Tujague M, Valotaire Y.** Regulation of gene expression and biological activity of rainbow trout estrogen receptor. (1997). *Fish Physiol Biochem* 17, 123-33.

**Pakdel F, Feon S, Le Gac F, Le Menn F and Voltaire Y.** *In Vivo* estrogen induction of hepatic estrogen receptor mRNA correlation with vitellogenin mRNA in rainbow trout. (1991). *Mol. Cell. Endocrinol.* 75, 205-12.

**Palmer B.D., Palmer S.K.** Vitellogenin induction by xenobiotic estrogens in the Red-eared Turtle and African Clawed frog. (1995). *Environ. Health Perspect.* 19-25.

**PARCOM 92/8.** Recommendation on nonylphenol-ethoxylates. London, UK. OSPAR Convention; 2000.

**Pencharz RI.** Effects of estrogens and androgens alone and in combination with chronic gonadotropin on the ovary of the hypophysectomised rats. (1940). *Science* 91, 554-55.

**Petit F, Le Goff P, Cravedi JP, Valotaire Y, Pakdel F.** Two complementary bioassays for screening the estrogenic potency of xenobiotics: recombinant yeast for trout estrogen receptor and trout hepatocyte cultures. (1997). *J. Mol. Endocrinol.* 19, 321-325.

**Petrovic M, Sole M, de Alda MJL, Barcelo D.** Endocrine disruptors in sewage treatment plants, receiving river waters, and sediments: integration of chemical analysis and biological effects on feral carp. (2002). *Environ Toxicol Chem* 21, 2146–56.

**Pettersson K, Grandien K, Kuiper GJ, Gustafsson JA.** Mouse estrogen receptor  $\beta$  forms estrogen response element-binding heterodimers with estrogen receptor  $\alpha$ . (1997). *Molecular Endocrinology* 11, 1486-96.

**Pinto B., Garritano S., Reali D.** L'ambiente marino, ecosistema a rischio da interferenti endocrini. (2005). XV Congresso della società italiana di ecologia-Torino 2005.

**Porta A, Cassano E, Balestrieri M, Bianco M, Picone R, De Stefano C, Abrescia P.** Haptoglobin transport into human ovarian follicles and its binding to apolipoprotein A1. (1999). *Zygote* 7, 67-77.

**Pratt WB.** The role of heat shock proteins in regulating the function, folding, and trafficking of the glucocorticoid receptor. (1993). *J Biol Chem* 268, 21455-58.

**Pratt WB, Scherrer LC, Hutchison KA, Dalman FC.** A model of glucocorticoid receptor unfolding and stabilization by a heat shock protein complex. (1992). *J. Steroid Biochem Mol Biol* 41, 223-29.

**Prisco M, Valiante S, Maddalena Di Fiore M, Raucci F, Del Giudice G, Romano M, Laforgia V, Limatola E, Andreuccetti P.** Effect of 17 $\beta$ -estradiol and progesterone on vitellogenesis in the spotted ray *Torpedo marmorata* Risso 1810 (Elasmobranchii: Torpediniformes): studies on females and on estrogen-treated males. (2008). *Gen Comp Endocrinol.* 157, 125-32

**Prisco M, Valiante S, Romano M, Recchiari L, Liguoro A, Laforgia V, Limatola E, Andreuccetti P.** Ovarian follicle cells in *Torpedo marmorata* synthesize vitellogenin. (2004). *Mol Reprod Dev* 67(4), 424-9.

**Rago V, Aquila S, Panza R, Carpino A.** Cytochrome P450arom, androgen and estrogen receptors in pig sperm. (2007) *Reprod Biol Endocrinol.* 23, 1-6

**Ramsey TL, Risinger KE, Jernigan SC, Mattingly KA, Klinge CM.** Estrogen receptor beta isoforms exhibit differences in ligand-activated transcriptional activity in an estrogen response element sequence-dependent manner. (2004). *Endocrinology* 145, 2854-65.

**Ratna W, Oyeamalu C.** The upstream stem-loop of the 3'-untranslated region of apolipoprotein II mRNA binds the estrogen-regulated mRNA stabilizing factor. *J steroid Biochem Mol Biol* 80, 383-393.

**Reaside JJ.** The isolation of estrone sulphate and oestradiol-17 $\beta$  sulphate from stallion testis. (1969). *Canadian Journal of Biochemistry* 47, 811-5.

**Redshaw MR, Follet BK.** The crystalline yolk platelet proteins and their soluble plasma precursor in an amphibian, *Xenopus laevis*. (1971). *J Biochem* 124, 759-66.

**Reese JC, Callard IP.** Two progesterone receptors in the oviduct of the freshwater turtle *Chrysemys picta*: possible homology to mammalian and avian progesterone receptor systems. (1989). *J Steroid Biochem* 33, 297-10.

**Reinli K, Block G.** Phytoestrogen content of foods- a compendium of literature values. (1996). *Nutr Cancer* 26, 123-48.

**Robaire B, Hermo L.** Efferent ducts, epididymis and vas deferens: structure, functions and their regulation. (1988). In Knobil E, Neill J, (Eds.). *The physiology of reproduction*. Raven Press, New York, pp. 999-1080.

**Robertson KM, O'Donnell L, Simpson ER, Jones ME.** The phenotype of the aromatase knockout mouse reveals dietary phytoestrogens impact significantly on testis function. (2002) *Endocrinology* 143, 2913-21.

**Robertson KM, O'Donnell L, Jones ME, Meachem SJ, Boon WC, Fisher CR, Graves KH, McLachlan RI, Simpson ER.** Impairment of

spermatogenesis in mice lacking a functional aromatase (cyp 19) gene. (1999). Proc Natl Acad Sci U S A. 96, 7986-91.

**Romano M, Limatola E.** Oocyte plasma membrane proteins and the appearance of vitellogenin binding protein during oocyte growth in the lizard *Podarcis sicula*. (2000) Gen Comp Endocrinol 118, 383-92.

**Routledge EJ, Sumpter JP.** Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. (1996). Environ Toxicol Chem 15, 241-8.

**Russell LD, Ettlin RA, Sinha AP, Clegg ED.** Histological and histopathological evaluation of the testis. (1990). Cache River Press, Clearwater, pp. 1-286.

**Russo M, Troncone G, Guarino FM, Angelini F, Chieffi P.** Estrogen-induced Akt-1 activity in the lizard (*Podarcis s. sicula*) testis. (2005) Mol Reprod Dev. 71, 52-7.

**Ruz R, Gregory M, Smith CE, Cyr DG, Lubahn DB, Hess RA, Hermo L.** Expression of aquaporins in the efferent ductules, sperm counts, and sperm motility in estrogen receptor-alpha deficient mice fed lab chow versus casein. (2006) Mol Reprod Dev. 73, 226-37.

**Saagua MC, Baeta-Hall L, Anselmo AM.** Microbiological characterization of a coke oven contaminated site and evaluation of its potential for bioremediation. (2002). World J Microbiol Biotechnol 18, 841-5.

**Sabo-Attwood T, blum JL, Kroll KJ, Patel V, Birkholz D, Szabo NJ, Fisher SZ, Mckenna R, Campbell-Thompson M, Denslow ND.** Distinct expression and activity profiles of largemouth bass (*Micropterus salmonides*) estrogen receptors in response to estradiol and nonylphenol. (2007) J. Mol Endocrinol 39, 223-237.

**Saunders PT, Maguire SM, Gaughan J, Millar MR.** Expression of oestrogen receptor beta (ER $\beta$ ) in multiple rat tissues visualised by immunohistochemistry. (1997). J Endocrinol 154, R13-R16.

**Schneider WJ.** Vitellogenin receptors: Oocyte-specific members of the low-density lipoprotein receptors supergene family. (1996) Int Rev Cytol 166, 103-34.

**Schomberg DW, Couse JF, Mukherjee A, Lubahn DB, Sar M, Mayo KE, Korach KS.** Targeted disruption of the estrogen receptor-  $\alpha$  gene in female mice: characterization of ovarian response and phenotype in the adult. (1999). Endocrinology 140, 2733-44.

**Selcer K.W. and B.D. Palmer.** Estrogen downregulation of Albumin and a 170-kDa serum protein in the turtle, *Trachemis scripta*. (1995). Gen. Comp. Endocrinol. 97, 340-352.

**Selcer KW, Leavitt WW.** Progesterone downregulates progesterone receptor, but not estrogen receptor, in the estrogen-primed oviduct of a turtle (*Trachemys scripta*). (1991) Gen Comp Endocrinol 83, 316-23.

**Sellström U, Kierkegaard A, Alsberg T, Jonsson P, Wahlberg C, de Wit C.** Brominated flame retardants in sediments from European estuaries, the Baltic sea and in sewage sludge. (1999). Organohalogen Compounds, 40, 383-386.

**SEPA** (2001) Miljöövervakning. Available: <http://www.environ.se>

**Servos MR, Maguire RJ, Bennie DT, Lee HB, Cureton PM, Davidson N, et al.** An ecological risk assessment of nonylphenol and its ethoxylates in the aquatic environment. (2003). Hum Ecol Risk Assess 9:569–87.

**Setchell BP, Cox JE.** Secretion of free and conjugated steroids by the horse testis into lymph and venous blood. (1982). J Reprod Fertil Suppl 32, 123-7.

**Setchell BP, Scott TW, Voglmayr JK, Waites GM.** Characteristics of testicular spermatozoa and the fluid which transports them into the epididymis. (1969). Biol Reprod 1, 40-66

**Shang DY, Macdonald RW, Ikonomou MG.** Persistence of nonylphenol ethoxylate surfactants and their primary degradation products in sediments from near a municipal outfall in the strait of Georgia, British Columbia, Canada. (1999). Environ Sci Technol 33, 1366-72.

**Shao B, Hu J, Yang M.** Nonylphenol ethoxylates and their biodegradation intermediates in water and sludge of a sewage treatment plant. (2003). Bull Environ Contam Toxicol 70, 527–32.

