

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 disrupters: 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 disrupters (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 disrupters, 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

INDICE

Introduzione	1
<i>Gemma Calamandrei, Alberto Mantovani</i>	
PARTE I	
Contributi presentati al Convegno nazionale: “Interferenti endocrini: valutazione e prevenzione dei possibili rischi per la salute umana” Istituto Superiore di Sanità, 15 ottobre 2008	3
Pesticidi organofosforici ed effetti neuroendocrini e comportamentali in modelli animali: rischi per la salute neuropsicologica in età evolutiva	5
<i>Gemma Calamandrei, Aldina Venerosi, Antonella Olivieri, Laura Ricceri</i>	
Contaminazione dei prodotti ittici da interferenti endocrini: il progetto pesci	8
<i>Francesco Maria Cancellotti</i>	
Caratterizzazione tossicologica delle miscele complesse di contaminanti ambientali. Indirizzi della ricerca sugli interferenti endocrini	10
<i>Teresa Coccini, Elisa Roda, Luigi Manzo</i>	
Effetti endocrini delle micotossine	12
<i>Annamaria Colacci, Monica Vaccari, Maria Grazia Mascolo, Stefania Perdicizzi, Elena Morandi, Francesca Rotondo, Paola Silingardi</i>	
Esposizione a livelli ambientali di xenoestrogeni: modelli di studio nel ratto <i>in vivo</i> e rilevanza degli effetti	13
<i>Francesca Farabollini, Leonida Fusani, Daniele Della Seta, Francesco Dessì-Fulgheri</i>	
Modelli sperimentali per valutare il rischio di esposizione neonatale a interferenti endocrini in matrici alimentari	16
<i>Cinzia La Rocca, Sabrina Tait, Alberto Mantovani</i>	
Esposizione <i>in utero</i> a di(2-etilesil)ftalato e marcatori di effetti epatici nel topo	19
<i>Stefano Lorenzetti, Roberta Tassinari, Gabriele Moracci, Vincenzo Lagatta, Antonietta D’Ambrosio, Daniele Marcoccia, Marco Salvatore, Domenica Taruscio, Francesca Maranghi</i>	
Meccanismi d’azione dei fitoestrogeni	22
<i>Maria Marino</i>	
Bisfenolo A e differenziazione sessuale di circuiti neurali e comportamento nel topo	24
<i>Paola Palanza, Stefano Parmigiani</i>	
Alterazioni comportamentali e neurali in quaglia giapponese dopo esposizione a xenoestrogeni <i>in ovo</i>	28
<i>Giancarlo Panzica, Elena Mura, Carla Viglietti-Panzica</i>	
Effetti neurocomportamentali dell’esposizione a interferenti endocrini in roditori di laboratorio	31
<i>Daniela Santucci, Igor Branchi, Virginia Belloni, Enrico Alleva</i>	

PARTE II

Contributi della rete di collaborazione italiana sugli interferenti endocrini	35
La comunicazione del rischio: l'area tematica "interferenti endocrini"	37
<i>Francesca Baldi, Alberto Mantovani</i>	
Effetto di sostanze ambientali ad azione estrogenica sulla secrezione di citochine da parte della placenta umana	38
<i>Nicoletta Bechi, Roberta Romagnoli, Giuseppina Sorda, Ilaria Corsi, Tommaso Serchi, Marco Cencini, Gianmichele Galassi, Luana Paulesu, Francesca Ietta</i>	
Effetti cerebrali degli obesogeni	39
<i>Elisabetta Bo, Daniela Sterchele, Carla Viglietti-Panzica, Giancarlo Panzica</i>	
Residui di fitosanitari in fluidi biologici umani e valutazione dell'esposizione in popolazione generale di un comune siciliano: progettazione di uno studio	40
<i>Giuseppe Calamusa, Nino Romano, Alberto Firenze, Maria Di Pasquale, Emanuele Amodio, Anna Maria Di Noto, Cinzia Cardamone, Teresa D'Oca, Francesco Vitale</i>	
Valutazione della contaminazione da diossine in campioni di latte e alimenti zootecnici in Regione Campania	41
<i>Stefania Cavallo, Mauro Esposito, Germana Colarusso, Rosa D'Ambrosio, Pasquale Gallo, Loredana Baldi, Luigi Serpe</i>	
Esposizione a PCB durante lo sviluppo e modificazioni delle funzioni neuroendocrine, metaboliche e del comportamento: uno studio integrato	42
<i>Fabio Celotti, Daniela Cocchi, Angela Santagostino, Maria Valeria Vergoni</i>	
Sviluppo di biosensori cellulari ricombinanti bioluminescenti per analisi multiplexed di interferenti endocrini in campioni ambientali, alimentari e clinici	44
<i>Luca Cevenini, Elisa Michelini, Laura Mezzanotte, Aldo Roda</i>	
L'arsenico inorganico nella dieta: un interferente endocrino emergente	45
<i>Silvia Ciardullo, Federica Aureli, Andrea Raggi, Alberto Mantovani, Francesco Cubadda</i>	
Sostanze ad azione farmacologica e indesiderabili in zootecnia: effetti tossici e strategie di controllo	47
<i>Cinzia Civitareale, Paolo Stacchini, Maurizio Fiori</i>	
Effetti interattivi dell'esposizione perinatale a metilmercurio e PCB153 sulla densità dei recettori colinergici muscarinici e sull'espressione genica nel tessuto nervoso	48
<i>Teresa Coccini, Elisa Roda, Erminio Marafante, Graziella Cimino-Reale, Luigi Manzo</i>	
Studio interdisciplinare per la valutazione di alterazioni biochimiche in <i>mytilus galloprovincialis</i> esposti a TBT	49
<i>Maria Elisabetta Cosulich, Camilla Liscio, Erika Pistarino, Marina Di Carro, Barbara Santamaria, Micaela Tiso, Emanuele Magi</i>	
Ciclodestrine specializzate come chemosensori per la determinazione di xenoestrogeni e micotossine	51
<i>Pietro Cozzini, Gianluigi Ingletto, Francesca Spyrakis, Chiara Dall'Asta</i>	

Additivi alimentari come xenoestrogeni: un approccio investigativo integrato <i>in silico</i> e <i>in vitro</i>	52
<i>Pietro Cozzini, Alessio Amadasi, Francesca Spyraakis, Andrea Mozzarelli, Clara Meda, Adriana Maggi</i>	
Esposizione a interferenti endocrini con effetto tireostatico: l'azione protettiva della iodoprofilassi	54
<i>Simona De Angelis, Emanuela Medda, Carla Fiumalbi, Angela Citrini, Alessandro Perico, Daniele Leandri, Fabrizio Franzellin, Cristina Fazzini, Enzo Gilardi, Maria Teresa Mechi, Ferruccio Santini, Teresa Rago, Rocco Valeriano, Paolo Vitti, Alberto Mantovani, Aldo Pinchera, Antonella Olivieri</i>	
Effetti del piombo sulla tiroide	56
<i>Gianfranco Desogus</i>	
Valutazione del rischio ecotossicologico attraverso il biomonitoraggio di popolazioni sentinella di vertebrati (uccelli e piccoli mammiferi)	57
<i>Nadia Francia, Simona Miletta, Irene Pistella, Massimo Pandolfi, Daniela Santucci, Enrico Alleva</i>	
Sistema per il controllo della salubrità in filiera alimentare e nell'ambiente mediante indici di tossicità e relativo metodo per la rilevazione e analisi dei dati (BEST)	58
<i>Chiara Frazzoli, Alberto Mantovani, Luigi Campanella, Roberto Dragone</i>	
Effetti dell'esposizione prenatale a basse dosi di bisfenolo A e alfa-etinil- estradiolo sul comportamento riproduttivo e parentale di maschi e femmine di topo	60
<i>Laura Gioiosa, Valentina Sanghez1, Stefano Parmigiani, Paola Palanza</i>	
Analisi di campioni vegetali nell'area di Mantova: il rosmarino come bio-indicatore dei livelli ambientali di PCB?	61
<i>Paola Grassi, Caterina Generoso, Elena Fattore, Ettore Zuccato, Marinella Palmiotto, Roberto Fanelli</i>	
Monitoraggio dell'<i>imposex</i> da tributilstagno (TBT) in molluschi acquatici bio-indicatori in laguna Sud di Venezia e fascia costiera	62
<i>Lucio Grassia, Marco Massironi, Valerio Rizzo, Giuseppina Fantauzzo, Maurizio Vidali</i>	
Interferenti endocrini nel latte materno: livelli, andamento temporale e stima dell'assunzione da parte dei lattanti	64
<i>Cristiana Guerranti Perra, Silvano E. Focardi</i>	
Livelli di interferenti endocrini in alimenti biologici e convenzionali	65
<i>Cristiana Guerranti Perra, Silvano E. Focardi</i>	
Lindano causa apoptosi nelle cellule germinali primordiali di topo	67
<i>Gina La Sala, Donatella Farini, Massimo De Felici</i>	
Studio dell'effetto di interferenti endocrini sull'attività catalitica di anidrasi carbonica II	68
<i>Lionetto Maria Giulia, Erroi Elisa, Schettino Trifone</i>	

La tossicogenomica come strategia <i>in vitro</i> per la caratterizzazione di sostanze che interferiscono con il recettore androgeno: il progetto ReProTect	69
<i>Stefano Lorenzetti, Vincenzo Lagatta, Ilaria Altieri, Federica Aureli, Francesco Cubadda, Daniele Marcoccia, Francesca Maranghi, Eleonora Arico', Irene Canini, Luciano Castello, Stefania Parlato, Lucia Gabriele, Alberto Mantovani</i>	
Effetto degli ftalati sulla fisiologia riproduttiva del teleosteo <i>Danio rerio</i>	71
<i>Francesca Maradonna, Matteo Evangelisti, Damiano Gustavo Mita, Oliana Carnevali</i>	
Effetti istopatologici preliminari di 2,3,7,8-TCDD, PCB-153, PBDE-47 e HBCD somministrati per 28 giorni in una dieta a parziale contenuto proteico ittico a femmine di topo BALB/c in fase pre-puberale	72
<i>Francesca Maranghi, Gabriele Moracci, Roberta Tassinari, Josef D. Rasinger, Thomas S. Carroll, Christer Hogstrand, Marte Haave, Anne Katherine Lundebye, Alberto Mantovani, Agostino Macrì</i>	
Esposizione a pesticidi e aumentato rischio di patologie tiroidee: studio epidemiologico su una coorte di lavoratori agricoli	74
<i>Emanuela Medda, Michele Roberti, Silvio Pascarella, Ciro Pascarella, Antonio Natale, Filippo D'Addio, Alessandro Correrà, Silvio Canzano, Antonio Anastasio, Simona De Angelis, Daniela Rotondi, Alberto Mantovani Antonella Olivieri</i>	
Enzimi termostabili per la rilevazione e decontaminazione di organofosfati	75
<i>Luigia Merone, Luigi Mandrich, Mosè Rossi, Giuseppe Manco</i>	
Effetti organizzazionali del bisfenolo-A sull'espressione della kisspeptina e della NOS nell'ipotalamo di topi CD-1	76
<i>Dèsirée Miceli, Mariangela Martini, Isabelle Franceschini, Paola Palanza, Carla Viglietti-Panzica, Giancarlo Panzica</i>	
Determinazione mediante HPLC-MS di acido perfluoro-ottan-sulfonico (PFOS) e acido perfluoro-ottanoico (PFOA) in tessuti biologici prelevati post mortem in un gruppo di soggetti della popolazione generale	78
<i>Sara Negri, Luciano Maestri †, Giulia Esabon, Massimo Ferrari, Ornella Pastoris, Danilo Cottica</i>	
Interferenti endocrini nelle acque per consumo umano	79
<i>Massimo Ottaviani</i>	
Ambienti di lavoro e interferenti endocrini: caratterizzazione dei rischi potenziali	81
<i>Bruno Papaleo, Lidia Caporossi</i>	
Esposizione di pre-adipociti umani a PCB: risultati preliminari	82
<i>Elisabetta Pazzano, Maria Grazia Aluigi, Sergio Bottero, Alessandra Cevasco, Rossella Coradeghini, Paolo Fardin, Chiara Generoso, C. Guida, Caterina Scanarotti, Barbara Vivaldi, Alberta Mandich</i>	
Livelli di composti perfluorurati in campioni di latte umano e di prodotti alimentari	84
<i>Guido Perra, Cristiana Guerranti Perra, Ilaria Bisogno, Simonetta Corsolini, Silvano E. Focardi</i>	

