

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

**Interferenti endocrini:
valutazione e prevenzione
dei possibili rischi per la salute umana**

A cura di
Gemma Calamandrei (a), Cinzia La Rocca (b),
Aldina Venerosi Pesciolini (a) e Alberto Mantovani (b)
(a) Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze
(b) Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare

ISSN 1123-3117
Rapporti ISTISAN
09/18

Istituto Superiore di Sanità

Interferenti endocrini: valutazione e prevenzione dei possibili rischi per la salute umana.

A cura di Gemma Calamandrei, Cinzia La Rocca, Aldina Venerosi Pesciolini e Alberto Mantovani
2009, vi, 95 p. Rapporti ISTISAN 09/18

L'Istituto Superiore di Sanità, attraverso i Dipartimenti di Biologia Cellulare e Neuroscienze e di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, ha organizzato nell'ottobre 2008 un incontro nazionale per promuovere e valorizzare la ricerca multidisciplinare sui possibili rischi per la salute associati all'esposizione a interferenti endocrini (IE): l'incontro è stato centrato su due temi prioritari, la sicurezza alimentare e gli effetti sullo sviluppo neurocomportamentale. Questo Rapporto raccoglie i contributi presentati al convegno, che ha evidenziato la possibilità e l'opportunità di costruire una rete nazionale che dia un valore aggiunto alle molteplici attività sugli IE, dalla tossicologia sperimentale alla valutazione dell'esposizione all'epidemiologia. L'obiettivo è di far sì che gli avanzamenti della ricerca sugli IE si traducano in strumenti per la valutazione del rischio e la prevenzione, secondo una strategia (*from bench to risk assessment*) di "prevenzione traslazionale".

Parole chiave: Interferenti endocrini, Sicurezza alimentare, Sviluppo neurocomportamentale, Valutazione del rischio

Istituto Superiore di Sanità

Endocrine disruptors: evaluation and prevention of possible risks to human health.

Edited by Gemma Calamandrei, Cinzia La Rocca, Aldina Venerosi Pesciolini and Alberto Mantovani
2009, vi, 95 p. Rapporti ISTISAN 09/18 (in Italian)

The Istituto Superiore di Sanità (Italian National Institute of Health), through the Department of Cell Biology and Neuroscience and the Department of Veterinary Public Health and Food Safety, held a national meeting in October 2008 to promote and enhance the multidisciplinary research on possible health risks associated with exposure to endocrine disruptors (ED). The meeting targeted priority issues such as food safety and the effects on neurobehavioral development. This Report collects the contributions presented for the meeting. The possibility and opportunity of building a national network is emphasized: this will give added value to the many activities on ED, from experimental toxicology through to exposure assessment and epidemiology. Research advances on ED have to be translated into tools for risk assessment and prevention, according to a strategy (*from bench to risk assessment*) of "translational prevention".

Key words: Endocrine disruptors, Food safety, Neurobehavioral development, Risk assessment

Si ringrazia Manuela Zazzara per il contributo apportato nella stesura finale del rapporto.

Per informazioni su questo documento scrivere a: alberto.mantovani@iss.it.

Il rapporto è accessibile online dal sito di questo Istituto: www.iss.it.

Citare questo documento come segue:

Calamandrei G, La Rocca C, Venerosi Pesciolini A, Mantovani A (Ed.). *Interferenti endocrini: valutazione e prevenzione dei possibili rischi per la salute umana*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2009. (Rapporti ISTISAN 09/18).

Presidente dell'Istituto Superiore di Sanità e Direttore responsabile: *Enrico Garaci*
Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 131/88 del 1° marzo 1988

Redazione: *Paola De Castro, Sara Modigliani e Sandra Salinetti*
La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori.