**Sharpe RM.** The roles of estrogen in the male. (1998). Trends Endocrinol Metab 9, 371-77.

**Sharpe RM.** Do males rely on female hormones? (1997) Nature. 4, 447-8.

**Shayu D, Kesava CC, Soundarajan R, Rao AJ.** Effects of ICI 182780 on estrogen receptor expression, fluid absorption and sperm motility in the epididymis of the bonnet monkey. (2005) Reprod Biol Endocrinol 2, 3-10

**Shetty G, Krishnamurthy H, Krishnamurthy HN, Bhatnagar AS, Moudgal NR.** Effect of long-term treatment with aromatase inhibitor on testicular function of adult male bonnet monkeys (*M. radiata*). (1998) Steroids 63, 414-20.

**Shibata N, Hamaguchi S.** Evidence for the sexual biopotentiality in the fish, *Oryzias latipes*. (1988). J Expe Zool 245(1), 71-7.

**Shupnik MA, Gordon MS, Chin WW.** Tissue-specific regulation of rat estrogen receptor mRNAs. (1989). Mol Endocrinol 3, 660-5

**Simpson ER, Mahendroo MS, Means GD, Kilgore MW, Hinshelwood MM, Graham-Lorence S, Amarneh B, Ito Y, Fisher CR, Michael MD.** Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. (1994). *Endocr Rev* 15(3), 342-55.

**Soares A.** Biodegradation of the endocrine disruptor nonylphenol. (2005). PhD thesis, Lund, Sweden, Department of Biotechnology, Lund University

**Soares A, Guieysse B, Delgado O, Mattiasson B.** Aerobic biodegradation of nonylphenol by cold-adapted bacteria. (2003). *Biotechnol Lett* 25, 731-8.

**Socorro S, Power DM, Olsson PE, Canario AV.** Two estrogen receptors expressed in the teleost fish, *Sparus aurata*: cDNA cloning, characterization and tissue distribution. (2000). *J Endocrinol* 166, 293-306.

**Soto AM, Sonnenschein C, Chung KL, Fernandez MF, Olea N, Serrano FO.** The E-screen assay as a tool to identify estrogens-an update on estrogen-sensitive cells. (1995). *Environ Health Perspect* 103, 113-22.

**Soto AM, Justicia H, Wray JW, Sonnenschein C.** P-Nonylphenol: an estrogenic xenobiotic released from "modified" polystyrene. (1991). *Environ Health Perspect* 92, 167-73.

**Soverchia, L., Rugegri, B., Palermo, F., Mosconi, G., Cardinaletti, G., Scortichin, G., Gatti, G, Polzonetti-Magni, A.M.** Modulation of vitellogenin synthesis through estrogen receptor beta-1 in goldfish (*Carassius auratus*) juveniles exposed to 17-beta estradiol and nonylphenol. (2005). *Toxicol Appl Pharmacol* 209, 236-43.

**Steiner I, Kubesch K, Wildhack A, Fiala F.** Migration of phthalates from PVC-consumption goods. (1999). *Lebensmittelchemie* 53, 147-48.

**Stephanou E, Giger W.** Persistent organic chemicals in sewage effluent. 2. Quantitative determinations of nonylphenols and nonylphenol ethoxylates by capillary gas chromatography. (1982). *Environ Sci Technol* 16, 800-05.

**Stevens J, Green NJL, Jones KC.** Survey of PCDD/Fs and non-ortho PCBs in UK sewage sludges. (2001). *Chemosphere* 44, 1455-62.

**Stoll R, Ichas F, Faucounau N, Maraud R.** Action of estradiol and tamoxifen on the testis-inducing activity of the chick embryonic testis grafted to the female embryo. (1993). *Anat Embryol (Berl)*. 188, 587-92.

**Sumpter JP, Jobling S.** Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. (1995). *Environ. Health Perspect*. 103, 173-78.

**Tabira Y, Nakai M, Asai D, Yakabe Y, Tahara Y, Shinmyozu T, et al.** Structural requirements of para-alkylphenols to bind to estrogen receptor. (1999). *Eur J Biochem* 262, 240-5.

**Tada N, Saka M, Ueda Y, Hoshi H, Uemura T, and Kamata Y.** Comparative analyses of serum vitellogenin levels in male and female Reeves'pond turtle (*Chinemys reevesii*) by an immunological assay. (2004). J Comp Physiol B 174, 13-20.

**Taddei C.** The significance of pyriform cells in the ovarian follicle of *Lacerta sicula*. (1972). Exp Cell Res 72, 562-66.

**Tata JR.** Regulation of vitellogenesis by estrogen. (1978). In J Dumont and J Nunez editors. Hormone and cell regulation North Holland: Elsevier Biomedical Press 2, 23-9.

**Tekpetey FR, Amann RP.** Regional and seasonal differences in concentrations of androgen and estrogen receptors in ram epididymal tissue. (1988). Biol Reprod. 38, 1051-60.

**Thibaut R, Porte C.** Effects of endocrine disrupter on sex steroid synthesis and metabolism pathways in fish. (2004). J. Steroid Biochem Mol Biol 92, 485-94.

**Thiele B, Heinke V, Kleist E, Guenther K.** Contribution to the structural elucidation of 10 isomers of technical p-nonylphenol. (2004). Environ Sci Technol 38, 3405–11.

**Thorsen A, Kjesbu OS, Fyhn HJ Solemdal P.** Physiological mechanism of buoyancy in eggs from brackish water cod. (1996). J Fish Biol 48, 457-77.

**Toda K, Okada T, Takeda K, Akira S, Saibara T, Korach KS, Lubahn DB.** Oestrogen at the neonatal stage is critical for the reproductive ability of male mice as revealed by supplementation with 17 $\beta$ -oestradiol to aromatase gene (Cyp19) knockout mice. (2001) J Endocrinol 168, 455-63.

**Tollefsen KE, Mathisen R, Stenersen J.** Estrogen mimics bind with similar affinity and specificity to the hepatic estrogen receptor in Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). (2002). Gen Comp Endocrinol 126, 14-22.

**Topp E, Starratt A.** Rapid mineralization of the endocrine-disrupting chemical 4-nonylphenol in soil. (2000). Environ Toxicol Chem 19, 313–8.

**Turner TT.** On the epididymis and its role in the development of the fertile ejaculate. (1995). J Androl. 16, 292-8. Review.

**Uguz C, Varisli O, Agca C, Agca Y.** Effects of nonylphenol on motility and subcellular elements of epididymal rat sperm. (2009). Reprod Toxicol [Epub ahead of print].

**Urushitani H, Nakai M, Inanaga H, Shimohigash, Y, Shimizu A, Katsu Y, Iguchi T.** Cloning and characterization of estrogen receptor alpha in mummichog, *Fundulus heteroclitus*. (2003). Mol Cell Endocrinol 203, 41-50.

**USEPA** (United States Environmental Protection Agency). Testing consent order on 4-nonylphenol, branched. (1990). Fed Reg 35, 5991–94.

**Van den Belt K, Wester PW, van der Ven LT, Verheyen R, Witters H.** Effects of ethynylestradiol on the reproductive physiology in zebrafish (*Danio rerio*): time dependency and reversibility. (2002). Environ Toxicol Chem 21, 767-75.

**van Het Schip AD, Samallo J, Broos J, Ophuis J, Mojet M, Gruber M, Ab G.** Nucleotide sequence of a chicken vitellogenin gene and derived amino acid sequence of the encoded yolk precursor protein. (1987). J Mol Biol 196, 245-60.

**Van Zeil H.** (1997). Report of the Results of the One-Off Survey DIFFCHEM, Oslo and Paris Commissions SIMM 97/6/1-E.

**Viganò L., Mandich A., Benfenati E., Bertolotti S., Porazzi E., Agradi E.** Investigating the estrogenic risk along the river Po and its intermediate section. (2006). Arch. Environ. Contam. Toxicol. 51, 641-51.

**Viganò L, Arillo A, Bottero S, Massari A, Mandich A.** First observation of intersex cyprinids in the Po river (Italy). (2001). Sci Total Environ 26, 189-94

**Vikelsee J, Thomsen M, Carlsen L.** Phthalates and nonylphenols in profiles of differently dressed soils. (2002). Sci Total Environ 296, 105–16.

**Villeneuve D.L., Blankenship A.L., Giesy J.P.** Estrogen receptors-environmental xenobiotics. In “Toxicant-receptor Interactions and Modulation of Gene Expression” (M.S. Denison, Helferich W.G., Eds). Chp. 4, pp 69-99. Lippincott-Raven Pub., Philadelphia.

**Wahlberg C, Renberg L, Wideqvist U.** Determination of nonylphenol and nonylphenol ethoxylates as their pentafluorobenzoates in water, sewage sludge and biota. (1990). Chemosphere 20, 179-95.

**Wallace RA, Selman K.** Major protein changes during vitellogenesis and maturation of *Fundulus* oocytes. (1985) Dev. Biol. 110, 492-98.

**Wallace RA.** Vitellogenesis and oocyte growth in nonmammalian vertebrates. (1985). In: Browder L. editor, Development Biology 1: Oogenesis. University of Calgary, Calgary, Alberta, Canada: 3, 127-77.

**Wallace RA.** Oocyte growth in nonmammalian vertebrates. (1978) In: “The vertebrate ovary”. Pp 469-95 (ed.Jones R.E.) Plenum press N. Y.

**Wallace RA, Dumont JN.** The induced synthesis and transport of yolk proteins and their accumulation by the oocyte in *Xenopus laevis*. (1968) J Cell Physiol Suppl 72, 73-89.

**Walter P, Green S, Greene G, Krust A, Bornert JM, Jeltsch JM, Staub A, Jensen E, Scrace G, Waterfield M, et al.** Cloning of the human estrogen receptor cDNA. (1985). Proc Natl Acad Sci USA. 82, 7889-93.

**Wang Z, Zhang X, Shen P, Loggie BW, Chang Y, Deuel TF.** Identification, cloning, expression of human estrogen receptor- $\alpha$ 36, a novel variant of human estrogen receptor- $\alpha$ 66. (2005). Biochem Biophys Res Commun 336, 1023-27.