Interferenti endocrini: un modello di test a breve termine <i>in vitro</i> per identificare i possibili rischi per la salute della popolazione connessi ad esposizione a composti estrogenomimetici	85
<i>Barbara Pinto, Paolo Bizzozero, Katy Sanfilippo, Daniela Reali</i>	
Il topo ERE-luc: un modello per identificare e studiare gli interferenti endocrini presenti nel cibo	86
<i>Balaji Ramachandran, Paolo Ciana, Adriana Maggi</i>	
Differente effetto di isoflavoni e latte di soia sull'attività del recettore degli estrogeni nel topo	87
<i>Gianpaolo Rando, Balaji Ramachandran, Monica Rebecchi, Paolo Ciana, Adriana Maggi</i>	
Effetti <i>in vitro</i> della genisteina sulla contrattilità ovarica nella specie bovina	88
<i>Annalisa Rizzo, Claudia Cosola, Massimo Spedicato, Giuseppe Minoia, Maddalena Mutinati, Carmelinda Trisolini, Stefano Punzi, Maria Teresa Roscino, Marianna Pantaleo, Raffaele Luigi Sciorsci</i>	
Variazione del pattern di espressione genica in maschi di zebrafish (<i>Danio rerio</i>) esposti ad estradiolo-17beta e 4-nonilfenolo	90
<i>Barbara Ruggeri, Massimo Ubaldi, Ambarasu Lourdasamy, Laura Soverchia, Roberto Ciccocioppo, Gary Hardiman, Michael E Baker, Francesco Alessandro Palermo, Alberta Maria Polzonetti-Magni</i>	
Esposizione prenatale al clorpirifos: effetti comportamentali della fluvoxamina sul topo adulto	91
<i>Valentina Sanghez, Aldina Venerosi, Angela Rungi, Laura Ricceri, Gemma Calamandrei</i>	
Effetti del mancozeb sulle cellule della granulosa di topo	92
<i>Adriana Santilli, Gianna Rossi, Rita Paro, Hamid Deldar, Guido Macchiarelli, Sandra Ceccon</i>	
Resveratrolo: un possibile modulatore dell'attività citotossica del condensato di sigaretta su diverse linee cellulari	93
<i>Sabrina Tait, Cristina Andreoli</i>	
Utilizzo di biomarcatori di effetto nel ratto in seguito ad esposizione pre- e/o post-natale ad interferenti endocrini degli alimenti: gli effetti che non ti aspetti	94
<i>Roberta Tassinari, Francesca Maranghi, Daniele Marcoccia, Antonietta D'Ambrosio, Gabriele Moracci, Agostino Eusepi, Antonio Di Virgilio, Antonella Olivieri, Simona De Angelis, Stefano Lorenzetti</i>	
Valutazione dell'esposizione a metalli pesanti tramite l'assunzione di pesce nell'area dell'Alto Adriatico	95
<i>Annalisa Zaccaroni, Dino Scaravelli</i>	

INTRODUZIONE

Gemma Calamandrei (a), Alberto Mantovani (b)

(a) Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze, Istituto Superiore di Sanità, Roma

(b) Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Perché dedicare specificamente un Rapporto ISTISAN alla ricerca sugli interferenti endocrini (IE)? In realtà la tematica IE è considerata da tempo – in Europa e nelle altre aree industrializzate – argomento prioritario in diversi ambiti, tutti attinenti al grande campo della prevenzione: la regolamentazione delle sostanze chimiche, la sicurezza alimentare, la strategia europea *Environment and Health*, la salute riproduttiva e dell'età evolutiva.

Il rilievo degli IE nella loro complessità (contaminanti persistenti, pesticidi, sostanze industriali, fitoestrogeni, ecc.) trova solide basi scientifiche:

- la molteplicità delle strutture chimiche e dei meccanismi, da cui consegue la capacità di interagire con svariati bersagli del sistema endocrino inducendo uno spettro di effetti la cui comprensione è tuttora incompleta;
- la difficile valutazione del rischio, in particolare per gli effetti a lungo termine di esposizioni precoci sui sistemi, riproduttivo, nervoso, immunitario e sulla suscettibilità ad alcuni di tipi di tumore;
- la diffusa esposizione, la cui sorveglianza è resa maggiormente complessa dalla capacità di persistenza e bioaccumulo di diversi gruppi di composti, e soprattutto, la possibilità di un'esposizione combinata attraverso la dieta e l'ambiente di vita a diversi IE con effetti additivi;
- la correlazione fra la vulnerabilità a specifici IE e fattori quali, in primo luogo, il genere e la fase del ciclo vitale, ma anche la dieta e gli stili di vita;
- infine, la crescente evidenza di un'associazione fra esposizione a IE e patologie umane (infertilità, poliabortività, disturbi neurocomportamentali, pubertà precoce, ecc.), che merita considerazione anche alla luce dei mutamenti in atto nei paesi sviluppati ed emergenti riguardo alla struttura demografica, i consumi alimentari e gli stili di vita, e della conseguente importanza della prevenzione delle patologie cronico-degenerative su base endocrina.

L'Istituto Superiore di Sanità ha da tempo avviato attività scientifico-istituzionali sugli IE; oltre alla partecipazione a progetti europei e alla formulazione della strategia europea *Environment and Health*, ne sono testimonianza l'area tematica all'interno del sito dell'ISS (<http://www.iss.it/inte/>).

La complessità e il rilievo dei problemi legati all'analisi del rischio degli IE offrono importanti indicazioni allo sviluppo di programmi di ricerca per la prevenzione, quali:

- lo sviluppo di strategie integrate di saggi tossicologici per l'identificazione e regolamentazione di IE;
- la caratterizzazione dei meccanismi di azione e dei potenziali effetti di IE sui diversi sistemi dell'organismo, compresi gli eventuali meccanismi di interazione fra diversi IE;
- strategie per la valutazione integrata dell'esposizione a IE attraverso l'alimentazione e l'ambiente di vita, compreso il trasferimento di strategie innovative (es. biomarker, biosensoristica) alle strutture che operano sul territorio;
- studi di popolazione che utilizzino adeguati biomarcatori di esposizione, effetto e suscettibilità;

- non ultimo, la valutazione di possibili strategie per la riduzione del rischio, che possono e debbono comprendere anche l'innovazione tecnologica e una comunicazione del rischio medesimo che metta i cittadini in grado di attuare scelte consapevoli.

Appare evidente che per affrontare la tematica IE è indispensabile un approccio multidisciplinare che valorizzi il contributo delle tante competenze presenti in Italia, come richiesto dal documento “Sorveglianza dell'Esposizione a interferenti endocrini” del Comitato Nazionale Biosicurezza, BioSicurezza e Scienze della Vita della Presidenza del Consiglio (http://www.governo.it/biotecnologie/documenti/interferenti_endocrini.pdf). Il nostro Istituto si sta muovendo in questo senso con diverse iniziative: l'avvio di un database nazionale con censimento delle attività di ricerca sugli IE, in collaborazione con il consorzio interuniversitario INBB (Istituto Nazionale di Biostrutture e Biosistemi, <http://www.inbb.it>), il progetto PREVIENI (<http://www.iss.it/prvn>), finanziato dal Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare, che integra competenze cliniche, e chimico-analitiche, tossicologiche nello studio, mediante biomarker, dell'impatto di IE sulla salute riproduttiva, e infine le attività di ricerca di base sui temi della vulnerabilità agli interferenti endocrini in età evolutiva, con particolare riguardo agli effetti neuroendocrini e neuro comportamentali.

Proprio per favorire e valorizzare l'interazione multidisciplinare, l'Istituto Superiore di Sanità, attraverso i Dipartimenti di Biologia Cellulare e Neuroscienze e di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, ha organizzato il 15 ottobre 2008 il Convegno nazionale: “Interferenti endocrini: valutazione e prevenzione dei possibili rischi per la salute umana” centrato su due temi di massima attualità: la sicurezza alimentare e gli effetti sullo sviluppo neurocomportamentale.

Questo Rapporto raccoglie sia alcuni contributi presentati al convegno come comunicazioni orali, sia altri brevi contributi relativi ad attività innovative, che fanno parte della rete di collaborazione italiana nel campo della ricerca sugli interferenti endocrini. Tale rete ne emerge rafforzata e contribuisce pertanto a dare un valore aggiunto alle molteplici attività sugli IE, dalla ricerca alla sorveglianza ambientale, alimentare ed epidemiologica, favorendo lo scambio di informazioni e l'integrazione fra strategie di studio complementari. 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”.

PARTE I

**Contributi presentati al Convegno nazionale:
“Interferenti endocrini: valutazione e prevenzione
dei possibili rischi per la salute umana”
Istituto Superiore di Sanità, 15 ottobre 2008**

PESTICIDI ORGANOFOSFORICI ED EFFETTI NEUROENDOCRINI E COMPORTAMENTALI IN MODELLI ANIMALI: RISCHI PER LA SALUTE NEUROPSICOLOGICA IN ETÀ EVOLUTIVA

Gemma Calamandrei, Aldina Venerosi, Antonella Olivieri, Laura Ricceri
Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Studi sperimentali e clinici hanno identificato un elevato numero di xenobiotici con potenziali effetti teratogeni sulla progenie. Molti inquinanti ambientali, quali gli organoclorurati, gli organofosfati, gli erbicidi, e i metalli pesanti provocano alterazioni cliniche o subcliniche dello sviluppo neurocomportamentale in assenza di tossicità materna e di embriotossicità, attraverso effetti “sottili” sul cervello in sviluppo. Questi effetti sono spesso difficili da diagnosticare, e si manifestano solo più tardivamente, per esempio in età scolare, esitando in disturbi dell'apprendimento, dell'attenzione e dell'emozionalità che influenzano le prospettive individuali di un'intera esistenza con particolare riferimento alla qualità della vita e alle relazioni sociali. Gli studi di tossicologia comportamentale condotti in modelli animali hanno significativamente aumentato la conoscenza dei meccanismi attraverso i quali molti xenobiotici influenzano lo sviluppo del sistema nervoso e del comportamento. Un agente tossico può influenzare lo sviluppo cerebrale alterando direttamente i processi di proliferazione, sinaptogenesi o mielinizzazione, ma anche interferendo con l'azione di molecole modulatrici della plasticità cerebrale, quali gli ormoni steroidi e tiroidei, che hanno un ruolo fisiologico determinante nella maturazione di specifiche aree cerebrali, coinvolte nella regolazione dei comportamenti complessi e delle funzioni riproduttive.

Effetti neurocomportamentali e neuroendocrini dei pesticidi: il caso del clorpirifos

Il clorpirifos (CPF) è un insetticida organofosforico di largo impiego in agricoltura e per uso domestico. La neurotossicità di questo agente è tradizionalmente associata all'inibizione dell'attività dell'enzima acetilcolinesterasi (AChE), responsabile dell'inattivazione del neurotrasmettitore acetilcolina, sia nel sistema nervoso centrale che periferico. Nel 2001, l'*Environmental Protection Agency* statunitense ha introdotto forti restrizioni nell'uso del CPF per la potenziale elevata attività neurotossica sull'organismo in via di sviluppo. Uno studio condotto nel 1998 e mirato a determinare le fonti di esposizione ai pesticidi per i soggetti in età evolutiva, ha infatti evidenziato che il CPF si accumula in concentrazioni significative sui giocattoli, pavimenti e su altre superfici assorbenti. Questi dati conducono a una stima di esposizione acuta di 365 microg/kg/day per un bambino di età compresa tra i 3 e i 6 anni, ben al di sopra del livello di esposizione accettabile stabilito per l'adulto (1).

Nell'ultimo decennio sono stati condotti numerosi studi sperimentali sulla neurotossicità del CPF in roditori di laboratorio. Differentemente da quanto accade nell'adulto, la neurotossicità neonatale del CPF si verifica per esposizioni a dosi che non producono intossicazione sistemica, e in assenza di inibizione significativa della AChE cerebrale. In particolare, a dosi di poco inferiori a quelle che provocano tossicità sistemica, il CPF inibisce la replicazione cellulare, anche e in misura maggiore attraverso meccanismi non mediati dall'effetto sulla AChE. Inoltre, a dosi ancora più basse, il CPF

altera numerosi processi cellulari alla base dello sviluppo cerebrale inclusi la sintesi di DNA, la crescita assonale e il sistema dei secondi messaggeri (2). Questi effetti “sottili”, che avvengono in assenza di chiare alterazioni morfologiche, hanno tuttavia ripercussioni a lungo termine sul comportamento: studi sperimentali, condotti esponendo roditori neonati a dosi sub-tossiche di CPF (da 1 a 6 mg/kg) riportabili alla presunta esposizione nella specie umana, hanno evidenziato alterazioni comportamentali che compaiono in età giovanile e si estendono nell'età adulta. Le alterazioni più consistenti riguardano l'attività esplorativa, alcune funzioni cognitive, e la risposta a stimoli ambientali significativi (3). Gli effetti comportamentali si verificano in assenza di alterazioni significative del tradizionale marcatore di effetto del CPF, ossia l'attività dell'enzima AChE, e potrebbero quindi essere associati all'interferenza di questo pesticida in fasi critiche dello sviluppo dell'SNC con la maturazione di sistemi neurotrasmettitoriali diversi dal sistema colinergico, quali quelli mediati dalla serotonina, un neurotrasmettitore implicato nella regolazione dei comportamenti sociali. Dati recenti raccolti nel nostro laboratorio hanno indicato che la somministrazione di CPF, in fase prenatale o neonatale, aumenta i livelli di aggressività intraspecifica tra maschi in topi CD1, mentre modifica le risposte sociali e materne nelle femmine dello stesso ceppo (4, 5).

