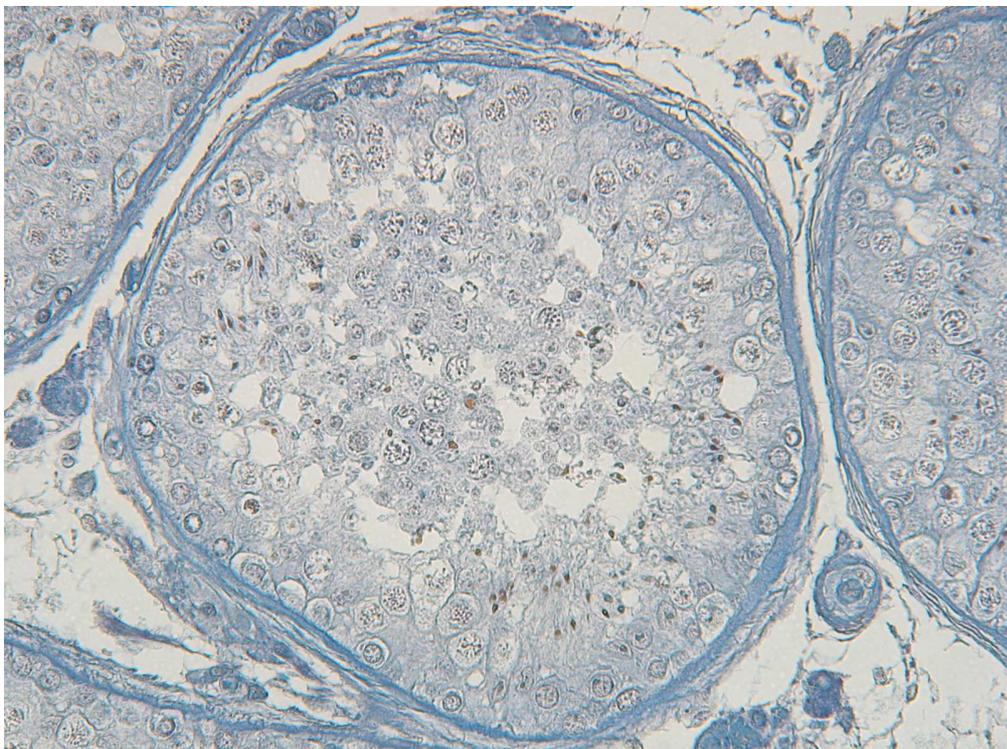


# **Introduzione**

## TUMORI TESTICOLARI

### Introduzione

Il tumore del testicolo rappresenta l'1-2% di tutti i tumori maschili (Fig 1). Si può diagnosticare ad ogni età, ma ha picco di incidenza tra i 15 e i 35 anni. In Italia si registrano 500-600 nuovi casi all'anno. Tale neoplasia era fino a 25 anni fa la prima causa di morte per cancro nell'uomo al di sotto dei 40 anni. Negli ultimi 20 anni lo sviluppo di nuove terapie antineoplastiche (chemioterapia e/o radioterapia), combinate con tecniche chirurgiche, hanno permesso il miglioramento della prognosi e della sopravvivenza di questi pazienti. Attualmente circa il 90% di questi tumori, se diagnosticati precocemente, raggiunge la guarigione.



*Fig.1 - Sezione di testicolo normale*

## **Epidemiologia**

La frequenza della patologia neoplastica a livello del testicolo ha un andamento trimodale: un picco in età infantile (1/100.000 nei maschi sotto i 15 anni), uno in età giovane-adulta (11/100.000 tra i 15 e i 29 anni) ed un picco nell'anziano (1/100.000 all'età di 70 anni). Negli ultimi 40 anni l'incidenza di questa patologia è aumentata di oltre 2 volte, con un picco più elevato in Svizzera, nei paesi scandinavi ed in Nuova Zelanda, mentre l'incidenza più bassa si riscontra in Africa ed in Asia. Per quanto riguarda le razze, anche il rapporto fra gli uomini di razza bianca rispetto a quella nera sta rapidamente cambiando, una volta era molto più diffuso in quella bianca (più di 4 volte maggiore), ma ultimamente la razza nera è sempre più coinvolta.<sup>[1]</sup>

## **Eziopatogenesi**

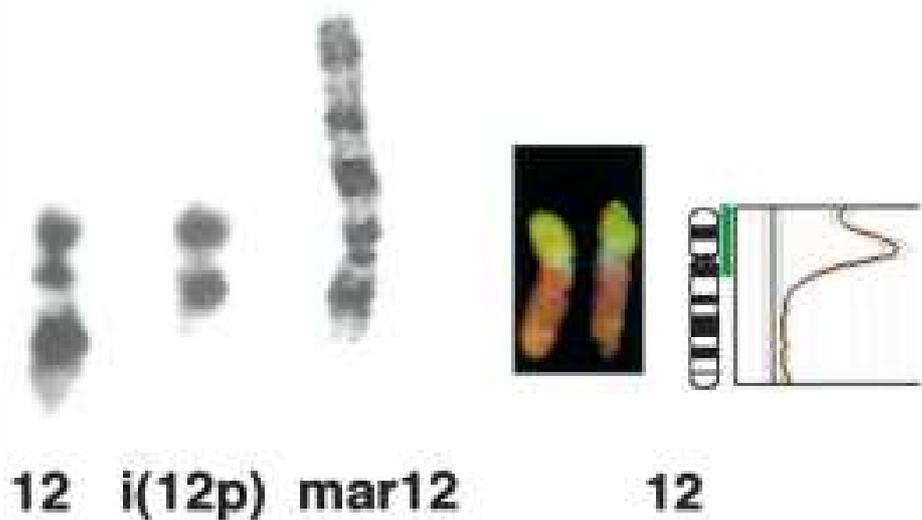
Attualmente vi sono soltanto ipotesi eziologiche. Come per tutte le neoplasie, anche per i tumori testicolari, la causa principale rimane sconosciuta. Sono stati individuati vari fattori predisponenti quali criptorchidismo, tumore testicolare controlaterale e storia familiare di neoplasia testicolare. Il testicolo ritenuto incrementa da 2 a 4 volte il rischio degenerazione neoplastica.<sup>[2]</sup> Tale rischio non si riduce significativamente neanche dopo il suo riposizionamento nella sacca scrotale tramite intervento di orchidopessi, a confermare l'ipotesi disegnetica del criptorchismo. La relazione tra testicolo ritenuto e tumore del testicolo non è ancora chiara; è stato suggerito che i fattori genetici, lo stile di vita e fattori ambientali, possano essere fattori eziologici comuni di entrambe le patologie. Il criptorchismo potrebbe far parte di una catena di eventi che culminano nella neoplasia testicolare. È stato riscontrato, inoltre, che i

pazienti con tumore testicolare monolaterale hanno un maggiore fattore di rischio di insorgenza di tumore controlaterale. <sup>[3]</sup>

Come per altre neoplasie anche per il tumore del testicolo è stata messa in evidenza la predisposizione familiare che si riscontra nel 2% dei casi. Fratelli di pazienti con cancro del testicolo hanno un rischio da 6 a 10 volte maggiore di sviluppare la stessa malattia. E' ragionevole pensare che la suscettibilità genetica sia un fattore molto importante nella eziologia di questa patologia neoplastica, che non può essere spiegata solo da fattori ambientali.

Questa neoplasia ha anche un substrato genetico. Nel 2000 Rapley et al., hanno studiato 134 alberi genealogici, con 2 o più casi di tumore del testicolo, dimostrando una associazione della neoplasia con il locus Xq27. Dall'analisi del linkage si mette in evidenza la presenza, in questo locus, di un gene suscettibile al tumore del testicolo. <sup>[4]</sup> Nel 2006 l'International Testicular Cancer Linkage Consortium ha effettuato uno studio genico su 237 alberi genealogici dimostrando una associazione tra tumore del testicolo e 6 "regioni genomiche di interesse" ovvero: 2p23, 3p12, 3q26, 12p13-q21, 18q21-q23 e Xq27. <sup>[5]</sup> (fig 2) Per il tumore testicolare è stato dimostrato anche un substrato genetico legato all'isocromosoma p12 ovvero la duplicazione del braccio corto del cromosoma 12; la principale alterazione cromosomica rilevata in questa neoplasia, infatti, è i(12p). <sup>[6]</sup> L'amplificazione di una regione nel braccio corto del cromosoma 12 è osservata virtualmente in tutti i casi. In circa l'80% degli uomini ciò accade attraverso la presenza dell'isocromosoma 12p-i(12p), mentre nel resto dei casi si ha amplificazione di una sezione del braccio corto del cromosoma 12 che ha traslocato in altri cromosomi. Inoltre la ciclina D2,

importante nella replicazione cellulare, che è soppressa in tali neoplasie, è codificata da un gene presente sul cromosoma 12. Ne risulta, quindi, che la ciclina D2 potrebbe essere un oncogene di questi tumori. Recentemente diversi lavori hanno valutato i polimorfismi genici che possono essere coinvolti nella modulazione del meccanismo di azione degli ormoni sessuali. L'insensibilità agli androgeni è stata ipotizzata essere un fattore di rischio del tumore testicolare. Studi epidemiologici hanno dimostrato che la diversa lunghezza delle triplette ripetute CAG possono giocare un ruolo importante nell'insorgenza di tale neoplasia. La razza Africana, infatti, ha un minor numero di triplette CAG e un minore rischio di tumore del testicolo rispetto alla razza Caucasica. I dati in letteratura, che analizzano una possibile relazione tra lunghezza dei CAG e tumore testicolare, sono pochi e contrastanti. [\[7,8,9,10, 11\]](#)



*Fig.2 - Cromosoma 12 coinvolto nella eziologia del tumore del testicolo*

### *Fattori di rischio prenatali e perinatali*

Le caratteristiche epidemiologiche, precedentemente descritte, hanno incoraggiato ipotesi eziologiche nell'insorgenza di tale patologia neoplastica. Alla fine del 1970 viene proposto che i livelli di estradiolo delle donne in gravidanza giochino un ruolo critico durante la vita fetale nella carcinogenesi testicolare. Dal 1980 la ricerca sulla eziologia del tumore testicolare viene focalizzata sui fattori prenatali e perinatali. In una review del 2005 Garner et al., hanno preso in considerazione fattori quali l'ordine di nascita, la durata della gestazione, l'età materna, la nausea durante la gravidanza, il peso alla nascita, etc. Relativamente alla età materna i risultati sono contrastanti: alcuni lavori hanno evidenziato un rischio di tumore 2 volte più elevato in madri con età avanzata, mentre in altri studi tale correlazione non è stata trovata. I dati sono contrastanti anche relativamente ad un altro fattore di rischio: il peso alla nascita; alcuni lavori hanno rilevato un aumento di rischio di insorgenza della neoplasia nei neonati con basso peso, mentre altri non hanno rilevato alcuna associazione. [\[12,13,14,15\]](#) Negli anni 80 viene proposta come causa di insorgenza del tumore testicolare l'esposizione fetale ad ormoni ed, in particolare, al dietilstilbestrolo, estrogeno non steroideo utilizzato, in passato, per prevenire aborti e complicanze durante la gestazione. In diversi studi caso-controllo su pazienti affetti da neoplasia del testicolo è stato valutato l'effetto degli ormoni assunti durante la gravidanza ottenendo risultati contrastanti. [\[14,16\]](#)

### *Fattori postnatali*

Anche i fattori ambientali sono stati associati ad un incremento di rischio di tumore del testicolo. Un aumento di neoplasia testicolare è stato segnalato in addetti alla

lavorazione del petrolio greggio e all'estrazione di gas naturali e in addetti all'agricoltura e all'allevamento del bestiame. I gruppi di professionisti a rischio includono vari settori tra cui fabbriche alimentari o di pellami, lavoratori esposti a microonde o onde radio e militari.

Garner et al., nel 2003 [\[17\]](#) ha dimostrato come anche la dieta alimentare possa essere associata all'insorgenza del tumore. Una elevata assunzione di grassi e di latticini è correlata con un maggiore rischio di tumore del testicolo. Latte e formaggi contengono estrogeni e progesterone, ormoni che vengono associati con l'insorgenza della neoplasia.

Alcuni autori hanno identificato l'infertilità maschile come un possibile fattore di rischio per il tumore testicolare. Una alterata spermatogenesi potrebbe essere causata da esposizione in utero estrogeni sintetici [\[18\]](#), inquinanti ambientali, alterazioni ormonali, fattori psicologici e immunologici. Gli inquinanti ambientali possono interferire con il bilancio ormonale dei soggetti anche durante la vita postnatale e determinare nell'adulto infertilità e tumore testicolare.

L'ipotesi patogenetica più accreditata, attualmente, è la "teoria della maggiore impregnazione estrogenica". Nel 1993 Sharpe e Skakkebeak propongono la definizione di "sindrome di disgenesia testicolare" (TDS), la cui eziologia è legata alla esposizione ad estrogeni ambientali, denominati endocrine disrupters (EDCs) o interferenti endocrini, e ad una suscettibilità genetica a tali sostanze chimiche. [\[19,20,21\]](#) La disgenesia testicolare (fig 3) insorge durante la formazione del tratto riproduttivo maschile ovvero il primo periodo dello sviluppo fetale e può determinare criptorchidismo, ipospadia, tumore del testicolo e alterazione dei parametri seminali.

[22,23] Secondo questa ipotesi, la presenza di estrogeni ambientali causa una alterazione delle cellule primordiali nella cascata differenziativa spermatogenetica, determinando, quindi, la formazione di cellule che dopo la nascita possono trasformarsi in maligne ed evolvere in carcinoma in situ. Queste cellule saranno quiescenti durante l'infanzia, ma la pubertà e gli stimoli endocrini potrebbero determinare un aumento di tali cellule e la diffusione nei tubuli seminiferi. I fattori scatenanti che inducono la trasformazione del CIS in neoplasia non sono noti. L'impregnazione di estrogeni può essere un fattore secondario ad una maggiore assunzione di ormoni o causata da uno sbilancio ormonale endogeno. Il Dietilstilbestrolo è stato prescritto per 30 anni per prevenire aborti. Studi successivi hanno evidenziato che questo estrogeno sintetico aveva aumentato il rischio di malformazione testicolare, sviluppo di cisti e alterazione della spermatogenesi.

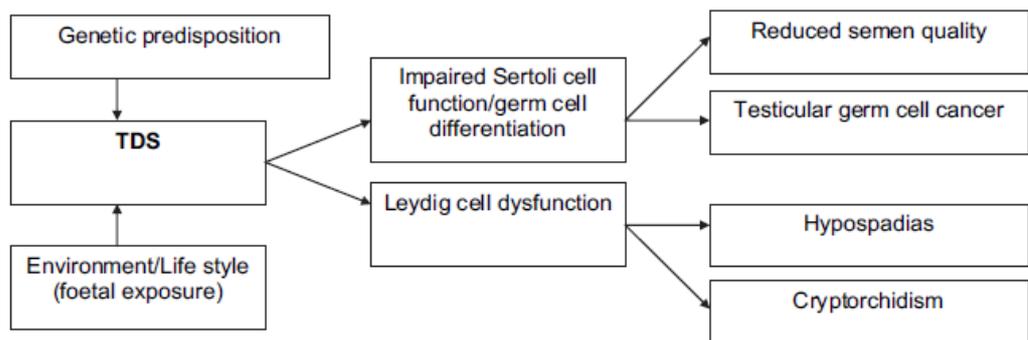


Fig.3 - Schema della Sindrome di disgenesia del testicolo (TDS)

## Classificazione dei tumori del testicolo

Le neoplasie testicolari ricoprono una vasta gamma di tipi istologici <sup>[24,25]</sup> (Tab1). Sono divise in due grandi categorie: *tumori delle cellule germinali* e *tumori delle cellule non germinali*. Circa il 95% origina da cellule germinali. La maggior parte di queste neoplasie germinali sono molto aggressive e presentano una rapida e diffusa disseminazione metastatica anche se , con le terapie attualmente disponibili, possono essere curate. <sup>[26]</sup> Si ritiene che i tumori a cellule germinali rappresentino la controparte maligna dello sviluppo embrionale normale. La cellula primordiale ha la capacità di formare sia tessuti embrionali (endo, meso ed ectoderma) che daranno in seguito origine sia a strutture somatiche mature che a tessuti extra-embryonali. Il corrispettivo maligno di una cellula germinale primordiale conserva la sua pluripotenzialità pertanto si ipotizza che il seminoma derivi dallo spermatozoo, il corion carcinoma ed il tumore del sacco vitellino dalla differenziazione in strutture extra-embryonali.

I tumori non germinali comprendono i tumori dello stroma e dei cordoni sessuali, con riferimento alle cellule stromali specializzate interstiziali, come quelle del Leyding, ed alle cellule stromali dei cordoni sessuali delle prime fasi di differenziazione della gonade, come quelle del Sertoli. Sono generalmente benigni, alcuni di questi producono ormoni steroidei e causano sindromi endocrinologiche. Poco frequente è l'evenienza di un linfoma extranodale localizzato al testicolo. Con estrema rarità dallo stroma connettivo-vascolare possono originare tumori, quasi generalmente benigni, tra cui angiomi, leiomiomi, neuro fibromi, che non si diversificano dagli omonimi tumori di altre sedi. Si possono osservare, in casi rari,

tumori della rete testis, adedoni o adenocarcinomi. Al testicolo si possono estendere rari sarcomi paratesticolari, per lo più rabdosarcomi dell'infanzia e della adolescenza. Il testicolo può essere sede, occasionalmente, di tumori metastatici derivanti da carcinomi prostatici o polmonari.

<b>Classificazione e stadiazione dei tumori testicolari</b>		
TNM (UICC 2002)	Estensione del tumore primitivo (pT)	pTx: non definibile pT0: non evidenziabile pTis: tumore esclusivamente intratubulare ( <i>in situ</i> ) pT1: limitato al testicolo, compresa la rete testis pT2: supera l'albuginea o invade l'epididimo pT3: invasione del funicolo spermatico pT4: invasione dello scroto
	Linfonodi regionali (N)	Nx: linfonodi regionali non definibili N1-3: metastasi linfonodali con dimensioni da 2 a 5 cm
	Metastasi a distanza (M)	Mx: metastasi non definibili M1 (1a o 1b): metastasi a distanza, viscerali e non, polmonari e non
Royal Marsden Hospital	Stadio I: tumore limitato al testicolo senza evidenza di linfoadenopatie Stadio IV: presenza di metastasi linfatiche ed extra-linfatiche sopra e sotto-diaframmatiche	
Memorial Sloan Kettering Cancer Center (per i tumori germinali non seminomatosi)	Stadio A, B (1, 2, 3) e C, con interesse soprattutto alle stazioni linfonodali interessate	
Seminomi e tumori non seminomatosi	Stadio I: tumore localizzato al solo testicolo, senza diffusione a linfonodi o altri organi Stadio IIa: interessamento dei linfonodi addominali con diametro $\leq 2$ cm Stadio IIb: interessamento dei linfonodi addominali con diametro $> 2$ cm Stadio IIc: interessamento dei linfonodi addominali con diametro $> 5$ cm Stadio III: estensione extra-addominale, con interessamento di altri linfonodi o organi	

Tabella 1 - Classificazione e stadiazione dei tumori testicolari

## **Tumore a cellule germinali del testicolo**

Le cellule germinali sono totipotenti e una volta subita la trasformazione neoplastica, non vengono inibite durante la loro differenziazione (Fig 4)

I tumori a cellule germinali (*germ cell tumors* GCT) del testicolo sono classificati in due categorie sulla base della presenza di uno solo o di più tipi istologici. Quelli che presentano un unico tipo istologico rappresentano circa il 40% di tutte le neoplasie testicolari; nel restante 60% si osserva una commistione di due o più tipi istologici.

I tumori a cellule germinali del testicolo si originano da una neoplasia intratubulare a cellule germinali- *IntraTubular Germ Cell Neoplasia*, ITGCN. Le cellule germinali neoplastiche si differenziano sulla linea gonadica dando origine al *seminoma*, o si trasformano in una popolazione di cellule totipotenti che maturano nei *tumori non seminomatosi* (NSGT9) Fig.5. Queste cellule totipotenti possono rimanere anaplastiche, formando quindi *carcinoma embrionario*, oppure possono differenziarsi in una linea extraembrionaria determinando la formazione di *tumori del sacco vitellino* o i *corio carcinomi*. Il teratoma deriva dalla differenziazione delle cellule embrionarie carcinomatose lungo la linea dei tre foglietti embrionali. Analogamente i seminomi possono essere i precursori da cui originano altre forme di neoplasie testicolari germinali.

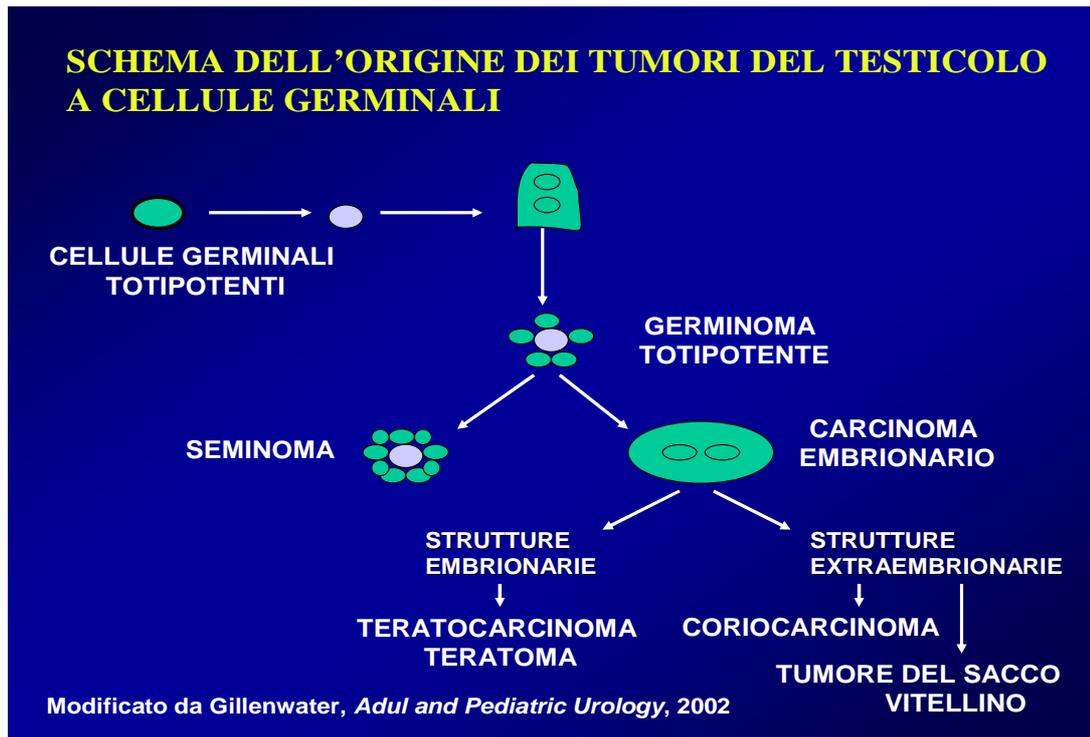
I tumori germinali possono avere anche una origine extragonadica, principalmente nel mediastino, nel retro peritoneo e nella regione pineale-soprascellare. Tali localizzazioni derivano, verosimilmente, dalla migrazione aberrante di cellule germinali nelle prime fasi della embriogenesi, o in alternativa da alcune cellule

staminali precursori comuni delle cellule germinali, delle cellule del timo e dei pinealociti.

I tumori a cellule germinali del testicolo derivano da lesioni pre-invasive all'interno dei tubuli seminiferi, da una cellula germinale totipotente. La presenza di cellule indifferenziate intratubulari configura la neoplasia intratubulare a cellule germinali indifferenziata detta carcinoma in situ (CIS), localizzata sulla membrana basale del tubulo seminifero. Tale presenza indica una probabilità del 50% che il testicolo sviluppi un tumore invasivo entro 5 anni. Il CIS non presenta caratteristiche di differenziazione che ne determina la formazione del tumore del testicolo definitivo, ma la differenziazione avviene nel momento in cui la neoplasia preinvasiva diventa invasiva e infila l'interstizio. L'ipotesi più accreditata sull'istogenesi dei tumori a cellule germinali del testicolo è che tali neoplasie deriverebbero da una cellula germinale totipotente che, ad ogni divisione mitotica, dà origine, da un lato, ad una cellula che prosegue nel processo di differenziazione e determina la formazione di spermatozoi ed una altra cellula che mantiene le caratteristiche della cellula da cui ha avuto origine. I processi di formazione del tumore possono interessare entrambe le linee cellulari e determinare rispettivamente la formazione di tumori seminomatosi e di tumori non seminomatosi. In questo secondo caso la cellula può seguire due vie: rimanere indifferenziata e dare origine al carcinoma embrionale, oppure iniziare un processo di differenziazione, che potrà svilupparsi seguendo la linea cellulare embrionale determinando la formazione di un teratoma o teratocarcinoma, oppure seguendo la linea extraembrionale, dando origine al corio carcinoma o al tumore del sacco vitellino. Come in tutte le forme neoplastiche, le alterazioni del genoma sono importanti anche nella patogenesi del tumore del testicolo. La presenza di un

isocromosoma del braccio corto del cromosoma 12, i(12p), è costante in tutte le neoplasie a cellule germinali, indipendentemente dal loro tipo istologico. Nel 10% circa dei casi in cui i(12p) non viene trovato, si può osservare su altri cromosomi materiale genetico accessorio derivante da 12p. Evidentemente, il dosaggio dei geni localizzati su 12p è determinante per la patogenesi delle neoplasie testicolari, tanto che sono stati identificati molti geni candidati tra cui DAD-R, efficace per prevenire l'apoptosi. È interessante notare che i(12p) è presente anche nelle neoplasie a cellule germinali dell'ovaio, suggerendo che gli eventi che portano a questa alterazione genica possono essere importanti nella patogenesi molecolare di tutti i tumori germinali. <sup>[27]</sup>

Le cellule germinali neoplastiche del testicolo spesso secernono ormoni polipeptidici e alcuni enzimi, che possono essere dosati nel sangue. Tali *marcatori biologici* comprendono l' $\alpha$ -fetoproteina (AFP), la gonadotropina corionica umana (HCG), la fosfatasi alcalina placentare, l'ormone lattogeno placentare e la lattico deidrogenasi (LDH).