**Watanabe T, Inoue S, Sumito O.** Agonistic effect of tamoxifen in dependent on cell type, ere-promoter context, and estrogen receptor subtype: functional difference between estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  . (1997). Biochem Biophys Res Commun 236, 140-45.

**Weber LP, Hill RL, Janz DM.** Developmental estrogenic exposure in zebrafish (*Danio rerio*): II. Histological evaluation of gametogenesis and organ toxicity. (2003). Aquat Toxicol 63, 431-46.

**West NB, Brenner RM.** Estrogen receptor in the ductuli efferentes, epididymis, and testis of rhesus and cynomolgus macaques. (1990). Biol Reprod. 42, 533-8.

**Wester PW, Canton JH.** Histological studies of oryzias latipes (medaka) after long-term  $\beta$ -hexachlorocyclohexane exposure. (1986). Aquat Toxicol 9, 21-45.

**Whali W.** Evolution and expression of vitellogenina genes. (1988). Trends Genet 4, 227-32.

**Wheeler TF, Heim JR, LaTorre MR, Janes AB.** Mass spectral characterization of p-nonylphenol isomers using high-resolution capillary GC-MS. J (1997). Chromatogr Sci 35, 19-30.

**White DH, Hoffman DJ.** Effects of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans on nesting wood ducks (*Aix sponsa*) at Bayou Meto, Arkansas. (1995). Environ Health Perspect 103, 37-9

**Wiley HS, Wallace RA.** Three different molecular weight forms of the vitellogenin peptide from *Xenopus laevis*. (1978). Biochem Biophys Res Commun 85, 153-59.

**Williams PC.** Effects of stilbestrol on the ovaries of the hypophysectomised rats. (1940). Science 145, 388-89.

**Wong LB, Miller IF, Yeates DB.** Nature of the mammalian ciliary metachronal wave. (1993). J Applk Physiol 75, 458-67

**Wu KH, Tobias ML, Thornton JW, Kelley DB.** Estrogen receptors in *Xenopus*: duplicate genes, splice variants, and tissue-specific expression. (2003). Gen Comp Endocrinol. 134, 347.

**Wu C, Patiño R, Davis KB, Chang X.** Localization of estrogen receptor alpha and beta RNA in germinal and nongerminal epithelia of the channel catfish testis. (2001). *Gen Comp Endocrinol* 124, 12-20.

**Xia Z, Gale WL, Chang X, Langenau D, Patino R, Maule AG, Densmore LD.** Phylogenetic sequence analysis recombinant expression, and tissue distribution of a channel catfish estrogen receptor beta. (2000) *Gen Comp Endocrinol* 118, 139-149.

**Yadetic, F., Arukwe, A., Goksoyr, A., Male, R.** Induction of hepatic estrogen receptor in juvenile *Atlantic salmon* in vivo by the environmental estrogen, 4-nonylphenol. (1999). *Sci Total Environ* 223, 201-10.

**Yamamura J, Adachi T, Aoki N, Nakajima H, Nakamura R, Matsuda T.** Precursor- product relationship between chicken vitellogenin and the yolk proteins: the 40 kDa yolk plasma glycoprotein is derived from the C-terminal cysteine-rich domain of vitellogenin II. (1995). *Bioch. et Biophys. Acta* 1244, 384-94 .

**Younes MA, Pierrepoint CG.** Estrogen steroid receptor binding in the canine epididymis (1981). *Andrologia* 13, 562-72.

**Younes M, Evans BA, Chaisiri N, Valotaire Y, Pierrepoint CG.** Steroid receptors in the canine epididymis. (1979). *J Reprod Fertil* 56, 45-52.

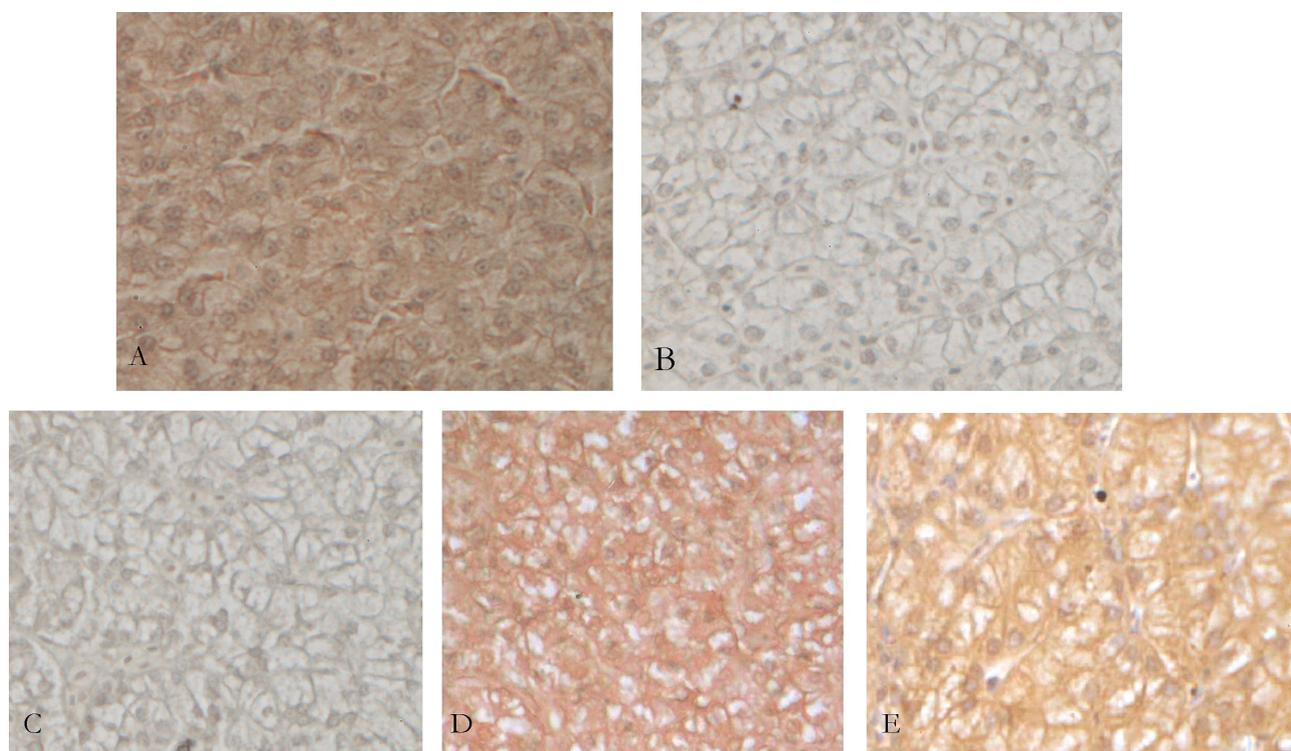
**Zha J, Sun L, Spear PA, Wang Z.** Comparison of ethinylestradiol and nonylphenol effects on reproduction of Chinese rare minnows (*Gobiocypris rarus*). (2007). *Ecotoxicol Environ Safety* 1-10

**Zhou Q, Clarke L, Nie R, Carnes K, Lai LW, Lien YH, Verkman A, Lubahn D, Fisher JS, Katzenellenbogen BS, Hess RA.** Estrogen action and male fertility: roles of the sodium/hydrogen exchanger-3 and fluid reabsorption in reproductive tract function. (2001). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 20, 14132-7.

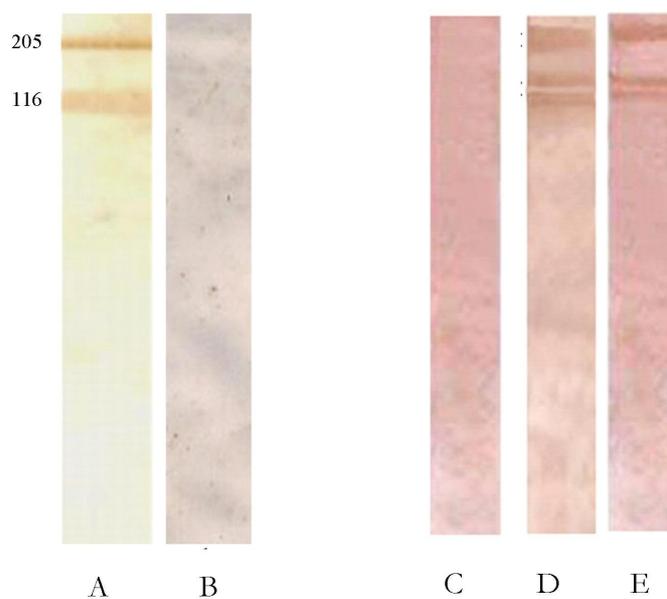
**Zini A, Schlegel PN.** Identification and characterization of antioxidant enzyme mRNAs in the rat epididymis. (1997). *Int J Androl.* 20, 86-91.