Sulla base degli effetti comportamentali riscontrati nel modello animale, ovvero effetti sessualmente dimorfici e relativi all'ambito delle competenze sociali e riproduttive, abbiamo ipotizzato che il CPF potesse interferire con alcuni meccanismi neuroendocrini di regolazione del comportamento. In particolare abbiamo evidenziato come l'esposizione perinatale al CPF abbia, nella prole esposta, effetti a lungo termine sia sui livelli di ormoni tiroidei (T3 e T4) che sulla morfologia della tiroide (verificata attraverso parametri istomorfometrici), effetti più marcati nel sesso maschile. È possibile che tali effetti siano conseguenti alla condizione di lieve ipotiroidismo riscontrato nelle femmine gravide esposte al CPF nella fase finale della gravidanza. Nello stesso gruppo di animali esposti al CPF nella fase prenatale e/o neonatale sono stati anche misurati all'età adulta i livelli ipotalamici dei neuropeptidi ossitocina, vasopressina e prolattina. L'ossitocina e la vasopressina agiscono da neurotrasmettitori tra diverse aree del cervello coinvolte nella regolazione dei comportamenti sociali, agonistici e parentali mentre quando vengono rilasciate nella circolazione sanguigna fungono da ormoni regolando diversi processi fisiologici, dalla secrezione di latte nella ghiandola mammaria (ossitocina) alla regolazione dei fluidi corporei (vasopressina). Nei topi esposti in fase perinatale al CPF abbiamo osservato che i livelli ipotalamici di ossitocina erano significativamente aumentati mentre al contrario i livelli di vasopressina diminuivano, in assenza di effetti sui livelli di prolattina (6). Questi risultati, quindi, dimostrano per la prima volta che il clorpirifos agisce come un interferente endocrino, alterando sia i livelli costitutivi di due neuropeptidi ipotalamici con importanti funzioni ormonali che la funzionalità tiroidea, con potenziali effetti a lungo termine sulla regolazione neuro-endocrina e sullo sviluppo psico-sociale dell'individuo.

Rilevanza dei dati sperimentali per la valutazione del rischio per la salute umana

Nel processo di valutazione del rischio, i modelli animali sono uno strumento importante di indagine sia per confermare dati clinici di tossicità funzionale di uno xenobiotico, sia per ottenere indicazioni sui potenziali meccanismi di neurotossicità. Alterazioni anche sottili dell'omeostasi neuroendocrina in fasi sensibili dello sviluppo potrebbero sommarsi agli effetti diretti “tradizionali” di agenti neurotossici come il clorpirifos e altri pesticidi organofosforici. I nostri risultati confermano effetti neurocomportamentali di tipo non colinergico, e suggeriscono che esposizioni prolungate e a basse dosi a questo pesticida potrebbero rappresentare un fattore

di rischio per lo sviluppo di disturbi affettivi e di relazione nei bambini/adolescenti esposti, anche in accordo con un recente studio clinico/epidemiologico (7). I dati sperimentali indicano la necessità di incrementare il monitoraggio delle popolazioni (soprattutto delle fasce più vulnerabili) per ottenere stime affidabili di esposizione a differenti classi di pesticidi e di identificare nuovi biomarcatori di effetto, inclusi i parametri di funzionalità neuroendocrina, come suggerito dagli studi *in vivo*. Il Piano Europeo Salute e Ambiente (EHAP) 2004-2010 ha identificato tra le quattro aree prioritarie delle patologie infantili i disordini del neurosviluppo e gli effetti endocrini, sottolineando l'urgenza di identificare i fattori ambientali di rischio per queste patologie e di attuare conseguentemente politiche europee di prevenzione. In questo contesto l'azione concertata HENVINET (*Health and ENVironment NETwork*), finanziata nell'ambito del 6° programma quadro (www.henvinet.eu/) e che raccoglie esperti di tutti i Paesi Membri nei settori della clinica, della ricerca di base, sta integrando i dati epidemiologici e sperimentali relativi ai rischi ambientali per la salute infantile, con l'obiettivo di fornire ai decisori politici strumenti aggiornati per la valutazione del rischio.

Bibliografia

1. Gurunathan S, Robson M, Freeman N, Buckley B, Roy A, Meyer R, Bukowski J, Liroy PJ. Accumulation of chlorpyrifos on residential surfaces and toys accessible to children. *Environ Health Perspect.* 1998;106(1):9-16.
2. Dam K, Seidler FJ, Slotkin TA. Developmental neurotoxicity of chlorpyrifos: delayed targeting of DNA synthesis after repeated administration. *Brain Res Dev Brain Res* 1999;116:9-20.
3. Ricceri L, Markina N, Valanzano A, Fortuna S, Cometa MF, Meneguz A, Calamandrei G. Developmental exposure to chlorpyrifos alters reactivity to environmental and social cues in adolescent mice. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2003;191(3):189-201.
4. Ricceri L, Venerosi A, Capone F, Cometa MF, Lorenzini P, Fortuna S, Calamandrei G. Developmental neurotoxicity of organophosphorous pesticides: fetal and neonatal exposure to chlorpyrifos alters sex-specific behaviors at adulthood in mice. *Toxicol Sci.* 2006;93(1):105-13.
5. Venerosi A, Cutuli D, Colonnello V, Cardona D, Ricceri L, Calamandrei G. Neonatal exposure to chlorpyrifos affects maternal responses and maternal aggression of female mice in adulthood. *Neurotoxicol Teratol.* 2008 in stampa
6. Tait S, Ricceri L, Venerosi A, Maranghi F, Mantovani A, Calamandrei G Long-Term Effects on hypothalamic neuropeptides following developmental exposure to chlorpyrifos in mice. *Environ Health Perspect* 2008 in stampa
7. Rauh VA, Garfinkel R, Perera FP, Andrews HF, Hoepner L, Barr DB, Whitehead R, Tang D, Whyatt RW. Impact of prenatal chlorpyrifos exposure on neurodevelopment in the first 3 years of life among inner-city children. *Pediatrics.* 2006;118(6):1845-59.

CONTAMINAZIONE DEI PRODOTTI ITTICI DA INTERFERENTI ENDOCRINI: IL PROGETTO PESCI

Francesco Maria Cancellotti
Istituto Zooprofilattico delle Regioni Lazio e Toscana, Roma

Il complesso delle risorse umane e strumentali di cui dispone il Servizio veterinario pubblico ai livelli centrale, regionale e di territorio, ivi compresi gli Istituti zooprofilattici che ne costituiscono gli strumenti di laboratorio, si raccorda con gli altri servizi della Sanità pubblica al fine di garantire la salute umana.

La Sanità pubblica veterinaria ha, tra i diversi compiti, quello di effettuare i controlli delle diverse filiere produttive degli alimenti di origine animale al fine di accertare la igienicità e la salubrità dei processi e dei prodotti, attraverso la verificata della conformità alle disposizioni emanate dalle normative definite a livello comunitario e recepite dal Paese.

Fin dagli anni sessanta si è evidenziata la necessità di porre sotto controllo gli allevamenti bovini e i prodotti derivati, al fine di limitare l'impiego di sostanze auxiniche, impropriamente utilizzate al fine di rispondere alla crescente domanda di proteine di origine animale di un Paese in rapida crescita economica. Nel corso degli anni sono state emanate svariate normative, anche in recepimento di direttive comunitarie, al fine di far fronte a frodi che hanno sempre un forte impatto sulla pubblica opinione.

Ormoni nei prodotti di origine animale, inclusi quelli destinati alla prima infanzia, ocratossine nelle farine, micotossine nel latte, PCB (policlorobifenili) e diossine nei mangimi e nei prodotti di origine animale, metalli pesanti nei prodotti ittici, OGM (organismi geneticamente modificati) non autorizzati, residui di antibiotici in latte, uova, carni, pesci, sono alcuni esempi di episodi che sono stati oggetto di forte allarme sociale.

Al fine di ottimizzare i controlli sulle filiere produttive, a tutela della salute pubblica e della salubrità degli alimenti viene predisposto annualmente, fin dal 1988, il Piano nazionale per la ricerca dei residui e il Piano nazionale alimentazione animale.

Questi piani si concretizzano con l'analisi di campioni prelevati lungo le fasi dei processi produttivi. Interessate sono diverse matrici di tutti i settori produttivi – bovino, suino, ovicaprino, equino, avicunicolo, dell'acquacoltura, della selvaggina, del latte, delle uova, del miele.

Gli ambienti acquatici rappresentano una componente dell'ecosistema vulnerabile alla contaminazione da agenti chimici, microbici e parassitari. La contaminazione deriva dalla concentrazione negli organismi attraverso la catena trofica, i sedimenti e per l'immissione nei corpi idrici di scarichi urbani, industriali e agrozootecnici.

Inoltre, pratiche di allevamento non corretto portano all'impiego di antimicrobici, auxinici, antifungini e di mangimi che possono portare alla presenza di residui nei prodotti, alcuni dei quali consentiti, altri vietati, altri immessi accidentalmente nell'ambiente.

L'*European Food Safety Authority* ha prodotto documenti sui rischi legati al consumo di pesce allevato e pescato, considerando tanto l'esposizione a contaminanti quanto ai benefici nutrizionali.

Considerata la rilevanza igienica e nutrizionale dei prodotti ittici, si è avviato un confronto tra l'Istituto Superiore di Sanità, l'Istituto Zooprofilattico delle Regioni Lazio e Toscana e l'Università la Sapienza sulla possibilità di costituire un gruppo di lavoro sulla tematica delle contaminazioni di questi prodotti e sulle sue capacità nutriceutiche.

Il progetto è stato recentemente approvato e finanziato dal Ministero della Salute e cofinanziato da altri enti.

Il piano di ricerca si propone di valutare gli aspetti emergenti di natura igienico sanitaria, tossicologica e nutrizionale dei prodotti ittici; assicurare la tracciabilità dei risultati delle ricerche *in vivo* e *in vitro* e dei prodotti, anche attraverso nuovi sistemi (biomarker, biosensori); individuare eventuali molecole non incluse, ma da comprendere nei piani di controllo; creare un sistema corretto di comunicazione dei rischi e dei benefici.

Nel complesso sedici unità operative, facenti capo ad un coordinatore, svolgeranno, ciascuna per la propria competenza le ricerche sui prodotti allevati e pescati in acque dolci e salate e importati sui diversi siti produttivi e commerciali del Paese. Verranno condotte ricerche di tossicità e di tracciabilità ed è stato predisposto un sito web dedicato alla divulgazione dei dati.

Al termine dei 24 mesi della ricerca, di recente avviata, ma che ha già permesso di acquisire alcuni importanti dati preliminari, verranno predisposti eventi di formazione destinati agli operatori del Servizio sanitario pubblico che effettuano attività di controllo.

CARATTERIZZAZIONE TOSSICOLOGICA DELLE MISCELE COMPLESSE DI CONTAMINANTI AMBIENTALI. INDIRIZZI DELLA RICERCA SUGLI INTERFERENTI ENDOCRINI

Teresa Coccini (a), Elisa Roda (b), Luigi Manzo (a, b)

(a) Servizio di Tossicologia, Centro Ricerche di Tossicologi Ambientale e Occupazionale, IRCCS Fondazione Maugeri, Pavia

(b) Dipartimento di Medicina Interna e Terapia Medica, Università degli Studi di Pavia

Nelle matrici ambientali e nei prodotti alimentari contaminati, gli interferenti endocrini (IE) sono contenuti in genere sotto forma di miscele complesse e ciò rende molto difficoltosa la stima dei rischi derivanti dall'esposizione. Da vari anni, la comunità scientifica ha adottato sistemi pratici per determinare la concentrazione totale e la tossicità complessiva delle miscele di IE presenti in campioni biologici (tessuti animali, prodotti alimentari contaminati) o in matrici naturali (acqua, suolo, sedimenti). Il metodo in uso fa riferimento alla scala dei TEF (*Toxicity Equivalent Factor*). A ciascun composto si assegna un valore di TEF determinato in base alla potenza d'azione (quale risulta da dati di tossicità *in vitro* o *in vivo*) in confronto con quella della diossina, posta pari a 1. I valori individuali di TEF, moltiplicati per le concentrazioni dei singoli composti, forniscono il valore totale delle "concentrazioni tossiche equivalenti" (TEQ) relativo ai residui presenti nel campione in esame. Tale parametro è comunemente utilizzato per determinare la dose complessiva negli studi di esposizione e di *risk assessment* e nella valutazione del rapporto dose-risposta per le miscele complesse di IE.