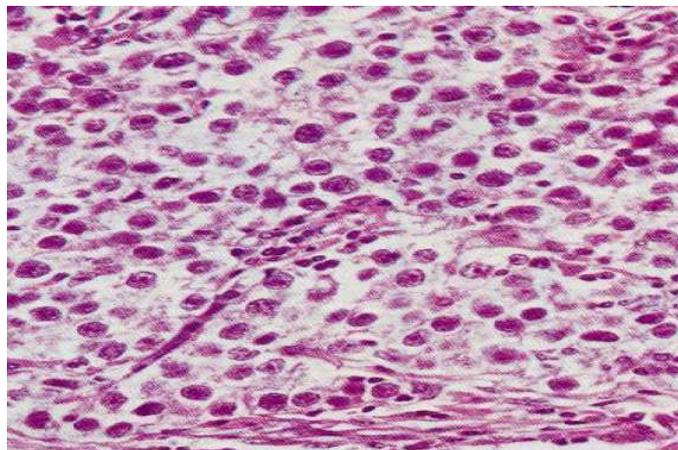


*Fig.4 - Schema dell'origine dei tumori del testicolo.*

## **Seminoma**

È il tumore germinale più comune (50% dei casi) ed è classificato in tipico o classico (85%), anaplastico (10%) e spermatocitico (5%). Non colpisce quasi mai nell'infanzia, ha il suo picco di incidenza nella terza-quarta decade di vita in epoca più tardiva rispetto ad altri tumori a cellule germinali e si associa con maggiore frequenza al criptorchidismo. I seminomi generano masse voluminose, a volte di dimensioni dieci volte superiore al testicolo normale. Il testicolo si presenta, oltre che ingrandito, di consistenza aumentata per la tensione dell'albuginea. Macroscopicamente, il seminoma tipico è costituito di un nodulo o di una massa che sostituisce in parte o totalmente il parenchima testicolare, nei

confronti del quale presenta un netto piano di clivaggio, ma non è incapsulato. Il semonima tipico si presenta coem una massa omogenea, bianco-grigiastra, lobulata al taglio e senza stravasi emorragici e quasi sempre senza aree di necrosi. Generalmente, la tonaca albuginea non è interessata nel processo, o solo nelle fasi tardive, ,ma talvolta si ha coinvolgimento dell'epididimo, del funicolo o del sacco scrotale.



*Fig 5 Sezione istologica di tessuto testicolare: seminoma tipico*

Microscopicamente (Fig 5), il seminoma tipico è costituito da lamine cellulari uniformi scarsamente demarcate in lobuli da fini setti di tessuto fibroso infiltrati da una variabile quantità di linfociti T. La cellula seminomatosa appare aumentata di volume, con forma variabile da tonda a poligonale e con membrana cellulare distinta, citoplasma chiaro o simil acquoso, e un grande nucleo centrale con uno o due nucleoli prominenti. La quantità di mitosi è variabile, generalmente è modesta, ma in

alcuni casi possono essere in media 3pcv, in tal caso si parla di seminoma anaplastico. Il citoplasma contiene glicogeno in varia quantità. Le cellule del seminoma tipico non contengono  $\alpha$ -fetoproteina (AFP) o gonadotropina corionica umana (HCG), per cui le cellule non si colorano immunohistochimicamente né per AFP né per HCG, mentre contengono fosfatasi alcalina placentare (PLAP) ed enolasi neuro-specifica (NSE), alcune cellule sparse possono essere positive alla cheratina. I livelli sierici di PLAP ed NSE costituiscono un marcatore importante per il monitoraggio dei pazienti affetti da seminoma. Nel 15% dei casi di seminoma contiene sincizio trofoblasti placentali, disposti in piccoli gruppi. Caratteristica comune di queste cellule è la loro capacità di produrre, così come quelle placentali, gonadotropine corioniche. In questo sottogruppo di pazienti, infatti, i livelli sierici di HCG sono elevati, anche se non raggiungono i livelli osservati nei pazienti con corio carcinoma.

### **Seminoma spermatocitico**

Il seminoma spermatocitico è un tumore raro; rappresenta infatti l'1-2 % di tutte le neoplasie testicolari germinali. L'età media di insorgenza è più alta rispetto agli altri tumori testicolari, gli individui affetti sono spesso ultrasessantacinquenni. Tale istotipo manca di ogni correlazione con il criptorchidismo; nonostante la denominazione il seminoma spermatocitico non ha alcuna correlazione istologica, morfologica e clinica con il seminoma tipico; è una neoplasia a lenta crescita che raramente dà luogo a metastasi. Macroscopicamente, il seminoma spermatocitico tende ad essere di dimensioni maggiori rispetto al seminoma classico e al taglio presenta una superficie di colore giallo pallido. In genere è formato da tre

popolazioni cellulari: 1) cellule di media grandezza (15-18u), con nucleo tondo e citoplasma eosinofilo; 2) piccole cellule (6-8u), con una rima sottile di citoplasma eosinofilo, simile agli spermatozoi secondari; e 3) cellule di grandi dimensioni (50-100u) mono e multinucleate. In alcune cellule di medie dimensioni, l'aspetto della cromatina è simile a quello delle cellule spermatozoi che non neoplastiche in fase di meiosi (cromatina spiraliforme). I caratteri istologici ed ultrastrutturali del seminoma spermatozoi fanno ritenere che questo istotipo riproduca cellule con caratteri dell'epitelio germinativo, coincidenti anche con spermatozoi di secondo ordine e con spermatozoi da cui deriva il nome seminoma spermatozoi.

### **Carcinoma embrionale**

Il carcinoma embrionale insorge preferenzialmente tra i 20-30 anni; è il tumore più frequente dopo il seminoma. Nella forma pura rappresenta più del 60% dei NSGCT; spesso però si può presentare come componente di tumori misti (45% di tumori germinali). È una neoplasia a rapida crescita che metastatizza per via ematica e linfonodale, al momento della diagnosi il 60% dei pazienti ha ripetizioni a livello dei linfonodi para-aortici, del fegato e dei polmoni, occasionalmente il riscontro è ginecomastia. Il carcinoma embrionale è costituito da cellule anaplastiche che conservano notevoli potenzialità differenziative rispetto agli altri istotipi. È una neoplasia aggressiva, a rapida crescita e poco radiosensibile. I caratteri macroscopici di questo istotipo sono di dimensioni minori rispetto ai seminomi, sono generalmente noduli non incapsulati, di consistenza soffice e di colore bianco- grigiastro al taglio. La massa può apparire variegata, con margini scarsamente demarcati e con aree di necrosi e di emorragia. L'estensione può attraversare la tonaca albuginea verso

l'epididimo o il funicolo. All'esame microscopico il carcinoma embrionale è formato da cellule che crescono formando strutture alveolari o tubulari, con aspetti, talvolta, papillari. Si evidenzia la mancanza di strutture ghiandolari con nuclei basali e citoplasma apicale come accade anche per i teratomi. Le cellule hanno un aspetto epitelioide, anaplastico, con forma allargata, nuclei ipercromatici e nucleoli prominenti. La presenza di cellule giganti e di figure mitotiche è frequente. L'esame immunohistochimico permette di identificare cellule sinciziali contenenti HCG, AFP o entrambi.

### **Tumore del sacco vitellino**

Conosciuto anche come carcinoma embrionario infantile o tumore del seno endodermico, il tumore del sacco vitellino (*yolk sac tumor*) è la neoplasia più comune nei bambini di età inferiore ai 3 anni. Negli adulti la forma pura è rarissima, si osserva con più frequenza in combinazione con i carcinomi embrionari. È un tumore a rapido accrescimento ed ha una resistenza agli agenti chemioterapici maggiore del carcinoma embrionale, rendendo la prognosi peggiore. All'esame macroscopico il tumore non è capsulato, è un nodulo in sezione omogeneo, di colore bianco-giallastro, di consistenza variabile, di rado con necrosi ed emorragie. Può avere piccoli spazi cistici a contenuto mucoide. All'esame microscopico questa neoplasia è caratterizzata dall'aggregazione simil-reticolare, forma una rete di cellule cuboidi o allungate di media grandezza. In circa la metà di questi tumori, si possono osservare strutture simili ai seni endodermici- corpi di Schiller-Duval. Il tessuto presenta positività immunohistochimica per AFP, citocheratina e PLAP. La presenza

della AFP nelle cellule tumorali è caratteristica e sottolinea la loro differenziazione in cellule del sacco vitellino.

### **Coriocarcinoma**

Nella sua forma “pura”, il coriocarcinoma è il più raro tumore a cellule germinali di cui costituisce l'1%. Più frequente è la presenza di focolai di coriocarcinoma nell'ambito di carcinomi embrionali e teratocarcinomi (12%). Il picco di incidenza si ha tra la fine della seconda e l'inizio della terza decade di vita. Si tratta di un tumore altamente maligno che metastatizza precocemente per via ematica. Malgrado il suo comportamento aggressivo, il coriocarcinoma puro solitamente appare con piccole lesioni, per cui non determina un aumento di volume del testicolo e si manifesta come piccoli noduli palpabili. All'esame macroscopico appare come un piccolo nodulo, con aree necrotiche ed emorragiche. Poiché la crescita delle cellule tumorali è rapida, l'irrorazione sanguigna diventa a volte insufficiente e, talvolta, già in presenza di diffusione metastatica, al posto del focolaio testicolare primitivo è presente una piccola cicatrice fibrosa. All'esame microscopico è possibile osservare due tipi cellulari: le cellule del citotrofoblasto con citoplasma abbondante eosinofilo e ricco di vacuoli; e le cellule del sinciziotrofoblasto che producono HCG.

### **Teratoma**

La definizione di teratoma si riferisce ad un gruppo di tumori con diverse componenti cellulari o tissutali derivanti dai tre foglietti embrionali ectoderma, mesoderma ed endoderma. La forma pura è comune nei lattanti e nei bambini (40%);

negli adulti la forma pura è solo il 2-3 %, mentre è più frequente in associazione con altri tipi istologici (45%).

Macroscopicamente il teratoma può essere molto voluminoso; il testicolo appare di forma irregolare, di consistenza eterogenea dovuta alla presenza di differenti componenti cellulari. Poiché questo istotipo si compone di diversi tessuti, l'aspetto è eterogeneo, con aree solide, talvolta cartilaginee e cistiche. Le necrosi e le emorragie sono rare.

Microscopicamente si distingue una forma di teratoma maturo ed una immatura a seconda che la differenziazione e la distribuzione dei vari tessuti che compongono la neoplasia corrispondano a fasi precoci o tardive dello sviluppo embrionale. Nel teratoma maturo i tessuti più spesso riconoscibili sono l'epitelio squamo-cellulare, quello pseudo stratificato e muciparo, il tessuto cartilagineo e quello muscolare liscio. Nella forma immatura i tessuti hanno una incompleta differenziazione, presenza di mesenchima indifferenziato, di strutture epiteliali, di muscolo striato e di neuro epitelio. Nel testicolo dell'adulto è raro trovare la forma matura, generalmente sono mescolati aspetti diversi. Raramente nel contesto del teratoma può svilupparsi un processo neoplastico maligno aggiuntivo a carico di uno dei suoi componenti tissutali.

### **Tumore germinale misto**

Circa il 60% dei tumori testicolari è costituito da più di uno dei tipi istologici "puri, vengono chiamati tumori germinali misti. La più frequente combinazione (14% dei tumori germinali) è quella tra carcinoma embrionale, teratoma, tumore del sacco

vitellino e sincizio trofoblasto. Alla combinazione di carcinoma embrionale e teratoma si dà il nome di *teratocarcinoma*. La prognosi è in parte influenzata dai singoli tipi istologici; da ciò deriva l'estrema importanza che ha l'individuazione precisa ed esatta dei diversi istotipi che compongono la neoplasia e la loro relativa percentuale.

### **Tumori non a cellule germinali del testicolo o tumori dello stroma e dei cordoni sessuali.**

Questo tipo di tumori originano dalle cellule del Leyding, dalle cellule del Sertoli o da una comune cellula indifferenziata progenitrice. Di conseguenza si hanno tumori a cellule di Leyding, tumori a cellule del Sertoli, tumori a cellule della granulosa, tumori che sono una mescolanza di tutti questi tipi cellulari e tumori dello stroma gonadico indifferenziato. I più frequenti sono i tumori a cellule del Leyding, ma nel complesso sono rari. Questo tipo di tumori può insorgere in qualsiasi età e sono benigni nel 90% dei casi, l'unico indizio di malignità è dato dalle metastasi.

### **Tumore a cellule del Leyding o tumore interstiziale**

Il tumore delle cellule del Leyding o tumore delle cellule interstiziali o Leydingioma può insorgere a qualsiasi età, sebbene la maggior parte dei casi sia stata riportata tra i 20-60 anni. È un tipo di neoplasia particolarmente interessante perché può secernere androgeni o combinazioni di androgeni ed estrogeni, o addirittura corticosteroidi, di conseguenza la diagnosi può essere fatta in seguito alle manifestazioni ormonali. Nei bambini le caratteristiche cliniche dominanti sono, appunto, rappresentate dagli

effetti ormonali che si manifestano sotto forma di pubertà precoce, rapida crescita scheletrica e sviluppo dei caratteri sessuali secondari. Nell'adulto si manifesta con tumefazione testicolare e ginecomastia. Macroscopicamente è formato da noduli di diametro di circa 5cm. Al taglio si presenta omogeneo e di colore bruno-dorato. Dal punto di vista istologico le cellule tumorali del Leyding sono simili all'istotipo normale dal quale derivano.

### **Tumori a cellule del Sertoli o androblastoma**

Questo tipo di tumore è molto raro e costituisce meno dell'1% di tutte le neoplasie testicolari. Il 30% di questa neoplasia si osserva nella prima decade di vita. Il tumore a cellule del Sertoli può essere costituito interamente da cellule del Sertoli (puro), oppure presentare una componente a tipo cellule della granulosa. Alcuni tumori determinano modificazioni endocrinologiche nella misura in cui possono produrre sia estrogeni che androgeni, ma solo raramente in quantità tale da causare una mascolinizzazione precoce; occasionalmente nell'adulto si può verificare femminilizzazione con ginecomastia.

All'esame macroscopico il tumore si presenta come piccoli noduli con superficie omogenea da grigio-biancastra o giallastra. Microscopicamente, si può riscontrare un aspetto tubulare (adenoma tubulare), a cellule fusate stromali o misto.

### **Tumore a cellule della granulosa**

Questo tumore ha due varianti: la forma dell'adulto e la forma giovanile, entrambe generalmente benigne. La variante dell'adulto è estremamente rara, mentre la forma giovanile è più comune nel neonato. È una neoplasia che può insorgere in pazienti

con criptorchidismo o con disgenesia gonadica. Macroscopicamente è un tumore circoscritto di colore grigiastro con cavità cistiche. Istologicamente può avere aspetto follicolare, solido o misto.

### **Tumore misto a cellule germinali stromali**

Sono tumori estremamente rari. In questa categoria rientra il Gonadoblastoma. Questa neoplasia nonostante insorga in una gonada disgenetica o criptorchide, può colpire anche il testicolo normale. I pazienti affetti spesso hanno malformazioni congenite come ipospadia, testicolo ritenuto o localizzazione ectopica degli organi sessuali. All'esame microscopico questo tumore è costituito da nidi di cellule rotondeggianti con citoplasma vacuolato, circondate da cellule del Sertoli, della granulosa o del Leyding.

### **Linfoma del testicolo**

La maggior parte del linfoma del testicolo corrisponde alla manifestazione locale di un linfoma generalizzato sebbene sia riconosciuta l'esistenza di un linfoma entrinodale localizzato al testicolo. Sia nella forma primitiva che in quella secondaria il linfoma costituisce la più comune forma di tumore testicolare nell'uomo al di sopra dei 60 anni. Macroscopicamente il testicolo si manifesta di dimensione aumentata, al taglio è di aspetto compatto, giallastro, di consistenza soffice e soda. Istologicamente si distingue dai tumori a cellule germinali per la costante proliferazione cellulare interstiziale, con ampliamento dell'interstizio e con tipica persistenza dei tubuli seminiferi.

## **CRIOCONSERVAZIONE**

La crioconservazione è volta a preservare in vita lo spermatozoo sospendendone in modo reversibile le attività biochimiche. Le cellule viventi esposte a basse temperature subiscono danni irreversibili che ne comportano la morte. In criobiologia, per superare tali problematiche, si utilizzano crioprotettori che esplicano la loro azione durante il congelamento modificando l'ambiente intra ed extracellulare, evitando la formazione di cristalli di ghiaccio intracellulare e lo stress osmotico. Esistono diversi terreni adatti alla crioconservazione, tutti hanno lo scopo di preservare lo spermatozoo dalla disidratazione, dall'aumento della concentrazione di sali intracellulari, ottimizzando l'osmolarità nei fluidi extracellulari (glicina, saccarosio e citrato); salvaguardare l'integrità della membrana cellulare, soprattutto nella parte lipoproteina (tuorlo d'uovo e il glicerolo).<sup>[28]</sup>

La crioconservazione del liquido seminale attualmente è rivolta ai pazienti: pazienti che devono sottoporsi a trattamenti medici o chirurgici potenzialmente in grado di indurre sterilità, uomini che si sottopongono a tecniche chirurgiche (TESA, TESE) per il recupero degli spermatozoi dal testicolo per accedere a tecniche di fecondazione assistita. In particolare la crioconservazione è diventata una tappa fondamentale per i pazienti oncologici che si sottopongono a chemio- radioterapia. I progressi nella terapia antineoplastica e le tecniche all'avanguardia nel campo della fecondazione assistita hanno consentito nuove possibilità riproduttive per il maschio infertile e, quindi, la crioconservazione del seme si impone anche per i pazienti con qualità del liquido seminale gravemente alterata che non avrebbero avuto nessuna possibilità di fecondare in epoca ICSI (Intracytoplasmatic Sperm Injection). È doveroso da parte dell'oncologo informare il paziente neoplastico della possibilità di

congelare il seme in caso di terapie che possono ledere in maniera transitoria o permanente la capacità fecondante; è altrettanto importante che la crioconservazione sia effettuata prima dell'inizio di qualsiasi terapia che potrebbe compromettere l'integrità del DNA cellulare.

In caso di patologie neoplastiche testicolari il "periodo finestra" utile ad una corretta crioconservazione è tra l'intervento di orchietomia e l'inizio del trattamento chimico o radiante.

### **ANDROGENI E RECETTORE DEGLI ANDROGENI NEL CONTROLLO DELLA SPERMATOGENESI.**

Il testicolo è sotto il controllo endocrino delle gonadotropine FSH ed LH, e quello paracrino di fattori locali (FIG 6). L'FSH regola le funzioni delle cellule del Sertoli, legandosi a specifici recettori di membrana, anche se non è esclusa una azione diretta sugli spermatogoni, sui quali sono stati trovati dei siti specifici di legame. La cellula del Sertoli non presenta siti per l'LH, mentre possiede il recettore nucleare del Testosterone nonché i recettori per altri fattori proteici e steroidei (insulina, IGF-1, acido retinoico,  $\beta$ -endorfina) che ne modificano l'attività. L'LH stimola le cellule di Leydig, regolandone l'attività steroidogenetica. I livelli intratesticolari di T, che nell'uomo sano sono circa 100 volte quelli plasmatici, sono importanti per la regolazione della spermatogenesi. Il T ha effetti sulle cellule del Sertoli, mentre non ha azioni dirette sulle cellule germinali. Sebbene si ritenga che l'FSH abbia un ruolo nei primi stadi meiotici della spermatogenesi ed il T negli ultimi stadi, non si conosce se e con quali meccanismi questi ormoni sinergizzano nel controllo della

spermatogenesi. L'importanza del T nella regolazione della spermatogenesi è confermata dal fatto che mutazioni puntiformi o polimorfismi della regione poligluttammica del recettore degli androgeni che ne compromettono la funzionalità sono associate ad infertilità maschile.

L'induzione, lo sviluppo e il mantenimento di una normale spermatogenesi sono dipendenti dal corretto funzionamento dell'asse ipotalamo-ipofisi-testicolare. Il testosterone e il suo prodotto  $5\alpha$ -ridotto, il DHT, svolgono una azione importante sulle cellule del Sertoli. Le azioni biologiche degli androgeni sono mediate del recettore degli androgeni (AR) membro della superfamiglia dei recettori nucleari insieme a diversi co-regolatori (co-attivatori e co-repressori). AR agisce come fattore di trascrizione dipendente dal ligando. Si ritiene che gli androgeni siano presenti solo sulle cellule del Sertoli, anche se evidenze suggeriscono la presenza anche a livello degli spermatogoni e spermatociti, e forse anche in cellule spermatogeniche più mature. Gli androgeni possono mediare effetti nelle cellule del Sertoli attraverso una via non recettoriale; gli androgeni possono produrre diversi effetti metabolici in diversi tipi cellulari indipendentemente dalla interazione AR-DNA.

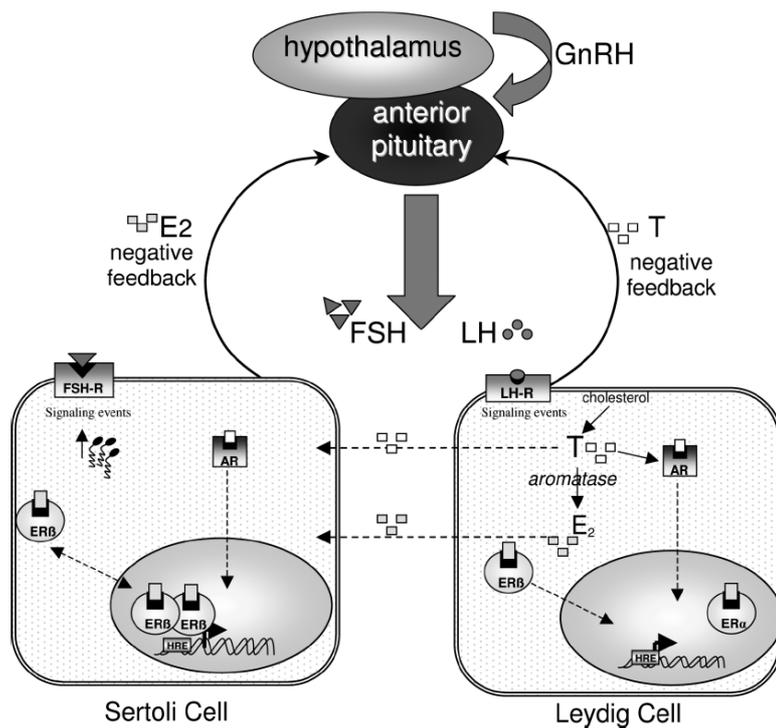


Fig.6 - Asse ipotalamo-ipofisi-testicolare (HPT)

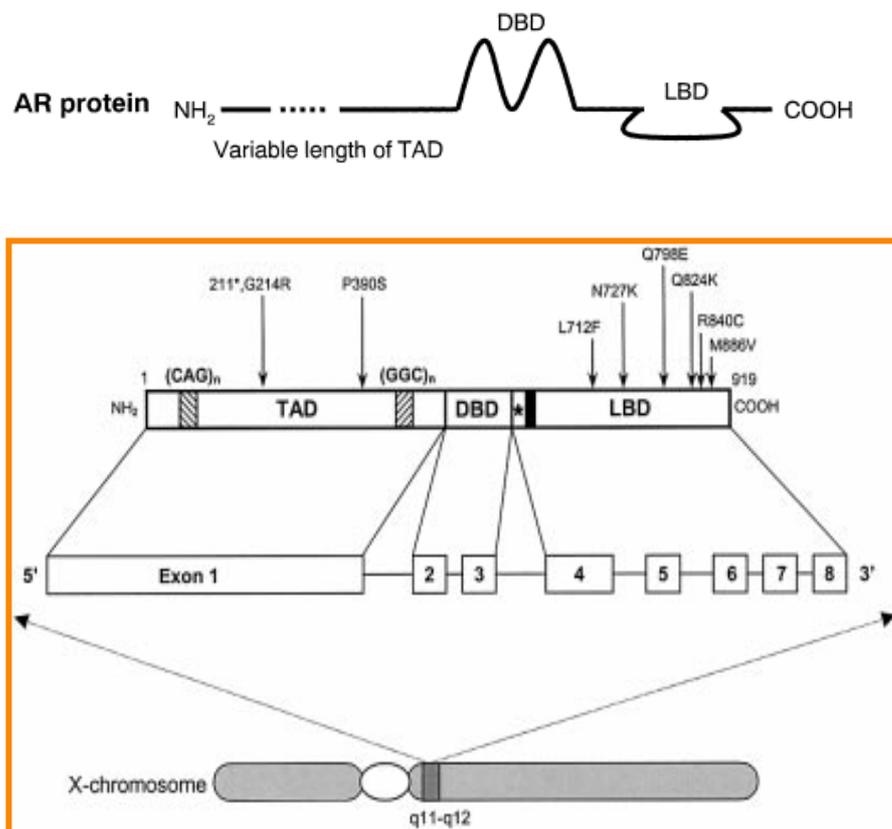
### *Gli androgeni*

La spermatogenesi richiede l'azione di peptidi e ormoni steroidei, ognuno dei quali ha un ruolo fondamentale nel normale funzionamento dell'epitelio seminifero. Questi messaggeri ormonali sono importanti per la regolazione dello sviluppo delle cellule germinali maschili e per la proliferazione e la funzione di cellule somatiche richieste per il corretto sviluppo del testicolo. Queste cellule includono le cellule del Leyding, la cui funzione primaria è la produzione di testosterone; le cellule mioidi, che circondano i tubuli seminiferi provvedendo al supporto fisico e al movimento contrattile di queste strutture; e le cellule del Sertoli, che hanno contatto diretto con le cellule germinali all'interno del tubulo seminifero, sono essenziali nel fornire supporto fisico e nutrizionale durante la spermatogenesi.

La funzione degli androgeni e del loro recettore AR sono essenziali per un corretto differenziamento sessuale e per il mantenimento della normale spermatogenesi. L'attività di AR è regolata dal T e DHT che si legano al recettore determinandone una traslocazione nucleare e l'inizio della funzione di regolazione della trascrizione.

### *Il recettore degli androgeni*

Il recettore degli androgeni (AR) è una proteina intracellulare codificata da un gene a singola copia localizzato sul cromosoma Xq11-12. Il gene è composto da 8 esoni divisi da 7 introni e si estende per circa 75-90kb. Il gene codifica per un fattore di trascrizione che appartiene alla superfamiglia dei fattori di trascrizione steroidei ligando-attivati (Fig 7).