**Zondek B.** Mass excretion of oestrogenic hormone in the urine of the stallion. (1934). *Nature.* 193, 209-10

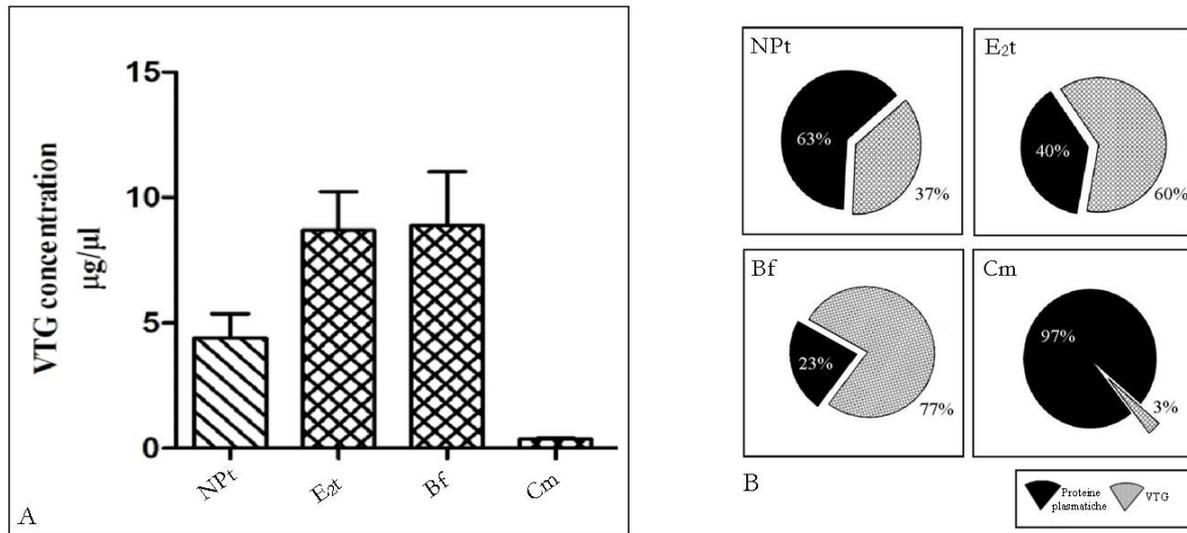
# ***Tavole***



**Fig.1:** Immunocitochimica anti-VTG: sezioni in paraffina di fegato di femmine e maschi. Evidente positività negli epatociti di femmine del periodo riproduttivo (A). Nessuna positività è evidente nelle femmine del periodo non riproduttivo e immature (B) e nei maschi naturali (C). Nei maschi il trattamento con NP (D) o E<sub>2</sub> (E) determina comparsa di VTGir.

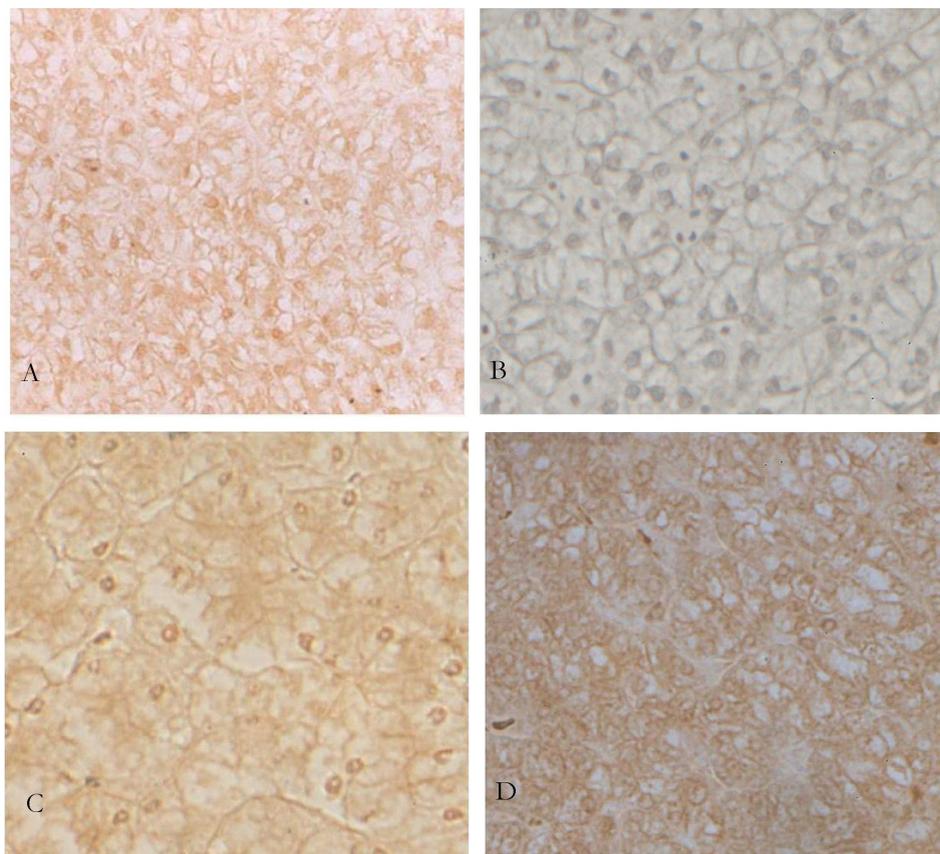


**Fig.2:** Western blotting su proteine plasmatiche con anti-VTG omologo di *Podarcis*. Due bande positive a 205 e 116 kDa nelle femmine del periodo riproduttivo (A) e nei maschi NPt (D) e E<sub>2</sub>t (E). Nessuna positività è evidente nelle femmine del periodo non riproduttivo (gennaio), nelle immature (B), e nei maschi controllo (C)

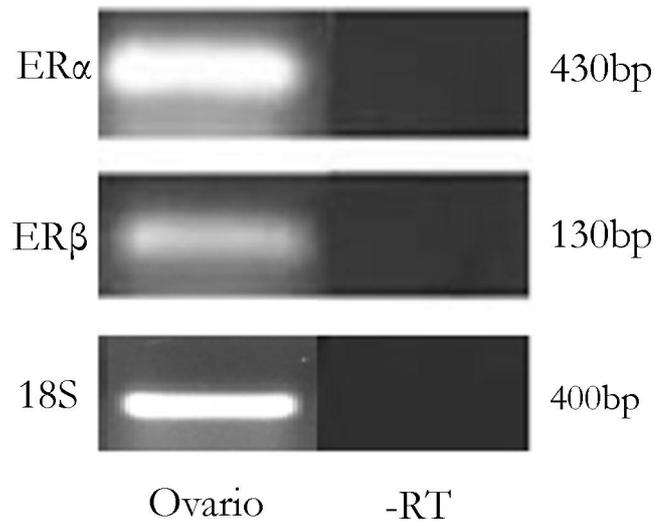


**Fig.3: A-** valori di VTG plasmatica misurata con saggio ELISA. La concentrazione di VTG nel plasma dei maschi NPt è circa la metà di quella presente in E<sub>2</sub>t, quest'ultima quasi pari a quella delle Bf. La sensibilità del saggio è 0.01 ng/µL. L'inter-assay è 3.5% per NPt; 5.8% per E<sub>2</sub>t; 6% per Bf; 1.7% per Cm. L'intra-assay è 7% per NPt; 3.4% per E<sub>2</sub>t; 1% per Bf; 4% per Cm.

**B-** ratio VTG/proteine plasmatiche nelle diverse condizioni sperimentali.

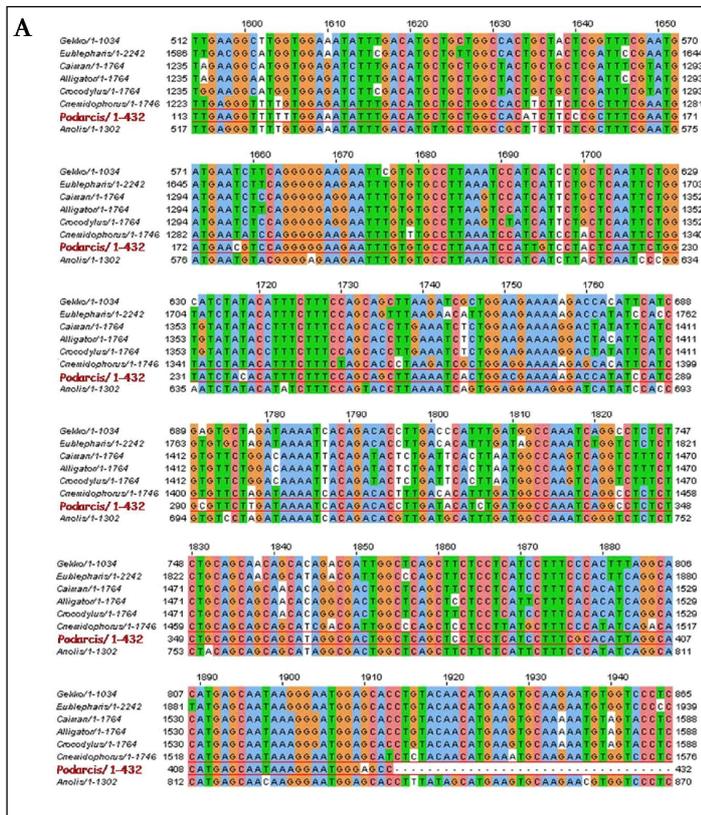


**Fig.4:** Immunocitochimica anti-ER $\alpha$ : positività negli epatociti di femmine del periodo riproduttivo (maggio) (A). Nessuna positività è evidente nei maschi naturali (B). irER $\alpha$  compare solo nei maschi NPt (C) o E<sub>2</sub>t (D)



**Fig.5:** RT-PCR con primers *ER $\alpha$*  e *ER $\beta$*  su ovario di ovario di femmina del periodo riproduttivo

**18S:** controllo della qualità del cDNA. **-RT:** RT-PCR senza enzima.



**B**

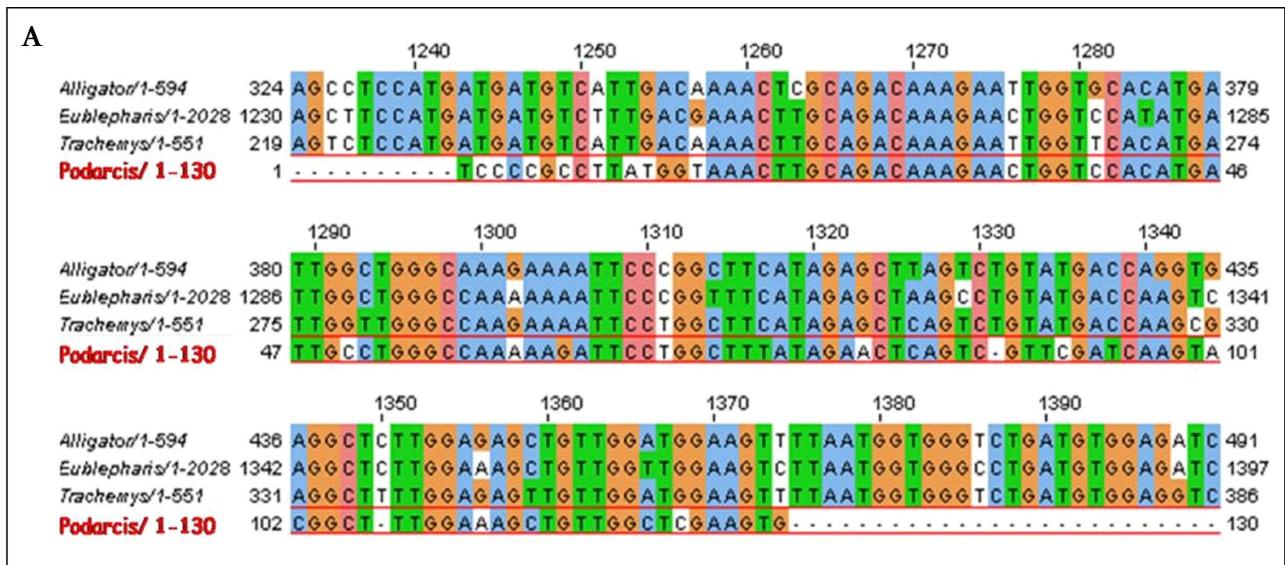
Identità nucleotidica ERα

---

Cnemidophorus unipoarens	86%
Gekko swinhonis	85%
Anolis carolinensis	84%
Eublepharis maculatus	85%
Caiman crocodilus	81%
Crocodylus niloticus	81%
Alligator mississippiensis	81%