Basandosi su parametri standardizzati, il metodo è molto utile per la dosimetria attuata nell'ambito di programmi di monitoraggio. Il suo impiego presuppone che i composti presenti nella miscela abbiano identico meccanismo d'azione e che gli effetti siano additivi. Per l'applicabilità del TEF ad un determinato composto, occorre inoltre che questo (a) sia resistente alla degradazione, (b) si leghi al recettore Ah e (c) induca risposte biochimiche ed effetti mediati proprio dal suddetto recettore.

È dunque evidente che l'impiego dei TEF comporti un ampio margine di incertezza nella stima dei rischi da esposizione a miscele di composti il cui meccanismo d'azione sia ancora poco conosciuto. È noto oggi che gran parte dei composti classificati come IE agisce su bersagli cellulari anche diversi dal recettore Ah. Anzi, la tossicità principale di queste sostanze si deve a volte meccanismi indipendenti dall'interazione con il recettore Ah. Si conoscono molti tipi di congeneri che, a fronte di una scarsa o nulla azione sul recettore Ah, esercitano marcati effetti su parametri della neurotrasmissione e/o su sistemi di secondi messaggeri da cui dipende in gran parte la neurotossicità esercitata nel soggetto in via di sviluppo. Va anche ricordato che le matrici contaminate con diossine e PCB contengono spesso anche altri tipi di inquinanti non classificabili come IE ma pur sempre capaci di influenzare la tossicità cellulare e molecolare degli IE. Un esempio è quello dei prodotti ittici che contengono metilmercurio (MeHg) e miscele di PCB.

Si vanno perciò affermando nuovi indirizzi negli studi di *risk assessment* delle miscele. In particolare: (a) l'approccio meccanicistico, ovvero lo studio degli effetti esercitati dalla miscela nel suo insieme su target critici a livello fisiologico (es. processo dello sviluppo), strutturale (es. citoarchitettura dell'SNC), biochimico (neurotrasmissione, fattori di crescita, ecc.) e molecolare (es. espressione genica). Lo studio dei rapporti dose-risposta condotto con questi criteri

consente a volte di individuare i parametri fisiologici, cellulari o molecolari più sensibili alla tossicità della miscela e dei suoi componenti. (b) studi tossicologici disegnati caso per caso, in base agli specifici scenari di esposizione e alle caratteristiche della popolazione a rischio (es. popolazione infantile, esposizione professionale, caratteristiche della dieta, ecc.).

Come esempi dell'applicazione di tali indirizzi, si riportano i risultati di alcuni studi multicentrici condotti nel quadro di progetti comunitari, quali Devnertox: Grant della Commissione Europea, FOOD-CT-2003-506143 *Toxic threats to the developing nervous system: in vivo and in vitro studies on the effects of mixture of neurotoxic substances potentially contaminating food*, e Anemone: Grant della Commissione Europea: QLK4-CT-2001-00186; *Assessment of neurobehavioural endpoints and markers of neurotoxicant exposures*.

La Tabella 1 riporta i bersagli principali dell'interazione tra MeHg e di PCB153 co-somministrati quotidianamente a piccole dosi in animali di laboratorio durante la gravidanza e in epoca perinatale.

Tabella 1. Bersagli neurochimici dell'interazione tra MeHg e PCB153 assorbiti durante la gravidanza e l'allattamento

Parametro	Finestra di suscettibilità
<i>Recettori</i>	
Dopaminergici (D1 e D2)	Pubertà
Muscarinici	Pubertà
<i>Secondi Messaggeri</i>	
Via del glutammato-NO-cGMP	Adulto (Età adulta)

Dati ottenuti mediante somministrazione perinatale (dal GD7 a PD21) a MeHg (0,5 mg/kg/die) e PCB153 (5 mg/kg/die) in ratti Sprague Dawley (Anemone, Devnertox).

Nel cervello del soggetto esposto in epoca perinatale gli effetti interattivi di PCB153 e MeHg riguardano principalmente parametri della neurotrasmissione, in particolare alcuni sistemi (colinergico, dopaminergico, glutamatergico) notoriamente implicati nei processi dello sviluppo neuro-comportamentale. Queste interazioni si presentano talvolta in forme inattese o con conseguenze non prevedibili, considerata l'azione che le singole sostanze esercitano negli stessi modelli quando sono somministrate separatamente.

È da notare che gli effetti osservati *in vivo* sono alquanto diversi da quelli rilevabili applicando le stesse combinazioni di sostanze in colture cellulari. Ciò fa ritenere che nel soggetto in via di sviluppo MeHg e PCB153 interferiscono su processi fisiologici di tipo omeostatico e su *cross-talk* neurochimici e neuroendocrini che intervengono nello sviluppo neuro-comportamentale. In molti casi, gli effetti si manifestano con una lunga latenza, ad esempio all'epoca dello svezzamento o della pubertà, anche a distanza di settimane o di mesi dal termine dell'esposizione perinatale alla miscela di contaminanti. Alcune delle alterazioni neurochimiche osservate sono persistenti. Il trattamento perinatale con MeHg e PCB153 produce alterazioni cerebrali del sistema glutammato-ossido nitrico-GMP ciclico osservabili anche nel soggetto giunto in età adulta.

L'approccio meccanicistico al *risk assessment* richiede studi più sofisticati rispetto a quelli tradizionali. Esso, tuttavia, offre un contributo importante alla prevenzione di rischi in quanto chiarisce il ruolo che specifici inquinanti esercitano nelle miscele complesse potendo quindi servire all'adozione di misure razionali per la tutela delle catene alimentari.

EFFETTI ENDOCRINI DELLE MICOTOSSINE

Annamaria Colacci, Monica Vaccari, Maria Grazia Mascolo, Stefania Perdichizzi, Elena Morandi, Francesca Rotondo, Paola Silingardi

Eccellenza Cancerogenesi Ambientale e Risk Assessment, ARPA Emilia Romagna-Bologna

La contaminazione da micotossine ha subito un'impennata dovuta ai progressivi cambiamenti climatici. La presenza di clima caldo-umido anche in aree geografiche non appartenenti alla fascia subtropicale, ha determinato un incremento dei riscontri di micotossine in derrate alimentari prodotte anche nei Paesi UE. A questo incremento di ritrovamenti fa da riscontro la diminuzione dei limiti ammessi in base alla nuova normativa. A questo quadro, prettamente tecnico, si aggiunge una nota di economia di mercato che complica il lavoro degli Enti istituzionali preposti al controllo. Il libero mercato ha determinato, infatti, la circolazione di derrate alimentari dai Paesi in forte crescita economica, che possono presentare caratteristiche di qualità e sicurezza non conformi alle sempre più severe normative europee e nazionali. È dunque necessario sviluppare strumenti che consentano di identificare i rischi correlati a tale tipo di contaminazione. Tuttavia, mentre per le tossine prodotte da *Aspergillus* si ha una buona conoscenza degli effetti sulla salute, ancora poco si conosce sulle micotossine prodotte da *Fusarium*, quali fumonisine e zearalenone. La letteratura più recente suggerisce che alcune di queste micotossine possano essere interferenti endocrini. In questo studio, mediante test *in vitro* e un approccio di tossicogenomica, si è cercato di delineare il profilo tossicologico di alcune micotossine particolarmente importanti per i livelli e l'estensione geografica della contaminazione (fumonisina) e per la sospetta attività di interferente endocrino (zearalenone e, forse, fumonisina). Una serie di test preliminari ha consentito di identificare i modelli cellulari più adatti per studiare il profilo tossicologico delle due molecole. Sono stati, poi, approntati studi di citotossicità e vitalità per definire le dosi efficaci. Lo studio dell'attività di interferenza endocrina è stato effettuato sia mediante test funzionali che tramite l'analisi della modulazione dell'espressione di geni coinvolti nella risposta ad estrogeni, ad androgeni o a molecole diossino-simili mediante *real-time PCR (Polymerase Chain Reaction)*. Obiettivo finale di tutti i test eseguiti è stata l'identificazione, per ciascuna delle molecole oggetto di indagine, delle dosi operative per l'esecuzione dello studio della modulazione dell'espressione genica mediante *microarray*. Nei test funzionali zearalenone, ma non fumonisina 1, ha dato evidenza di attività estrogenica. Zearalenone modula anche l'attività del gene PDZK coinvolto nel *pathway* metabolico degli estrogeni. Lo studio, mediante *microarray*, dei meccanismi molecolari di azione di ZEA, ha consentito di evidenziare alcuni possibili marcatori coinvolti nella citotossicità della micotossina in esame, così come di individuare alcuni geni probabilmente responsabili di una risposta adattativa messa in atto della cellula. È risultata, inoltre, significativamente modulata la categoria del legame ai recettori per gli estrogeni che conteneva al suo interno esclusivamente due geni, entrambi up-regolati: NRIP1 e RERG. Anche altri marcatori del *pathway* di risposta agli estrogeni come PDZK1, HSP27, GREB1 e catepsina D sono risultati tutti up-regolati. Questi dati danno evidenza di una spiccata attività estrogenica da parte di zearalenone. Sarà importante approfondire la relazione dose-risposta poiché alcuni test hanno evidenziato una spiccata attività di zearalenone a basse dosi.

Questo studio è stato svolto nell'ambito Progetto MITICA, Finanziamento FISIR 2003 Ministero Università e Ricerca Scientifica.

ESPOSIZIONE A LIVELLI AMBIENTALI DI XENOESTROGENI: MODELLI DI STUDIO NEL RATTO IN VIVO E RILEVANZA DEGLI EFFETTI

Francesca Farabollini (a), Leonida Fusani (c), Daniele Della Seta (a), Francesco Dessì-Fulgheri (b)

(a) Dipartimento di Fisiologia, Università di Siena

(b) Dipartimento di Biologia Evolutiva, Università di Firenze

(c) Dipartimento di Biologia Evolutiva, Università di Ferrara

Una delle emergenze ambientali della quale va maturando, anche sui media (vedi *Time Magazine* del 21 luglio 2008 pag. 45-46), una maggiore consapevolezza, è costituito dalla presenza nell'ambiente di una serie di sostanze ad azione estrogenica – sia naturali che prodotte dall'uomo – che possono modificare la funzionalità del sistema endocrino nelle popolazioni animali e nell'uomo. Sostanze ad azione estrogenica sono ampiamente presenti negli alimenti (fitoestrogeni) e sono molto usate per il contenimento e la conservazione degli alimenti (es. bisfenolo A, BPA). L'azione di queste sostanze può influenzare la riproduzione e il comportamento, con conseguenze invalidanti o comunque importanti, come è stato dimostrato in numerosi studi, a partire da vom Saal *et al.* (1).

Il rischio dell'esposizione dell'uomo al BPA è stato anche di recente oggetto di analisi da parte delle agenzie regolatorie a livello internazionale.

Il dibattito su questo tema suggerisce che i protocolli sperimentali riconosciuti dalle agenzie regolatorie, basati su criteri tossicologici, sono non idonei nel rilevare il rischio potenziale per l'uomo di sostanze con attività ormonale ed evidenzia l'opportunità di sviluppare modelli sperimentali standardizzati di tipo *environmental-like* (2, 3).

Nei nostri studi *in vivo*, su ratti maschi e femmine, abbiamo adottato il modello delle basse dosi – paragonabili a quelle presenti nell'ambiente – e degli effetti prolungati, analizzando gli effetti di un'esposizione precoce sul comportamento dell'animale adulto. Il comportamento rappresenta nei nostri esperimenti un *end-point* di elezione, in quanto punto di convergenza di sistemi neuroendocrini complessi, capace di rilevare sottili modificazioni degli stessi. Di particolare importanza nel valutare l'interferenza degli xenoestrogeni sono i comportamenti critici per il successo riproduttivo, come il comportamento sessuale.

In una prima serie di esperimenti abbiamo studiato gli effetti dell'esposizione a basse dosi di BPA, un composto di largo uso nell'industria alimentare. L'esposizione precoce alla sostanza ci ha permesso di individuare le fasi critiche dello sviluppo sensibili al trattamento (prenatale, postatale, puberale); sono state evidenziate alterazioni dei comportamenti sessualmente dimorfici nell'adulto, in particolare il comportamento socio-sessuale, suggerendo che la sostanza agisce sui processi organizzativi del comportamento (4). Altri nostri studi sul comportamento materno hanno evidenziato l'azione del BPA anche nella vita adulta, in fasi sensibili agli ormoni, quali gravidanza e allattamento (5).