© Istituto Superiore di Sanità 2009

ALTERAZIONI COMPORTAMENTALI E NEURALI IN QUAGLIA GIAPPONESE DOPO ESPOSIZIONE A XENOESTROGENI *IN OVO*

Giancarlo Panzica, Elena Mura, Carla Viglietti-Panzica
Dipartimento di Anatomia, Farmacologia e Medicina Legale, Università di Torino e Istituto Nazionale di Neuroscienze, Torino

Molti comportamenti degli alti vertebrati sono sessualmente dimorfici e dipendono dai livelli di ormoni (in particolar modo degli ormoni gonadici) per il loro funzionamento. Questi circuiti dimorfici si differenziano nel corso dello sviluppo durante una finestra temporale ben precisa (periodo critico) che dipende dalla specie e dalla classe. Durante il periodo critico, gli ormoni gonadici giocano un ruolo primario per indirizzare il successivo differenziamento dei circuiti e dei relativi comportamenti in senso maschile o femminile. Per questo motivo, il periodo critico rappresenta un momento particolarmente vulnerabile dello sviluppo dell'animale durante il quale alterazioni anche minime dell'equilibrio ormonale possono determinare effetti irreversibili sul corretto differenziamento dei circuiti e del comportamento. L'esposizione degli organismi durante il periodo critico a interferenti endocrini capaci di legarsi al recettore degli estrogeni (xenoestrogeni, XE) può quindi risultare particolarmente dannosa per il corretto differenziamento dei circuiti e dei comportamenti dell'animale adulto.

Nei mammiferi da laboratorio (roditori) il periodo critico è perinatale (immediatamente prima della nascita e circa una settimana dopo la nascita) e l'esposizione naturale agli XE avviene attraverso la madre, prima con la nutrizione placentare e successivamente con l'allattamento. Negli uccelli da laboratorio (galliformi) il periodo critico è invece embrionale (all'incirca a due terzi dello sviluppo) e l'esposizione avviene in quanto gli XE vengono accumulati nell'uovo da parte della madre. Dal punto di vista sperimentale la manipolazione di uova embrionate di galliformi è molto più semplice della manipolazione di madri gravide che si deve operare nei mammiferi di conseguenza, nel nostro laboratorio, abbiamo intrapreso una serie di studi volti a descrivere gli effetti dell'accumulo di XE sul differenziamento nervoso e comportamentale della quaglia giapponese (1).

In questo animale la somministrazione di estradiolo benzoato prima del 12° giorno di sviluppo (la schiusa avviene a 17 giorni) determina la completa demascolinizzazione del comportamento copulatorio maschile nell'animale adulto. In ricerche precedenti abbiamo dimostrato che questo trattamento altera in maniera irreversibile il circuito sessualmente dimorfico parvocellulare a vasotocina che è presente in questi animali (come nella maggior parte dei vertebrati) (2). Tale circuito, nella quaglia, è uno dei controllori del comportamento copulatorio maschile, in particolare svolge una funzione inibitoria nei riguardi di questo comportamento. Gli animali esposti ad estradiolo benzoato prima del 12° giorno di incubazione presentano, da adulti, un sistema a vasotocina fenotipicamente femminile (ovvero un'estrema riduzione del numero di cellule e dell'innervazione in aree specifiche come il nucleo della stria terminale, BST, il nucleo preottico mediale, POM, e il setto laterale, SL) (3).

Il modello sperimentale che abbiamo adottato è stato quindi l'iniezione di XE nell'uovo all'inizio dello sviluppo (al 3° giorno di incubazione) senza altri interventi. Gli animali sono stati mantenuti in condizioni controllate fino alla maturazione sessuale (circa 2 mesi) quando sono stati testati per il comportamento copulatorio maschile e per alcuni parametri morfologici androgeno-dipendenti come la dimensione della ghiandola cloacale. Gli encefali, prelevati dopo il sacrificio, sono stati congelati, sezionati e trattati per l'evidenziazione immunoistochimica della vasotocina.