---

**Fig.6:** A- analisi BLAST del frammento di 430 bp (ERα) di *Podarvis sicula*. La sequenza parziale del frammento è annotata in Banca dati No. AB482182. B- identità nucleotidica di ERα di *Podarvis* con altri rettili

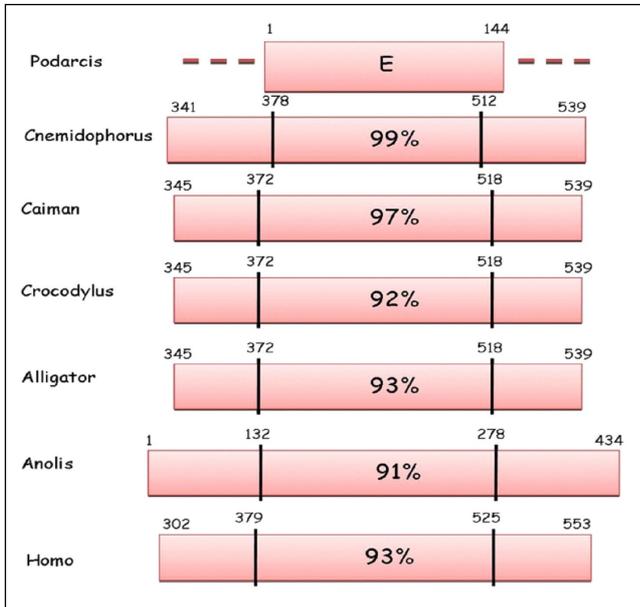


**Fig.7: A-** analisi BLAST del frammento di 130 bp ( $ER\beta$ ) di *Podarcis sicula*. La sequenza parziale del frammento è annotata in Banca dati No. AB482181.  
**B-** identità nucleotidica del frammento di  $ER\beta$  di *Podarcis* rispetto ad altri rettili

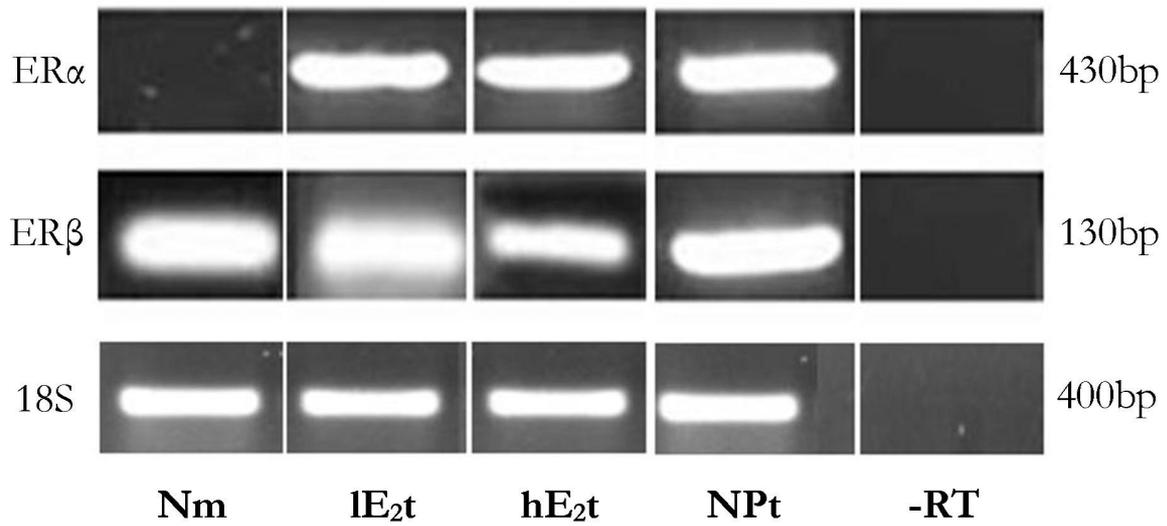
**B**

Identità nucleotidica  $ER\beta$

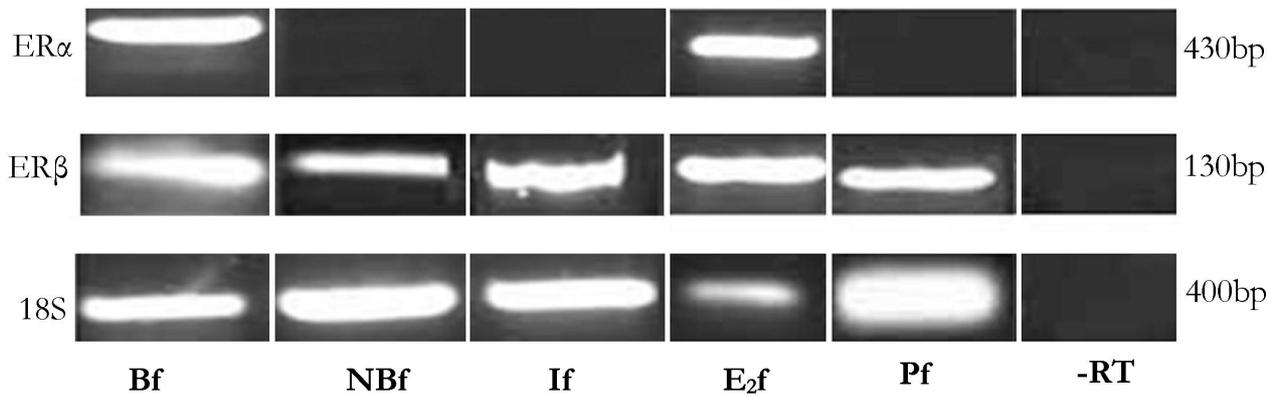
Eublepharis maculatus	84%
Trachemys scripta	82%
Alligator mississippiensis	81%



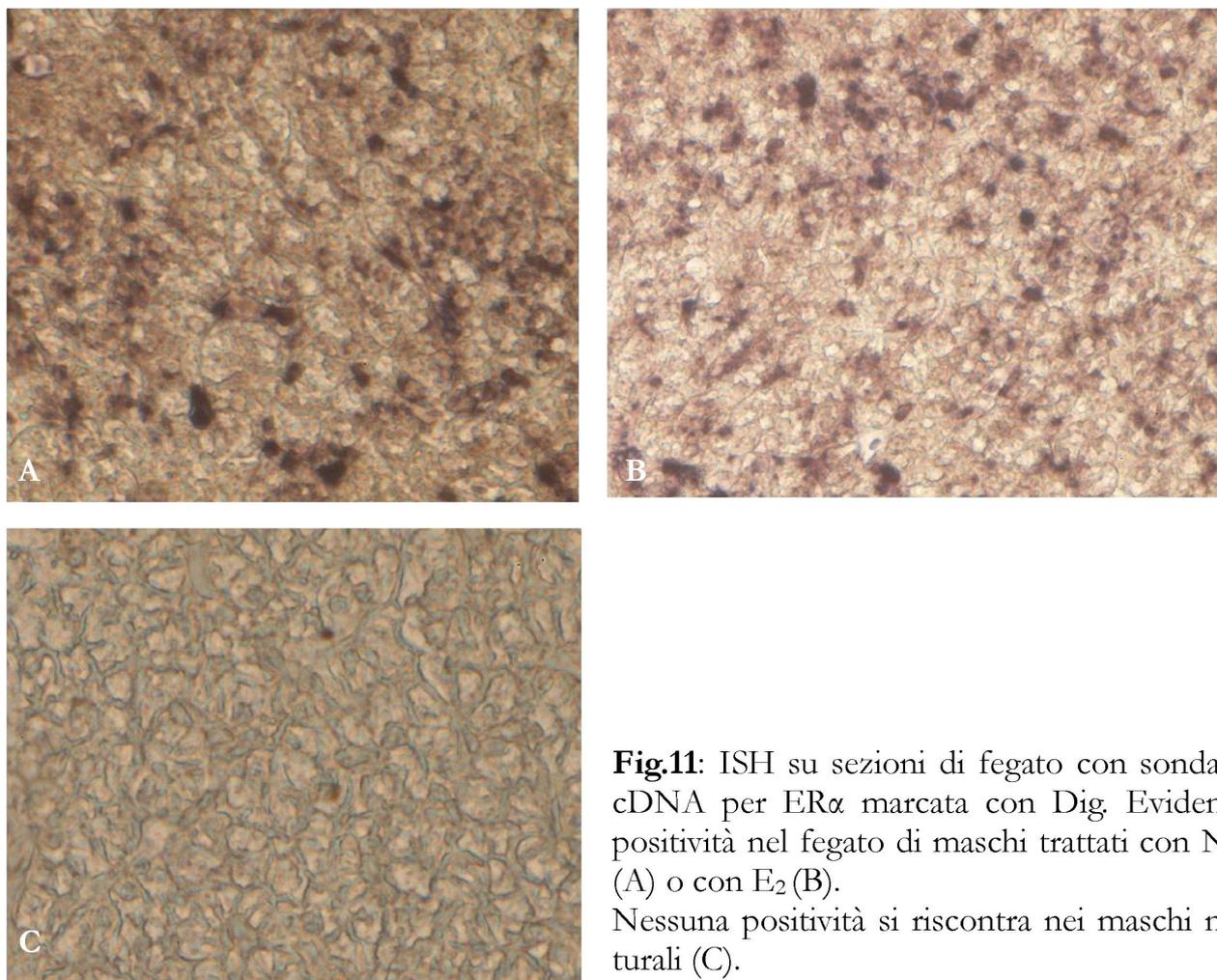
**Fig8:** confronto della dedotta sequenza amminoacidica del dominio che lega il ligando (E) di ER $\alpha$  di *Podarcis sicula* con le sequenze note per altre specie. È evidente un'elevata similarità con il dominio E di ER $\alpha$  umano.