È rilevante che i dosaggi usati negli studi citati fossero inferiori al NOAEL (*no-observed-adverse-effect-level*, 50 mg/kg/giorno) e alla TDI (*tolerable daily intake*, 50 microgrammi/kg/giorno, massima dose accettabile nell'uomo).

Alcuni degli effetti osservati nei nostri esperimenti nel ratto (e in altri condotti nel topo) e la direzione delle modificazioni comportamentali (demascolinizzazione nel maschio) non sembrano essere interamente riconducibili ad un'azione estrogenica del BPA, conseguente al legame con i recettori alpha e beta degli estrogeni. Questi risultati sottolineano la mancanza di

un parametro unitario di classificazione: infatti alcuni degli xenoestrogeni oggetto di studio mostrano, a seconda della concentrazione, effetti di tipo estrogenico o antiestrogenico (6).

I nostri risultati e le difficoltà di interpretazione hanno messo in luce la necessità di ottimizzare il modello *environmental-like* rispetto ad altri elementi, quali: l'utilizzo di uno standard con il quale paragonare i risultati di esposizioni a sostanze dalla incerta natura 'estrogenica', l'esposizione per periodi molto prolungati, come avviene per le popolazioni che vivono in ambienti contaminati, e soprattutto la necessità di individuare *end-points* direttamente riconducibili alla situazione naturale.

In una fase sperimentale successiva abbiamo quindi affrontato il problema della coesistenza di effetti estrogenici e non-estrogenici in alcune delle sostanze classificate come xenoestrogeni, mediante lo studio di sostanze estrogeniche pure che possano funzionare da controllo positivo.

Nei ratti maschi abbiamo paragonato gli effetti dell'esposizione, durante il periodo prepuberale, a basse dosi di etinilestradiolo (EE), un estrogeno sintetico puro, e di BPA; sono stati dimostrati effetti a medio e a lungo termine sul comportamento socio-sessuale, più marcati negli animali trattati con EE, rispetto a quelli trattati con BPA (7).

Sono stati anche condotti esperimenti su femmine di ratto, esposte in età perinatale ad EE, somministrato sia a dosaggi paragonabili ai livelli dell'esposizione ambientale (presenza di estradiolo nelle acque reflue) che a livelli fisiologici (pillola anticoncezionale); le femmine adulte mostravano evidenti alterazioni del ciclo estrale e del comportamento sessuale, recettivo e procettivo (8).

Considerato l'effetto specifico degli xenoestrogeni sul sistema riproduttivo, abbiamo introdotto un nuovo modello sperimentale basato su coppie di animali in cui entrambi i partner sono stati sottoposti allo stesso trattamento, analizzando come *end-point* il successo riproduttivo della coppia: ciò al fine di valutare gli effetti cumulativi di un'esposizione ambientale, in cui tutti gli individui sono esposti in modo simile. I risultati sulla *fitness* di coppia nel ratto hanno un particolare interesse se messi a confronto con il comportamento sessuale fine dei due sessi, poiché permettono di valutare in che modo le alterazioni comportamentali si riflettono sul successo riproduttivo. Basse dosi di etinilestradiolo (EE), a cui gli animali erano esposti nella vita prenatale fino al periodo puberale, non produceva negli animali adulti evidenti effetti fisiologici sui due sessi, negli animali adulti, nè modificava la fertilità; tuttavia la fecondità risultava alterata (9).

Nei nostri esperimenti anche il comportamento cognitivo e in particolare la memoria spaziale studiata con il Morris Water Maze, risultava modificata nel ratto maschio adulto, in seguito all'esposizione durante l'intero periodo dello sviluppo ad EE (10); ciò conferma l'influenza degli estrogeni su funzioni cognitive, che sono controllate da aree diverse da quelle implicate nelle funzioni riproduttive.

Bibliografia

1. Vom Saal FS, Cooke PS, Buchanan DL, Palanza P, Thayer KA, Nagel SC, Parmigiani S, Welshons WV. A physiologically-based approach to the study of bisphenol A and other estrogenic chemicals on the size of reproductive organs, daily sperm production, and behavior. *Toxicol Ind Health* 1998;14:239-60.
2. Richter CA, Birnbaum LS, Farabolini F, Newbold RR., Rubin BS, Talsness CE, Vanderbergh JG, Walser-Kuntz DR, vom Saal FS. *In vivo* effects of bisphenol A in laboratory rodent studies. *Reprod toxicol* 2007;24:199-224.
3. Chapel Hill Bisphenol A. panel consensus statement: Integration of mechanisms, effects in animals and potential to impact human health at current levels of exposure. *Reprod toxicol* 2007;24:131-38.

4. Farabollini F, Porrini S, Della Seta D, Bianchi F, Dessi-Fulgheri F. Effects of perinatal exposure to bisphenol A on sociosexual behavior of female and male rats. *Environ Health Perspect* 2002;110:409-13.
5. Della Seta D, Minder I, Dessi-Fulgheri F, Farabollini F. Bisphenol A. exposure during pregnancy and lactation affects maternal behavior in rats. *Brain Research Bulletin* 2005;65:255-60.
6. MacLusky NJ, Hajszan T, Leranth C. The environmental estrogen bisphenol A inhibits estradiol-induced hippocampal synaptogenesis. *Environ. Health Perspect* 2005;113:675-79.
7. Della Seta D, Minder I, Belloni V, Aloisi AM, Dessi-Fulgheri F, Farabollini F. Pubertal exposure to estrogenic chemicals affects behavior in juvenile and adult male rats. *Horm Behav* 2006;50:301-7.
8. Della Seta D, Farabollini F, Dessi-Fulgheri F, Fusani L. Environmental-like exposure to low levels of estrogen affects sexual behavior and physiology of female rats. *Endocrinology* 2008, in press. Disponibile all'indirizzo: <http://endo.endojournals.org/cgi/content/abstract/en.2008-0113v1>; ultima consultazione 20/07/2009.
9. Fusani, L, Della Seta D, Dessi-Fulgheri F, Farabollini F. Altered reproductive success in rat pairs after environmental-like exposure to xenoestrogen. *Proc Biol Sci* 2007;274:1631-6.
10. Corrieri L, Della Seta D, Canoine V, Fusani L. Developmental exposure to xenoestrogen enhances spatial learning in male rats. *Horm Behav* 2007;51:620-5.

MODELLI SPERIMENTALI PER VALUTARE IL RISCHIO DI ESPOSIZIONE NEONATALE A INTERFERENTI ENDOCRINI IN MATRICI ALIMENTARI

Cinzia La Rocca, Sabrina Tait, Alberto Mantovani

Dipartimento Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Il *Network of Excellence* “CASCADE”, finanziato dalla Comunità Europea nell’ambito del 6° Programma Quadro, comprende diversi gruppi di ricerca europei, tra cui l’Istituto Superiore di Sanità rappresentato dal reparto di “Tossicologia Alimentare e Veterinaria” diretto dal Dott. Alberto Mantovani, nel Dip. Di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare. CASCADE ha come finalità quella di costituire un coordinamento e un’integrazione della ricerca europea tra competenze scientifiche nell’ambito della biologia molecolare, endocrinologia, tossicologia, chimica analitica, sicurezza alimentare e valutazione del rischio. CASCADE comprende diversi Workpackages fra i quali il WP19, *Chemical as contaminants in food*, che si propone di identificare gli IE presenti negli alimenti, sviluppando opportuni metodi che ne consentano il rilevamento nelle matrici alimentari stesse. Lo scopo è quindi quello di fornire nuove metodologie sperimentali sfruttando la caratteristica dei recettori nucleari di rispondere agli stimoli esterni. Attualmente sono state selezionate due categorie alimentari, pane (BREAD) e alimenti per l’infanzia (BABYFOOD).

L’infanzia, per le sue caratteristiche di immaturità nello sviluppo di alcuni sistemi, rappresenta una delle fasce più vulnerabili e suscettibili all’azione degli interferenti endocrini (IE). Il progetto BABYFOOD intende quindi valutare l’esposizione infantile, dalla nascita ai primi anni di vita, studiando i possibili effetti derivanti dall’assunzione degli alimenti per l’infanzia, presenti in commercio, sulla modulazione dei recettori nucleari. In particolare, al fine di tutelare la salute dei bambini non allattati al seno, vengono studiati campioni di latte in polvere (completo, ipoallergenico e di soia) selezionati in base alle stime di vendita e di consumo per tipo e per marca. Per meglio comparare i risultati ottenuti dallo studio delle matrici alimentari, CASCADE ha selezionato quattro sostanze modello il cui meccanismo d’azione sia esemplificativo di una particolare interazione con diversi recettori nucleari:

- *Bisfenolo A*
sostanza presente nelle plastiche che interagisce con i recettori estrogeni e tiroideo;
- *Vinclozolin*
pesticida che interagisce con il recettore androgeno;
- *2,3,7,8-Tetraclorodibenzo-p-diossina*
contaminante presente negli alimenti che interagisce con il recettore arilico;
- *Genisteina*
fitoestrogeno, sostanza bioattiva presente ad esempio nella soia che interagisce con il recettore estrogeno.

I livelli di tali sostanze vengono determinati nelle matrici considerate al fine di valutare l’esposizione reale.

Nell’ambito del progetto BABYFOOD, il nostro gruppo si propone di mettere a punto un idoneo sistema *in vitro* in grado di evidenziare gli effetti di tali matrici e/o sostanze attraverso l’analisi dei livelli di marcatori funzionali opportunamente selezionati.

Trattandosi di alimentazione sono state scelte due linee cellulari rappresentative di organi del sistema digerente quali fegato e colon. Tali organi, infatti, sono importanti per il loro

coinvolgimento nei processi di trasformazione, assorbimento e metabolismo dei cibi e dei suoi costituenti, e rappresentano un potenziale bersaglio di disregolazione endocrina.

Di seguito sono indicate le linee cellulari e i corrispondenti marcatori funzionali utilizzati nel modello sperimentale:

- nelle HuH6 (epatoblastoma umano stabilizzate da fegato di donatore maschio di 1 anno) vengono analizzati i livelli di γ -GT e β -catenina, importanti marcatori di funzionalità epatica;
- nelle DLD-1 (adenocarcinoma coloretale umano stabilizzate da donatore maschio adulto) vengono analizzati i livelli di due citochine implicate nella risposta infiammatoria quali TNF- α e interleuchina-8 (IL-8), poiché lo sviluppo dell'immunità mucosale avviene nelle prime fasi della vita a livello dell'intestino (1).

È inoltre previsto lo studio della modulazione di alcuni recettori nucleari (ER α , ER β , AR, AhR e PPAR γ) con cui interagiscono direttamente le sostanze modello e che, a cascata, possono influire anche sulla regolazione dei marcatori sopra citati (2, 3).

I dati preliminari sono relativi agli effetti dell'esposizione delle due linee cellulari a latte in polvere completo (Mf), al latte di soia (Sf), a quello ipoallergenico (HAf) e a due delle sostanze modello (BPA e Vinclozolin). Le concentrazioni di tali sostanze utilizzate nei trattamenti sono state desunte da studi di letteratura in cui i livelli sono stati determinati su matrici alimentari per l'infanzia (4, 5).

Le cellule di fegato HuH6 non hanno mostrato effetti rilevanti di modulazione di PPAR γ e ER α .

Le cellule di colon DLD-1 hanno mostrato un sovraespressione di entrambi i recettori in seguito a trattamento sia con le matrici sia con i composti. L'effetto è particolarmente evidente per ER α in generale ma, in particolare, nelle cellule trattate con HAf laddove risulta paragonabile a quello osservato in cellule trattate con BPA.

Per quanto riguarda l'analisi dei marcatori nelle cellule DLD-1 i livelli di TNF α e IL-8 sono risultati in generale inferiori al controllo in tutti i trattamenti, in modo particolarmente evidente per TNF α . Inoltre, tale effetto è più marcato in cellule trattate con HAf.

Nel complesso, i risultati preliminari presentati indicano che:

- le due linee cellulari utilizzate mostrano modulazioni qualitativamente e quantitativamente diverse dei recettori nucleari studiati, con le DLD-1 più sensibili delle HuH6 ai trattamenti subiti;
- gli alimenti per l'infanzia studiati evocano risposte simili agli IE utilizzati come sostanze modello; in particolare HAf nelle cellule DLD-1 provoca una modulazione simile al BPA per l'espressione di entrambi i recettori nucleari e per le citochine.

Ulteriori studi sono in corso per l'analisi dei marcatori di funzionalità epatica e di espressione genica degli altri recettori nucleari in seguito ad esposizione anche delle altre due sostanze modello.

Pur tenendo conto della preliminarità dei dati è possibile supporre che:

- il modello *in vitro* scelto risulti essere idoneo al rilevamento di effetti diversi in relazione ai tessuti esaminati in seguito ad esposizione a matrici alimentari;
- i marcatori selezionati sono in grado di mettere in evidenza le differenze fra matrici e la loro possibile interazione con i recettori nucleari permettendo, inoltre, la comparazione con l'effetto dovuto all'esposizione alle singole sostanze modello.