*Fig.7 - Rappresentazione del gene di AR e della proteina codificata.*

L'esone 1 codifica per il dominio N-terminale trans attivante TAD, gli esoni 2-3 per il dominio centrale DNA-binding (DBD) e gli esoni 4-8 per il dominio C-terminale legante l'androgeno (LBD). L'attività trans attivante richiede l'interazione tra i domini TAD e LBD e l'azione di co-attivatori tra cui il più importante è p160/SRC, di cui TIF2 interagisce con i domini TAD e LBD e con CBP/p300 si lega al promotore dei geni bersaglio di AR, aumentandone la funzione trans-attivante. Alterazioni della funzione di AR sono responsabili della sindrome di insensibilità agli androgeni (AIS). Gli androgeni sono ormoni steroidei essenziali per lo sviluppo e la funzionalità degli organi sessuali maschili, per la gametogenesi, per il manifestarsi dei caratteri sessuali secondari maschili e per il metabolismo generale dell'organismo. Mutazioni del gene per il recettore androgenico possono comportare una completa perdita di funzione della proteina recettore che si manifesta come pseudoermafroditismo maschile (AIS). Mutazioni del gene di AR che alterano fortemente la funzione del recettore determinano AIS completa, caratterizzata da femminilizzazione completa di un individuo genotipicamente maschio (CAIS). Mutazioni che non alterano del tutto la funzione di AR determinano AIS parziale (PAIS) ovvero i pazienti affetti presentano vari gradi di ambiguità genitale. Una disfunzione di AR minima determina alterazione della spermatogenesi senza altre anomalie nelle caratteristiche sessuali maschili secondarie. Per il recettore degli androgeni sono state descritte più di 300 mutazioni spiegando il 2% dell'infertilità maschile; di queste 23 sono localizzate nel dominio trans-attivante. A livello di questo dominio, nell'esone 1, il recettore presenta due siti polimorfici caratterizzati da un diverso numero di ripetizioni CAG e GGC che determinano differenti lunghezze di tratti poliglutamminici e poliglinici nel frammento N-terminale del

TAD. Queste triplette sono causa di un tipo di mutazione particolare definita *dinamica* poiché l'aumento del numero di triplette comporta una costante tendenza all'espansione (cui il nome mutazione dinamica) e costituisce un elemento di instabilità grave del materiale genetico. Questa mutazione sembrerebbe avere un ruolo nel modulare la funzione e, quindi, la sensibilità del recettore dell'androgeno. La lunghezza del "repeat" CAG è legata all'origine etnica: 8-30 tra gli individui bianchi americani, 8-39 tra gli europei e 11-31 tra gli asiatici. Nel soggetto normale il numero di triplette CAG varia da 10-35 (media 21-23). Un elevato numero di ripetizioni CAG sembra determinare una ridotta attività trascrizionale dell'AR sia in vivo che in vitro. Una espansione delle triplette superiore a 40 "repeat" determina atrofia muscolare spino bulbare (SBMA) o "Sindrome di Kennedy", patologia con anomalie endocrinologiche quali atrofia testicolare e scarsa virilizzazione. Più del 50% degli individui affetti da questa sindrome presentano una alterazione della spermatogenesi, dalla severa oligozoospermia all'azoospermia. Dati in vitro dimostrano una correlazione inversa tra la lunghezza delle ripetizioni CAG e la funzione di AR: l'espansione di CAG causa diminuzione lineare della funzione trans attivante del recettore. Un numero basso di ripetizioni CAG è associato al tumore della prostata. Numerosi studi condotti su uomini di Singapore, Australia, nord America e Giappone indicano che i "repeat" CAG più lunghi sono associati ad alterata spermatogenesi, confermando l'ipotesi di correlazione inversa tra lunghezza del tratto poligluttaminico e la funzione di AR. Questi risultati non sono in accordo con studi condotti sulla popolazione europea. Irvine et al. suggerisce che un aumento della lunghezza del "repeat" CAG potrebbe interferire sull'interazione tra il dominio N-terminale e il co-attivatore p160, diminuendo l'attività trans attivante del recettore.

## **Gli interferenti endocrini (EDCs)**

Gli interferenti endocrini ( Endocrine Disrupting Compounds- EDC) (Fig 9) sono sostanze che mimano gli ormoni endogeni. La definizione classica universalmente accettata è la seguente: *“una sostanza esogena che interferisce con la produzione, il rilascio, il trasporto, il metabolismo, il legame, l’azione o l’eliminazione degli ormoni naturali dell’organismo responsabili del mantenimento dell’omeostasi e della regolazione dei processi di sviluppo”*.

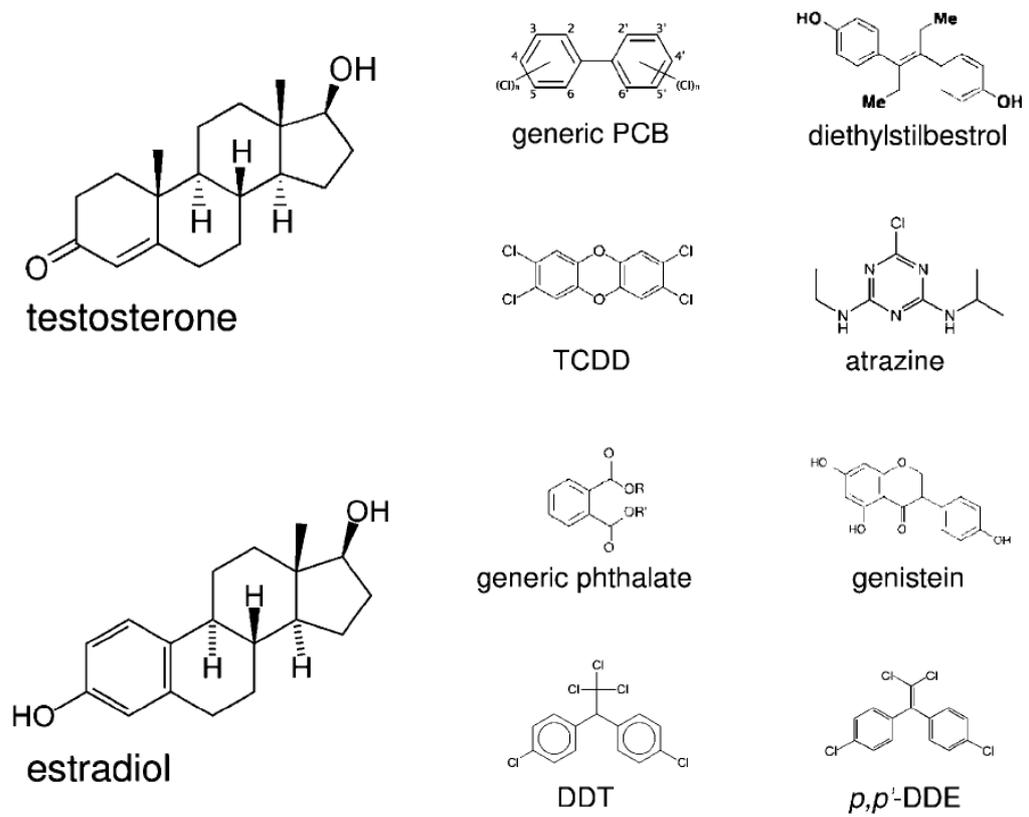
Gli EDC sono un gruppo eterogeneo di sostanze esogene caratterizzate dalla capacità di interferire con il funzionamento del sistema endocrino, causando effetti dannosi su un organismo o sulla sua progenie. La riproduzione e lo sviluppo pre- e postnatale sono le fasi biologiche più sensibili agli effetti endocrini degli EDC. Gli effetti indesiderati degli EDC finora osservati, mediante studi *in vivo* e *in vitro* sono:

- compromissione della capacità riproduttiva
- presenza di difetti morfologici o funzionali alla nascita
- sviluppo di neoplasie
- alcune alterazioni del sistema immunitario e altri effetti.

Le ricerche finora condotte nel campo degli interferenti endocrini hanno dato risultati che portano a cinque conclusioni principali:

1. i distuttori endocrini sono un gruppo di contaminati persistenti e bioaccumulanti che si ritrovano all’interno di numerose classi di sostanze chimiche
2. l’esposizione dell’uomo a queste sostanze è ubiquitaria
3. i livelli di esposizione sufficienti a causare profondi e significativi effetti a livello fisiologico non sono molto elevati

4. tutti i sistemi ormonali finora esaminati sono risultati sensibili alla distruzione endocrina
5. l'esposizione *in utero* a un numero crescente di sostanze chimiche ha avuto un grosso impatto sullo sviluppo producendo risultati visibili precocemente alla nascita o tardivamente in età adulta.



*Fig.8 - Struttura chimica di alcuni interferenti endocrini e ormoni della riproduzione.*

## ***Classificazione degli EDC***

In linea generale è possibile raggruppare questi composti in cinque categorie principali:

1. farmaci o estrogeni sintetici (es. 17- $\beta$  estradiolo o l'estrogeno sintetico dietilstilbestrolo- DES)
2. pesticidi, a loro volta distinguibili in organo fosforici; carbammati; piretoidi sintetici; organo clorurati
3. plastificanti e prodotti derivanti dalla combustione del PVC, ma anche della carta e delle sostanze putrescibili, come le diossine (Fig 9)
4. sostanze di origine industriale

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

Queste sostanze possono essere classificate sulla base della loro origine:

1. naturale (fitoestrogeni ed estrogeni)
2. sintetica, ulteriormente suddivisibili in:
  - estrogeni sintetici (farmaceutici-dietilstilbestrolo; industriali)
  - antiestrogeni sintetici(farmaceutici-tamoxifen; industriali-diossine)

Gli EDC hanno un carattere lipofilo per questo possono diffondere attraverso la membrana plasmatica, legare eventualmente i recettori per gli ormoni steroidei e accumularsi a livello del tessuto adiposo.

Negli ultimi decenni si è assistito all'aumento dell'incidenza di tumori testicolari e ad un aumento delle anomalie a carico del tratto riproduttivo maschile, quali criptorchidismo e ipospadia. Secondo alcuni autori si sarebbe manifestato un declino

nella qualità del liquido seminale e un decremento nella concentrazione di spermatozoi per eiaculato.

Sharpe e Skakkebaek (1993) hanno avanzato l'ipotesi che questi cambiamenti possano essere stati causati da un aumento del livello di EDC ad azione estrogeno-simile nell'ambiente. Potrebbe esserci una eziologia comune alla base di tutte le anomalie osservate: tumore del testicolo, criptorchidismo, ipospadia e scarsa qualità del liquido seminale.

La suscettibilità del testicolo agli effetti negativi dovuti ad un aumento degli estrogeni risiedono negli effetti di questi ormoni sullo sviluppo e la funzione delle cellule del Sertoli nel testicolo fetale. FSH(ormone follicolo stimolante) stimola la proliferazione e la funzione delle cellule del Sertoli, regola la secrezione dell'ormone antimulleriano ed è responsabile, nei maschi, della regressione dei dotti mulleriani. Una diminuzione nella secrezione di FSH causata da un aumento di estrogeni nel circolo materno-fetale può avere un effetto negativo sulla proliferazione delle cellule del Sertoli e sulla secrezione dell'ormone antimulleriano. Livelli anomali di FSH pare possano portare a differenti tipi di condizioni intersessuali o al criptorchidismo, dato il suo ruolo nella fase addominale della discesa testicolare. Evidenze sperimentali suggeriscono che l'ormone antimulleriano controlli anche la divisione delle cellule germinali primordiali: scarse quantità di tale ormone causerebbe l'abnorme proliferazione di cellule germinali e , quindi, determinerebbe lo sviluppo, in età adulta, di carcinomi *in situ*.

FSH controlla la moltiplicazione delle cellule del Sertoli che avviene principalmente durante la vita fetale fino alle prime fasi della vita neonatale. Ogni cellula del Sertoli

può nutrire un numero limitato di cellule germinali determinandone lo sviluppo verso lo stadio di spermatozoo maturo.

Gli eventi importanti nello sviluppo testicolare accadono precocemente quando l'incremento nei livelli di estrogeni circolanti nel sangue materno non ha ancora avuto luogo. Un aumento nei livelli basali di estrogeni in questa fase può avere un effetto negativo sullo sviluppo dell'apparato riproduttivo.

Nello stesso lavoro, Sharpe e Skakkebaek hanno introdotto l'ipotesi della esposizione ad un eccesso di estrogeni esogeni materni durante la vita fetale. Tale ipotesi postula che un aumento della incidenza di anomalie a carico del tratto riproduttivo maschile potrebbe essere determinata dalla esposizione ad estrogeni esogeni della madre in utero. Nello stesso anno Colborn et al., affermano che condizioni sfavorevoli dello sviluppo prenatale possono essere associate alla esposizione in utero a interferenti endocrini (Endocrine Disruptors-EDCs). Questi due lavori pongono l'attenzione sulla possibile relazione tra EDCs e disordini del tratto genitale maschile (tumore del testicolo; criptorchidismo; ipospadia ed alterata spermatogenesi) noti come Sindrome di Disgenesia Testicolare (TDS).<sup>[29]</sup>

Tra gli EDCs, i pesticidi organoclorurati e i policlorobifenili (PCBs) sono lipofili e inquinanti organoclorurati persistenti, sono ampiamente usati nel settore industriale e dei prodotti sin dagli anni '70. Questi composti mimano l'azione degli estrogeni nella misura in cui si legano al recettore estrogenico o ne determina un effetto antiandrogenico. A causa della forte persistenza nell'ambiente, questi composti sono contaminanti ubiquitari. La popolazione è esposta a questi composti principalmente attraverso ingestione di cibi di origine animale, come carne e pesce, prodotti caseari.

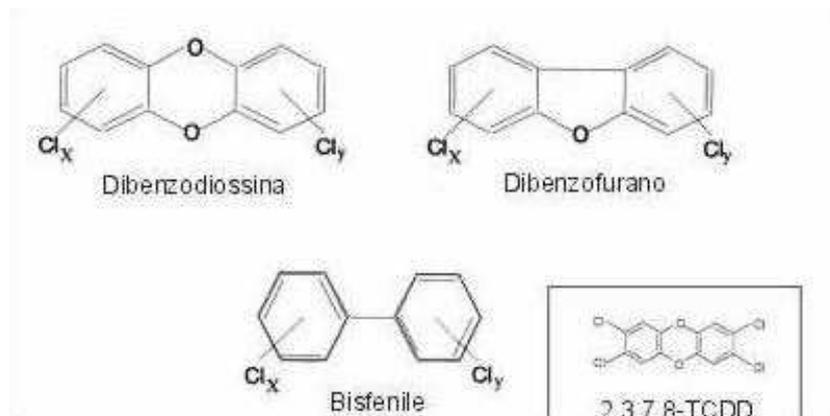


Fig.9 - Struttura chimica di alcune principali diossine

### ***Pesticidi organo clorurati***

I pesticidi organoclorurati sono di particolare interesse perché includono un pesticida sintetico di moderna produzione: DDT. Il DDT, oggi vietato in molti paesi del mondo, era di uso commerciale in molti paesi industrializzati come per esempio negli USA tra il 1945 e il 1973. Come conseguenza del divieto, il dosaggio nel siero del DDT e del suo metabolita primario, 1,1-dicloro-2,2-bis(p-clorofenil)etilene (p,p'- DDE), è diminuito nella popolazione US in pochi decenni. Il DDT mina l'azione degli estrogeni legandosi al recettore degli estrogeni, mentre il p,p'- DDE è stato dimostrato che si comporta come antagonista.

Molti studi hanno dimostrato la relazione tra il livello sierico del DDT, del DDE e il criptorchidismo <sup>[30]</sup>, ma nessuno ha riportato dati statisticamente significativi. Risultati negativi sono stati riportati in tre studi in cui si è studiata una possibile relazione tra DDT/DDE e l'ipospadia. <sup>[31-32]</sup> Nel complesso questi risultati non dimostrano una associazione tra l'esposizione al DDT/DDE e anomalie congenite

del tratto genitale maschile- Sindrome di Disgenesia Testicolare (TDS). Due dei disordini della sindrome di disgenesia testicolare, alterata spermatogenesi e tumore del testicolo, che si manifestano in età adulta, mostrano un legame con i livelli sierici di DDT. Studi condotti<sup>[33-34]</sup> sulla qualità del liquido seminale hanno dimostrato che un decremento della concentrazione spermatica, della motilità e/o della morfologia nemaspermica potrebbe essere associato alla esposizione a DDT/DDE. Per il tumore del testicolo sono stati condotti solo due studi in cui non è stata trovata una associazione tra i livelli sierici del DDE e l'insorgenza della patologia neoplastica.  
[35]

### ***Clordani***

Il clordano è un insetticida ciclodiene metabolizzato in ossiclordano, consiste di più di 40 isomeri compresi il *cis*-clordano, *trans*-clordano, *cis*-nonaclordano e *trans*-nonaclordano, sono strettamente associati con il ciclodiene e con l'eptacloro (IARC, 2001). L'associazione degli isomeri del clordano con la Sindrome di Disgenesia Testicolare (TDS) non è stata ampiamente studiata così come per il DDT/DDE. Due studi hanno valutato una eventuale relazione tra criptorchidismo e livelli sierici di clordano: Hosie et al., (2000)<sup>[30]</sup> hanno esaminato i livelli di residui di clorurati nell'adipe di uomini non trovando associazione, mentre nell'altro studio del 2006 Damgaard et al.,<sup>[36]</sup> hanno valutato i livelli di clorurato nel latte materno di donne con figli con testicoli criporchidi, trovando una associazione statisticamente significativa. Nel complesso questi studi suggeriscono che tutti gli isomeri del clordano potrebbero avere una associazione con il rischio di criptorchidismo. Una associazione tra TC e livelli sierici di clordano è stata trovata in uno studio del 2003

[35] condotto su una popolazione svedese ; nello stesso gruppo di studio sono stati dosati i DDE. Coerente con l'associazione di questo studio, i livelli di *cis*-nonaclorano sono significativamente elevati in uomini affetti da tumore del testicolo, in particolare nei seminomi; le madri di questi pazienti presentano livelli più alti di *cis*-nonaclorano, *trans*-nonaclorano e di clorani totale, rispetto alle madri del gruppo di controllo. I livelli di DDE, invece, sono significativamente più elevati solo tra le madri di pazienti con tumori non seminomatoso. Il meccanismo che potrebbe spiegare l'associazione clordano- rischio di tumore del testicolo è ancora poco chiaro. Il clordano non ha un ruolo estrogenico, ma potrebbe avere un ruolo sul metabolismo epatico degli estrogeni secondo studi condotti sui topi [37]. Inoltre, il clordano potrebbe agire come agente androgenico inibendo l'azione della aromatasi, e come antagonista del recettore estrogenico  $\alpha$ -1 potrebbe regolare negativamente gli effetti sulla espressione della aromatasi [38]. L'agenzia Internazionale della Ricerca sul Cancro (IARC, 2001) ha classificato il clordano come possibile agente cancerogeno. Qualunque sia il meccanismo è stata notata una associazione del clordano con il seminoma, ma non con i tumori non seminomatosi, compatibile con il trend di aumento del tumore del testicolo in USA [39]: la percentuale di seminomi aumenta, mentre la percentuale di tumori non seminomatosi sembra rimanere costante. Se il DDE è associato con entrambe le forme di tumore e i livelli sierici di DDE diminuiscono nella popolazione, la tendenza indica che il contributo di DDE all'insorgenza del TC ha un picco. Il clordano è stato usato nei passati 15 anni come sostituto del DDT vietato dalla legge, per cui i livelli del clordano sono più alti del DDE nella popolazione. L'associazione specifica del clordano con il rischio di

insorgenza di un seminoma potrebbe spiegare il continuo incremento della percentuale di seminomi.

### *Policlorobifenili (PCB)*

I PCB (Fig 10) sono una classe di composti sintetici, persistenti, lipofili e alogenati ampiamente usati nei settori dell'industria e dei prodotti prima che la loro produzione fosse proibita negli US negli anni '70. Come risultato del loro ampio uso e della loro persistenza, i PCBs sono contaminanti ambientali ubiquitari; sono distribuiti su scala mondiale; sono stati misurati nell'aria, nelle acque, nei sedimenti marini, nel pesci e nella fauna. Inoltre i PCBs si concentrano e si conservano a livello del tessuto adiposo nell'uomo. La popolazione è esposta inizialmente attraverso l'ingestione di cibo contaminato (carne, pesce, e prodotti caseari), ma i PCBs sono presenti a più livelli della catena alimentare. Come risultato della loro persistenza e ubiquitarità, i PCBs sono stati rilevati nel siero della maggior parte della popolazione USA.

In uno dei primi studi sulla esposizione ai PCBs e qualità del liquido seminale, Bush e i suoi collaboratori (1986) hanno riportato che i livelli di plasma seminale dei PCBs 153, 138 e 118, sono inversamente collegati con la motilità spermatica, ma solo in pazienti con concentrazione seminale inferiore a 20 milioni/ml. In un lavoro più recente svolto nel Paesi Bassi, Dallinga et al.,<sup>[40]</sup> hanno studiato uomini che si sono recati con le loro compagne in un centro di infertilità. Basandosi sulla concentrazione della motilità spermatica progressiva, hanno identificato un gruppo di pazienti con buona qualità seminale (gruppo 1) e un gruppo con qualità scarsa (gruppo 2). Al contrario di quanto ci si aspettava la somma dei PCBs sul plasma seminale del gruppo 1 è più alta rispetto al gruppo 2. All'interno del gruppo 1 è stata

notata una associazione inversa tra livelli sierici di PCBs, concentrazione spermatica e motilità progressiva.



Fig.10 - Struttura chimica di alcuni PCB

### *Meccanismo d'azione degli EDC*

Gli interferenti endocrini sono un gruppo di sostanze, a differente struttura chimica, che determinano tossicità agli animali e all'uomo, attraverso meccanismi d'azione diversi: interazione positiva o negativa con i recettori per gli estrogeni (ER) e per gli androgeni (AR); alterazione della biosintesi degli ormoni sessuali tramite meccanismo di feed-back sull'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi; azione interferente sull'attività degli enzimi preposti al metabolismo degli stessi. La loro azione interferente può essere esercitata:

- mimando l'azione di ormoni sessuali, estrogeni ed androgeni;
- esercitando azione agonista o antagonista mediante interazione con i recettori per gli estrogeni e per gli androgeni (AR), localizzati a livello della membrana plasmatica e del nucleo;
- modificando i livelli di ER ed AR, a livello nucleare e di membrana plasmatica;

- alterando la biosintesi e il metabolismo degli ormoni steroidei (Tab 2)

Alcuni EDC mostrano spiccata attività estrogenica, mentre altri agiscono tramite un'attività androgenica, causando rispettivamente effetti antiandrogenici (femminilizzazione) ed antiestrogenici (mascolinizzazione). Gli EDC estrogenici (BPA, DDT) agiscono interferendo con il classico pathway dell'ormone steroideo: si legano, pertanto, al recettore estrogenico (ER) che, quindi, dimerizza (ER $\alpha\alpha$ ; ER $\beta\beta$ ; ER $\alpha\beta$ ) e il complesso EDC-recettore formatosi, si lega al DNA, attivando l'espressione dei geni coinvolti nella risposta biologica (Fig12).

Altri EDC invece, esplicano una attività antiestrogenica (come il farmaco antitumorale ICI-182,780), antagonizzando od inibendo i processi estrogeno-dipendenti nelle cellule target (Navas, 1998). Tale attività può essere mediata tramite la via del legame al recettore ER agendo da antagonisti o parziale agonisti. Una tale variazione di risposta biologica è correlata al differente pattern di espressione dei recettori ER ( $\alpha$  e/o  $\beta$ ) nei diversi tessuti e organi. Inoltre, uno stesso EDC può comportarsi sia da agonista (come l'antitumorale tamoxifene nell'osso e nell'utero) che

da antagonista (tamoxifene nella mammella), in relazione al tessuto target e ciò, presumibilmente, a causa del coinvolgimento di proteine co-attivatrici ad espressione tessuto-specifica.

Gli EDC androgenici agiscono mediante legame con AR, recettore intracellulare per gli androgeni (testosterone e diidrotestosterone), appartenente alla famiglia dei recettori nucleari. In seguito al legame con l'EDC, si forma un complesso EDC-AR omodimero che trasloca nel nucleo dove agisce come fattore di trascrizione,

legandosi al DNA. Il DDE, i metaboliti M1 e M2 del fungicida vinclozolina e, in minor misura gli ftalati, rappresentano i più noti antagonisti del recettore AR.

Un particolare meccanismo è rappresentato da 2,3,7,8-tetracloro-dibenzo-p-diossina (TCDD), da alcuni policlorobifenili (PCB) e da idrocarburi poliaromatici (IPA). La diossina agisce principalmente attraverso l'interazione con il recettore intracellulare degli idrocarburi arilici o recettore arilico (AhR) (Bradfield, 1991). Tale recettore è un membro della famiglia delle proteine bHLH/PAS (basic Helix-Loop-Helix/ Per-Arnt-Sim), noti regolatori trascrizionali, coinvolto nella detossificazione di xenobiotici, e in particolare, nelle diverse risposte fisiologiche tessuto-specifiche indotte dalla diossina. Il meccanismo d'azione dell'interazione diossina-AhR è stato ampiamente dibattuto e solo recentemente definito. Il recettore AhR, a seguito del legame con la diossina, entra nel nucleo e forma un eterodimero con una proteina strutturalmente simile, conosciuta come translocatore nucleare di AhR (ARNT). Il Complesso AhR/ARNT, associandosi a sua volta al recettore ER libero e al coattivatore p300, riconosce una sequenza specifica di DNA nota come HRE (Hormone Response Elements), corrispondente alla regione enhancer/promoter per un gene ormone-dipendente. L'interazione complesso recettoriale-DNA determina alterazioni nella struttura della cromatina con conseguente induzione del segnale di transattivazione. In tal modo, viene facilitato l'accesso alla sequenza TATAbox del promotore per l'avvio della trascrizione (Fig13).