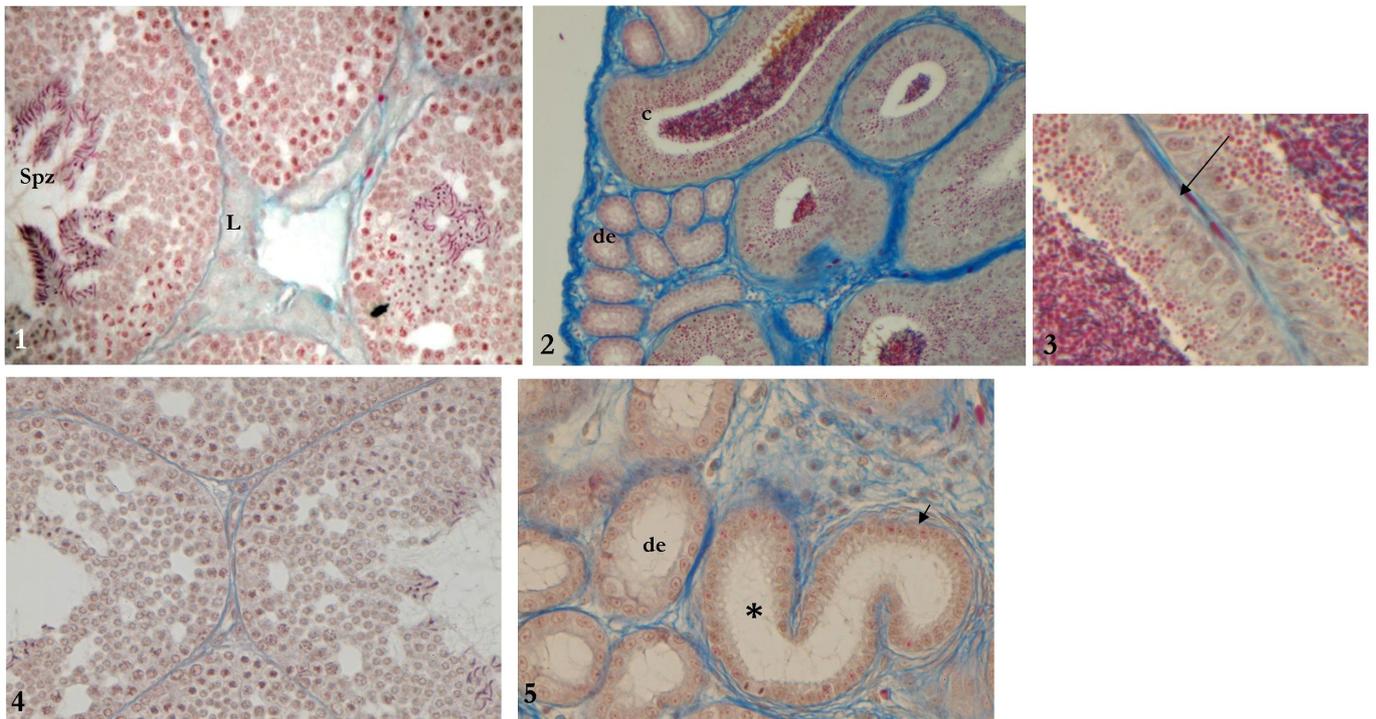
**Fig.9:** Analisi di espressione di *ER $\alpha$*  e *ER $\beta$*  nel fegato di maschi di *Podarcis*: naturali (**Nm**), trattati con una dose minore di E<sub>2</sub> (**1E<sub>2</sub>t**), con una dose maggiore di E<sub>2</sub> (**hE<sub>2</sub>t**), con NP (**NPt**). **18S**: controllo della qualità del cDNA; **-RT**: RT-PCR senza enzima.



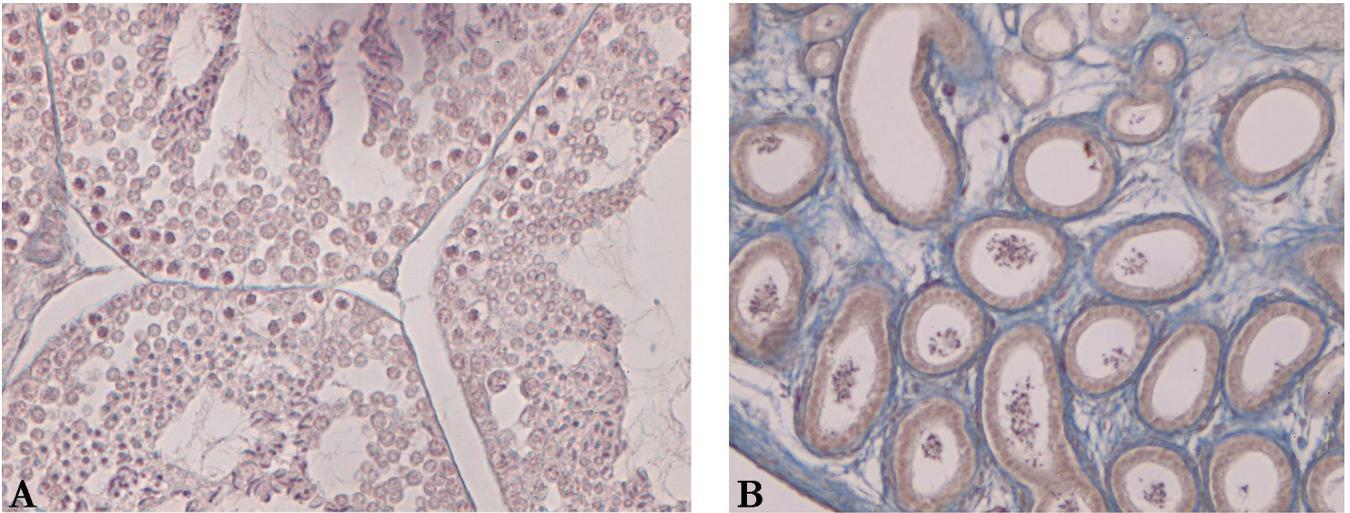
**Fig.10:** Analisi di espressione di *ERα* e *ERβ* nel fegato di femmine di *Podarcis*: del periodo riproduttivo (maggio) (**Bf**), del periodo non riproduttivo (gennaio) (**NBf**), immature (**If**), trattate con E<sub>2</sub> nel periodo non riproduttivo (gennaio) (**E2f**), trattate con P nel periodo riproduttivo (maggio) (**Pf**). **18S**: controllo della qualità del cDNA; -RT: RT-PCR senza enzima.



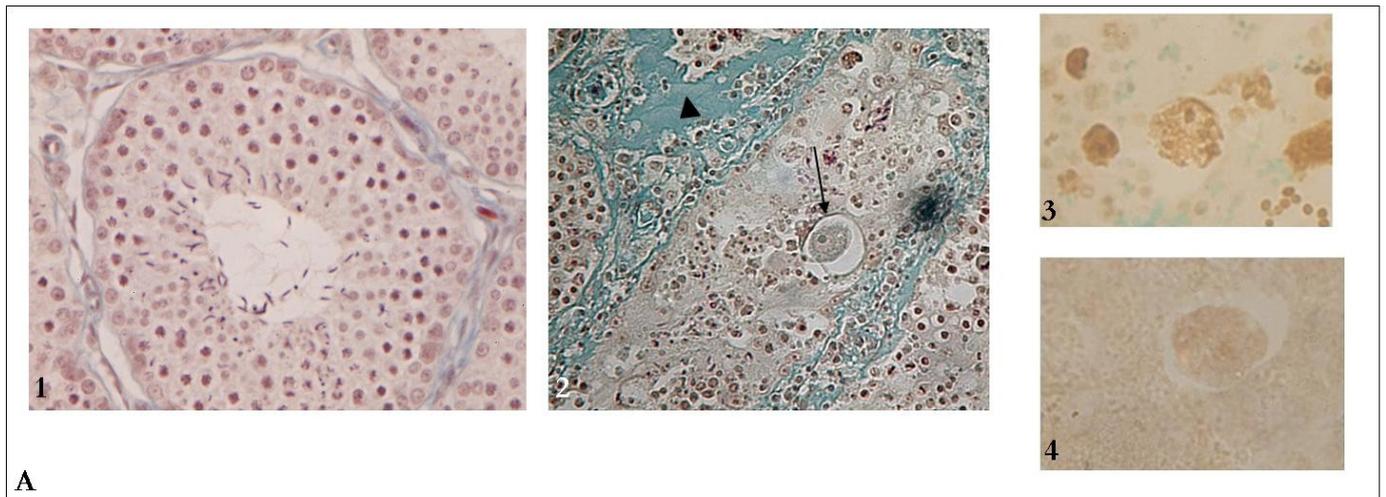
**Fig.11:** ISH su sezioni di fegato con sonda a cDNA per ER $\alpha$  marcata con Dig. Evidente positività nel fegato di maschi trattati con NP (A) o con E<sub>2</sub> (B). Nessuna positività si riscontra nei maschi naturali (C).