L'applicazione di tale modello anche allo studio di altre matrici alimentari potrebbe quindi rivelarsi un valido strumento per la valutazione degli effetti da IE.

Ringraziamenti

La presente attività è svolta nell'ambito del "6th EU FP NoE, CASCADE (FOOD CT-2004-506319), WP 19 Chemicals as Contaminants in Food_BABYFOOD".

Bibliografia

1. Forchielli ML, Walker WA. The role of gut-associated lymphoid tissues and mucosal defence. *Br J Nutr.* 2005;31(Suppl 9):S41-8.
2. Wang K, Wan YY. Nuclear Receptors and Inflammatory Diseases. *Exp Biol Med.* 2008;233:496-506.
3. Yao C, Lin Y, Chua MS, Ye CS, Bi J, Li W, Zhu YF, Wang SM. Interleukin-8 modulates growth and invasiveness of estrogen receptor-negative breast cancer cells. *Int J Cancer* 2007;121(9):1949-57.
4. Balinova AM, Mladenova RI, Shtereva DD. Effects of processing on pesticide residues in peaches intended for baby food. *Food Addit Contam.* 2006;23(9):895-901.
5. Onn Wong K, Woon Leo L, Leng Seah H. Dietary exposure assessment of infants to bisphenol A from the use of polycarbonate baby milk bottles. *Food Addit Contam.* 2005;22(3):280-8.

ESPOSIZIONE IN UTERO A DI(2-ETILESIL)FTALATO E MARCATORI DI EFFETTI EPATICI NEL TOPO

Stefano Lorenzetti (a), Roberta Tassinari (a), Gabriele Moracci (a), Vincenzo Lagatta (a), Antonietta D'Ambrosio (a), Daniele Marcoccia (a), Marco Salvatore (b), Domenica Taruscio (b), Francesca Maranghi (a)

(a) Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare Istituto Superiore di Sanità, Roma

(b) Centro Nazionale Malattie Rare, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Il di(2-etilesil)ftalato [di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP)], contaminante ubiquitario della famiglia degli ftalati, è usato per rendere flessibili le plastiche a base di PVC utilizzate nella produzione dei materiali di imballaggio, nei giocattoli per l'infanzia e nei dispositivi medici quali i tubi e le sacche per trasfusione. Poiché il DEHP (e gli ftalati, in genere) non è legato covalentemente al PVC, viene rilasciato nelle matrici con cui viene a contatto (es. fluidi biologici e alimenti) rappresentando un contaminante ad elevato impatto sulla salute umana anche in fasce di popolazione suscettibili quali l'infanzia (inclusi i bambini nati pre-termine) e gli adulti sottoposti a trattamenti terapeutici continui (1-4).

Gli studi sperimentali hanno dimostrato l'embriotossicità e la teratogenicità del DEHP a seguito di esposizione durante la gravidanza e viene considerato un interferente endocrino (IE) poiché interferisce con il metabolismo degli androgeni con effetti principalmente sul sistema riproduttivo maschile. Inoltre il DEHP è cancerogeno e induce tumori nel fegato di topi e ratti adulti di entrambi i sessi. A livello molecolare il meccanismo di azione proposto si basa sull'induzione della proliferazione dei perossisomi di cui il DEHP è un noto attivatore mediante la sua capacità di legare i *Peroxisome Proliferator-Activate Receptors* (PPARs; 2, 3), fattori di trascrizione che modulano l'espressione di geni coinvolti in attività fondamentali, come il metabolismo e il trasporto dei lipidi e del glucosio, in diversi tessuti (es. fegato e tessuto adiposo). Scarsi dati sono tuttora disponibili sui possibili effetti sull'omeostasi energetica indotti da un'esposizione a DEHP in epoca prenatale, in particolare sulle potenziali alterazioni a lungo termine indotte durante le fasi critiche di sviluppo e differenziazione del fegato.

Per verificare i potenziali effetti a lungo termine del DEHP sul metabolismo energetico a seguito di esposizione precoce, topi CD-1 sono stati esposti durante i giorni di gravidanza (GG) 11-19 per via orale a 0 (solo veicolo = olio di oliva), 25 e 100 mg/kg di peso corporeo pro die di DEHP. Tale finestra di suscettibilità corrisponde nel topo alla fase di organogenesi e istogenesi del fegato. Gli animali sono stati controllati quotidianamente durante il trattamento per le condizioni generali di salute, le variazioni del peso corporeo e del consumo di mangime. Successivamente sono stati lasciati partorire spontaneamente e, dopo il parto (giorno post-natale [GPN] = 0) le nidiare sono state pesate, contate e controllate per l'eventuale presenza di nati morti e/o malformati. Successivamente madri e nidiare sono state pesate e controllate ogni 4 giorni. Al GPN 21 (svezzamento del topo) e successivamente al GPN 35 (raggiungimento della pubertà nel topo) metà delle nidiare e tutte le madri sono state prima sottoposte, previa anestesia, al prelievo ematico dal plesso retro-orbitale e successivamente sacrificate tramite asfissia con CO₂. A tutti gli animali il fegato è stato pesato, prelevato e fissato in formalina per l'analisi istologica (colorazione ematossilina-eosina e, per evidenziare il glicogeno epatico, la colorazione con *Periodic Acid Schiff*, PAS) e immunoistochimica (per la determinazione della localizzazione cellulare della β -catenina).

L'esposizione a DEHP durante la gravidanza non ha causato nelle madri alcun segno di tossicità generale; il peso corporeo è risultato inferiore nei trattati rispetto al gruppo di controllo

durante la gravidanza, mentre nessun effetto è stato riscontrato durante l'allattamento. Il consumo di mangime non è variato né durante la gravidanza né durante l'allattamento. Il peso del fegato non è risultato alterato. Il peso medio e la numerosità delle nidiate sono risultati inferiori nei gruppi trattati con DEHP.

Nei maschi della generazione F1, a livello istologico e immunoistochimico, l'esposizione *in utero* a DEHP ha evidenziato nei trattati rispetto al controllo: i) la riduzione dose-dipendente dell'accumulo di glicogeno epatico; ii) l'aumento dose-dipendente di vacuolizzazione citoplasmatica, indice di accumulo lipidico (epatosteatosi); e iii) un aumento della β -catenina citoplasmatica quale indicatore indiretto di maggiore proliferazione cellulare (5).

Difetti nella sintesi e nell'accumulo di glicogeno sono stati associati al ritardo di crescita intrauterino: ratti *knock-out* per IGF2 (il regolatore principale del metabolismo del glicogeno in fase embrionale) mostrano sia un chiaro ritardo intrauterino della crescita sia la concomitante riduzione dell'accumulo del glicogeno. Negli epatociti, il mancato accumulo di glicogeno comporta l'attivazione della sintesi degli acidi grassi e infatti nei topi CD1 esposti a DEHP si osserva epatosteatosi. Il trattamento *in utero* dei topi CD1 con DEHP comporta quindi un'alterazione metabolica dei tessuti epatici i cui meccanismi d'azione devono essere chiariti.

È interessante notare, tuttavia, come alcune forme di malattie dismetaboliche del glicogeno siano state associate a casi di epatoblastoma, il principale tumore epatico infantile, di cui l'aumento di β -catenina citoplasmatica e intranucleare (con ridotta localizzazione sulla membrana plasmatica) rappresenta un noto biomarcatore (6). Recentemente, l'associazione tra esposizione a DEHP in fasi suscettibili dello sviluppo, in particolare quello feto-embryonale nei nati pre-termine, e l'insorgenza di tumori epatici infantili (epatoblastoma) è stata suggerita da diversi autori (1, 4, 6). In questo studio, l'alterazione dose-dipendente del metabolismo del glicogeno e dei lipidi avviene contemporaneamente alla mobilizzazione della proteina oncogenica β -catenina dalla membrana plasmatica al citoplasma suggerendo un legame tra esposizione a DEHP in fasi suscettibili dello sviluppo del fegato, alterazioni metaboliche e biomarcatori tumorali (6).

In conclusione, lo studio dei contaminanti alimentari e ambientali che interagiscono con i recettori PPARs e altri recettori nucleari del tessuto epatico (es. il *Pregnane X Receptor*, PXR, e il *Liver X Receptor*, LXR) rappresenta una nuova prospettiva di ricerca sugli IE che amplia la visione tradizionale di caratterizzazione di biomarcatori precoci di effetto a carico del sistema endocrino-riproduttivo a quella mirata al sistema endocrino-metabolico.

Ringraziamenti

Questo studio è condotto nell'ambito del progetto *Tackling rare diseases yet lacking diagnosis and/or prognosis: a pilot project integrating data collection and experimental studies*. (NIH-ISS 2007-2009 grant).

Bibliografia

1. Latini G, Del Vecchio A, Massaro M, Verrotti A, De Felice C. In utero exposure to phthalates and fetal development. *Curr Med Chem*. 2006;13(21):2527-34.
2. Latini G, Scoditti E, Verrotti A, De Felice C, Massaro M. Peroxisome proliferator-activated receptors as mediators of phthalate-induced effects in the male and female reproductive tract: epidemiological and experimental evidence. *PPAR Res*. 2008:359267.
3. Rees WD, McNeil CJ, Maloney CA. The Roles of PPARs in the Fetal Origins of Metabolic Health and Disease. *PPAR Res*. 2008:459030.

4. Reynolds P, Urayama KY, Von Behren J, Feusner J. Birth characteristics and hepatoblastoma risk in young children. *Cancer* 2004;100(5):1070-6.
5. Thompson MD, Monga SP. WNT/beta-catenin signaling in liver health and disease. *Hepatology* 2007;45(5):1298-305.
6. Salvatore M, Lorenzetti S, Maranghi F, Mantovani A, Taruscio D. Molecular link(s) between hepatoblastoma pathogenesis and exposure to di-(2-ethylhexyl)phthalate: a hypothesis. *Folia Medica (Plovdiv)* 2008;50(4):17-23.

MECCANISMI D'AZIONE DEI FITOESTROGENI

Maria Marino

Dipartimento di Biologia, Università Roma Tre, Roma

I fitoestrogeni rappresentano un numeroso gruppo di composti non-nutrienti prodotti dalle piante come parte dei loro meccanismi di difesa nei confronti di stress di varia natura (1). Questi composti, noti fin dagli anni '40 come la causa principale della sterilità che colpiva gli ovini in Australia (2), hanno recentemente attratto l'interesse dei ricercatori per il loro potenziale effetto protettivo nei confronti di diverse patologie degenerative umane (3-6). Queste evidenze hanno portato a raccomandare un aumento del consumo di cibo contenente alte concentrazioni di fitoestrogeni i quali sono, attualmente, disponibili anche come prodotti da banco nelle farmacie. Questo aumentato consumo di fitoestrogeni nella popolazione avviene nonostante il loro meccanismo di azione non sia completamente chiarito. Infatti, per questi composti sono stati descritti effetti estrogeno-mimetici o anti-estrogenici o effetti che dipendono esclusivamente dalla natura chimica dei composti. Così la stessa molecola è descritta come interferente endocrino o come estrogeno mimetico, come antiossidante o come inibitore di chinasi (7). In parte queste divergenze dipendono dalla complessità del meccanismo di azione degli estrogeni, che agiscono attraverso due isoforme di recettore e attraverso distinte vie di traduzione del segnale, in parte dipendono dalla pleiotropicità degli effetti riportati per molti fitoestrogeni.

Qui sarà considerato il meccanismo di azione alla base degli effetti anti-proliferativi di noti fitoestrogeni appartenenti alla classe dei flavonoidi e in particolare del flavanone naringenina e del flavonolo quercetina, sostanze note sia per la loro capacità di legare i recettori per gli estrogeni che per i loro effetti antiossidanti. Inoltre, sarà valutato l'effetto della naringenina nel modulare alcune delle funzioni tipiche degli ormoni estrogeni quali la proliferazione e il differenziamento cellulare. I risultati mostrano che la quercetina, pur risultando una molecola con un alto potenziale antiossidante, possiede effetti anti-proliferativi solo in cellule di cancro che esprimono i recettori per gli estrogeni (8). Inoltre, sia la quercetina che la naringenina agiscono come estrogeno mimetici in presenza della isoforma beta del recettore per gli estrogeni, mentre in presenza dell'isoforma alfa gli effetti di questi flavonoidi sono anti-estrogenici (9). In particolare, la naringenina blocca selettivamente alcune attività dell'isoforma alfa del recettore per gli estrogeni importanti per la progressione del ciclo cellulare (6). D'altra parte il legame della naringenina e della quercetina con l'isoforma alfa del recettore per gli estrogeni rapidamente attiva la fosforilazione della proteina p38 attivando una cascata pro-apoptotica (9, 6). Questi stessi risultati sono stati confermati anche in un altro modello sperimentale il muscolo scheletrico durante il differenziamento indotto da estradiolo. Anche in questo caso il trattamento delle cellule con naringenina provoca il disaccoppiamento delle attività dell'isoforma alfa del recettore bloccando, in questo modo gli effetti ormonali (10).