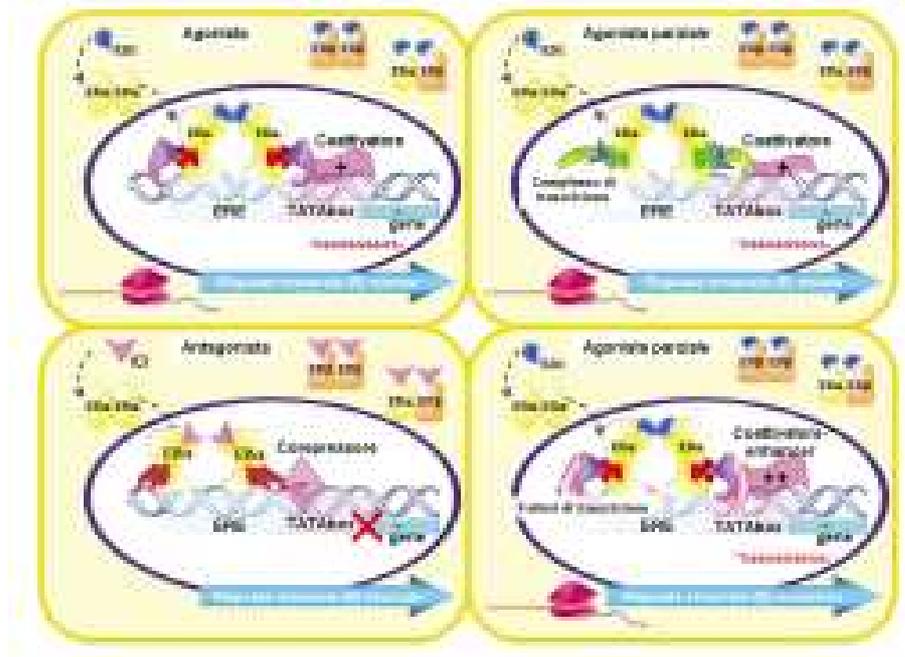


Fig.11 - Meccanismo d'azione di EDC estrogenici mediata dal binding al Recettore ER

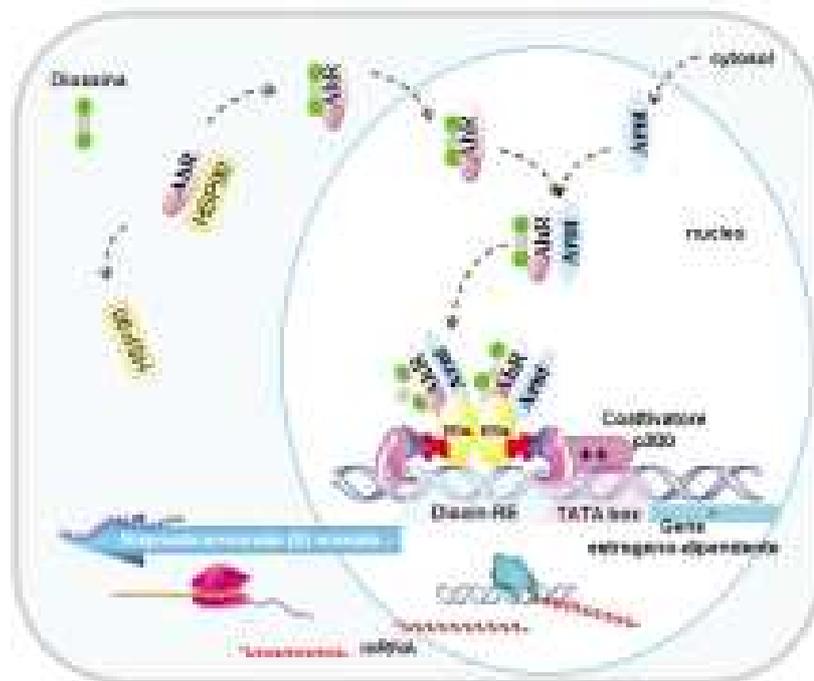


Fig.12 - Meccanismo d'azione della Diossina e dei PCB dioxin-like mediato dal pathway AhR/ER

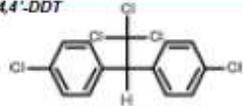
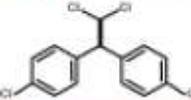
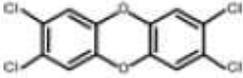
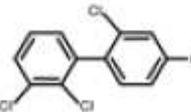
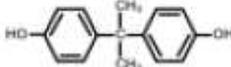
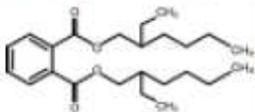
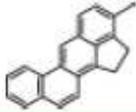
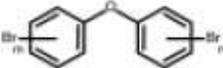
EDC	Recettori bersaglio	Modello d'azione	Effetti tossici
<b>4,4'-DDT</b> 	Recettori per estrogeni ER $\alpha$ (ipofisi, gonadi, mammelle, reni) e ER $\beta$ (ipotalamo, prostata, polmone, vescica) nei mammiferi (Deroo and Korach, 2006) Recettori per estrogeni ER $\alpha$ , ER $\beta$ e ER $\gamma$ nei teleostei (Hawkins et al., 2000)	Agonista Estrogenico	Eff. Estrogenico: femminilizzazione e sintesi di vitellogenina in uccelli, anfibi e pesci (Preziosi, 1998; Funkenstein et al., 2004) Severa iperplasia adrenocorticale, osteoporosi, malformazioni articolari, neoformazioni uterine (IPCS/WHO, 2002)
<b>4,4'-DDE (metabolita del DDT)</b> 	Recettori per androgeni AR nei mammiferi Recettori per androgeni AR $_1$ (cervello) e AR $_2$ (gonadi) nei teleostei (Sperry and Thomas, 1999)	Debole Agonista Estrogenico Forte Antagonista Androgenico (Kaib e et al., 1996)	Eff. Anti-androgenico: demascolinizzazione in rettili (Preziosi, 1998); riduzione della capacità riproduttiva maschile nei teleostei: ridotto numero di spermatozoi, ridotto sviluppo testicolare, alterazioni del comportamento sessuale (Bastrup and Junge, 2001)
<b>Diossina (TCDF)</b>  <b>Policrobifenili (PCBs) dioxin-like</b> 	Recettore arilico (AhR) /ER	Agonista Estrogenico	Deficit riproduttivi, endometriosi, immunotossicità, teratogenicità e carcinogenicità (Perugini, 2006)
<b>Bisfenol A (BPA)</b> 	Recettori per estrogeni (ER)	Agonista Estrogenico anche a basse dosi (Basheer et al., 2004)	Eff. Anti-androgenico: blocco dell'azione del diidrotestosterone, induzione di vitellogenina e ridotto sviluppo testicolare nei teleostei (Sohni and Sumpter, 1998; Larsson et al., 1999). Alterazioni del differenziamento e comportamento sessuale: conversione del testosterone in estradiolo per azione delle aromatasi cerebrali nei roditori (McEwen and Alves, 1999; IPCS/WHO, 2002)
<b>Fluati (componenti del PVC) (DEHP)</b> 	Recettori per estrogeni (ER)	Agonista Estrogenico	Eff. Estrogenico: riduzione della capacità riproduttiva maschile nei roditori: ridotto numero di spermatozoi, ridotto sviluppo testicolare (Preziosi, 1998), disintegrazione e morte delle cellule germinali testicolari (Peters et al., 1997)
<b>Idrocarburi policiclici aromatici (IPA)</b> 	Recettore arilico (AhR) /ER	Agonista Estrogenico	Eff. Anti-estrogenico: inibizione dello sviluppo ovarico, riduzione del peso delle uova e della sopravvivenza larvale nei teleostei (IPCS/WHO, 2002)
<b>Ritardanti di fiamma Brominati (Polibrominati difenil eteri)</b> 	Recettore arilico (AhR) /ER	Agonista Estrogenico	Eff. Estrogenico debole. Eff. tireotossico: interferenza con il sistema ormonale tiroideo tramite binding al T $_4$ e/o alla proteina di trasporto TTR (Birnbaum and Stasik, 2004)
<b>Fitoestrogeni</b> (isoflavoni, Lignani, Cumestani, Zeaxanone)	Recettori per estrogeni (ER)	Forte Agonista Estrogenico (alta affinità per ER $\beta$ )	Eff. Estrogenico: attività biologica sul tessuto osseo, ovarico, ipofisario, vascolare e prostatico (IPCS/WHO, 2002)
<b>Metalli pesanti</b> (Cd, As, Pb, Cr, Hg)	Recettori per estrogeni (ER)	Agonista Estrogenico (Cd, As e Selenite legano ER $\alpha$ )	Eff. simil-Estrogenico: riduzione della capacità riproduttiva, alterazioni nella qualità dei gameti (Vidaeff and Sever, 2008)

Tabella 2

## **Scopo del lavoro**

Gli androgeni sono essenziali per lo sviluppo, il mantenimento e la funzionalità degli organi sessuali maschili, per la gametogenesi, per il manifestarsi dei caratteri sessuali secondari maschili e, infine, per il metabolismo generale dell'organismo.

Dalla letteratura si evince un importante ruolo dei fattori genetici e ambientali nell'insorgenza della patologia neoplastica testicolare. Ad oggi non è stata ancora identificata una forte associazione con i fattori ambientali che possa spiegare l'aumentata incidenza di tumore del testicolo. Dai dati in letteratura si può evidenziare come la riproduzione e lo sviluppo pre e post-natale siano fasi biologiche sensibili agli effetti degli interferenti endocrini. Studi epidemiologici suggeriscono una correlazione tra esposizione a specifici gruppi di EDC e alterazioni riproduttive: malformazioni dell'apparato riproduttivo, infertilità, aumentato rischio di tumore del testicolo. Numerosi punti restano tuttavia ancora da chiarire, tra questi i meccanismi biologici alla base di tali correlazioni e gli eventuali fattori di suscettibilità e/o di rischio concomitanti, patologie potenzialmente associabili all'esposizione a EDC.

Il presente lavoro è uno studio caso-controllo in cui ho valutato la qualità del liquido seminale di tutti i pazienti, ho estratto il DNA genomico da sangue periferico e, con uno studio molecolare, ho valutato il numero di triplette ripetute CAG in ogni paziente. Ho analizzato la concentrazione di sostanze inquinanti organo clorurati persistenti (POPs), nel siero di pazienti affetti da tumore testicolare e in soggetti di controllo; ciò per valutare se la concentrazione di questi EDC fosse associata con un rischio di insorgenza della patologia neoplastica. In particolare, ho analizzato il *p,p'* DDE che agisce come antagonista sul recettore degli androgeni, per questo motivo ho valutato se la variazione nella lunghezza del polimorfismo delle triplette CAG nel

recettore di AR potesse influenzare il rischio di tumore testicolare associato al  $p,p'$  DDE.

## **Materiali e Metodi**

## Casistica

Per la realizzazione del mio progetto di ricerca ho selezionato 50 pazienti affetti dal tumore del testicolo (TC, n=50) e 50 controlli (C, n=50) che si sono presentati presso il Laboratorio di Seminologia del Dipartimento di Medicina Sperimentale - sezione di Fisiopatologia Medica della Università di Roma "La Sapienza".

Tutti i pazienti affetti da neoplasia testicolare sono stati valutati dopo un mese dalla orchietomia. I controlli sono stati reclutati tra i pazienti che si sono sottoposti all'esame del liquido seminale per valutare la fertilità, sono pazienti esenti da patologie neoplastiche o da TDS. Tutti i pazienti reclutati sono uomini Caucasici di età compresa tra 18-45 anni e che non hanno manifestato altre neoplasie.

I campioni seminali sono stati raccolti in un contenitore sterile, tramite masturbazione. Il sangue venoso (10mL) è stato prelevato e raccolto in tubi di silicone Vacutainer®. Entro 24 h dalla raccolta, il sangue è stato centrifugato e il siero congelato. A tutti i pazienti è stato chiesto di rispondere ad un questionario strutturato. Il questionario (Tab 3) include informazioni demografiche, luogo di residenza durante la vita pre post-natale e storia clinica (alterazione della funzione testicolare, presenza di difetti congeniti: criptorchidismo, ipospadia, traumi o infezioni pregresse). Il questionario include anche informazioni accurate sulla storia lavorativa, stile di vita, fattori ambientali quali esposizione a EDCs e hobbies. Il questionario è lo stesso sia per i pazienti con tumore del testicolo sia per i controlli, ad eccezione delle domande sulla patologia neoplastica. Il questionario include informazioni prenatali (peso alla nascita, mesi di gestazione) e sul luogo di

residenza e lavoro svolto dalla madre durante la gravidanza. Tutti i pazienti sono stati sottoposti a:

1. esame del liquido seminale
2. studio molecolare per valutare la lunghezza del tratto poliglutaminico nel gene AR
3. questionario
4. dosaggio sierico dei PBCs

### **ESAME DEL LIQUIDO SEMINALE**

I pazienti hanno raccolto il liquido seminale mediante masturbazione direttamente in un contenitore sterile, dopo 3-5 giorni di astinenza. L'esame del liquido seminale mi ha permesso di valutare le variabili seminali in tutti i soggetti in esame. I campioni seminali sono stati lasciati fluidificare per 60 min. a 37°C e poi esaminati in accordo con il World Health Organization (*WHO 1992; 1999*). Sono state prese in considerazione le seguenti variabili : volume (ml), pH, concentrazione nemaspermica/ml ( $n \times 10^6/\text{ml}$ ), concentrazione nemaspermica/eiaculato ( $n \times 10^6$ ), motilità rettilinea (%), morfologia (% forme atipiche).

Sul campione seminale dei pazienti ho effettuato una valutazione macroscopica e una microscopica.

#### *Valutazione macroscopica e microscopica*

La valutazione macroscopica definisce le caratteristiche reologiche quali il volume, il pH, l'aspetto, la fluidificazione e la viscosità.

La valutazione microscopica analizza sia la componente gametica che quella non gametica.

Valutazione microscopica componente gametica

\_ *Concentrazione nemaspermica*

\_ *Motilità nemaspermica*

\_ *Morfologia nemaspermica*

Valutazione microscopica componente non gametica

La componente cellulare non nemaspermica è rappresentata dai seguenti elementi:

\_ *Elementi della linea spermatogenetica*

\_ *Globuli bianchi, costituiti prevalentemente da granulociti, linfociti, macrofagi.*

\_ *Emazie.*

\_ *Cellule di sfaldamento derivanti dalle ghiandole accessorie, dai dotti e canali dell'apparato genito-urinario*

\_ *Corpuscoli prostatici.*

## **STUDIO MOLECOLARE**

La valutazione molecolare comprende lo studio del polimorfismo del gene AR. Propedeutica per lo studio è stata l'estrazione del DNA genomico da leucociti di sangue periferico.

## **Estrazione del DNA**

Ho estratto il DNA genomico umano da leucociti di campioni di sangue periferico fresco o eparinato utilizzando il kit Wizard Genomic (Promega - USA). Il kit prevede quattro fasi importanti per il recupero del DNA: lisi dei globuli rossi, lisi dei globuli bianchi, deproteinizzazione, precipitazione del DNA, reidratazione.

Lisi dei globuli rossi:

- *aggiungere ad un volume iniziale di 300  $\mu$ l di sangue eparinato 900  $\mu$ l di Cell Lysis Solution;*
- *incubare la soluzione per 10 minuti a temperatura ambiente;*
- *centrifugare il campione a 13.000 x g per 20 secondi;*
- *decantare il surnatante senza toccare il pellet*
- *agitare con il vortex per 10-15 secondi fino a risospendere i leucociti.*

Lisi dei globuli bianchi:

- *aggiungere alla soluzione precedente 300 $\mu$ l di Nuclei Lysis Solution;*
- *aggiungere 1,5 $\mu$ l di RNAsi;*
- *incubare a 37°C per 15 minuti.*

Deproteinizzazione:

*Ha lo scopo di liberare il DNA nucleare nel mezzo e digerire le proteine ad esso associate e può essere schematizzato come segue:*

- *aggiungere ai nuclei lisati 100  $\mu$ l di Protein Precipitation Solution,*
- *agitare vigorosamente con il vortex per 10-20 secondi;*
- *centrifugare a 13.000 x g per 3 minuti a temperatura ambiente, fino ad ottenere la formazione del pellet proteico marrone scuro.*

Precipitazione del DNA:

*Ha lo scopo di recuperare gli acidi nucleici in forma solida. Ho utilizzato la precipitazione con l'Isopropanolo, ottenendo il DNA sotto forma di filamenti visibili ad occhio nudo, che vengono recuperati tramite centrifugazione mediante le seguenti fasi:*

- *trasferire il surnatante in una provetta sterile contenente 300µl di Isopropanolo,*
- *miscelare delicatamente e agitare per inversione fino alla comparsa del "fiocco" di DNA;*
- *centrifugare a 13.000 x g per 1 minuto per evidenziare il DNA come un piccolo pellet bianco;*
- *decantare il surnatante.*

**Lavaggio con etanolo :**

*Viene utilizzato per lavare il precipitato e ripulirlo dalle tracce dell'Isopropanolo, nel modo seguente:*

- *aggiungere al DNA 300µl di Etanolo al 70%, invertendo la provetta numerose volte per lavare il pellet di DNA;*
- *centrifugare a 13.000 x g per 1 minuto;*
- *decantare e rovesciare la provetta su carta bibula per eliminare il residuo di alcool e lasciare asciugare il pellet all'aria per 10-20 minuti.*

**Reidratazione:**

- *aggiungere 100µl di Rehydration Solution;*
- *incubare la soluzione over-night a 4°C;*

- *misurare la concentrazione del DNA e la sua purezza allo spettrofotometro, diluendo il DNA fino ad ottenere una concentrazione di 25µg/ml per standardizzare la mia metodica.*

### **PCR (Polimerase Chain Reaction)**

Ho effettuato l'analisi dei polimorfismi del gene AR su DNA estratto da sangue periferico utilizzando un kit di estrazione, come descritto precedentemente.

Ho valutato i polimorfismi del gene mediante PCR e successivo sequenziamento, utilizzando un set di 2 paia di primers disegnati sull'esone 1. (CAG A: TCCAGAATCTGTTCCAGAGCGTGC) (CAG B: GCTGTGAAGGTTGCTGTTCCCTCAT).

La PCR è stata effettuata mediante la reazione classica con le seguenti condizioni:

*1° step: denaturazione 10 min. a 95°C,*

*2° step: denaturazione 1 min a 95°C, ibridazione 1 min. a 60°C estensione 1.20 min. a 72°C (ripetuto 35 volte)*

*3° step: estensione 12 min. a 72°C*

### **ELETTROFORESI**

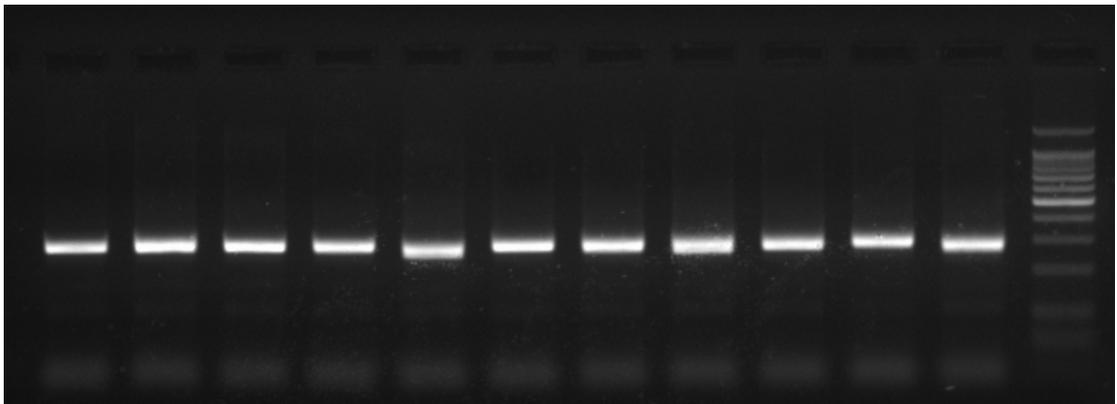
I frammenti di DNA amplificati vengono fatti migrare in un campo elettrico mediante un supporto costituito da gel di agarosio (2%):

- *10  $\mu$ l di amplificato + 2  $\mu$ l di Blue/Orange 6X Loading Dye (Promega, USA) vengono caricati su un gel di agarosio al 2% (PROMEGA, USA);*
- *Si utilizza come buffer il TAE 1X (Promega, USA);*
- *L'evidenziazione dei prodotti amplificati viene ottenuta mediante Bromuro di Etidio (10mg/ml) (3 $\mu$ l).*

Il bromuro di etidio è un agente intercalante del DNA. Questa molecola di per sè non fluorescente, emette una fluorescenza rossa quando si lega alle basi del DNA. Tale visualizzazione avviene attraverso l'esposizione agli UV con il transilluminatore.

L'amplicone (circa 282bp-Fig 13) è stato purificato e sequenziato ottenendo un elettroferogramma sul quale ho valutato il numero delle triplette CAG ripetute.

L'analisi dei polimorfismi del gene AR mediante PCR e sequenziamento, mi ha permesso di valutare il numero delle triplette CAG nei 2 Gruppi studiati.



*Fig.13 - Gel elettroforetico con amplicone di  $\approx$ 282 pb (marker 100bp)*

## SEQUENZIAMENTO

Gli ampliconi ottenuti con la PCR sono stati purificati dai primers non incorporati utilizzando colonnine che trattengono i piccoli frammenti e consentono l'eluizione dell'amplificato e sottoposti a sequenziamento automatica tramite lo strumento 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystem- Fig 14).

Il processo di sequenziamento fornisce come dato analizzabile un grafico, detto elettroferogramma (Fig 15), caratterizzato da una successione di picchi di quattro colori diversi, che corrispondono alle emissioni fluorescenti dei diversi fluorocromi ogni volta che i vari frammenti di diversa lunghezza nucleotidica raggiungono la posizione del rilevatore. I picchi risultano essere di altezza diversa che dipende dall'intensità con cui il DNA riemette fotoni dopo la sollecitazione del laser. Tale intensità dipende a sua volta dal numero di molecole di DNA colpite dal laser: più molecole si troveranno sotto il laser in un dato momento, più alto sarà il picco di riemissione.

```
Score = 407 bits (220), Expect = 5e-111
Identities = 252/265 (95%), Gaps = 12/265 (4%)
Strand=Plus/Plus

Query 10      CAGTACCCGGGCCCCAGGCACCCAGAGGCCGCGAGCGCAGCACCTCccgggcccagtttg 69
            ||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 5083079 CAGAACCCGGGCCCCAGGCACCCAGAGGCCGCGAGCGCAGCACCTCCCGGCCCCAGTTTG 5083138

Query 70      ctgctgctgcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcag 129
            ||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 5083139 CTGCTGCT-----GCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG 5083186

Query 130     cagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcag 189
            ||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 5083187 CAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG 5083246

Query 190     cagggTGAGGATGGTTCTCCCCAAGCCCATCGTAGAGGCCCCACAGGCTACCTGGTCTG 249
            ||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 5083247 CAGGGTGAGGATGGTTCTCCCCAAGCCCATCGTAGAGGCCCCACAGGCTACCTGGTCTG 5083306

Query 250     GATGAGGAACAGCAACCTTCACAGC 274
            ||||||| |||||||||||||||||||
Sbjct 5083307 GATGAGGAACAGCAACCTTCACAGC 5083331
```

Fig.14 - Risultato di sequenziamento



esposta a queste sostanze principalmente attraverso l'ingestione di cibi di origine animale (pesce, carne, prodotti caseari); inoltre i PCBs sono bioaccumulabili nella catena alimentare. Così come i PCBs anche gli OCPs, come l' 1,1,1-tricloro-2,2-bis(4-clorofenile)etano (DDT), e l'esaclorobenzene (HCB) non sono più utilizzati nelle industrie, ma sono ancora presenti a causa della loro persistenza nell'ambiente. Il metabolita del DDT, 1,1-dicloro-2,2-bis(p-clorofenil)etilene (p,p'-DDE), è un problema per la sua tossicità e perché è più persistente del DDT. POPs hanno una lunga emivita. Come risultato della loro persistenza e ubiquitaria età, livelli misurabili di POPs sono stati trovati in elevate proporzioni nella popolazione generale (WHO 1989 e 1993), in un recente lavoro è stato osservato un decremento di tali concentrazioni a partire dal 2000<sup>[41]</sup>.

### **SAGGIO SIERICO**

È stato utilizzato un metodo analitico veloce e sicuro, precedentemente validato per la sola analisi dei PCBs<sup>[42]</sup>, modificato in questo studio per rilevare simultaneamente 9 PCBs, isomeri del *p,p'*-DDE e HCB.

- Prendere 2mL di siero e aggiungere 2 mL di metanolo
- Vortexare per 30 sec

L'estrazione è effettuata usando 5mL di etere etilico (1:1 v/v). La parte organica è stata separata e l'operazione ripetuta due volte. La fase organica evapora sotto 500 uL di nitrogeno. Questo residuo viene, quindi, purificato con Bond Elut PCB dopo trattamento precedentemente della cartuccia con 1 mL di esano. L'estratto è stato eluito con 3mL di esano e dopo con 3 mL di esano: etere etilico (1:1 v/v). L'eluato è

stato raccolto e asciugato in nitrogeno. Il residuo asciutto è stato risospeso in 100  $\mu$ L di esano e analizzato con Gas-cromografia-spettrometria di massa ( GC-MS).

#### *Strumentazione e condizioni cromatografiche*

Per la separazione cromatografica è stato utilizzato una gascromografia-spettrometria di massa GCMS-QP505A equipaggiata con auto-iniettore AOC-20 e auto-campionatore. E' stato utilizzato un capillare PONA 50m $\times$  0.2mm  $\times$  0.5  $\mu$ m, J&W 100% dimetilpolisiloxano. 2 $\mu$ L sono stati iniettati in splitless mode con uno split outlet aperto dopo 0.7 min. Le temperature di iniezione e di detenzione sono state settate rispettivamente a 270°C e 280°C. La temperatura del forno è stata programmata nel modo seguente: 80°C per 1 min, 3°C/min a 200°C, 5°C/min a 300°C e 6 min a 300°C. lo spettrofotometro di massa opera in modalità elettro-ionizzata (EI)A 70 eV. E' stato utilizzato un programma SIM per l'acquisizione e la quantificazione dei dati. Due ioni ( $M^+$  e  $[M+2]^+$  ioni) sono stati monitorati per ogni livello di clorazione. I picchi sono stati misurati con il programma GCMS Postrun Analysis della Shimadzu Workstation GCMS Solution software per GCMS-QP5000 Series, che calcola anche la pendenza e il coefficiente di correlazione. L'area dei picchi è tracciata contro un rapporto e le curve di calibrazione sono state ottenute con regressione lineare dei dati.

#### *Materiali e reagenti*

Gli standards analitici di riferimento per ogni analita sono stati ottenuti dal Laboratorio del Dott. Ehrenstorfer (Augusta, Germania), così come gli standard interni (IS) dei PCB 46 e 143.