L'estensione dell'immunoreattività è stata misurata nel BST, POM e SL con metodi quantitativi computerizzati. I dati morfometrici sono stati successivamente comparati con i dati comportamentali e analizzati con analisi della varianza. Gli XE che sono stati testati sono il dietilstilbestrolo (DES), un estrogeno sintetico molto potente, la genisteina, un fitoestrogeno abbondante in vegetali largamente usati nell'alimentazione animale e umana, come la soia, e il DDE un metabolita stabile e permanente del DDT con azione antiandrogenica e antiestrogenica. Le dosi che sono state iniettate nelle uova embrionate sono simili alle dosi di possibile esposizione ambientale. L'ipotesi sperimentale era che se questi composti hanno azione estrogenica la loro somministrazione deve distruggere in tutto o parzialmente il comportamento copulatorio maschile e, nello stesso tempo, indurre un fenotipo di tipo femminile a livello del sistema a vasotocina. In ogni esperimento si è anche allestito un gruppo di controllo positivo iniettato con estradiolo benzoato. I risultati sono riassunti nelle Figure 1 e 2.

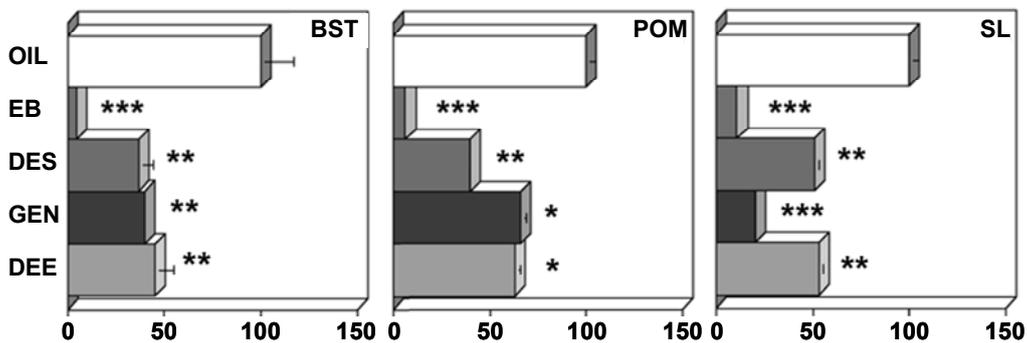


Figura 1. Effetti dei trattamenti in ovo con diversi XE sull'innervazione a vasotocina del SL e del BST. Dati espressi in percentuale rispetto ai controlli. Tutti i trattamenti inducono una significativa riduzione dell'innervazione (modificata da Panzica *et al.*, 2007)

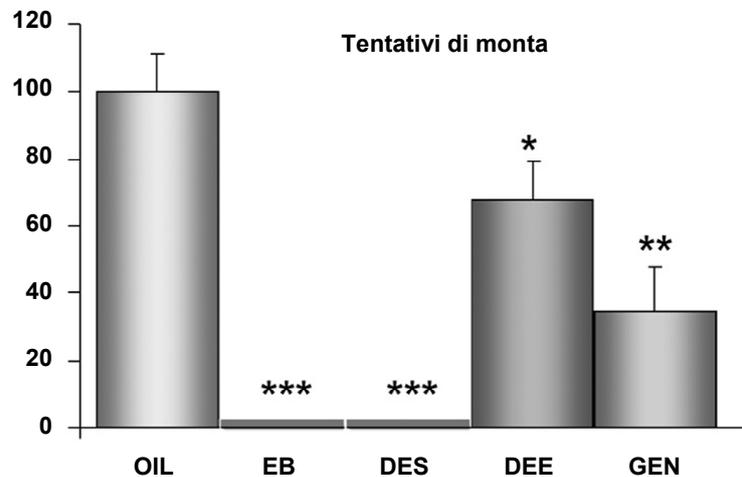


Figura 2. Comportamento copulatorio maschile (tentativi di monta espressi come percentuale di quelli espressi dai controlli). Tutti i trattamenti con XE hanno indotto un decremento del comportamento copulatorio, massimo nel caso del DES e dell'estradiolo benzoato, minimo nel caso del DDE