Queste vie di segnale evidenziando nuovi meccanismi alla base dell'effetto anti-estrogenico dei flavonoidi rendono evidente la necessità di indagare a fondo sull'azione di questi composti per la corretta predizione dei loro effetti sulla salute umana.

Bibliografia

1. Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 2004;79:727-47.

2. Bennetts HW, Underwood EJ, Shier FLA. Specific breeding problem of sheep on subterranean clover pasture in western Australia. *Austr Vet J* 1946;22:2-12.
3. Dang ZC, Lowik C. Dose-dependent effects of phytoestrogens on bone. *Trend Endo Metabol* 2005;16:207-213.
4. Ricketts ML, Moore DD, Banz WJ, Mezei O, Shay NF. Molecular mechanisms of action of the soy isoflavones include activation of promiscuous nuclear receptors. A review. *J Nutr Biochem*. 2005;16:321-30.
5. Galluzzo P, Marino M. Nutritional flavonoid impact on nuclear and extranuclear estrogen receptor activities. *Gene Nutr* 2006;(1):161-76.
6. Galluzzo P, Ascenzi P, Bulzomi P, Marino, M. The Nutritional flavanone naringenin triggers antiestrogenic effects by regulating estrogen receptor α -palmitoylation. *Endocrinology* 2008;a 149:2567-575.
7. Virgili F, Marino M. Regulation of cellular signals from nutritional molecules: a specific role for phytochemicals, beyond antioxidant activity. *Free Radic Biol Med* 2008; in press.
8. Galluzzo P, Martini C, Bulzomi P, Leone S, Bolli A, Pallottini V, Marino, M. Quercetin-induced apoptotic cascade in cancer cells: antioxidant versus estrogen receptor α -dependent mechanisms *Mol Nutr Food Res* 2008b; in press.
9. Totta P, Acconcia F, Leone S, Cardillo I, Marino M. Mechanisms of naringenin-induced apoptotic cascade in cancer cells: involvement of estrogen receptor α and β signalling. *IUBMB Life* 2004;56:491-9.
10. Marino M, Bulzomi P. Mechanisms at the root of flavonoid action in cancer: a step toward solving a Rubik's cube. In: Keller RB (Ed.). *Flavonoids: biosynthesis, biological effects and dietary sources*. New York: Nova Science; 2009.

BISFENOLO A E DIFFERENZIAZIONE SESSUALE DI CIRCUITI NEURALI E COMPORTAMENTO NEL TOPO

Paola Palanza, Stefano Parmigiani

Dipartimento di Biologia Evolutiva e Funzionale, Università di Parma

Tutti gli organismi viventi dipendono da una complessa serie di segnali chimici (ormoni) che controllano lo sviluppo biologico e regolano l'attività di cellule e organi (1). Numerose sostanze naturali o artificiali presenti nell'ambiente e negli alimenti, chiamate collettivamente “distruttori endocrini” o “interferenti endocrini” (IE), sono, tuttavia, in grado di interferire con gli ormoni tiroidei e gonadici dei vertebrati, mimandone o inibendone l'azione e interferendo con i normali processi di sviluppo. Gli IE meglio caratterizzati sono i composti in grado di legarsi ai recettori intracellulari degli ormoni sessuali, in particolare ai recettori degli estrogeni, come i fitoestrogeni naturali (es: nella soia), i pesticidi come DDT, metossicloro, i composti rilasciati dai policarbonati utilizzati come contenitori alimentari, come il bisfenolo A, farmaci, come l'etinil-estradiolo, componente della pillola anticoncezionale, o il dietilstibestolo, o alcuni policlorobifenili (PCB). L'esposizione dell'uomo a tali contaminanti può avvenire direttamente con l'utilizzo di acque contaminate o attraverso l'alimentazione e l'ingestione di cibi (animali o vegetali) che contengano sostanze con attività ormonale. È quindi di grande interesse lo sviluppo di nuovi metodi di indagine per evidenziare la biodisponibilità ambientale e il rischio biologico associato a questi contaminanti.

Contemporaneamente al riconoscimento della capacità degli IE di interferire con un'ampia gamma di processi durante lo sviluppo negli animali (2, 3), alcuni di studi epidemiologici sull'uomo hanno rilevato un aumento negli ultimi anni di alcuni disordini e patologie umane, correlandolo in alcuni casi all'esposizione agli IE. Questi disordini includono: l'aumento delle pubertà precoci, dell'abortività e dei parti pre-termine, l'obesità, disfunzioni cognitive e comportamentali (come autismo e ADHD, *Attention Deficit Hyperactivity Disorder*, riduzione del quoziente intellettivo), malformazioni dell'apparato riproduttivo (criptorchidismo e ipospadia), una diminuita funzionalità a livello di sistema riproduttivo (la riduzione della produzione spermatica, l'aumento delle cisti ovariche e dell'endometriosi) e del sistema immunitario, patologie tiroidee e alcuni tipi di neoplasie (cancro alla prostata, carcinoma della mammella e della vagina) (4). Tuttavia, se esistono pochi dubbi sul fatto che ci sia stato un diffuso incremento nel tasso di obesità e diabete, sussiste invece un dibattito ancora aperto circa la riduzione globale nella funzionalità riproduttiva o sull'incremento nell'ADHD, dovuto alla limitatezza dei dati storici. Ancora più difficile è dimostrare le possibili cause ambientali di questi fenomeni. Tuttavia i meccanismi biologici alla loro base suggeriscono che possano esservi coinvolti segnali intra- e intercellulari, e per ciascuno dei fenomeni epidemiologici citati, i dati disponibili indicano uno o più punti di vulnerabilità agli IE nei meccanismi di controllo.

Presi nel loro insieme, i nuovi dati sperimentali ottenuti dagli studi sugli IE stanno provocando una serie di rivalutazioni concettuali che minano gli assunti tradizionali alla base degli studi tossicologici e le applicazioni dei risultati ottenuti da questi studi agli standard di valutazione della salute pubblica. L'evidenza sperimentale emersa dalle recenti ricerche sull'azione dei composti ad azione endocrina ha messo in evidenza due importanti differenze concettuali rispetto al tradizionale approccio tossicologico. Uno riguarda la messa in dubbio dell'assunto tossicologico circa la “dose appropriata”, poichè dosi estremamente basse di IE (nell'intervallo di una parte per miliardo o anche per milione di miliardo) sono in grado di interferire col sistema endocrino in modelli animali. È importante sottolineare che gli ormoni e

le sostanze che ne mimano l'azione (IE) non mostrano una curva dose-risposta lineare per un ampio intervallo di dosi, ma sono state osservate funzioni non lineari, ad esempio curve a U o a U invertita (2, 5). Il secondo cambiamento concettuale riguarda l'evidenza che, durante il ciclo vitale di un organismo, esistono particolari fasi dello sviluppo in cui è maggiore la vulnerabilità alle interferenze ormonali; in particolare le fasi dello sviluppo embrionale e/o neonatale sono vulnerabili alle interferenze del milieu ormonale. Ciò dipende da diversi fattori, inclusa l'assenza di sistemi enzimatici protettivi pienamente sviluppati e l'elevato metabolismo durante lo sviluppo embrionale. Il punto essenziale è, tuttavia, che gli eventi coinvolti nello sviluppo implicano una serie di scelte organizzative che sono irreversibili, una volta compiute. Gli stadi embrionali e fetali, o anche le prime fasi dopo la nascita (a seconda delle specie), appaiono specialmente vulnerabili all'esposizione agli inquinanti ad attività ormonale (6). Nei mammiferi le madri possono trasmettere i contaminanti alla prole tramite placenta o, dopo la nascita, allattando i neonati. Anche se gli individui adulti esposti a un determinato composto ad una particolare dose possono non evidenziare effetti nocivi, la loro prole può invece mostrare alterazioni riproduttive, comportamentali, neurali e immunitarie per tutta la vita. In modo differente, negli adulti, i processi in gioco possono molto spesso mutare la direzione dei loro effetti semplicemente rimuovendo l'IE e riportando così l'espressione genica e i sistemi biologici a livelli normali; questi effetti transienti sono detti "attivazionali".

Una chiara implicazione dell'attenzione alle esposizioni a basse dosi di IE durante lo sviluppo fetale e neonatale è che i livelli di esposizione che sono stati identificati come di base, e quindi sicuri, possono invece esercitare effetti sul sistema riproduttivo e neuroendocrino degli organismi esposti, in relazione alle modalità e al periodo di esposizione. Ciò non è stato finora preso in seria considerazione a causa della virtuale assenza di studi in cui si utilizzino basse dosi e in cui si esaminino gli effetti di tipo funzionale durante lo sviluppo a qualunque dose.

Gli indici comportamentali sono particolarmente sensibili alle perturbazioni del sistema neuro-endocrino, poiché essi rappresentano il punto finale di sistemi altamente integrati e anche sottili alterazioni in ognuna delle componenti di tali sistemi può riflettersi nell'alterazione del comportamento. In particolare lo studio di comportamenti sessualmente dimorfici e dei loro substrati neurali si propone come un modo particolarmente sensibile di evidenziare l'azione distruttrice o semplicemente modulatrice degli IE estrogenici. È noto da tempo che livelli appropriati di ormoni sessuali sono indispensabili per il normale sviluppo e la differenziazione sessuale degli organi riproduttivi e del sistema nervoso centrale, e, conseguentemente, del comportamento.

Il bisfenolo A (BPA) è un componente essenziale nella manifattura delle resine e dei polycarbonati che viene rilasciato dalle lattine degli alimenti in scatola durante l'autoclavaggio e dai contenitori in plastica (es. i biberon); inoltre è un componente delle resine utilizzate per le otturazioni dentarie. Diversi studi hanno confermato che il BPA è rilevabile nelle popolazioni dei paesi sviluppati (7) ed è stato misurato nel fluido amniotico, nel plasma materno e fetale, nella placenta alla nascita e nel latte materno. Il BPA possiede affinità di legame per entrambi i recettori estrogenici classici, ER α ed ER β . Recentemente il *National Toxicology Program*, organo del National Institute of Health degli USA, in un documento provvisorio basato sulla vastissima letteratura esistente (247 citazioni, tra cui quelle prodotte dal GRIDES – gruppo di ricerca interuniversitario su distruttori endocrini e sviluppo neurocomportamentale – www.biol.unipr.it/grides) ha condotto una dettagliata analisi dei lavori scientifici sugli effetti del bpa. Questa analisi – sulla base di studi effettuati su animali – individua una "qualche preoccupazione" che l'esposizione a basse dosi di bisfenolo di feti e infanti (periodo perinatale, infantile e prepuberale) possa interferire in primo luogo con il corretto sviluppo del sistema nervoso e del comportamento ed essere implicata in disordini metabolici e riproduttivi.

La nostra ricerca si propone di esaminare i sistemi comportamentali sessualmente dimorfici sensibili all'azione di basse concentrazioni (compatibili con quelle presenti nell'ambiente) di BPA durante periodi critici, individuandone le possibili alterazioni dei substrati neurali. Topi femmine CD1 sono state addestrate a bere spontaneamente da una siringa modificata soluzioni di olio di mais, con o senza il bisfenolo A (BPA 10, 20 o 40 microg/kg), durante l'ultima settimana di gestazione e/o la prima settimana post-parto. La loro prole è stata sottoposta a diversi test di esplorazione, di comportamento cognitivo, di risposta alla ricompensa e di comportamento sociale e riproduttivo. I risultati dell'analisi del comportamento indicano che nei diversi paradigmi sperimentali i controlli mostrano chiare differenze sessuali nel comportamento in risposta ad un ambiente nuovo e nell'apprendimento di un percorso, mentre la prole esposta a BPA presenta una riduzione o un annullamento delle differenze sessuali (Tabella 1) (8, 9). Abbiamo inoltre valutato gli effetti dell'esposizione prenatale a bisfenolo A su alcuni substrati neurali: l'attività del sistema noradrenergico nel locus coeruleus e l'area preottica e la produzione di tirosina idrossilasi in LC. I dati hanno indicato che l'esposizione perinatale riduce le differenze sessuali in queste aree rispetto ai controlli. Insieme con altri studi questi dati confermano che l'esposizione a basse dosi di un interferente endocrino come il bisfenolo A, durante il periodo critico della differenziazione sessuale del sistema nervoso centrale, può esercitare effetti a lungo termine sul comportamento e l'SNC degli adulti in un modello animale.