Tutti i solventi (metanolo, esano, dietilere, iso-ottano) sono pesticidi *grade* (Merck, Darmstadt, Germany). È stato utilizzato un Supelco (Bellefonte, PA, USA) Visiprep<sup>DM</sup>- DL SPE collettore sottovuoto per analizzare contemporaneamente fino a 24 campioni. È stato utilizzato un Varian BondElut® PCB (1g/3 mL column reservoir) e tubi SPE (Varian Canada Inc., ON, Canada). Affinchè il metodo fosse valido, accurato (preciso e riproducibile) è stato studiato in accordo con le linee guida della Eurachem (EURACHEM Guide, 1998),

Il metodo di calibrazione esterna è stato usato per l'assestamento della linearità della matrice di calibrazione (0.20, 0.50, 1.00, 5.00, 10.0, 25.0 ng/mL). Sono state preparate dieci repliche con diversa concentrazione (0.25, 3.125, 6.25, 12.5 ng/mL) per ogni campione di controllo (QC) in 4 giorni diversi. L'incertezza di misura è stata valutata in accordo con la guida Eurachem/ CITAC (2000). Per gli analiti selezionati, le concentrazioni hanno effetto sulle componenti quali ripetibilità e calibrazione. Un fattore di copertura 2 è stato scelto in quanto dà un conteggio interno circa il 95% della distribuzione dei valori. Il limite inferiore di quantificazione (LOQ) è stato definito come l'importo minimo che può essere quantitativamente determinato con precisione e accuratezza adeguate. Il limite di detenzione (LOD) è la concentrazione avendo un rapporto segnale-rumore con ratio di 3:1.

## **Risultati**

## **Analisi seminale**

Nel mio studio ho reclutato 100 soggetti di età compresa fra 17 e 47 anni a cui ho eseguito l'esame del liquido seminale.

Ho valutato 50 pazienti affetti da tumore del testicolo, età media è di  $28 \pm 6.4$  (range 18-44) che hanno eseguito la crioconservazione del seme un mese dopo orchietomia e prima di iniziare terapia antineoplastica.

I valori medie, le deviazioni standard e i range dei parametri seminali relativi al gruppo di pazienti con tumore del testicolo sono indicati in Tab 3.

In Tab 4 sono presenti i valori medie, le deviazioni standard e i range dei parametri seminali relativi al gruppo di controllo.

	<b>AA</b>	<b>VOL.</b>	<b>N/ml</b>	<b>N/Eiac</b>	<b>RET</b>	<b>DISC</b>	<b>MOT TOT</b>	<b>ATIP.</b>
<b>Media</b>	28	2,9	36,7	96,1	30,4	5,4	35,8	74,1
<b>DS</b>	6,4	1,7	35,3	93,8	17,3	3,8	16,3	11,6
<b>Min</b>	18	0,2	0,2	0,04	0	0	0	57
<b>Max</b>	44	9,5	150	456	60	20	60	100

*Tabella 3 - Medie, DS e range dei parametri seminali del Gruppo A*

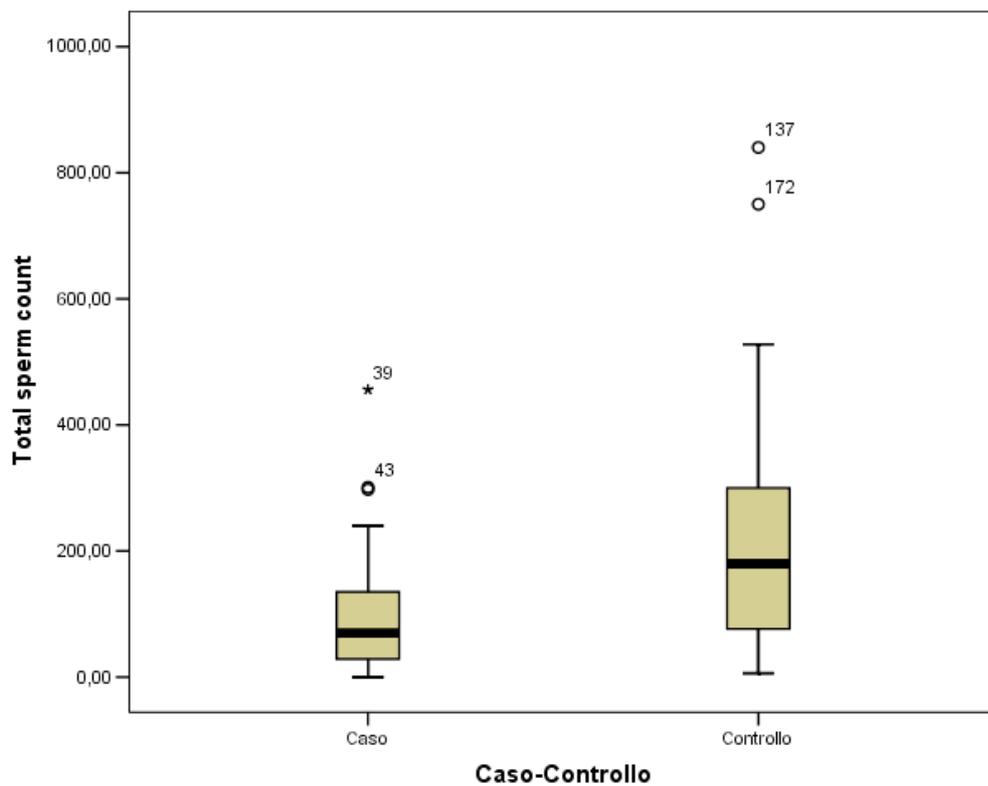
	<b>AA</b>	<b>VOL.</b>	<b>N/ml</b>	<b>N/Eiac</b>	<b>RET</b>	<b>DISC</b>	<b>MOT TOT</b>	<b>ATIP.</b>
<b>Media</b>	30	3,35	69,0	219,3	40,4	5,9	46,3	70,0
<b>DS</b>	5,9	1,52	51,6	174,6	14,9	6,5	13,3	8,4
<b>Min</b>	17	0,9	2,5	6,25	0	0	0	58
<b>Max</b>	47	8	280	840	60	40	60	100

*Tabella 4 - Medie, DS e range dei parametri seminali del Gruppo B*

	<b>AA</b>	<b>VOL.</b>	<b>N/ml</b>	<b>N/Eiac</b>	<b>RET</b>	<b>DISC</b>	<b>MOT TOT</b>	<b>ATIP.</b>
<b>Controlli</b>	30,0 ± 5,9	3,3 ± 1,5	69,0 ± 51,6	219,3 ± 174,6	40,4 ± 14,9	5,9 ± 6,5	46,3 ± 13,3	70,0 ± 8,4
<b>Tumore Testicolare</b>	28 ± 6,4	2,9 ± 1,7	36,7 ± 35,3	96,1 ± 93,8	30,4 ± 14,9	5,4 ± 3,8	35,8 ± 16,3	74,1 ± 11,6
	<b>n.s.</b>	<b>n.s.</b>	<b>***</b>	<b>***</b>	<b>**</b>	<b>n.s.</b>	<b>***</b>	<b>n.s.</b>

*Tabella 5* Medie, deviazioni standard e P value nei casi e nei controlli.

In Tabella 5 sono riportate le medie e le deviazioni standard dei parametri seminali dei casi, e dei controlli. È possibile notare una differenza statisticamente significativa in quattro parametri seminali: concentrazione di spermatozoi per ml ( $P=0.0004$ ); concentrazione per eiaculato ( $P<0.0001$ ); motilità rettilinea ( $P=0.0025$ ) e motilità totale ( $P=0.0004$ ).



*Fig.16 - Distribuzione “box plot” della concentrazione totale di spermatozoi nei due gruppi di studio.*

## Dosaggio interferenti endocrini

ORs modificati in base al livello di istruzione dei pazienti e i fattori prenatali come età della madre e parità, risultano statisticamente significativi associati ad alti livelli sierici di *p,p'*-DDE in entrambi gli istotipi di tumore del testicolo (< 0.2 ng/ml vs  $\geq$  0.2 ng/ml; OR<sub>adjusted</sub> = 5.05, 95%CI: 1.30-19.52) e i due tipi istologici (seminoma OR<sub>adjusted</sub> = 4.27, 95%CI: 1.02-17.87; nonseminoma: OR<sub>adjusted</sub> = 6.10, 95%CI: 1.13-32.83) (Tabella 6). Il rischio risulta statisticamente significativo dopo aver raggruppato i POPs (< LOD vs  $\geq$  LOD; OR = 7.48, 95%CI: 2.07-27.07).

Inoltre, ho condotto una analisi separata sui casi per valutare se in questo gruppo il rischio di oligozoospermia secondo il WHO 1999 possa essere associata con alti livelli sierici di POPs. Ho trovato un rischio aumentato di oligozoospermia nei casi di tumore del testicolo che presentano alti livelli sierici di DDE (OR = 7.4, 95%CI: 1.3-41.40). Un risultato simile è stato trovato consideranto i POPs totali (OR = 10.5, 95%CI: 1.8-58.70); mentre un incremento del rischio non statisticamente significativo è stato osservato in relazione con alti livelli sierici di HCB (OR = 3.5, 95%CI: 0.2-46.60) e concentrazione totale di PCBs (OR = 2.0, 95%CI: 0.3-12.90) (Tabella 7).

Compound (ng/ml)	All (N=50)			Seminoma (N=28)			Nonseminoma (N=22)			Controls (N=50)
	n (%)	OR adjusted *	(95 % CI)	n (%)	OR adjusted *	(95 % CI)	n (%)	OR adjusted *	(95 % CI)	n (%)
p,p'-DDE										
< 0.2	37 (74.0)	1.00		20 (71.4)	1.00		17 (77.3)	1.00		4 (88.0)
≥ 0.2	13 (26.0)	<b>5.05</b>	<b>(1.30-19.52)</b>	8 (28.6)	<b>4.27</b>	<b>(1.02-17.87)</b>	5 (22.7)	<b>6.10</b>	<b>(1.13-32.83)</b>	6 (12.0)
Tot. EDCs										
< LOD	31 (62.0)	1.00		15 (53.6)	1.00		16 (72.7)	1.00		4 (88.0)
≥ LOD	19 (38.0)	<b>7.48</b>	<b>(2.07-27.07)</b>	13 (46.4)	<b>7.83</b>	<b>(2.04-29.98)</b>	6 (27.3)	<b>7.84</b>	<b>(1.51-40.59)</b>	6 (12.0)

\* Adjusted for education, mother age at birth and parity of the mother

Tabella 6 - Odds ratio e 95% CI per POPs per casi con seminoma, non-seminoma e tutti i tumori del testicolo . Il limite di rilevabilità

(LOD) of POPs è usato come cut-off value.

	ng/ml	Group A			Group B		
		≤ 40 x106 / ml (n = 23)	> 40 x106 / ml (n = 27)	OR adjusted (95 % CI)	≤ 40 x106 / ml (n = 18)	> 40 x106 / ml (n = 27)	OR adjusted (95 % CI)
p, p' – DDE	< 0.2	14 (37.8)	23 (62.1)	1.00	11 (32.3 %)	23 (67.6 %)	1.00
	≥ 0.2	9 (69.2 %)	4 (30.7 %)	<b>5.8 (1.2 - 26.5)</b>	7 (63.6 %)	4 (36.3 %)	<b>7.4 (1.3 - 41.4)</b>
HCB	< 0.2	21 (44.6 %)	26 (55.3 %)	1.00	16 (38.0 %)	26 (61.9 %)	1.00
	≥ 0.2	2 (66.6 %)	1 (33.3 %)	2.6 (0.2 - 34.4)	2 (66.6 %)	1 (33.3 %)	3.5 (0.2 - 47.6)
Tot. PCBs	< LOD	19 (44.1 %)	24 (55.8 %)	1.00	15 (38.4 %)	24 (61.5 %)	1.00
	≥ LOD	4 (57.1 %)	3 (42.8 %)	2.4 (0.4 - 13.7)	3 (50 %)	3 (50 %)	2.0 (0.3 - 12.9)
Tot. EDCs	< LOD	10 (32.2 %)	21 (67.7 %)	1.00	8 (27.5 %)	21 (72.4 %)	1
	≥ LOD	13 (68.4 %)	6 (31.5 %)	<b>10.4 (2.1 - 51.4)</b>	10 (62.5 %)	6 (37.5 %)	<b>10.5 (1.8 - 58.7)</b>

\* Adjusted for education, mother age at birth and parity of the mother

Tabella 7. Odds ratio e 95% CI per POPs per casi di tumore del testicolo con oligozoospermia, e senza oligozoospermia. Il limite di rilevabilità (LOD) di POPs è usato come cut-off value.

Ho analizzato la relazione tra interferenti endocrini (EDCs) e parametri seminali. La concentrazione del DDE è stata dicotomizzata. Nel gruppo di pazienti con tumore del testicolo ad un basso livello sierico  $\leq 0,2$  di DDE corrispondono parametri seminali migliori (67.6%), mentre nel 63.6% dei casi ad un elevato livello sierico di DDE corrispondono parametri seminali alterati (tabella 8). Esisterebbe, quindi, una tendenza degli inquinanti a peggiorare la qualità seminale, la differenza non è statisticamente significativa ( $P=0.086$ ). Nel gruppo di controllo non sono presenti dati statisticamente significativi

## **Analisi molecolare**

Nella figura 17 e nella tabella 9 è illustrata la distribuzione delle ripetizioni (CAG)<sub>n</sub> nel gene del recettore degli androgeni AR nei due gruppi di pazienti esaminati.

Ho effettuato l'estrazione del DNA da leucociti di sangue periferico, l'amplificazione specifica del gene codificante per AR e l'analisi dell'amplicone mediante il sequenziamento.

L'analisi delle triplette CAG nel gruppo di controllo mostra differenti lunghezze da un minimo 14 a 34 con un valore medio di  $22,02 \pm 3,41$ . Il numero più frequente di ripetizioni è 21 per i pazienti con tumore del testicolo il range di lunghezza delle ripetizioni CAG è 9-31 con un valore medio di  $21,9 \pm 3,44$ . L'allele più rappresentato è 23.

Variabili	Controlli	Tumore del testicolo
<i>N° pazienti</i>	50	50
<i>Media ±SD</i>	22.02 ±3,41	21,9±3,44.
<i>Mediana</i>	21	21
<i>Range</i>	14-34	9-31
<i>CAG più frequente</i>	21	23

Tabella 9 - Confronto della distribuzione delle triplette CAG del recettore degli androgeni tra i due gruppi di studio.

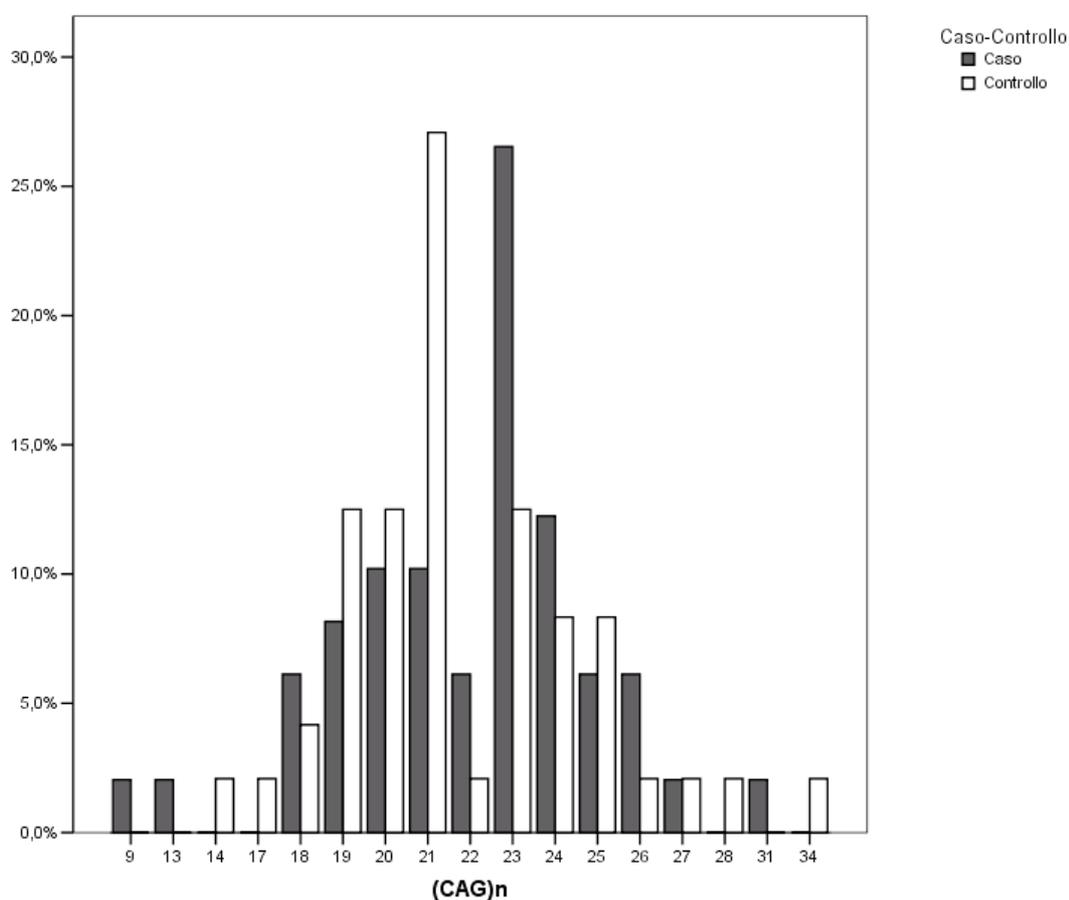


Fig.17 - Distribuzione del numero delle ripetizioni CAG nel gene del recettore degli androgeni in pazienti con neoplasia testicolare e nel gruppo di controllo.

Nel gruppo di pazienti con tumore del testicolo la distribuzione delle triplette CAG >21 è statisticamente significativa rispetto al gruppo di controllo (61,2% vs 39,6%, P=0.043,).

Utilizzando la mediana delle triplette CAG in AR (21 ripetizioni) ho analizzato la relazione tra la distribuzione della lunghezza dei CAG e parametri seminali nei due gruppi di studio. I valori di riferimento secondo il WHO (1999) indicano che il valore cutoff della concentrazione nemaspermica è 20 mil/mL, al di sotto di tale valore si definisce la oligozoospermia. Le triplette CAG sono state distinte in due sottogruppi:  $\leq 21$  e  $>21$ ; queste due varianti sono state considerate nei due gruppi di studio e in relazione alla concentrazione nemaspermica. Nel gruppo B il 73.3% mostra un numero di ripetizioni  $>21$  con una conta di spermatozoi  $>20$ mil/mL, il 57.9% ha un numero di ripetizioni  $\leq 21$  con valori di conta di spermatozoi  $\leq 20$  mil/mL. La differenza non è statisticamente significativi, ma è possibile notare che ripetizioni CAG  $>21$  corrispondono a parametri seminali migliori nel gruppo dei pazienti con tumore del testicolo. Nel gruppo di controllo i valori sono sovrapponibili (P=1).

## **Questionario**

La tabella n°10 riporta i dati “grezzi” di OR per ogni variabile di interesse: età del paziente, storia pregressa di patologie del tratto genitale, varicocele, livello di istruzione, hobby che prevedono l’uso di sostanze chimiche che potrebbero avere attività simil-endocrina, uso di pesticidi nel giardinaggio, luogo di residenza durante il periodo fetale, luogo di residenza durante la pubertà, luogo di residenza durante l’età adulta, attività occupazionale a rischio durante l’adolescenza e nell’età adulta.

Variabili	Tot			Seminoma			Nonseminoma			Controlli
	n	OR	CI	N	OR	CI	n	OR	CI	N
Peso alla nascita (Kg)										
≤ 4	31	1.00		18	1.00		13	1.00		36
> 4	8	1.18	0.46-3.01	3	1.00	0.22-4.46	5	2.30	0.60-8.86	6
Missing	11									6
Età della madre (anni)										
> 25	24	1.00		10	1.00		14	1.00		29
≤ 25	26	1.65	0.74-3.68	18	<b>2.74</b>	<b>1.04-7.21</b>	8	0.87	0.30-2.47	19
Parità materna										
> 1	41	1.00		23	1.00		18	1.00		44
≤ 1	9	2.41	0.69-8.44	5	2.39	0.58-9.77	4	2.44	0.55-10.85	4
Difetti riprodotti alla nascita										
No	38	1.00		22	1.00		16	1.00		46
Si	12	<b>7.26</b>	<b>1.53-34.47</b>	6	<b>6.27</b>	<b>1.17-33.62</b>	6	<b>8.62</b>	<b>1.57-47.13</b>	2
Allattamento										
No	10	1.00		5	1.00		5	1.00		5
Si	40	0.46	0.14-1.47	23	0.36	0.14-2.04	17	0.39	0.10-1.54	43
Istruzione (anni)										
≤ 8	9	1.00		7	1.00		2	1.00		3
> 8	41	0.30	0.77-1.19	21	<b>0.20</b>	<b>0.04-0.85</b>	20	0.66	0.10-4.30	45
Residenza infanzia										
Urbana	35	1.00		19	1.00		16	1.00		32
Rurale	15	0.85	0.36-2.01	9	0.94	0.35-2.56	6	0.75	0.24-2.28	16
Residenza nella adolescenza										
Urbana	41	1.00		24	1.00		17	1.00		45
Rurale	9	3.29	0.83-13.00	4	2.50	0.51-12.09	5	4.41	0.94-20.50	2
Uso di pesticidi per il giardinaggio										
No	16	1.00		19	1.00		15	1.00		37
Si	34	1.58	0.64-3.88	9	1.59	0.56-4.50	7	1.57	0.51-4.81	11
Mixing directly pesticides										
No	45	1.00		24	1.00		21	1.00		47
Si	5	2.61	0.48-14.15	4	3.91	0.66-22.92	1	1.11	0.96-13.03	2
Hobbies a rischio										
No	35	1.00		17	1.00		18	1.00		12
Si	15	1.28	0.52-3.13	11	1.94	0.71-5.28	4	0.66	0.18-2.36	36
Guida per lavoro										
No	15	1.00		6	1.00		9	1.00		19
si	35	1.52	0.66-3.53	22	2.40	0.83-7.01	13	1.05	0.37-2.95	29

*Tabella 10 - Caratteristiche selezionate dei casi e dei controlli*

La presenza di difetti congeniti del tratto genitale nei pazienti è significativamente associato con il rischio di tumore del testicolo (OR = 7.26, 95%CI: 1.53-34.47), soprattutto per il non seminoma (OR = 8.62, 95%CI: 1.57-47.13). Questo risultato è in accordo con lavori presenti in letteratura che indicano i difetti congeniti del tratto riproduttivo come un fattore di rischio per insorgenza del tumore del testicolo. Nel presente lavoro ho osservato un dato statisticamente significativo relativamente al rischio di seminoma e giovane età materna ( $\leq 25$  vs.  $> 25$  years; OR = 2.74, 95%CI: 1.16-8.77). L'utilizzo di pesticidi per il giardinaggio, la residenza in zone rurali in età adulta e il miscelamento diretto di pesticidi è più frequente tra i casi. In particolare, la bassa parità materna ( $\leq 2$  vs.  $> 2$ , OR = 2.41, 95%CI: 0.69-8.44), la giovane età della madre al momento della gravidanza ( $\leq 25$  vs.  $> 25$ , OR = 1.65, 95%CI: 0.74-3.68), il basso numero di fratelli ( $<1$  vs.  $\geq 1$ , OR = 3.29, 95%CI: 0.83-13.00), l'uso di pesticidi per il giardinaggio (OR = 1.58, 95%CI: 0.64-3.88), miscelamento diretto di pesticidi (OR = 2.61, 95%CI: 0.48-14.15), la residenza in zone rurali in età adulta (OR = 3.29, 95%CI: 0.83-13.00) sono più comuni tra i pazienti con neoplasia testicolare. Un elevato livello di istruzione ( $> 8$  vs  $\leq 8$ ; OR = 0.3 CI = 0.77-1.19), l'allattamento al seno (OR = 0.46 CI = 0.14-1.47) e la residenza in zone rurali durante l'infanzia (OR = 0.85 CI = 0.36-2.01) sembrano avere un ruolo protettivo (Tabella 10). In particolare, i dati rilevano un decremento statisticamente significativo del rischio tra i casi di seminoma con maggiore istruzione rispetto ai controlli (OR = 0.2 CI = 0.04-0.85). Numerosi studi indicano il livello di scolarizzazione come un indicatore indiretto dello status sociale dei soggetti. Come tale, questo risultato è in contrasto con la conoscenza comune che attribuisce un rischio più alto di tumore del testicolo in

soggetti con più alto livello di istruzione e con un alto tenore di vita, sebbene gli studi considerati hanno una struttura “ecologica” e i soggetti considerati nella mia ricerca sono troppo giovani o non hanno ancora terminato gli studi. Per evitare che il livello di istruzione sia un fattore confondente ho considerato questo fattore nella regressione per calcolare il rischio associato con esposizione ai POPs. I fattori di rischio postnatali privi di significatività statistica  $ORs > 2$  per i seminomi sono il miscelamento diretto di pesticidi ( $OR = 3.91$ , 95%CI: 0.66-22.92), basso numero di fratelli ( $<1$  vs.  $\geq 1$ ,  $OR = 3.26$ , 95%CI: 0.71-14.86). Tra i casi di non seminoma, sono stati identificati possibili fattori di rischio non statisticamente significativi  $OR > 2$ : residenza in zone rurali in età adulta ( $OR = 4.41$ , 95%CI: 0.94-20.50), alto peso alla nascita ( $\leq 4$  vs  $> 4$ ;  $OR = 2.30$ , 95%CI: 0.60-8.86), basso numero di fratelli ( $<1$  vs.  $\geq 1$ ,  $OR = 3.33$ , 95%CI: 0.67-16.40) e bassa parità materna ( $\leq 1$  vs.  $> 1$ ,  $OR = 2.44$ , 95%CI: 0.55-10.85). In particolare i dati grezzi OR per i nonseminomi risultano  $>4$  e molto vicini ad una significatività in soggetti che hanno vissuto in zone rurali in età adulta rispetto a coloro i quali hanno vissuto in città. Il rischio diventa, quindi, significativo dopo correzione dei dati.