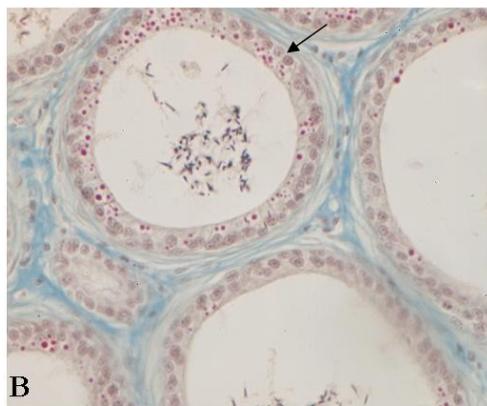
**Fig.12:** maschio naturale- periodo riproduttivo (maggio): nel lume del tubulo seminifero sono evidenti spermatozoi e cellule di Leydig (1); nell'epididimo le cellule del canale sono alte, spesso binucleate (3↑) e secernenti, il lume del canale (c) è pieno di secreto e spermatozoi (2), **de**: duttuli efferenti ciliati (3). Periodo non riproduttivo (gennaio): il lume del tubulo seminifero è ampio con evidenti spazi vuoti tra le cellule germinali (4); nell'epididmo le cellule del canale epididimale sono basse e non secernenti (↑), il lume (\*) è privo di secreto e di spermatozoi (5).



**Fig. 13:** maschi NPt testicolo (A) e epididimo (B) nel periodo riproduttivo: Nei tubuli seminiferi è evidente rallentamento della spermatogenesi, riduzione dell'epitelio seminifero, lume ampio e spazi vuoti tra le cellule germinali (A). Nell'epididimo il canale appare regredito (B).



A

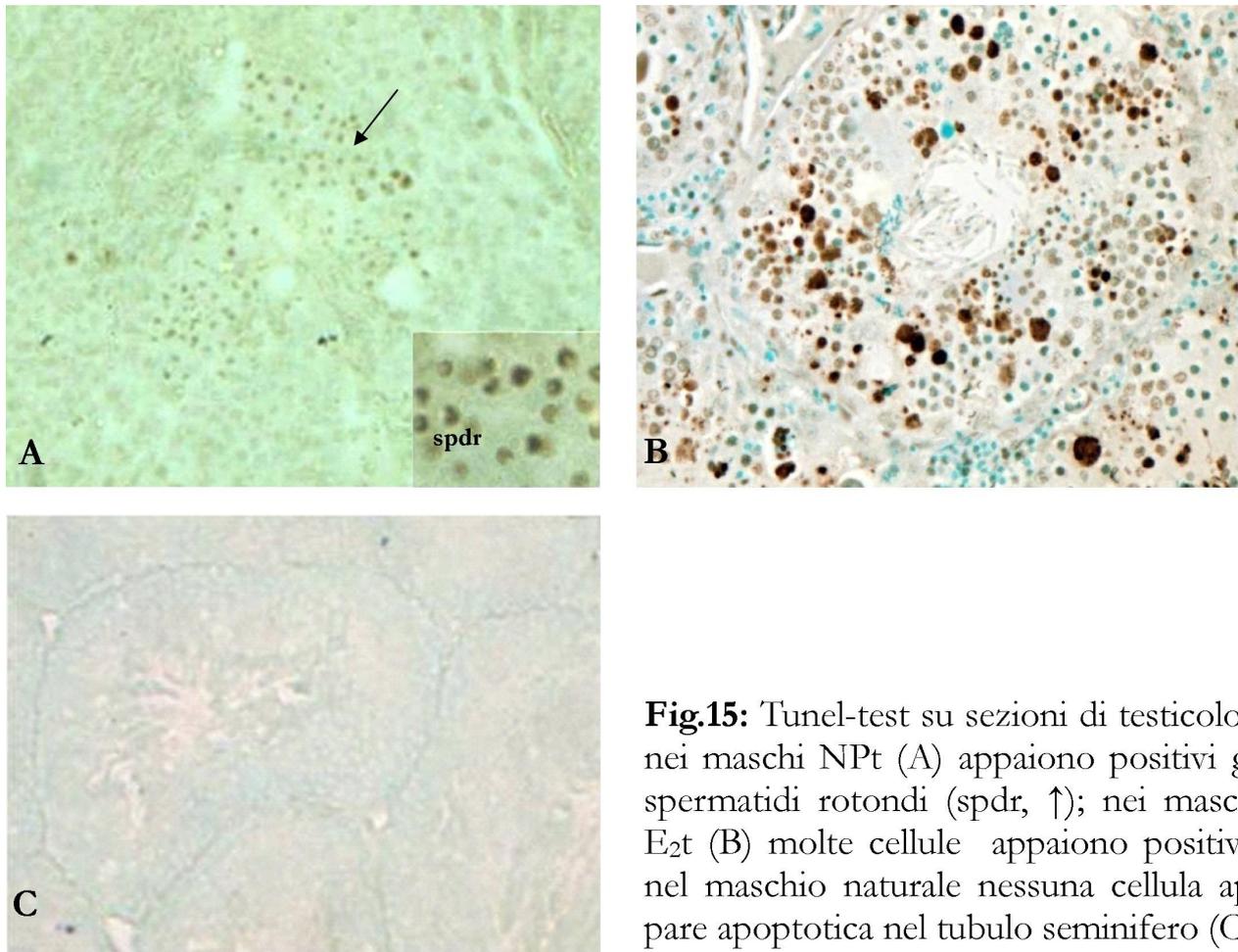


B

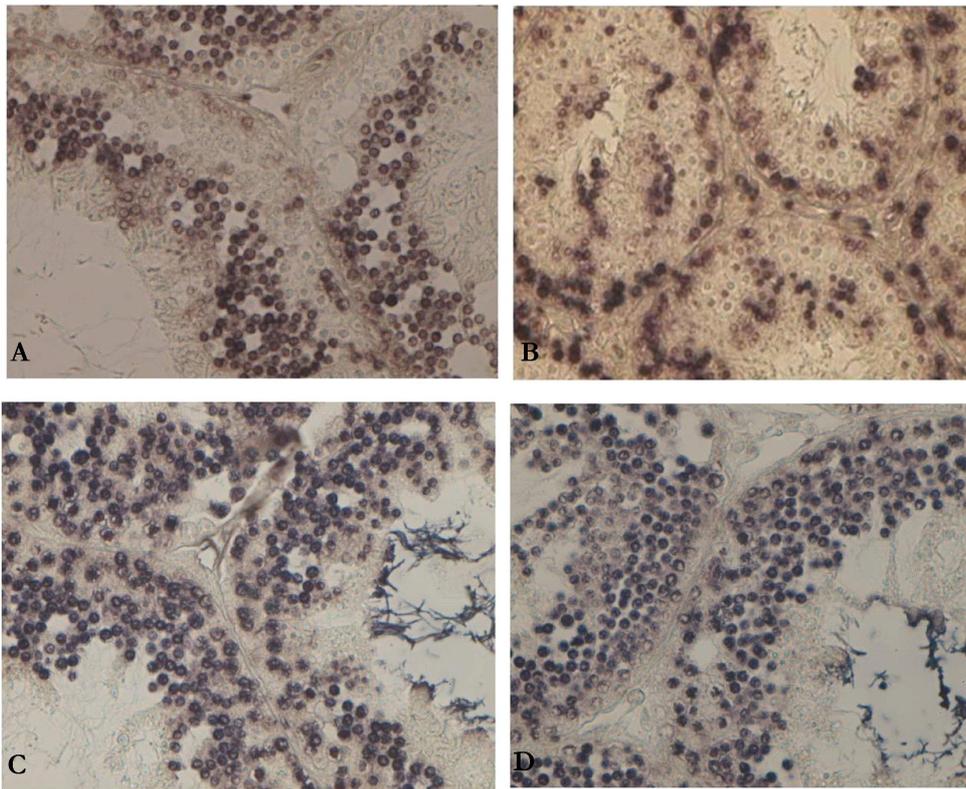
**Fig. 14:**maschi E<sub>2</sub>t nel periodo riproduttivo.

**A-** nel testicolo alcuni tubuli seminiferi presentano un rallentamento della spermatogenesi con pochi spermatozoi nel lume (1); altri tubuli appaiono più danneggiati: si osserva iperplasia del connettivo che circonda i tubuli (◄) e presenza di strutture oocyte-like (↑) (2) che sono positive alla Tunel (3) e all'anti-ER $\alpha$  (4).

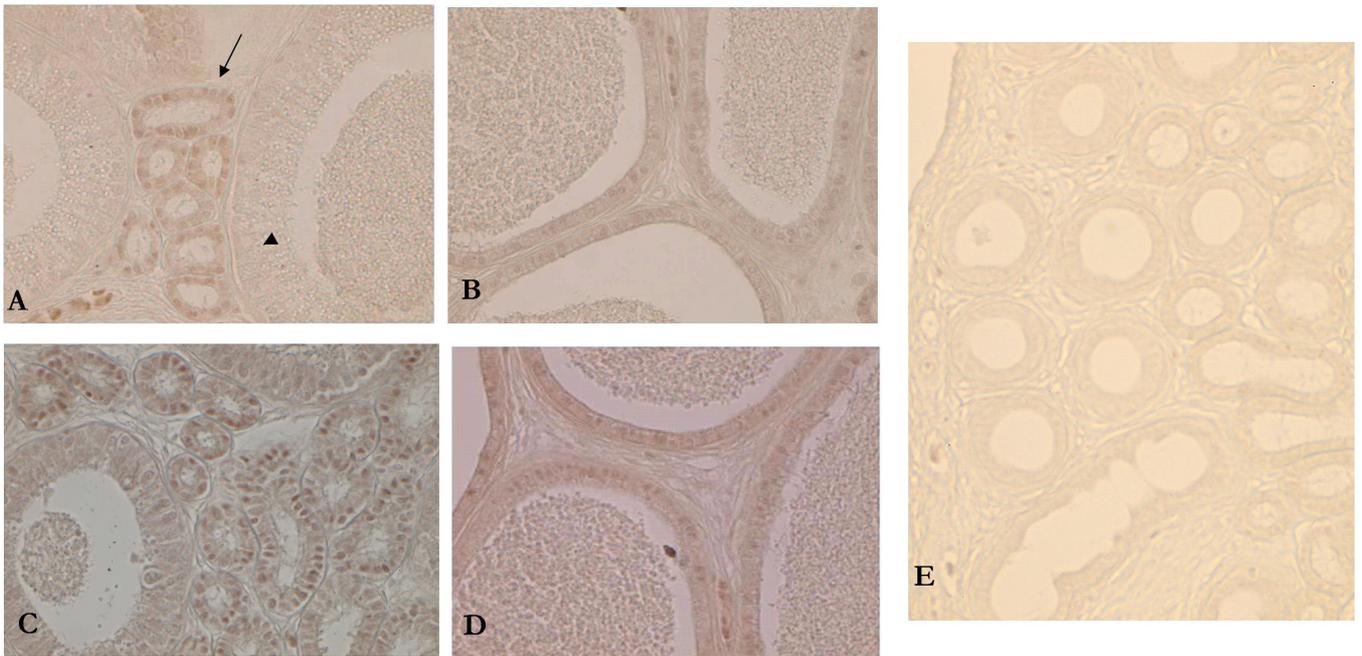
**B-** nell'epididimo le cellule del canale sono ridotte in altezza e scarsamente secernenti (↑).