I risultati ottenuti mostrano un effetto significativo dei trattamenti *in ovo* sui due parametri presi in considerazione: area frazionaria coperta da immunoreattività per la vasotocina nel BST, POM e SL, e comportamento copulatorio maschile. In generale l'effetto dell'estradiolo benzoato (EB) è molto forte su entrambi i parametri, mentre gli altri XE possono avere un diverso effetto sul comportamento e sull'innervazione a vasotocina (DES), oppure un effetto intermedio su entrambi i parametri (DDE, genisteina). Queste variazioni degli effetti degli XE possono essere dovute alla differente affinità che questi composti hanno per i due tipi di recettori estrogenici e al diverso ruolo che questi recettori possono avere nel differenziamento del comportamento riproduttivo e del sistema a vasotocina.

In accordo con l'ipotesi di partenza, questi risultati dimostrano che l'esposizione a XE durante il periodo critico embrionale della quaglia giapponese può determinare effetti irreversibili sul comportamento copulatorio e su uno dei circuiti di controllo di tale comportamento (5-7). Negli stessi animali sono stati valutati altri parametri come le dimensioni della ghiandola cloacale e la morfologia dei tubuli seminiferi. In entrambi i casi non si sono osservate alterazioni significative, suggerendo quindi che questi animali abbiano livelli normali di androgeni circolanti e non presentino evidenti alterazioni nella produzione di cellule germinali maschili.

In conclusione, il comportamento e i circuiti a esso correlati possono rappresentare un bersaglio privilegiato per gli XE e alterazioni del loro differenziamento possono avere effetti molto importanti nell'animale adulto anche in assenza di danni periferici evidenti, rappresentando un *end-point* di particolare interesse che deve essere valutato negli studi sugli effetti degli interferenti endocrini.

Ringraziamenti

Questi studi sono stati condotti con finanziamenti della Regione Piemonte, Fondazione CRT e Università di Torino.

Bibliografia

1. Ottinger MA, Lavoie E, Thompson N, Barton A, Whitehouse K, Abdelnabi M, Quinn MJ Jr, Panzica GC, Viglietti-Panzica C. Neuroendocrine and Behavioral Effects of Embryonic Exposure to Endocrine Disrupting Chemicals in Birds. *Brain Res Rev* 2008;57:376-85.
2. De Vries GJ, Panzica GC. Sexual differentiation of central vasopressin and vasotocin systems in vertebrates: different mechanisms, similar endpoints. *Neuroscience* 2006;138:947-55.
3. Panzica GC, Castagna C, Viglietti-Panzica C, Russo C, Tlemçani O, Balthazart J. Organizational effects of estrogens on brain vasotocin and sexual behavior in quail. *J Neurobiol* 1998;37:684-99.
4. Panzica GC, Viglietti-Panzica C, Mura E, Quinn Jr MJ, Palanza P, Ottinger MA. Effects of xenoestrogens on the differentiation of behaviorally relevant neural circuits. *Front Neuroendocrinol* 2007;28:179-200.
5. Mura E, Barale C, Quinn MJ, Panzica GC, Ottinger MA, Viglietti-Panzica C. Organizational effects of DDE on brain vasotocin system in male Japanese quail. *Neurotoxicology* 2009;30:479-84.
6. Viglietti-Panzica C, Montoncello B, Mura E, Pessatti M, Panzica GC Organizational effects of diethylstilbestrol on brain vasotocin and sexual behavior in male quail. *Brain Res Bull* 2005;65:225-33.
7. Viglietti-Panzica C, Mura E, Panzica GC Effects of early embryonic exposure to genistein on male copulatory behavior and vasotocin system of Japanese quail. *Horm Behav* 2007;51:355-63.

*La riproduzione parziale o totale dei Rapporti e Congressi ISTISAN
deve essere preventivamente autorizzata.
Le richieste possono essere inviate a: pubblicazioni@iss.it.*

*Stampato da Tipografia Facciotti srl
Vicolo Pian Due Torri 74, 00146 Roma*

Roma, luglio-settembre 2009 (n. 3) 2° Suppl.