Ho effettuato ulteriori analisi relativamente alle variabili pre e post-natali ottenendo  $OR > 2$  per la parità materna ed età della madre alla nascita, uso di pesticidi per il giardinaggio, il miscelamento diretto di pesticidi, residenza in zone rurali in età adulta. I dati OR sono stati corretti per le stesse variabili incluse in questa analisi (Tabella 11)

Variabili	n	All		Seminoma			Nonseminoma			N controlli
		OR adjusted	CI	n	OR adjusted	CI	n	OR adjusted	CI	
Età della madre (anni)										
> 25	24	1.00		10	1.00		14	1.00		29
≤ 25	26	1.48	0.62-3.51	18	<b>3.45</b>	<b>1.10-10.76</b>	8	0.71	0.22-2.28	19
Parità materna										
> 1	41	1.00		23	1.00		18	1.00		44
≤ 1	9	1.90	0.49-7.32	5	1.22	0.23-6.40	4	2.31	0.41-12.99	4
Uso di pesticidi per il giardinaggio										
No	16	1.00		19	1.00		15	1.00		37
Si	34	1.42	0.49-4.08	9	1.37	0.33-5.60	7	2.32	0.63-8.52	11
Mixing directly pesticides										
No	45	1.00		24	1.00		21	1.00		47
Si	5	2.96	0.43-20.12	4	<b>9.48</b>	<b>1.00-92.02</b>	1	1.59	0.10-24.40	2
Residenza in età adulta										
Urbana	41	1.00		24	1.00		17	1.00		45
Rurale	9	3.76	0.90-15.74	4	2.21	0.38-12.72	5	<b>7.19</b>	<b>1.34-38.57</b>	2

*Tabella 11 - Caratteristiche selezionate dei casi e dei controlli*

La preparazione diretta di pesticidi ( $OR_{adjusted} = 9.48$ , 95%CI: 1.00-92.02), la giovane età materna alla gravidanza ( $OR_{adjusted} = 3.45$ , 95%CI: 1.10-10.76) sono associati in modo statisticamente significativo al seminoma, mentre un alto rischio per i non seminomi è stato riportato tra i soggetti che hanno vissuto in un contesto rurale in età adulta ( $OR_{adjusted} = 7.19$ , 95%CI: 1.34-38.57).

Studiando il regime alimentare, l'alto consumo di prodotti caseari ( $OR = 2.25$ , 95%CI: 0.70-7.14) e di pesce ( $OR = 2.06$ , 95%CI: 0.88-4.80) sono indicati come possibili fattori di rischio per il tumore del testicolo (Tabella 12). Questi dati sono in accordo con quelli presenti in letteratura. E' stata inoltre evidenziata una riduzione del rischio di tumore testicolare associata ad un elevato consumo di cereali ( $OR = 0.27$ , 95%CI: 0.11-0.64) per tutti i tipi istologici e di frutta e verdura solo per i non seminomi con OR corretto per la concentrazione sierica dei POPs e la residenza in zona rurale in età adulta ( $OR_{adjusted} = 0.49$ , 95%CI: 0.10-0.99). Possibili implicazioni di carattere preventivo potrebbero essere associare questo tumore ad altri tumori ormone-dipendenti ove il ruolo protettivo di questi alimenti è già stato associato.

Variabili	All		Seminoma			Nonseminoma			Controls	
	n	OR	CI	n	OR	CI	n	OR	CI	n
Caffè	≤ 1 volta/die	19	1.00		11	1.00		8	1.00	19
	> 1 volta/die	31	1.00 (0.44-2.24)		17	0.94 (0.36-2.44)		14	1.07 (0.37-3.03)	31
Prodotti caseari	≤ 1 volta/die	40	1.00		22	1.00		18	1.00	45
	> 1 volta/die	10	2.25 (0.70-7.14)		6	2.45 (0.67-8.93)		4	2.00 (0.48-8.30)	5
Frutta e verdura	≤ 6 volte/sett	25	1.00		13	1.00		12	1.00	16
	> 6 volte/sett	25	0.47 (0.20-1.06)		15	0.54 (0.21-1.40)		10	0.39 (0.14-1.09)	34
Cereali	≤ 1 volta/mese	28	1.00		16	1.00		12	1.00	13
	> 1 volta/mese	22	<b>0.27 (0.11-0.64)</b>		<b>12</b>	<b>0.26 0.99-0.70)</b>		<b>10</b>	<b>0.29 (0.1-0.83)</b>	37
Pesce	≤ 1 volta/mese	13	1.00		8	1.00		5	1.00	21
	> 1 volta/mese	37	2.06 (0.88-4.80)		20	1.81 (0.67-4.89)		17	2.46 (0.78-7.73)	29

*Tabella 12 - Frequenza di consumo di cibo*

Infine ho osservato un incremento non significativo del rischio tra i figli di madri che hanno lavorato in un ambiente con possibile esposizione a EDCs rispetto ai controlli (OR = 1.46, 95%CI: 0.38-5.56). A tal fine ho usato Job Exposure Matrix- matrice di esposizione occupazionale- (Van Tongeren et al., 2002) (Tabella 13). Gli stessi risultati sono stati riportati relativamente al lavoro dei pazienti e dei padri e per la possibile esposizione dei soggetti ai vari EDCs in accordo con Job Exposure Matrix (Van Tongeren et al., 2002) (Tabella 6). Le matrici di esposizione occupazionale, dette anche JEM (Job Exposure Matrices), sono strutture di dati costruite con l'obiettivo di caratterizzare e documentare le conoscenze sulle relazioni tra posizioni lavorative (professioni ed attività economiche), rischi (esposizioni) e danni per la salute (patologie). In epidemiologia occupazionale una professione è spesso utilizzata come indicatore delle sostanze cui il lavoratore è esposto. Le JEM assumono, in questo caso, la forma di corrispondenze fra codici di professioni e giudizi di esposizione che queste comportano.

L'uso delle JEM presenta due principali vantaggi: la possibilità di raggruppare lavoratori che svolgono professioni diverse (anche in diversi settori produttivi) in classi omogenee ad ognuna delle quali è correlato un certo livello di esposizione; la possibilità di ottenere informazioni attendibili utilizzando dati solitamente ottenibili da fonti amministrative, da letteratura scientifica o da semplici questionari. Per contro bisogna considerare l'inevitabile errore che si compie utilizzando le valutazioni dell'esposizione che si ottengono consultando una JEM, rispetto alle situazioni reali nelle quali vengono raccolti dati di esposizione specifici e puntuali.

Variable	Cases (n=50)		Controls (n=48)		ORcrude (95 % CI)
	n	%	n	%	
JEM for EDCs in participants					
0	33	66.0	33	68.8	1.00
≥ 1	17	34.0	15	31.3	1.13 (0.48-2.64)
Pesticides					
Improbable	44	88.0	41	85.4	1.00
≥ Possible	6	12.0	7	14.6	0.79 (0.24-2.57)
Polychlorinated organic compounds					
Improbable	47	94.0	48	100.0	1.00
≥ Possible	3	6.0	0	0.0	P Fisher = 0.24
Phtalates					
Improbable	40	80.0	36	75.0	1.00
≥ Possible	10	20.0	12	25.0	0.75 (0.28-1.94)
Alkylphenolic compounds					
Improbable	39	78.0	36	75.0	1.00
≥ Possible	11	22.0	12	25.0	0.84 (0.33-2.15)
Bi-phenolic compounds					
Improbable	48	96.0	48	100.0	1.00
≥ Possible	2	4.0	0	0.0	P Fisher = 0.49
Heavy metals					
Improbable	45	90.0	44	91.7	1.00
≥ Possible	5	10.0	4	8.3	1.22 (0.30-4.85)
JEM for EDCs in fathers					
0	38	33.0	33	70.2	1.00
≥ 1	11	14.0	14	29.8	0.68 (0.27-1.70)
JEM for EDCs in mothers					
0	44	88.0	43	91.5	1.00
≥ 1	6	12.0	4	8.5	1.46 (0.38-5.56)

*Tabella 13 - Eesposizione occupazionale dei partecipanti e dei genitori JEM (Van Tongeren et al., 2002)*

Per quanto riguarda gli hobbies e la possibile esposizione a EDCs riportante nei casi, questi includono stampa di fotografie (5casi), modellismo (3casi), pittura (3casi), lavorazione del legno (2 casi); per quanto riguarda i controlli includono modellismo (4 controlli), pittura (1 controllo), lavorazione del legno (1 controllo) e stampa di fotografie (5 controlli). È possibile osservare un debole incremento non significativo tra i casi che praticano hobby con uso di sostanze chimiche con proprietà di interferenti endocrini (OR = 1.94; CI = 0.71-5.28). Questo rischio è più alto tra i casi di non seminoma (OR = 1.28 CI = 0.52-3.13) e più basso nel sottogruppo di non seminomi (OR = 0.66 CI = 0.18-2.36) (Tabella 7).

### **Analisi e metodi statistici**

Il metodo utilizzato nel presente studio è quello caratteristico dell'indagine caso-controllo, selezionando per ogni paziente 1 controllo comparabile con il caso rispettivo per età e località di nascita (p=NS), per un totale di 50 casi e 50 controlli omogeneamente distribuiti secondo le caratteristiche suddette.

Le analisi sono state svolte utilizzando il metodo della regressione logistica, attraverso la misura del rischio denominata Odds Ratio (OR), con 95 % di intervallo di confidenza (CI). Tutte le analisi statistiche sono state effettuate utilizzando il programma SPSS v. 13.0 per Windows e STATA-9. Abbiamo, quindi, stimato le associazioni tra differenti variabili di esposizione in riferimento al rischio di tumore testicolare, valutato sia come totalità dei casi presenti, sia analizzando separatamente i differenti istotipi del seminoma e del non seminoma. La nostra analisi ha incluso OR grezzi relativi alle caratteristiche socio demografiche e perinatali di casi e controlli. Abbiamo anche condotto una analisi

di regressione logistica sull'esposizione materna e paterna nel periodo prenatale. Abbiamo quindi corretto il dato OR grezzo (OR adjusted) per le concentrazioni di EDCs con diversi confondenti: età del partecipante, parità materna, livello di istruzione, età alla nascita della madre.

*Indagini sierologiche.* Per quanto riguarda le analisi sierologiche dei contaminanti POP, sono stati dosati livelli rilevabili di contaminanti nel 38 % dei campioni riferiti ai casi (limite di rilevabilità del contaminante – limit of detection = LOD), mentre la percentuale dei campioni rilevati tra i controlli risultava essere del 16 %. Considerando il numero di campioni con livelli di contaminanti inferiori al LOD, le concentrazioni sieriche non sono state corrette per la componente lipidica, ma è stato possibile effettuare una media geometrica, misurare i valori della mediana, i valori di minimo e massimo, utilizzando il valore preso come misura della metà del LOD per ciascun campione non rilevabile (Turci et al., ....). Per calcolare l'OR per le diverse variabili abbiamo infine suddiviso i campioni secondo due gruppi dicotomici con valori inferiori o superiori al LOD (< LOD vs  $\geq$  LOD).

*Analisi seminali.* Per ciascun parametro sono state calcolate media e deviazione standard. Il confronto tra casi e controlli è stato effettuato utilizzando il test t di Student.

## **Discussione**

Negli ultimi anni, la diagnostica andrologica ha subito una notevole evoluzione definendo una buona percentuale di infertilità considerata, precedentemente, idiopatica. I fattori genetici sono responsabili del 15% dell'infertilità maschile; tali fattori comprendono alterazioni cromosomiche numeriche e strutturali, microdelezioni del cromosoma Y e mutazioni del gene del recettore degli androgeni (AR). La relazione dei CAG repeats del gene AR e infertilità maschile è poco chiara e ancora non è nota la connessione tra polimorfismo di queste triplette e qualità della spermatogenesi. Il recettore AR è essenziale per una corretta differenziazione sessuale, per lo sviluppo e il mantenimento di una normale spermatogenesi (Yong et al. 2000<sup>[43]</sup>, van Rooijen et al. 1995<sup>[44]</sup>, McLachlan et al. 1996<sup>[45]</sup>). Il recettore degli androgeni (AR) è una proteina intracellulare codificata da un gene a singola copia localizzato sul cromosoma Xq11-12. Il gene è composto da 8 esoni divisi da 7 introni e si estende per circa 75-90kb. Il gene codifica per un fattore di trascrizione che appartiene alla superfamiglia dei fattori di trascrizione steroidei ligando-attivati. AR media gli effetti fisiologici degli androgeni (testosterone e 5 $\alpha$ -diidrotestosterone) agendo come fattore di trascrizione dipendente dal ligando (Trapman J. et al., 1999<sup>[46]</sup>).

Il recettore possiede due siti polimorfici a livello dell'esone 1 caratterizzati da un diverso numero di ripetizioni CAG e GGC che determinano differenti lunghezze del tratto poliglutaminico e poliglicinico nel frammento N-terminale del TAD, e sembrano avere un ruolo nel modulare la funzione e quindi la sensibilità del recettore all'androgeno. Nel soggetto normale il numero di triplette CAG varia da 10 a 35 (media 21-23) e quello delle triplette GGC da 4 a 24 (media 16-17). (Giwerzman et al., 1998<sup>[47]</sup>)

Un'espansione della tripletta superiore a 40 "repeats" determina atrofia muscolare spino bulbare (SBMA) o sindrome di Kennedy, patologia genetico-metabolico del sistema nervoso centrale con anomalie endocrinologiche quali atrofia testicolare e scarsa virilizzazione. Più del 50% degli individui affetti dalla sindrome di Kennedy presentano un'alterazione della spermatogenesi, dalla severa oligozoospermia all'azoospermia (La Spada A. R. et al., 1991<sup>[48]</sup>; Fischbeck K. H., 1997<sup>[49]</sup>; Mengual et al., 2003<sup>[50]</sup>). Questa regione, quindi, ha un ruolo importante nel modulare la funzione e la sensibilità del recettore all'androgeno. Un elevato numero di ripetizioni CAG, anche nell'ambito del range di normalità, sembra determinare una ridotta attività trascrizionale dell'AR sia in vivo che in vitro.

Alterazioni della funzione di AR sono responsabili della sindrome da insensibilità agli androgeni (AIS). Gli androgeni sono essenziali per lo sviluppo e la funzionalità degli organi sessuali maschili, per la gametogenesi, per il manifestarsi dei caratteri sessuali secondari maschili e per il metabolismo generale dell'organismo. Mutazioni di AR che alterano fortemente la funzione del recettore determinano la AIS completa, caratterizzata da individui genotipicamente maschi 46 XY, ma con un fenotipo completamente femminile. Altre mutazioni che non alterano completamente la funzione di AR sono responsabili della AIS parziale; in questo caso i soggetti presentano ambiguità genitale (Yong E. L. et al., 1998<sup>[51]</sup> ; Ghadessy F. J. et al., 1999<sup>[52]</sup> ; Ong Y. C. et al., 2002<sup>[53]</sup>). Inoltre esistono mutazioni che determinano una disfunzione di AR minima con alterazione della spermatogenesi e fenotipo normale (Yong E. L. et al., 2000<sup>[43]</sup>; Loy C. Y. And Yong E. L., 2001). In letteratura sono descritte più di 300 mutazioni a livello di AR che possono spiegare il 2% dell'infertilità maschile (Wang Q. et al., 1998<sup>[54]</sup> ,

Ghadessy F. J. et al., 1999<sup>[52]</sup>; Hiort O. et al., 2000<sup>[55]</sup>). Di queste solo 23 sono localizzate in corrispondenza del dominio transattivante, essenziale per la funzione del recettore, in quanto, dati in vitro indicano che una sua delezione produce una proteina non funzionale (Jenster G. et al., 1995<sup>[56]</sup>). Sempre a livello del dominio transattivante, è presente la tripletta CAG, codificante per un “repeat” polimorfico di glutammine (Tut T. G. et al., 1997<sup>[57]</sup>; Yoshida K. I. et al., 1999<sup>[58]</sup>; Mifsud A. et al., 2001<sup>[59]</sup>). La lunghezza dei “repeat” CAG dipende dall’origine etnica: 8-30 tra gli individui bianchi americani, 8-39 tra gli europei e 11-31 tra gli asiatici (Rajpert-De Meyts E. et al., 2002<sup>[60]</sup>).

L’analisi del numero di ripetizioni CAG nella popolazione degli infertili ha dato risultati contrastanti. Nelle popolazioni australiane, nordamericane e giapponesi è stata riportata un’associazione positiva tra la lunghezza delle ripetizioni CAG e infertilità maschile (Edwards et al., 1992; Lange et al., 2008<sup>[61]</sup>), ma nei paesi europei questo risultato non è stato confermato (Giwercman et al., 1998). Questa diversità di risultati può essere spiegata ipotizzando che la costituzione genica europea è più tollerante la diversità funzionale dell’AR risultata dai polimorfismi, basso numero di campioni esaminati, gruppi di controllo non adeguati, criteri di inclusione non idonei o problemi legati alla differente storia etnica. Inoltre, poiché un’alterazione della spermatogenesi può avere un’eziologia multifattoriale, una minore sensibilità dell’AR può diventare un fattore patogenetico importante solo quando sono presenti altri fattori che influenzano negativamente questo processo. Pertanto alcuni autori riportano che l’associazione tra la lunghezza dei CAG repeats e l’infertilità potrebbe essere valida per uno specifico gruppo etnico ma non necessariamente lineare se venisse estesa alle diverse etnie (Nenonen et al., 2010<sup>[62]</sup>).

Studi *in vitro* dimostrano l'esistenza di una correlazione inversa tra la lunghezza dei CAG "repeat" e la funzione di AR: una maggiore espansione dei CAG causa una diminuzione lineare della funzione transattivante del recettore (Chamberlain N. L. et al., 1994<sup>[63]</sup>). Alcuni lavori riportano che "repeat" corti sono associati con il tumore della prostata (Giovannucci E. et al., 1997<sup>[64]</sup>). Questo è in disaccordo con la tesi del lavoro pubblicato recentemente in cui non vi è alcuna associazione tra la lunghezza dei CAG "repeat" e il rischio di cancro alla prostata. E, quindi, che la conoscenza della lunghezza dei CAG "repeat" non fornisce alcuna informazione clinicamente utile per predire il rischio di cancro prostatico (Price D. K. et al., 2010<sup>[65]</sup>).

In accordo con la correlazione inversa tra la lunghezza dei "repeat" CAG e la funzione di AR, diversi studi coinvolgenti individui di Singapore, Australia, nord America e Giappone indicano che i CAG "repeat" più lunghi sono associati ad un'alterazione della spermatogenesi (Tut T. G. et al., 1997<sup>[57]</sup>; Dowsing A. T. et al., 1999<sup>[66]</sup>; Yoshida K. I. et al., 1999<sup>[58]</sup>; Mifsud A. et al., 2001<sup>[59]</sup>; Patrizio P. et al., 2001<sup>[67]</sup>; Wallerand H. et al., 2001<sup>[68]</sup>). Questi risultati non trovano riscontro con studi che prendono in considerazione la popolazione europea (Rajpert- De Meyts E. et al., 2002<sup>[69]</sup>).

Altri autori dimostrano una relazione tra una diminuzione della spermatogenesi e una moderata espansione delle triplette CAG (Casella R. et al., 2003<sup>[70]</sup>). Questi dati sono in disaccordo con altri studi in cui non sono emerse differenze statisticamente significative tra i pazienti infertili ed il gruppo di controllo (Ferlin A et al., 2004<sup>[71]</sup>).

Nel 2000 Irvine R. A. suggerisce che un aumento della lunghezza dei CAG “repeat” potrebbe interferire sull’interazione tra il dominio aminotermine e il co-attivatore p160, diminuendo l’attività transattivante del recettore.

Altri studi riportano una correlazione tra l’espansione delle triplette CAG e la morfologia nemaspermica, dimostrando che in pazienti con teratozoospermia si ha un aumento del numero delle ripetizioni CAG (Milatiner D. et al., 2004<sup>[72]</sup>).

L’espansione o la diminuzione di sequenze ripetute nella regione codificante di un gene è implicato in un crescente numero di patologie. L’espansione di triplette sembra essere una forma di instabilità dei micro satelliti associata a diversi tipi di tumori nell’uomo, compreso il TGCC. Il recettore degli androgeni presenta, a livello dell’esone 1, due siti polimorfici la cui lunghezza dipende dal numero di triplette CAG e GGN. Cambiamenti nella lunghezza del polimorfismo CAG nel gene del recettore degli androgeni AR, che può portare ad alterazione nella transattivazione del gene AR, sono stati implicati nello svolgere un ruolo nella patogenesi di diverse forme di tumori endocrini e in disordini riproduttivi. In letteratura sono presenti studi in cui sono state esaminate le variazioni di lunghezza del tratto poliglutamminico del recettore androgenico (AR) rispetto al rischio di insorgenza del tumore del testicolo.

King et al., (1997<sup>[73]</sup>) hanno studiato l’espansione delle triplette CAG nella linea cellulare derivante dalla neoplasia testicolare e, poiché, la lunghezza del tratto poliglutamminico può essere alla base di alcuni casi di ereditarietà del tumore del testicolo, è stato estratto il DNA da cellule della linea germinale da 5 parenti di pazienti e, pertanto, predisposti al tumore. È stata osservata una espansione del tratto CAG in 5 su 11 pazienti con patologia neoplastica testicolare. Inoltre un aumento della lunghezza del tratto CAG è stato osservato nei 5 familiari dei

pazienti neoplastici. Queste osservazioni aumentano le possibilità che l'espansione del tratto poliglutamminico del recettore di AR sia ereditabile e che possa avere un ruolo nella tumorigenesi testicolare. De-Meyts et al.,(2002<sup>[9]</sup>) hanno studiato 102 pazienti con tumore del testicolo e 110 controlli. Non sono state notate differenze nella distribuzione dei CAG tra i due gruppi di studio, nessuna differenza tra numero di CAG e istologia del tumore testicolare e nessuna associazione con la stadiazione neoplastica. Giwercman et al.,(2004<sup>[8]</sup>) ha studiato il numero di ripetizioni CAG/GGN in 83 pazienti con tumore del testicolo e 220 controlli. Il numero medio di CAG o GGN non differisce tra TGCC e controlli. La proporzione di uomini con CAG>25, valore indicativo di riduzione della sensibilità agli androgeni, è significativamente più bassa tra pazienti con seminoma e con tumore misto rispetto ai pazienti con tumore non seminomatoso e i controlli. La media della lunghezza dei CAG è più alta se il tumore presenta metastasi alla diagnosi. I polimorfismi di AR non sono associati al rischio di insorgenza e di sviluppo di TGCC, ma tratti lunghi di ripetizioni CAG (>25), associati ad una ridotta sensibilità androgenica, sono più frequenti in pazienti con istotipo tumorale non seminomatoso; per cui un'alta sensibilità agli androgeni predisporrebbe le cellule CIS alla trasformazione in seminoma; mentre una bassa sensibilità faciliterebbe il passaggio CIS tumore non seminomatoso. Questo è il primo studio che mostra una associazione tra polimorfismo di AR e istologia tumorale, così come con la progressione della patologia. La lunghezza delle ripetizioni CAG sembrerebbe correlata con la presenza/assenza di metastasi alla diagnosi: esisterebbe un impatto delle gonadotropine e degli steroidi sessuali nello sviluppo del CIS in tumore invasivo, così come nella crescita della neoplasia e nella capacità di metastatizzare. Un paziente con patologia tumorale testicolare è

considerato geneticamente predisposto a tale neoplasia. Anomalie testicolari sono associate con infertilità e con rischio aumentato di tumore del testicolo. Mutazioni o delezioni nel genoma mitocondriale sono implicate in alterazioni degli spermatozoi. Il DNA mitocondriale si replica e viene riparato dalla DNA polimerasi  $\gamma$ , la cui subunità catalitica è codificata dal gene *POLG*. Rovio et al.,(2001<sup>[74]</sup>) e Jensen et al.,(2004<sup>[75]</sup>) hanno dimostrato esistenza di un polimorfismo del micro satellite CAG nel gene *POLG* che è associato ad infertilità maschile: l'assenza di uno o di entrambi gli alleli è più frequente negli uomini con ridotta fertilità rispetto ai controlli fertili. Partendo dal presupposto che disordini del tratto riproduttivo maschile possono un fattore di rischio per il tumore del testicolo, nel 2005 Nowak et al.,(<sup>[76]</sup>) hanno studiato la variazione delle triplette CAG nel gene *POLG* in 49 pazienti con neoplasia e 55 controlli. La frequenza del genotipo wild-type omozigote in uomini polacchi sani è significativamente diversa rispetto alla popolazione europea, in accordo con gli studi che affermano che l'etnia diversa determina un diverso numero di CAG. Il polimorfismo della DNA polimerasi  $\gamma$  è più frequente nei pazienti con tumore del testicolo rispetto ai controlli. Questi dati supportano la suscettibilità genetica del tumore del testicolo e indicano il polimorfismo mitocondriale del gene della DNA polimerasi  $\gamma$  come possibile candidato. Nel 2008 Biggs et al(<sup>[77]</sup>), hanno esaminato se il rischio di TGCC fosse associato con i livelli sierici di 11 pesticidi organoclorati, incluso il p,p'-DDE, e se l'associazione p,p'-DDE-TGCC fosse modificata dai tratti polimorfici CAG o GGN nel gene del recettore androgenico AR. Sono stati studiati 246 pazienti con tumore del testicolo e 630 controlli. Tutti i pazienti sono stati sottoposti ad un questionario con informazioni demografiche, mediche e sullo stile di vita; i pesticidi sono stati dosati sul siero tramite gas-

cromatografia spettrometria di massa ad alta risoluzione; lo studio dei polimorfismi è stato fatto su DNA genomico. Non è stato osservato un pattern chiaro tra rischio di insorgenza TGCC e concentrazione di nessuno dei pesticidi organoclorati dosati; il rischio associato con p,p'-DDE è modificato da un genotipo CAG (<23) o GGN (<17). Questo studio non fornisce dati che possano supportare l'ipotesi che l'esposizione a pesticidi organoclorati è associato a rischio di insorgenza di TGCC. Nel 2011 sono stati condotti due lavori relativamente alla variazione del polimorfismo nel gene AR e rischio di neoplasia testicolare. Il primo studio è di Västermark et al.,<sup>[78]</sup> che hanno considerato 367 pazienti con tumore del testicolo e 214 controlli. I polimorfismi di AR potrebbero essere coinvolti nella interazione gene-ambiente aumentando la suscettibilità agli effetti degli interferenti endocrini. Da un punto di vista biologico i risultati di questo studio rafforzano l'ipotesi della importanza della azione degli androgeni nella eziologia e nella patogenesi di danni testicolari. In questo studio una maggiore lunghezza di CAG non è predittiva del rischio TGCC, come affermato in studi precedenti. Nel secondo lavoro di Davis-Dao et al.,<sup>[79]</sup> è stato studiato se variazioni della funzione del polimorfismo CAG in AR è associato con il rischio di insorgenza del TGCC. Sono stati reclutati 273 soggetti con tumore del testicolo. In questo lavoro è stata notata una associazione statisticamente significativa tra lunghezza di ripetizioni CAG e rischio di tumore distinto in istotipi, suggerendo che un aumento della attività trascrizionale di AR può essere implicato nello sviluppo del seminoma e/o progressione da CIS in TGCC. Distinguendo in istotipi il tumore del testicolo risulta che: i pazienti con tumore non seminomatoso hanno un numero medio di CAG maggiore rispetto ai controlli; i pazienti con seminoma hanno un numero medio inferiore ai controlli. Questi risultati dimostrano che i

composti presenti in natura, che mimano l'azione degli androgeni, possono contribuire all'aumento di incidenza di TGCC ed identificano, per la prima volta, un potenziale pathway biologico che possa influenzare il seminoma rispetto al tumore non seminomatoso, distinzione importante da un punto di vista biologico e clinico. L'associazione rischio seminoma e bassa lunghezza CAG, quindi, più alta attività transattivazione AR, indica che il ruolo di AR nel tumore del testicolo è più complesso della sola mediazione degli androgeni nei gonociti, nelle cellule CIS e nelle cellule del Sertoli. Per esempio Kinoshita et al., (2000<sup>[80]</sup>) hanno osservato un differente stato di metilazione nei seminomi rispetto ai tumori non seminomatosi. Looijenga et al.,(1997<sup>[81]</sup>) hanno identificato nel tessuto di pazienti con TGCC due siti Hha1 in AR che metilano nei tumori non seminomatosi, mentre non sono metilati in tutti i seminomi. Se la metilazione di AR è associata con il silenziamento nei TGCCs, questo suggerisce che l'attività di AR è più comune nei seminomi. È plausibile, quindi, che durante la fase adulta dello sviluppo di TGCC, una bassa lunghezza di ripetizioni CAG, e una più alta transattivazione, possono determinare la progressione da CIS in seminoma; il silenziamento di AR determinerebbe la progressione in non seminoma.