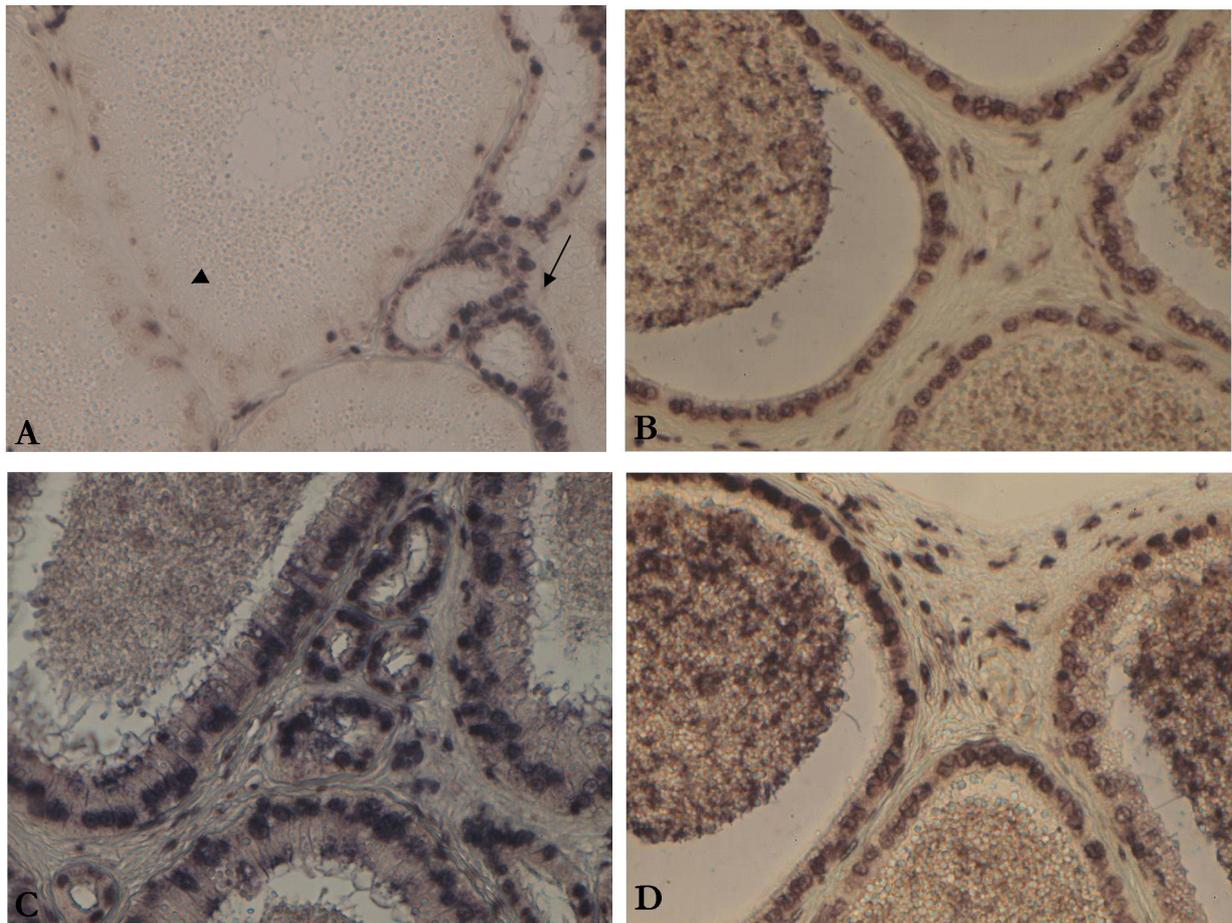
**Fig.15:** TUNEL-test su sezioni di testicolo - nei maschi NPt (A) appaiono positivi gli spermatidi rotondi (spdr, ↑); nei maschi E<sub>2</sub>t (B) molte cellule appaiono positive; nel maschio naturale nessuna cellula appare apoptotica nel tubulo seminifero (C).



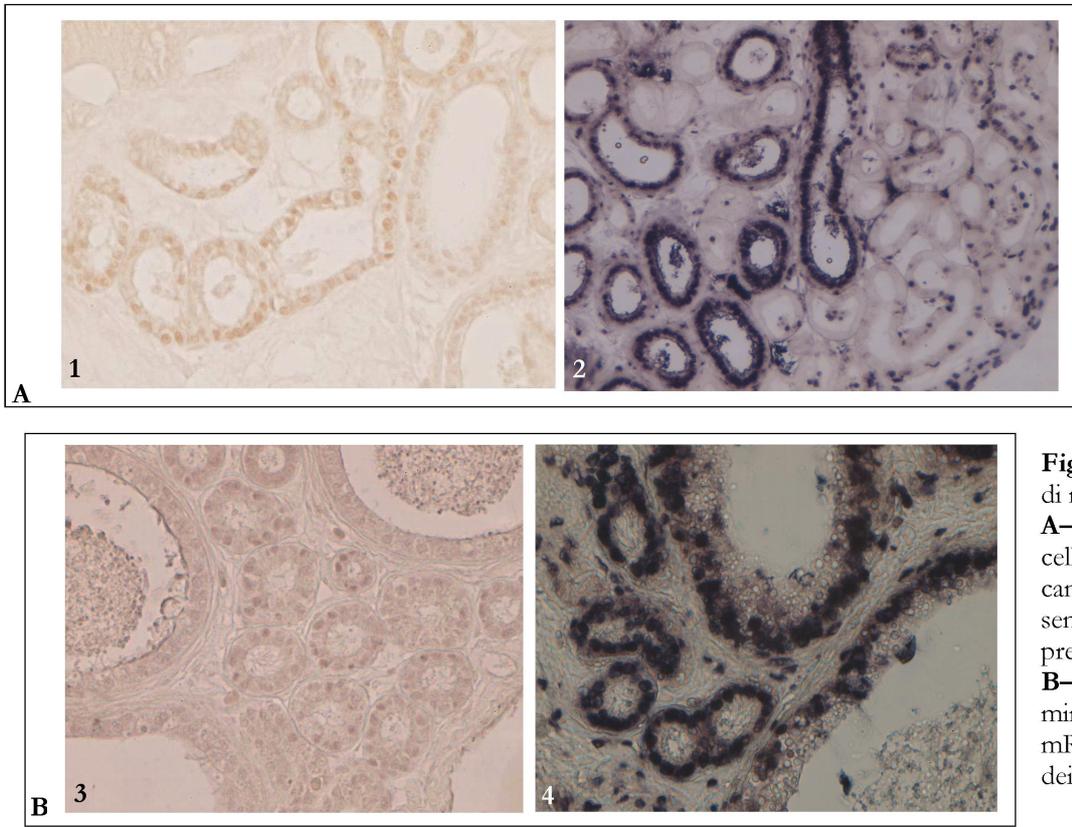
**Fig.16:** ISH-ERa testicolo di *Podarcis sicula*- nei maschi naturali del pieno periodo riproduttivo si osserva positività a livello di SpcI e SpcII (A); nel primo periodo di stasi (fine giugno) è evidente positività negli SpcI e Spg (B). Nei maschi NPt (C) o E<sub>2</sub>t (D) nel periodo riproduttivo evidente positività in SpcI, SpcII e Spg.



**Fig.17:** immunocitochimica anti ER $\alpha$  epididimo di maschi naturali- evidente positività nel periodo riproduttivo nelle cellule dei duttuli efferenti (A $\uparrow$ ) e della coda (B), nessuna positività si riscontra nel canale (A, ◀). All'inizio del primo periodo di stasi (fine giugno) tutte le cellule dell'epididimo appaiono positive (C, D). Nel periodo non riproduttivo l'epididimo non è responsivo agli estrogeni (E).



**Fig.18:** ISH-*ERα* epididimo di maschi naturali- positività nel periodo riproduttivo nelle cellule dei duttuli efferenti (A↑) e della coda (B), nessuna positività si osserva nel canale (A,◄). All'inizio della stasi tutte le cellule dell'epididimo presentano mRNA per *ERα* (C,D)



**Fig.19:** ICC e ISH in epididimo di maschi NPt (A) e E<sub>2</sub>t (B).

**A-** irER $\alpha$  sono evidenti nelle cellule dei duttuli efferenti e del canale (1); mRNA *ER $\alpha$*  è presente nelle cellule del canale e pressoché assente nei duttuli (2).

**B-** il trattamento con E<sub>2</sub> determina presenza di irER $\alpha$  (3) e mRNA per *ER $\alpha$*  (4) nelle cellule dei duttuli e nel canale