I tumori del testicolo sono formati da diversi tipi istologici. Più del 90% si origina dall'epitelio germinativo dei tubuli seminiferi andando a formare il gruppo di tumori a cellule germinali. I restanti tumori comprendono il gruppo di tumori non germinali. I tumori a cellule germinali si possono distinguere in seminomi e non seminomi distinzione fondamentale per la prognosi e per il trattamento chemio/radioterapico. I seminomi possono presenti nella variante tipica, anaplastica e spermatocitica che differisce dalle prime due per aspetti clinici e

istologici. I tumori non seminomatosi comprendono carcinoma embrionale, tumore del sacco vitellino, coriocarcinoma e teratoma. I tumori si possono distinguere anche in base al numero di tessuti istologici coinvolti: singolo tipo istologico (tumori puri) rappresentano circa il 40% di tutte le neoplasie; il restante 60% è formato da due o più tipi istologici (tumori misti) la cui prognosi dipende dai tessuti che costituiscono il tumore. I tumori a cellule germinali del testicolo si formano da lesioni preinvasive presenti all'interno dei tubuli seminiferi, da una cellula germinale totipotente. Le cellule indifferenziate intratubulari configurano la neoplasia intratubulare a cellule germinali indifferenziata detta carcinoma in situ (CIS), localizzata all'interno della membrana basale del tubulo seminifero. Questo tipo di neoplasia ha una probabilità del 50% di trasformarsi in tumore invasivo entro 5 anni dalla diagnosi. L'ipotesi più accreditata sulla istogenesi dei tumori a cellule germinali del testicolo è che tali neoplasie deriverebbero da una cellula germinale totipotente che, normalmente, ad ogni divisione mitotica dà origine ad una cellula che procede nel processo di differenziazione e porta alla formazione di spermatozoi maturi ed un'altra cellula che mantiene le caratteristiche di partenza. I processi di formazione dei tumori possono coinvolgere entrambe queste linee cellulari e determinare, quindi, la formazione di tumori seminomatosi e di tumori non seminomatosi. In questo secondo caso la cellula può rimanere indifferenziata determinando la formazione del carcinoma embrionale oppure subire un processo differenziativo, che potrà svilupparsi nel senso di linee cellulari embrionali e generare un teratoma o un teratocarcinoma, o di linee extraembrionali, che danno origine al coriocarcinoma o al tumore del sacco vitellino. In Italia il tumore del testicolo rappresenta il 1-2% di tutti i tumori maschili ed è la neoplasia più frequente tra i 18-40 anni. Esistono notevoli

differenze geografiche nell'incidenza e nel trend di incremento dell'incidenza di questa neoplasia, anche tra Paesi limitrofi e tra popolazioni simili; ciò può essere spiegato da fattori genetici o da possibili esposizioni a fattori ambientali. L'eziopatogenesi del tumore del testicolo è sconosciuta, sono stati individuati fattori predisponenti quali criptorchidismo, tumore testicolare contro laterale e storia familiare di neoplasia testicolare. Il criptorchidismo incrementa di 2-4 volte il rischio di degenerazione neoplastica. La predisposizione familiare si riscontra nel 2% dei casi: fratelli di pazienti con cancro al testicolo hanno un rischio aumentato di 6-10 volte maggiore di sviluppare la stessa patologia. Esisterebbe, quindi, una suscettibilità genetica importante nella eziologia di questa neoplasia che non può essere spiegata, solamente, da fattori ambientali. Nel 2000 Rapley et al., hanno studiato 134 alberi genealogici, con 2 o più casi di tumore del testicolo, dimostrando associazione di questa neoplasia con il locus Xq27. Questo locus è suscettibile al tumore testicolare. Nel 2006 l'International Testicular Cancer Linkage Consortium ha studiato 237 alberi genealogici dimostrando una associazione tra tumore testicolare e 6 "regioni genomiche di interesse". Per questa patologia è stato dimostrato anche un substrato legato alla duplicazione del braccio corto del cromosoma 12. Numerosi lavori hanno valutato i polimorfismi genici coinvolti nella modulazione del meccanismo di azione degli ormoni sessuali. È stato ipotizzato, infatti, che l'insensibilità agli androgeni sia un fattore di rischio del tumore testicolare. La diversa lunghezza delle triplette ripetute CAG potrebbe avere un ruolo nell'insorgenza di tale neoplasia. Il numero delle triplette varia con etnia per cui la razza africana ha un numero inferiore di ripetizioni CAG e, quindi, una minore incidenza di neoplasia testicolare rispetto alla razza Caucasica. I dati presenti in letteratura però sono pochi e contrastanti. Studi

epidemiologici hanno incoraggiato varie ipotesi eziologiche per l'insorgenza di tale patologia. Alla fine degli anni '70 è stato proposto che i livelli di estradiolo nelle donne in gravidanza giochino un ruolo critico durante la vita fetale nella carcinogenesi testicolare. Dagli anni '80 la ricerca sulla eziologia si è focalizzata sui fattori pre-perinatali. In questi anni è stata proposta come causa di tumore testicolare l'esposizione fetale ad ormoni esogeni ed in particolare al dietilstilbestrolo, estrogeno steroideo utilizzato in passato per prevenire aborti e complicanze durante la gestazione. Ancora una volta sono stati ottenuti risultati contrastanti. Anche i fattori postnatali tra cui i fattori ambientali sono stati associati al rischio di tumore del testicolo. In letteratura sono presenti diversi lavori che hanno associato dieta con tumore del testicolo. Garner et al., (2003) hanno dimostrato che una elevata assunzione di latticini e di grassi è correlata con un maggiore rischio di tumore testicolare. Il latte e i suoi derivati contengono estrogeni e progesterone, ormoni che vengono associati con l'insorgenza della neoplasia testicolare. L'infertilità maschile è stata chiamata in causa da alcuni autori che la indicano come possibile fattore di rischio per il tumore testicolare. Sono state fatte diverse ipotesi per spiegare alterazione della spermatogenesi: esposizione in utero ad estrogeni sintetici, esposizione ad inquinanti ambientali, alterazioni ormonali e fattori immunologici. Di particolare interesse è il ruolo degli inquinanti ambientali che possono interferire con il bilancio ormonale dei soggetti durante la vita postnatale e determinare nell'adulto infertilità e tumore del testicolo. La "teoria della maggiore impregnazione estrogenica" è l'ipotesi patogenetica attualmente più accreditata. Sharpe e Skakkebaek (1993) propongono la "sindrome di disgenesia testicolare"(TDS) legata alla esposizione ad estrogeni ambientali denominati endocrine disruptors EDCs o interferenti

endocrini e ad una suscettibilità genetica a queste sostanze chimiche. Questa sindrome insorgerebbe precocemente, durante il primo periodo della vita fetale ovvero quando si forma il tratto riproduttivo maschile e potrebbe indurre scarsa qualità dell'eiculate (intesa come concentrazione, motilità e morfologia spermatica), neoplasia del testicolo, il criptorchidismo (mancata discesa dei testicoli nello scroto) e l'ipospadia (lo sbocco anomalo del canale uretrale). Questa tendenza al peggioramento è in relazione all'anno di nascita: i pazienti delle coorti più vecchie hanno una migliore salute riproduttiva dei soggetti più giovani. Le ragioni sono ignote, ma la rapidità del cambiamento chiama in causa fenomeni ambientali si sospettano composti chimici ad azione endocrino-simile/clastica (che simulano l'azione di ormoni). Si sostiene che questi composti, attraverso una azione diretta sulle cellule di Sertoli (cellule che inducono la maturazione degli spermatozoi) e/o di Leydig (cellule che producono il testosterone), potrebbe ad alterazione della differenziazione delle cellule da cui originano gli spermatozoi. Si è individuato che alcuni di questi composti alterano lo sviluppo del testicolo e dei suoi annessi. Secondo questa ipotesi, quindi, la presenza o l'esposizione ad estrogeni ambientali determinerebbe una alterazione delle cellule primordiali nella cascata differenziativa spermatogonica; ciò porterebbe alla formazione di cellule che dopo la nascita possono trasformarsi in maligne ed evolvere in carcinoma in situ. L'impregnazione di estrogeni può essere secondaria ad una maggiore assunzione di ormoni o causata da uno sbilancio ormonale endogeno. Il dietilstilbestrolo (DES) è stato usato per circa 30 anni per prevenire aborti. Studi successivi hanno evidenziato che questo estrogeno sintetico aumentava il rischio di malformazioni testicolari, sviluppo di cisti epididimarie e alterazioni della spermatogenesi. Tra gli EDCs i pesticidi organo clorati e i bifenili policlorati

(PCBs) sono inquinanti organo clorati (POPs), lipofilici e persistenti, utilizzati nelle decadi passate nelle industrie, nei prodotti di consumo fino ai primi anni '80 quando il loro utilizzo è stato messo al bando determinando un decremento della concentrazione di questi composti nel siero. Sono contaminanti ubiquitari e si accumulano a livello del tessuto adiposo. Gli inquinanti organo clorati sono stati un interessante oggetto di studio in quanto comprendono il DDT ovvero il primo pesticida sintetico vietato nei primi anni '70, in Italia è stato vietato 30 anni fa, ma la sua produzione è continuata fino agli anni '90 , infatti, studi recenti mostrano livelli appena percepibili in alcune derrate alimentari. Il DDT mima l'azione degli estrogeni in quanto si lega al recettore estrogenico, mentre il p,p'-DDE, suo principale metabolita, ha azione antiandrogenica. Il DDE si accumula nel tessuto adiposo degli animali e dell'uomo compreso nei testicoli, fegato e mammella; può modificare il sistema endocrino e stimolare tumori ormone-dipendenti. Il DDE è più persistente nell'ambiente rispetto al DDT ed ha una emivita nel plasma sanguigno di circa 10 anni. Ayotte et al., (2001), Hauser et al., (2003), Aneck-Hahn et al., (2007) hanno evidenziato una relazione tra DDT/DDE e alterazioni della spermatogenesi, ed in particolare una diminuzione della concentrazione nemaspermica, della motilità e della morfologia associata all'esposizione con DDT/DDE. Due lavori sono stati condotti su popolazioni esposte ad alte concentrazioni di PCBs derivanti da contaminazioni rilevanti di diossine. Il primo lavoro è stato condotto da Guo et al., (2000<sup>[82]</sup>) in seguito all'incidente di Yusheng (Taiwan-1979). La popolazione, e quindi le donne in gravidanza, è stata esposta perché ha ingerito cibo contenente olio contaminato di PCBs e furani. Lo studio ha dimostrato che l'esposizione in utero a queste sostanze altera la funzione riproduttiva. Il liquido seminale dei bambini esposti mostra una percentuale

aumentata di anomalie morfologiche, una ridotta motilità e capacità di penetrare uova di hamster. È stata dimostrata una ridotta fertilità.

Mocarelli et al., (2011<sup>[83]</sup>) hanno studiato gli effetti della esposizione prenatale a diossina in relazione alla qualità del liquido seminale e degli ormoni della riproduzione. Il lavoro è stato svolto su 39 uomini nati tra 1977 e il 1984 dopo l'incidente di Seveso (Milano) avvenuto nel 1976. Le madri di questi pazienti sono state esposte a diossina in seguito all'incidente. Il gruppo di controllo è costituito da 58 uomini le cui madri sono state esposte in maniera marginale alla diossina. I risultati di questo studio indicano che l'esposizione, in utero e durante l'allattamento, a basse dosi di diossina può ridurre la qualità del liquido seminale.

I PCBs sono composti sintetici, lipofilici, persistenti, utilizzati fino agli anni '70 nei prodotti di consumo e industriali. Sono inquinanti ambientali ubiquitari, si accumulano nel tessuto adiposo e sono rilevabili nell'aria, nell'acqua, nei fondali marini, nei pesci e negli animali. La principale fonte di esposizione è attraverso il cibo contaminato (pesce, carne, latticini), ha una emivita da 7 a 30 anni. Il 90% delle esposizioni ai PCBs avviene tramite ingestione di pesce, carne e latticini; le proporzioni dipendono dalle abitudini alimentari della popolazione in esame. Un alto consumo di grassi e di latticini è associato ad un aumentato rischio di insorgenza di neoplasia testicolare. Il consumo di pesce è associato positivamente con i livelli sierici di composti organo clorati, e sono stati osservati effetti negativi sulla riproduzione sia su animali che sull'uomo. North et al., (2000<sup>[84]</sup>) hanno dimostrato che rischi riproduttivi sono associati ad una dieta ricca di cibo vegetale su cui si avrebbe un accumulo di pesticidi residui, fitoestrogeni con proprietà estrogenica e antiandrogenica. Nel 1991 l'International Agency for Research on Cancer (IARC<sup>[85]</sup>) considera "vaporizzare e applicare insetticidi" che implicano

esposizione come potenzialmente cancerogeni per gli animali e per l'uomo. Ad eccezione di individui esposti a tali sostanze per motivi occupazionali; l'esposizione può avvenire attraverso l'uso domestico e nel giardinaggio di organo clorati. Zahm et al., (1998<sup>[86]</sup>); Menegaux et al.,(2006<sup>[87]</sup>) e Ward et al., (2009<sup>[88]</sup>) hanno dimostrato che l'esposizione domestica a pesticidi può essere associata a leucemia.

I PCBs hanno proprietà estrogenica, antiestrogenica, androgenica e antiandrogenica. Hardell et al., (2003<sup>[89]</sup>) hanno studiato 38 PCBs, p,p'-DDE, HCB e clordani in 61 pazienti con tumore del testicolo e 58 controlli. Gli autori hanno analizzato gli stessi inquinanti anche in 44 madri dei casi e 45 dei controlli. È stato dimostrato un aumento della concentrazione sierica di cis-nonaclordano nei casi con tumore testicolare, mentre la concentrazione di p,p'-DDE e i PCBs non differiva tra i casi e i controlli. Nel siero delle madri dei pazienti è stato rilevato un aumento di inquinanti quali PCBs, HCB e clordani. Nessuna differenza statisticamente significativa è stata notata nella concentrazione di p,p'-DDE nei casi, nei controlli e nelle madri. McGlynn et al.,(2008<sup>[90]</sup>) hanno dosato clordani e p,p'-DDE in 754 pazienti con tumore del testicolo e 928 controlli. Gli autori hanno dimostrato una associazione tra esposizione a p,p'-DDE e insorgenza di tumore testicolare. Il limite di questo lavoro è nella mancanza di indicazione relativamente a come e quando sarebbe avvenuta l'esposizione a p,p'-DDE dei soggetti affetti. Presumibilmente l'esposizione potrebbe essere avvenuta in utero o durante l'allattamento, dato che il DDT può attraversare la placenta ed è presente nel latte materno. Dello stesso hanno è il lavoro di Biggs et al., (2008): è uno studio caso-controllo che valuta la relazione tra tumore testicolare e concentrazione sierica di 11 pesticidi organo clorati, tra cui p,p'-DDE che agisce

come antagonista del recettore degli androgeni. È stata valutata la variazione delle ripetizioni CAG nel gene AR per definire se potesse influenzare il rischio di insorgenza di neoplasia del testicolo in associazione con il p,p'-DDE. I risultati non mostrano correlazione tra pesticidi organo clorati e neoplasia e non dimostrano che il rischio di tumore associato al DDE possa essere modificato dai polimorfismi del recettore androgenico. INUENDO è un progetto basato su uno studio epidemiologico su larga scala che valuta l'attività di xenormoni (ER, AR) e di composti diossin-like (AhR) nel siero tramite CALUX. Bonde et al.,(2008<sup>[91]</sup>) hanno sintetizzato le principali scoperte relativamente all'impatto di POPs sulla funzione riproduttiva umana. È stato usato con database con questionario e informazioni biologiche di 2,269 donne e il loro compagno in 18 pubblicazioni relativamente a 4 popolazioni. Lo studio non fornisce evidenze dirette della attività ormone-simile dei PCBs, del CB-153, del p,p'-DDE, così come la concentrazione sierica di questi composti non è regolarmente associata all'azione endogena o esogena nel siero. Nonostante ciò sono stati identificati collegamenti tra l'esposizione a POPs e biomarkers della funzione riproduttiva maschile:

- alti livelli sierici di CB-153 e bassa conta spermatica in uomini con numero basso di ripetizioni CAG
- alta concentrazione sierica CB-153 e decremento della motilità spermatica e una indicazione di ridotta attività della  $\alpha$ -glucosidasi nel plasma seminale
- i danni alla integrità cromatinica spermatica è meno frequente negli Inuit rispetto ai gruppi europei e solo in quest'ultimo il danneggiamento della cromatina è in relazione ai POPs.

I POPs , quindi, possono influire sulla funzione riproduttiva maschile senza un grave impatto sulla fertilità. I dati non forniscono una evidenza diretta per EDs,

per cui altri meccanismi devono essere presi in considerazione. Nel 2009 McGlynn et al., hanno valutato la possibile relazione tra PCBs e neoplasia testicolare in 736 casi e 913 controlli. Sono stati dosati 15 PCBs di cui 8 hanno una relazione inversa con il rischio di insorgenza della neoplasia testicolare, mentre per altri non è stata rilevata associazione. In un recentissimo lavoro di Giwercman (2011) è stato valutato se gli effetti dei POPs sulla attività di AR è dipendente dalla lunghezza dei CAG *in vitro*. È stato testato l'impatto di CB-153, 4,4'-DDE sul recettore ARs attivato dal DHT contenente 16,22 e 28 ripetizioni CAG. Gli effetti di questi composti sono stati valutati singolarmente e insieme. La singola esposizione a 4,4'-DDE ha effetti evidenti sul recettore di AR contenente 16 ripetizioni CAG, mentre la variante più lunga ovvero 28 CAG è più sensibile se esposta a due composti contemporaneamente. Di conseguenza questi risultati *in vitro* confermano i dati *in vivo* : l'effetto della esposizione a PCBs sulla attività di trans attivazione di AR dipende dalla lunghezza del tratto CAG; i livelli di soppressione della attività di AR sono dipendenti dal tipo di esposizione e dal numero di ripetizioni presenti. Giannandrea et al.,(2011<sup>[92]</sup>) hanno condotto il primo studio sulla esposizione domestica ai pesticidi e rischio di insorgenza della neoplasia testicolare. In questo studio caso-controllo sono stati considerati 50 pazienti con tumore del testicolo e 48 controlli. I pazienti sono stati sottoposti ad un questionario dettagliato sulla esposizione a OPs, sul regime alimentare e sono stati dosati i pesticidi organo clorati, p,p'-DDE e HCB. È stata trovata una associazione tra TC , insetticidi domestici e alti livelli sierici di OPs nei casi rispetto ai controlli. Questo supporta i risultati presenti in letteratura che suggeriscono che l'esposizione a OPs potrebbe essere implicata nella patogenesi del TC.

Scopo del mio progetto di ricerca è stato esaminare il ruolo dei fattori genetici e ambientali nell'incidenza del tumore del testicolo. Nel presente progetto ho valutato 100 soggetti, di cui 50 pazienti affetti da tumore del testicolo e 50 controlli. Lo studio è stato svolto eseguendo, sia nei casi che nei controlli, esame del liquido seminale per la valutazione della fertilità e per valutare un eventuale rischio di alterazione dei parametri seminali causati da esposizione a EDC, dosaggio sierico di *p,p'*-DDE, congeneri dei PCBs ed esaclorobenzene e compilazione di un questionario. Quest'ultimo ha fornito informazioni su fattori prenatali, quali esposizione ambientale materna e caratteristiche biologiche, esposizione ambientale e abitudini alimentari dei soggetti, tutti questi fattori sono stati analizzati per valutare una possibile relazione con il rischio di insorgenza della neoplasia testicolare. I dati, presenti in questo lavoro, dimostrano che una maggiore esposizione a *p,p'*-DDE e a composti organo clorurati persistenti può essere associata con il rischio di insorgenza della neoplasia testicolare. Tra i fattori prenatali analizzati tramite questionario, è possibile osservare una relazione, non statisticamente significativa, con una minore età della madre in gravidanza, minore parità materna e più alto peso alla nascita; tra i fattori postnatali ho identificato una associazione, non significativa, tra tumore testicolare e minore numero di fratelli, residenza in zone rurali, giardinaggio e utilizzo di jeans stretti. Importante notare un maggiore rischio di oligozoospermia nei casi di tumore del testicolo con più alti livelli sierici di *p,p'*-DDE e POPs. Dati interessanti emergono dall'analisi delle abitudini alimentari nei due gruppi di studio, in particolare il consumo di latticini e pesce sono un possibile fattore di rischio per l'insorgenza della neoplasia testicolare, mentre un ruolo protettivo è stato rilevato dal consumo di cereali, frutta e verdura.

Data l'evidenza che *p,p'-DDE* agisce come antagonista del recettore degli androgeni, ho esaminato se la variazione nel numero delle triplette CAG nel gene di AR possano modificare il rischio di insorgenza della neoplasia associata con esposizione a *p,p'-DDE*.

Considerando il numero delle triplette CAG ho notato una differenza statisticamente significativa ( $P=0.043$ ) tra il gruppo dei pazienti affetti da neoplasia e gruppo di controllo. Dati presenti in letteratura relativamente alla lunghezza del tratto poliglutaminico e infertilità sono contrastanti e dipendono dalle etnie. Una differenza non statisticamente significativa è presente se si considera la mediana delle triplette CAG (21) e i parametri seminali: nei casi un numero  $CAG>21$  è associato a migliori parametri seminali, mentre nel gruppo di controllo i valori sono sovrapponibili.

Considerando i parametri seminali nei due gruppi di studio è possibile notare che nel gruppo di controllo la concentrazione spermatica totale è maggiore rispetto al gruppo dei casi, ma le differenze non sono statisticamente significative ( $P=0.058$ ). Non è possibile stabilire se le alterazioni seminali nel gruppo dei pazienti con neoplasia testicolare siano dovute alla presenza in sede testicolare della patologia o erano pregresse. Il presente studio è uno dei pochi presenti in letteratura che valuta la relazione tra inquinanti ambientali e parametri seminali. Ho potuto rilevare che una maggiore concentrazione sierica di sostanze inquinanti organo clorurate persistenti *p,p'-DDE* e POPs sono associate ad alterazioni seminali ed in particolare con una diminuzione della conta totale ( $<40\text{mil/mL}$ ) nei pazienti con tumore del testicolo, tale differenza per pochi valori non è statisticamente significativa. Esisterebbe, quindi, una tendenza degli inquinanti ambientali a

peggiore la qualità del liquido seminale così come ipotizzato nella Sindrome di Disgenesia Testicolare proposta nel 1993 da Sharpe e Skakkebaek.

Questo studio in parte supporta l'ipotesi sul ruolo degli interferenti endocrini nel rischio di tumore del testicolo e suggerisce che una maggiore incidenza di insorgenza di neoplasia testicolare nelle ultime decadi può essere dovuta all'accumulo di sostanze chimiche nell'ambiente. I risultati riportati sono in accordo con gli studi condotti nel Nord Europa e negli USA, ma è necessario studiare maggiormente in Italia il rischio di insorgenza di questa patologia e il trend.

### Tab 3 - Questionario

#### INFORMAZIONI GENERALI

Numero scheda individuale

Data intervista

Caso  Controllo

Provenienza soggetto:

Policlinico U. I

Modalità di somministrazione del questionario:

Intervista telefonica

Intervista personale

#### DATI ANAGRAFICI

Data di nascita:

Luogo di nascita: Comune  Provincia

Residenza:

Indirizzo: , n.   
comune  Provincia

Abitazione attuale (se non coincide con la residenza):

Indirizzo: , n.   
comune  Provincia

Recapito telefonico:

Stato civile:

Celibe  Coniugato  Divorziato  Vedovo

↳ da quanti anni?  anni

↳ ha mai convissuto?  Sì  No se, si da che età  a che età

Titolo di studio:

Elementare  Medie inf.  Medie sup.  Diploma univ.  Laurea  Altro

Servizio Militare:

espletato in data  durata  mesi

Arma  Corpo

Sede

Eventuali

spostamenti:

riformato (specificare)

esentato (specificare)

#### INFORMAZIONI SULLA RESIDENZA/DOMICILIO

##### 1. Come definirebbe il suo contesto abitativo?

Centro abitato  Periferia  Zona agricola  Zona industriale

Altro (specificare)   Non so

↳ Nel raggio di 500 metri dalla sua abitazione sono presenti uno o più dei seguenti siti?

scali portuali  scali aeroportuali  discariche  elettrodotti

impianti industriali (specificare)

aziende agricole (specificare)

2. Ha mai vissuto in campagna?  Sì  No

☞ **se, si in che periodo della sua vita e per quanto tempo?** da  anni di età a  anni di età

**3. Ha mai usato prodotti antiparassitari?**

Sì  No  Non so

☞ **se sì, effettuava miscele?**  Sì  No

☞ **utilizzava dispositivi di protezione?**  Sì  No

- **se sì, di che tipo?**  guanti  mascherina  tuta  visiera  
 altro

**STORIA LAVORATIVA**

**4. Qual è la sua professione attuale?** \_\_\_\_\_

☞ In quale Ditta/Istituzione e comparto produttivo? \_\_\_\_\_

**4. Qual è la sua mansione attuale?** \_\_\_\_\_

**5. Da quanto tempo esercita la sua mansione?**  Anni  Mesi

**6. Ha mai cambiato mansione?**  Sì  No  Non ricordo

☞ **Se sì, quali altre mansioni ha esercitato e per quanto tempo?**

Mansione	Anni	Mesi	Età
_____	<input type="text"/>	<input type="text"/>	da <input type="text"/> a <input type="text"/>
_____	<input type="text"/>	<input type="text"/>	da <input type="text"/> a <input type="text"/>
_____	<input type="text"/>	<input type="text"/>	da <input type="text"/> a <input type="text"/>

**7. Durante la sua attività manipola/ha manipolato sostanze o prodotti chimici?**

Sì  No  Non ricordo

☞ **se sì, quali sostanze/prodotti ( solventi, inchiostri, colle, vernici, benzina, detersivi, antiblastici, oli lubrificanti, ecc)?**

	Sì	No	Non so
1. _____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2. _____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

**8. Ha esercitato altre professioni o mestieri nel corso della sua vita?**

Sì  No  Non ricordo

professione: \_\_\_\_\_ da  anni a  anni di età

\_\_\_\_\_ da  anni a  anni di età

**9. Quale professione esercitava Sua mamma al momento della gravidanza?**

\_\_\_\_\_

**10. Quale professione esercitava Suo padre al momento della gravidanza?**

\_\_\_\_\_

**ANAMNESI GENERALE**

**1. Con che tipo di parto è nato?**

parto naturale  parto cesareo programmato (specificare) \_\_\_\_\_

non ricordo  parto cesareo d'urgenza (specificare) \_\_\_\_\_

**2. È nato prematuro?**  Sì  No  Non ricordo

☞ **Se sì, di quanti mesi?**  mesi

**3. Ricorda dove visse sua madre nel periodo della sua gravidanza?**  Sì  No

Comune: \_\_\_\_\_ Provincia

**4. Quando è nata sua mamma?**  /  /



Anni  Non ricordo

17. A che età si è rasato per la prima volta?   anni  Non ricordo

18. Nella sua famiglia ci sono altri casi di tumore?  Sì  No  Non so

☞ Se sì, specificare il tipo di tumore, il soggetto e l'età

Tipo di tumore e sede	Madre	Padre	Fratelli	Zii	Cugini	Nonni	Età
_____	<input type="checkbox"/>						
_____	<input type="checkbox"/>						

19. A che età le è stato diagnosticato il tumore?   anni data:

## STILE DI VITA

1. Fuma?  Sì  da che età?   anni  No  Ex-fumatore  
dall'età di   anni

☞ Se sì, cosa fuma/fumava e quanto?

sigarette/sigari   n° di sigarette/sigari al giorno  pipa  n° di pipe al  
giorno

altro \_\_\_\_\_

2. Ha praticato qualche sport nel corso della sua vita?  Sì  No

☞ Se sì, quale e per quanto tempo? \_\_\_\_\_

3. Come raggiunge il suo posto di lavoro?

a piedi  in automobile  in treno  in autobus  in bicicletta  motorino

4. Quante ore passa seduto durante una giornata  
comprese quelle a casa?   ore  non so quantificare

5. Da ragazzo si muoveva con moto/motorino?  Sì  No

6. Che tipo di abbigliamento è solito indossare

☞ Indossa spesso jeans aderenti?  Sì  No

☞ la biancheria intima che indossa è aderente?  Sì  No

7. Ha figli?  Sì  No

☞ Se sì, quanti

☞ I suoi figli sono stati concepiti prima o dopo la diagnosi?  prima  dopo

8. Ha qualche hobby?  Sì  No

☞ Se sì, specificare

modellismo  restauro  lavori di falegnameria  
 disegno/pittura  fotografia  altro (specificare) \_\_\_\_\_



## Bibliografia

- 1) Van As NJ, Gilbert DC, Money-Kyrle J, Bloomfield D, Beesley S, Dearnaley DP, Horwich A, Huddart RA. *Evidence-based pragmatic guidelines for the follow-up of testicular cancer: optimising the detection of relapse..* Br J Cancer. **98**: 1894-1902. (giugno 2008).
- 2) Giwerman A. , et al., *Prevalence of carcinoma in situ and other histopathological abnormalities in testes of men with a history of cryptorchidism.* J Urol. 1989 Oct; 142(4), 998-1001; discussion 1001-2
- 3) Wanders EH, et al., *Trends in incidence of testicular cancer: an overview.* J. Urol 2003; 170:5-11.
- 4) Rapley EA, et al., *Localization to Xq 27 of susceptibility gene for testicular germ-cell tumours.* Nat Genet. 2000 Feb; 24(2): 197-200
- 5) Crockford GP, et al., *Genome-wide linkage screen for testicular germ cell tumor susceptibility loci.* Hum Mol Genet. 2006 Feb 1;15(3):443-51
- 6) Chaganti RS, et al., *Genetics and biology of adult human male germ-cell tumours.* Cancer Res. 2000 Mar 15;60(6):363-71.
- 7) Garolla A.,et al., *Molecular analysis of the androgen receptor gene in testicular cancer.* Endocr Relat Cancer.2005 Sep, 12(3): 645-55,
- 8) Giwercman A. et al., *Linkage between androgen receptor gene CAG trinucleotide repeat length and testicular germ cell cancer histological type and clinical stage.* Eur J Cancer. 2004 Sep; 40(14):2152-8.
- 9) Rajpert-De Meyts E. et al., *Analysis of the polymorphic CAG repeat length in the androgen receptor gene in patients with testicular germ cell cancer.* Int J Cancer. 2002 Nov 10; 102(2):201-4.

- 10) Ono Y. et al., *Sporadic testicular germ cell cancers do not exhibit specific alteration in CAG/CTG repeats containing genes expressed in human testis.* Oncogene. 2001 Sep 6; 20(39):5548-53.
- 11) King BL. et al., *Repeat expansion detection analysis of CAGn tracts in tumor cell lines, testicular tumors, and testicular cancer families.* Cancer Res. 1997 Jan 15, 57(2):20.
- 12) Møller H, et al., *Testicular cancer and cryptorchidism in relation to prenatal factors: cases-control studies in Denmark.* Cancer Causes Control. 1997 Nov; 8(6):904-12.
- 13) Wanderås EH, et al., *Maternal health and pre-and perinatal characteristics in the etiology of testicular cancer: a prospective population-and register-based study on Norwegian males born between 1967 and 1995.* Cancer Causes Control. 1998 Oct; 9(5): 475-86.
- 14) Weir HK, et al., *Pre-natal and peri-natal exposures and risk of testicular germ-cell cancer.* Int J Cancer. 2000 Aug 1; 87(3):438-43.
- 15) Coupland CA, et al., *Maternal risk factors for testicular cancer: a population-based case-control study (UK).* Cancer Causes Control. 2004 Apr; 15(3):277-83.
- 16) Schottenfeld D, et al., *The epidemiology of testicular cancer in young adults.* Am J Epidemiol. 1980 Aug; 112(2):232-46.
- 17) Garner MJ, Birkett NJ, Johnson KC, Shatenstein B, Ghadirian P, Krewski D; Canadian Cancer Registries Epidemiology Research Group. *Dietary risk factors for testicular carcinoma.* Int J. Cancer. 106(6):934-41, (2003)
- 18) Depue RH, et al., *Estrogen exposure during gestation and risk of testicular cancer.* J Natl Cancer Inst. 1983 Dec; 71(6): 1151-5.

- 19) Skakkebeak NE. *Trends in male reproductive health. Environmental aspects.* Adv Exp Med Biol. 1998;444:1-2; discussion 3-4.
- 20) Skakkebeak NE et al., *Germ cell cancer and disorders of spermatogenesis: an environmental connections APMIS.* 1998 Jan; 106(1): 3-11; discussion 12. Review.
- 21) Jensen TK, et al., *Do environmental estrogens contribute to the decline in male reproductive health?* Clin Chem.1995 Dec; 41(12Pt2):1896-901.
- 22) Sharpe RM, et al., *Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of male reproductive tract?* Lancet.1993 May 29;341(8857):1392-5.
- 23) Morrish DW, et al., *Mechanisms of endocrine dysfunction in patients with testicular cancer.* J Natl Cancer Inst.1990 Mar7;82(5):412-8.
- 24) Ulbright TM, et al., *Tumors of testis, adnexa, spermatic cord and scrotum. In Atlas of Tumor Pathology, 3<sup>rd</sup> series, fascicle 25.* Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology, 1999.
- 25) Ulbright TM, *Germ cell neoplasms of testis.* Am J Surg Pathol 17:1075,1993
- 26) Bosl GJ, Motzer RJ: *Testicular germ-cell cancer.* N Engl J Med 337-242, 1997.
- 27) Libro marco titolo
- 28) Mahadevan M., Trounson A.O. *Effect of Cryoprotective Media and Dilution Methods on the Preservation of Human Spermatozoa.* Andrologia, 15-355 (1983)

- 29) Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E., Main KM., *Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common development disorder with environmental aspects*. Human Reproduction, 16(5):972-8, May (2001)
- 30) Hosie S., Loff S., Witt K., Niessen K., Waag KL., *Is there a correlation between organochlorine compounds and undescended testes?* Eur J Pediatr Surg., 10 (5):304-309, 2000.
- 31) Longnecker MP., Klebanoff MA., Brock JW., *Maternal serum level of 1,1-dichloro2,2-bis(p-chlorophenyl)ethylene and risk of cryptorchidism, hyposadias, and polythelia among male offspring*. Am J Epidemiology. 155(4):313-322, (2002)
- 32) Bhatia R., Shiao R., Petreas M., Weintraub JM., Farhang L., Eskenazi B., *Organochloride pesticides and male genital anomalies in the child health and development studies*. Environ Health Perspect. 113(2):220-224, (2005)
- 33) Ayotte P., Giroux S., Dewailly E., *DDT spraying for malaria control and reproductive function in Mexican men*. Epidemiology. 12(3):366-367, (2001)
- 34) Hauser R., Chen Z., Pothier L., Ryan L., Altshul L., *The relationship between human semen parameters and environmental exposure to polychlorinated biphenyls and p,p'-DDE*. Environ Health Perspect. 111(12):1505-1511, (2003)
- 35) Hardell L., van Bavel B., Lindstrom G., *Increased concentrations of polychlorinated biphenyls, hexachlorobenzene, and chlordanes in mothers of men with testicular cancer*. Environ Health Perspect. 111(12):930-934, (2003)

- 36) Damgaard IN., Skakkebaek NE., Toppari J., *Persistent pesticides in human breast milk and cryptorchidism*. Environ Health Perspect. 114(7):1133-1138, (2006)
- 37) Welch RM., Levin W., Kuntzman R., Jacobson M., Conney AH., *Effect of halogenated hydrocarbon insecticides on the metabolism and uterotrophic action of estrogens in rats and mice*. Toxicol Appl Pharmacol. 19(2): 234-246, (1971)
- 38) Yang C., Chen S., *Two organochlorine pesticides, toxaphene and chlordane, are antagonists for estrogen-related receptor alpha-1 orphan receptor*. Cancer Res.59(18):4519-4524, (1999)
- 39) McGlynn KA., Devesa SS., Singurdson AJ., Brown LM., Tsao L., Tarone RE., *Trends in the incidence of testicular germ cell tumors in the United States*. Cancer 97(1):63-70, (2003)
- 40) Dallinga JW., Moonen EJ., Dumoulin JC., Evers JL., Geraedts JP., Kleinjans JC., *Decreased human semen quality and organochlorine compounds in blood*. Human Reproduction, 17(8):1973-9, (2002)
- 41) Axmon A, Hagmar L, Jönsson BA. *Rapid decline of persistent organochlorine pollutants in serum among young Swedish males*. Chemosphere, 70(9):1620-8, (2008)
- 42) Turci R, Mariani G, Marinaccio A, Balducci C, Bettinelli M, Fanelli R, Nichetti S, Minoia C. *Critical evaluation of a high-throughput analytical method for polychlorinated biphenyls in human serum: which detector for the establishment of the reference values?* Rapid Commun Mass Spectrom. 18(4):421-34, (2004)

- 43) Yong EL., Lim LS., Wang Q., Mifsud A., Lim J., Ong YC., Sim KS., *Androgen receptor polymorphisms and mutations in male infertility*. J. Endocrinol Invest., 23(9):573-7, (2000)
- 44) Van Rooijen JH, Van Assen S, Van Der Kwast TH, De Rooij DG, Boersma WJ, Vreeburg JT, Weber RF. *Androgen receptor immunoexpression in the testes of subfertile men*. J.Androl., 16(6):510-6, (1995)
- 45) McLachlan RI, Wreford NG, O'Donnell L, de Kretser DM, Robertson DM. *The endocrine regulation of spermatogenesis: independent roles for testosterone and FSH*. J Endocrinol., 148(1):1-9, (1996)
- 46) Trapman J, Brinkmann AO, Blok LJ, de Ruiten PE, Doesburg P, Steketeer K, Berrevoets CA, *Mechanism of androgen receptor activation and function*. J Steroid Biochem Mol Biol.. 69(1-6):307-13, (1999)
- 47) Giwercman YL., Xu C., Arver S., Pousette A., Reneland R., *No association between the androgen receptor gene CAG repeat and impaired sperm production in Swedish men*. Clin Genet., 54(5):435-6, (1998)
- 48) La Spada AR., Wilson EM., Lubahn DB., Harding AE., Fischbeck KH., *Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy*. Nature, 352(6330):77-9, (1991)
- 49) Fischbeck KH. *Kennedy disease*. J. Inherit Metab Di., 20(2):152-8, (1997)
- 50) Mengual L., Oriola J., Ascaso C., Ballejà JL., Oliva R., *An increased CAG repeat length in the androgen receptor gene in azoospermic ICSI candidates*. J. Andrology , 24(2):279-84, (2003)
- 51) Yong EL., Ghadessy F., Wang Q., Mifsud A., Ng SC., *Androgen receptor transactivation domain and control of spermatogenesis*. Rev Reprod., 3(3):141-4, (1998)

- 52) Ghadessy FJ, Liow SL., Yong EL., *Mutations in the promoter region of the androgen receptor gene are not common in males with idiopathic infertility.* Mol Hum Reprod., 5(3):287-90, (1999)
- 53) Ong YC., Kolatkar PR., Yong EL., *Androgen receptor mutations causing human androgen insensitivity syndromes show a key role of residue M807 in Helix 8-Helix interactions and in receptor ligand-binding domain stability.* Mol Hum Reprod., 8(2):101-8, (2002)
- 54) Wang Q., Ghadessy FJ. Yong EL., *Analysis of the transactivation domain of the androgen receptor in patients with male infertility.* Clin Genet., 54(3):185-92, (1998)
- 55) Hiort O., Holterhus PM., Horter T., Schulze W., Kremke B., Bals-Pratsh M., Sinnecker GH., Kruse K., *Significance of mutations in the androgen receptor gene in males with idiopathic infertility.* J.Clin.Endocrinol. Metab., 85(8):2810-5, (2000).
- 56) Jenster G., van der Korput HA., Trapman J., Brinkmann AO., *Identification of two transcription activation units in the N-terminal domain of the human androgen receptor.* J. Biol. Chem., 270(13):7341-6, (1995)
- 57) Tut TG., Ghadessy FJ., Trifiro MA., Pinsky L., Yong EL., *Long polyglutamine tracts in the androgen receptor are associated with reduced trans-activation, impaired sperm production, and male infertility.* J.Clin Endocrinol Metab., 82(11):3777-82, (1997)
- 58) Yoshida KI., Yano M., Chiba K., Honda M., Kitahara S., *CAG repeat length in the androgen receptor gene is enhanced in patients with idiopathic azoospermia.* Urology, 54(6):1078-81, (1999)

- 59) Mifsud A., Sim CK, Boettger-Tong H., Moreira S., Lamb DJ., Lipshultz LI., Yong EL., *Trinucleotide (CAG) repeat polymorphisms in the androgen receptor gene: molecular markers of risk for male infertility*. *Fertil Steril.*, 75(2):275-81, (2001).
- 60) Rajpert- De Meyts E., Leffers H., Daugaard G., Andersen CB., Petersen PM., Hinrichsen J., Pedersen LG., Skakkebaek NE., *Analysis of the polymorphic CAG repeat length in the androgen receptor gene in patients with testicular germ cell cancer*. *Int J Cancer.*, 102(2):201-4, (2002).
- 61) Lange EM., Sarma AV., Ray A., Wang Y., Ho LA., Anderson SA., Cunningham JM., Cooney KA., *The androgen receptor CAG and GGN repeat polymorphisms and prostate cancer susceptibility in African-American men: results from the Flint Men's Health Study*. *J Hum Genet.*, 53(3):220-6, (2008)
- 62) Nenonen H, Björk C, Skjaerpe PA, Giwercman A, Rylander L, Svartberg J, Giwercman YL. *CAG repeat number is not inversely associated with androgen receptor activity in vitro*. *Mol Hum Reprod.* 16(3):153-7, (2010)
- 63) Chamberlain NL., Driver ED., Miesfeld RL., *The length and location of CAG trinucleotide repeats in the androgen receptor N-terminal domain affect transactivation function*. *Nucleic Acids Res.*, 22(15):3181-6, (1994)
- 64) Giovannucci E, Kantoff PW, Febbo PG, Krithivas K, Dahl DM, Chang G, Hennekens CH, Brown M, Stampfer MJ. *A polymorphism of the 5 alpha-reductase gene and its association with prostate cancer: a case-control analysis*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, 6(3):189-92, (1997)
- 65) Prince DK., Chau CH., Till C., Goodman PJ., Baum CE., Ockers SB., English BC., Minasian L., Parnes HL., Hsing AW., Reichardt JK., Hoque

- A., Tangen CM., Kristal AR., Thomson IM., Figg WD., *Androgen receptor CAG repeat length and association with prostate cancer risk: results from the prostate cancer prevention trial*. J. Urol., 184(6):2297-302, (2010)
- 66) Dowsing AT., Yong EL., Clak M., McLachian RI, De Kretser DM., Trounson AO., *Linkage between male infertility and trinucleotide repeat expansion in the androgen-receptor gene*. Lancet 354(9179):640-3, (1999).
- 67) Patrizio P., Leonard DG., *Expansion of the CAG trinucleotide repeats in the androgen receptor gene and male infertility: a controversial association*” J.Androl., 22(5):748-9, (2001).
- 68) Wallerand H., Chabannes E., Bittard H., *Idiopathic male infertility and androgene receptors*. Prog Urol., 11(4): 610-20, (2001)
- 69) Rajpert- De Meyts E., Leffers H., Andersen CB., Petersen PM., Pedersen LG., Carlsen E., Jørgensen N., Skakkebaek NE., *CAG repeat length in androgen receptor gene and reproductive variables in fertile and infertile men*. Lancet 359(9300):44-6, (2002)
- 70) Casella R., Maduro MR., Misfud A., Lipshultz LI., Yong EL.,Lamb DJ., *Androgen receptor gene polyglutamine length is associated with testicular histology in infertile patients*. J. Urol., 169(1):224-7, (2003)
- 71) Ferlin A., Bartoloni L., Rizzo G., Roverato A., Garolla A., Foresta C., *Androgen receptro gene CAG and GGC repeat length in idiopathic male infertility*. Mol. Hum. Reprod., 10(6):417-21, (2004)
- 72) Milantiner D., Halle D., Huerta M., Margalioth EJ., Cohen Y., Ben-Chetrit A., Gal M., Mimoni T., Eldar-Geva T., *Association between androgen receptor gene CAG repeat length and sperm morphology*. Hum Reprod., 19(6):1426-30, (2004)

- 73) King BL, Peng HQ, Goss P, Huan S, Bronson D, Kacinski BM, Hogg D. *Repeat Expansion Detention Analysis of (CAG)<sub>n</sub> tracts in the tumor cell lines, testicular tumors, and testicular cancer families.* *Cancer Res*, 57:209-14, (1997)
- 74) Rovio AT, Marchington DR, Donat S, Schuppe HC, Abel J, Fritsche E, Elliott DJ, Laippala P, Ahola AL, McNay D, Harrison RF, Hughes B, Barrett T, Bailey DM, Mehmet D, Jequier AM, Hargreave TB, Kao SH, Cummins JM, Barton DE, Cooke HJ, Wei YH, Wichmann L, Poulton J, Jacobs HT. *Mutations at the mitochondrial DNA polymerase (POLG) locus associated with male infertility.* *Nat Genet*, 29(3):261-2. (2002)
- 75) Jensen M, Leffers H, Petersen JH, Nyboe Andersen A, Jørgensen N, Carlsen E, Jensen TK, Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E. *Frequent polymorphism of the mitochondrial DNA polymerase gamma gene (POLG) in patients with normal spermiograms and unexplained subfertility.* *Hum Reprod*, 19(1):65-70, (2004)
- 76) Nowak R, Zub R, Skoneczna I, Sikora K, Ligaj M. *CAG repeat polymorphism in the DNA polymerase gamma gene in Polish population: an association with testicular cancer risk.* *Ann Oncol.*, 16(7):1211-2, (2005)
- 77) Biggs ML, Davis MD, Eaton DL, Weiss NS, Barr DB, Doody DR, Fish S, Needham LL, Chen C, Schwartz SM. *Serum organochlorine pesticide residues and risk of testicular germ cell carcinoma: a population-based case-control study.* *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 17(8):2012-8, (2008)
- 78) Västermark Å, Giwercman YL, Hagströmer O, De-Meyts ER, Eberhard J, Ståhl O, Cedermark GC, Rastkhani H, Daugaard G, Arver S, Giwercman A.

*Polymorphic variation in the androgen receptor gene: association with risk of testicular germ cell cancer and metastatic disease.* Eur J Cancer, 47(3):413-9, (2011)

**79)** Davis-Dao CA, Siegmund KD, Vandenberg DJ, Skinner EC, Coetzee GA, Thomas DC, Pike MC, Cortessis VK. *Heterogenous effect of androgen receptor CAG tract length on testicular germ cell tumor risk: shorter repeats associated with seminoma but not other histologic types.* Carcinogenesis, 32(8):1238-43, (2011)

**80)** Kinoshita H, Shi Y, Sandefur C, Meisner LF, Chang C, Choon A, Reznikoff CR, Bova GS, Friedl A, Jarrard DF. *Methylation of the androgen receptor minimal promoter silences transcription in human prostate cancer.* Cancer Res, 60(13):3623-30, (2000)

**81)** Looijenga LH, Gillis AJ, van Gurp RJ, Verkerk AJ, Oosterhuis JW. *X inactivation in human testicular tumors. XIST expression and androgen receptor methylation status.* Am J Pathol., 151(2):581-90, (1997)

**82)** Guo YL, Hsu PC, Hsu CC, Lambert GH. *Semen quality after prenatal exposure to polychlorinated biphenyls and dibenzofurans.* Lancet, 356<.1240-1(2000)

**83)** Mocarelli P, Gerthoux PM, Needham LL, Patterson DG Jr, Limonta G, Falbo R, Signorini S, Bertona M, Crespi C, Sarto C, Scott PK, Turner WE, Brambilla P. *Perinatal exposure to low doses of dioxin can permanently impair human semen quality.* Environ.Health Perspect, 119:713-8, (2011)

**84)** North K, Golding J. *A maternal vegetarian diet in pregnancy is associated with hypospadias.* The ALSPAC Study Team. Avon Longitudinal Study of Pregnancy and Childhood. B.J.U.Int 85:107-13, (2000).

- 85) International Agency for Research on Cancer (IARC). *Occupational Exposure in Insecticide Application and some Pesticides. IARC Monographs on Evaluation of Carcinogenesis Risks of Chemicals to Human*; IARC: Lyon, France. Vol 53, 179-249, (1991)
- 86) Zahm SH, Ward MH. *Pesticides and childhood cancer*. Environ. Health Perspect. ;106 Suppl 3:893-908, (1998)
- 87) Menegaux F, Baruchel A, Bertrand Y, Lescoeur B, Leverger G, Nelken B, Sommelet D, Hémon D, Clavel J. *Household exposure to pesticides and risk of childhood leukaemia*. Occup. Environ. Med. 63:131-4,(2006)
- 88) Ward MH, Colt JS, Metayer C, Gunier RB, Lubin J, Crouse V, Nishioka MG, Reynolds P, Buffler PA. *Residential exposure to polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides and risk of childhood leukemia*. Environ. Health Perspect 117(6):1007-13, (2009)
- 89) Hardell L, van Bavel B, Lindström G, Carlberg M, Dreifaldt AC, Wijkström H, Starkhammar H, Eriksson M, Hallquist A, Kolmert T. *Increased concentrations of polychlorinated biphenyls hexachlorobenzene, and chlordanes in mothers of men with testicular cancer*. Environ Health Perspect. 111(7):930-4, (2003)
- 90) McGlynn KA, Quraishi SM, Graubard BI, Weber JP, Rubertone MV, Erickson RL. *Persistent organochlorine pesticides and risk of testicular germ cell tumors*. J Natl Cancer Inst. 100(9):663-71,(2009)
- 91) Bonde JP, Toft G, Rylander L, Rignell-Hydbom A, Giwercman A, Spano M, Manicardi GC, Bizzaro D, Ludwicki JK, Zvyezday V, Bonefeld-Jørgensen EC, Pedersen HS, Jönsson BA, Thulstrup AM; INUENDO. *Fertility and markers of male reproductive function in Inuit and European populations*

*spanning large contrasts in blood levels of persistent organochlorines.*

Environ Health Perspect 116(3):269-77, (2008)

- 92) Giannandrea F, Gandini L, Paoli D, Turci R, Figà-Talamanca I. *Pesticides exposure and serum organochlorine residuals among testicular cancer patients and healthy controls.* J Environ Sci Health B., 46(8);780-7, (2011)