Tabella 1. Sommario degli effetti dell'esposizione pre- o peri-natale al BPA (10 microg/kg peso/giorno) sulle differenze sessuali nel comportamento di topi maschi e femmine in diversi paradigmi sperimentali

Paradigma sperimentale	Risposta comportamentale	Controlli	BPA
Risposta alla Novità ^(a) (<i>Novelty-test</i> pre-pubertà)	Ricerca della novità Attività di sostituzione (<i>grooming</i>)	F>M F<M	!F=M !F>M
Esplorazione di un'arena ^(a) (<i>Free-exploratory Open Field</i>)	Esplorazione Locomozione <i>Risk-taking</i> (centro e luce)	F>M F>M F>M	!F=M !F<M F=M
Labirinto a croce ^(a) (<i>Elevated Plus Maze</i>)	Esplorazione Ansia	F>M F<M	F=M !F=M
Condizionamento ^(b) (indotto da anfetamina; <i>Conditioned Place Preference</i>)	Memoria per la ricompensa (Preferenza per il compartimento associato alla droga)	F>M	!F=M

F=M, il comportamento non differisce tra maschi e femmine; F>M, livelli di comportamento sono significativamente maggiori nelle femmine che nei maschi; F<M, livelli di comportamento sono significativamente minori nelle femmine che nei maschi; !riduzione statisticamente significativa del comportamento in seguito all'esposizione perinatale; ! aumento statisticamente significativo del comportamento in seguito all'esposizione perinatale.

^(a) Esposizione al BPA dal giorno 11 di gravidanza al giorno 7 di allattamento (da 9).

^(b) Esposizione al BPA dal giorno 11 al 18 di gravidanza (da 8).

Bibliografia

1. McLachlan, J. A. Environmental Signaling: What embryos and evolution teach us about endocrine disrupting chemicals. *Endocrine Rev* 2001;22:319-41
2. Palanza P, vom Saal FS. Effects of Endocrine Disruptors on Behaviour and Reproduction. In: Dell'Omo G. (Ed.). *Behavioural Ecotoxicology* Chichester: John Wiley & Sons; 2002. p. 377-408.

3. Panzica G, Viglietti-Panzica C, Mura E, Quinn M, Palanza P, Ottinger A. Effects of xenoestrogens on the differentiation of behaviorally relevant neural circuits. *Frontiers in Neuroendocrinology* 2007;28(4):179-200.
4. Colborn T, Smolen MJ, Rolland R. Environmental neurotoxic effects: The search for new protocols in functional teratology. *Environmental Health Perspectives* 1998;14:9-23.
5. Palanza P, Morellini F, vom Saal FS, Parmigiani S. Prenatal exposure to Endocrine disrupting chemicals: Effects on behavioral development. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 1999;23(7):1011-27.
6. Colborn T, Vom Saal FS, Soto AM. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environmental Health Perspectives* 1993;101:378-84.
7. Vandenberg LN, Hauser R, Marcus M, Olea N, Welshons WV. Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reprod Toxicol* 2007;24:139-77.
8. Laviola G, Gioiosa L, Adriani W, Palanza P. d-Amphetamine-related reinforcing effects are reduced in mice exposed prenatally to estrogenic endocrine disruptors. *Brain Res Bull* 2005;65:235-40.
9. Gioiosa L, Fissore E, Parmigiani S, Palanza P. Developmental exposure to low doses of environmental estrogens alters sex differences in exploration and emotional behavior in mice. *Horm Behav* 2007;52:307-16.
10. Palanza P, Gioiosa L, vom Saal FS, Parmigiani S. Effects of developmental exposure to bisphenol-A on brain and behavior in mice. *Env Res* 2008(108);2: 150-7.

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 intereferenti 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.

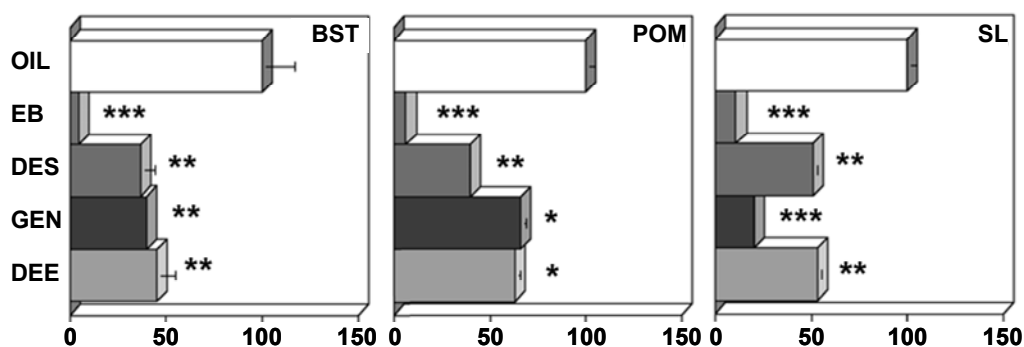


Figura 1. Effetti dei trattamenti in ovo con diversi XE sull'innervazione a vasotocina del SL e del BST. Dati espressi in percentuale rispetto ai controlli. Tutti i trattamenti inducono una significativa riduzione dell'innervazione (modificata da Panzica *et al.*, 2007)

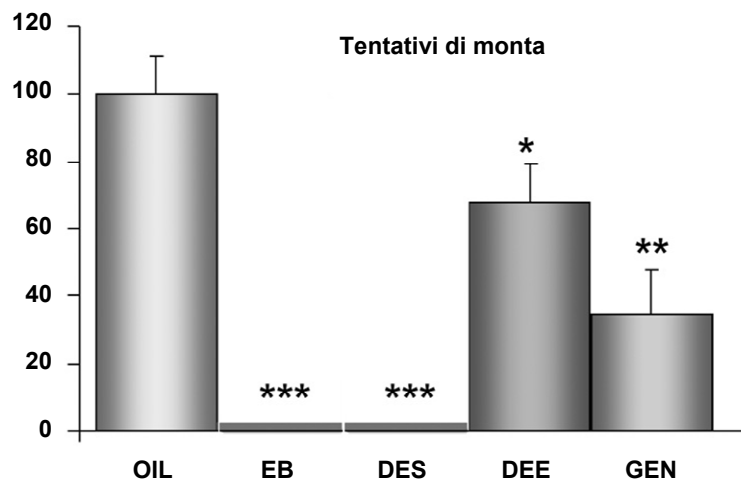


Figura 2. Comportamento copulatorio maschile (tentativi di monta espressi come percentuale di quelli espressi dai controlli). Tutti i trattamenti con XE hanno indotto un decremento del comportamento copulatorio, massimo nel caso del DES e dell'estradiolo benzoato, minimo nel caso del DDE

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.

EFFETTI NEUROCOMPORTAMENTALI DELL'ESPOSIZIONE A INTERFERENTI ENDOCRINI IN RODITORI DI LABORATORIO

Daniela Santucci (a), Igor Branchi (a), Virginia Belloni (b), Enrico Alleva (a)

(a) *Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(b) *Dipartimento di Biologia animale e Genetica, Università di Firenze*

Il problema emergente delle sostanze note come *Endocrine Disrupting Chemicals* (EDC) ha provocato negli ultimi anni un interesse notevolissimo ed è attualmente argomento di approfondito dibattito nella comunità scientifica e in tutte le sedi competenti in materia di tutela della salute. La possibilità che sostanze chimiche contaminanti disperse nell'ambiente, nel cibo o nell'acqua possano interferire con l'azione del sistema endocrino, anche a livelli di esposizione molto bassi, rappresenta un problema rilevante e attuale di sanità pubblica e di gestione dei pertinenti rischi ambientali. È stato suggerito che gli EDC abbiano già influenzato grandemente lo sviluppo e la riproduzione nell'uomo e, sebbene allo stato attuale delle conoscenze non sia possibile stabilire chiare relazioni causa-effetto, l'impatto sanitario e ambientale appare talmente considerevole che tale problema ha acquisito carattere di urgenza: un mancato riscontro potrebbe infatti determinare gravi implicazioni sia sociali che economiche.

Validazione dei metodi a fini di screening e di definizione del rischio (*testing strategies* /modelli animali e saggi di laboratorio)

Gli effetti endocrini non sono suscettibili di essere analizzati mediante un set di saggi tossicologici generici, in quanto pur essendo questi in grado di rilevare parecchi degli effetti funzionali o su organi bersaglio, tali test sono generalmente inefficaci nell'individuare effetti apparentemente sottili come alterazioni nell'omeostasi sistema nervoso/sistema endocrino, assolutamente critiche per un normale sviluppo ontogenetico. La natura particolare di tali sostanze e le caratteristiche dei sistemi con i quali queste possono interagire rende specificatamente necessaria la validazione di metodi adeguati per la valutazione del rischio da esposizione e degli effetti. La curva dose-risposta per gli EDC, per esempio, può differire da quella normalmente associata con altri tossici chimici (la più classica curva monotonica) rendendo particolarmente difficile la predizione della natura degli effetti e della loro intensità al variare della dose di esposizione. Va quindi considerata la possibilità di rivedere la metodologia classica per lo screening tossicologico impiegando un più ampio spettro di dosi, specifiche metodologie e specifici disegni sperimentali per saggi standardizzati, utili all'inclusione o definitiva esclusione di agenti a potenziale attività ED.

La comprensione delle proprietà di tali composti chimici, così come l'identificazione di metodi atti alla valutazione della loro potenziale azione biologica, sono di grande importanza per la valutazione del rischio e per le iniziative regolamentatorie che andranno eventualmente intraprese, quali per esempio innovazioni o variazioni nella vigente normativa. Sebbene possa risultare importante saggiare un gran numero di prodotti chimici esistenti o quelli di nuova

sintesi per le loro potenziali caratteristiche ED a prescindere dal loro uso, questo sarebbe estremamente dispendioso e richiederebbe molto tempo: sorge quindi la necessità di formulare “criteri” con i quali saggiare i composti chimici che tengano in considerazione la struttura chimica così come la relazione struttura/attività, le caratteristiche di bioaccumulo, la persistenza e gli effetti tossicologici dovuti all’interazione con il sistema endocrino. Se studi *in vitro* si rendono particolarmente utili per la comprensione dei meccanismi e per la conferma di potenziali effetti nocivi, la valutazione del rischio associato a esposizione a EDC si dovrebbe tuttavia basare su studi *in vivo*.

Effetti dell’esposizione perinatale all’atrazina sul comportamento sociale del topo immaturo

I risultati di alcune ricerche condotte nel nostro laboratorio e finalizzate alla valutazione di effetti di breve, medio e lungo termine dell’esposizione a sostanze appartenenti a diversi gruppi di ED (PCB, PBDE, atrazina) indicano come solo la caratterizzazione fine di elementi comportamentali individuati nell’ambito più generale dei repertori comportamentali di roditori possano evidenziare effetti sottili ma significativi, dell’esposizione a tali sostanze. In particolare, il comportamento di topi esposti nelle prime fasi di vita postnatale a dosi ecologicamente compatibili del pesticida di ampio utilizzo atrazina (Figura 1), indica come la perturbazione dell’equilibrio ormonale durante una fase sensibile dello sviluppo possa avere un’influenza di medio-lungo termine sui sistemi neurochimici dell’SNC, determinando nei maschi una femminilizzazione della componente investigativa e affiliativa del comportamento sociale, che presenta un andamento sessualmente dimorfico in questa specie. Nei maschi l’esposizione perinatale all’atrazina determina una chiara alterazione nei comportamenti investigativi-affiliativi. In particolare il trattamento ATB induce un potenziamento in tali elementi comportamentali che, pur seguendo il classico profilo di abitudine, si mantengono a frequenze più alte nei tre intervalli rispetto al gruppo di controllo.

L’atrazina, un membro clorinato della famiglia delle triazine, è un erbicida pre-e post-emergenza, che agisce interferendo con il processo fotosintetico ed è attualmente uno dei più ampiamente utilizzati in agricoltura e in selvicoltura. In natura si è osservato un forte impatto sugli ecosistemi, prevalentemente su quelli acquatici e l’esposizione umana a tale sostanza è stata ormai confermata e studi recenti indicano livelli di contaminazione attraverso la dieta di 0,046-0,286 µg/kg al giorno in accordo con i parametri stabiliti dall’*Environmental Protection Agency* (1).

L’atrazina sembrerebbe influenzare la differenziazione sessuale, attivando l’aromatasi (2). È noto che alcuni aspetti del comportamento sociale dei giovani mammiferi, come il gioco nei ratti, siano modulati direttamente dagli androgeni perinatali e quindi non mediati dall’aromatizzazione del testosterone, come invece avviene nel comportamento sessuale. Gli effetti sul comportamento sociale potrebbero quindi essere mediati dall’azione dell’aromatasi risultante in un aumento degli estrogeni e in un abbassamento dei livelli di testosterone in specifiche aree dell’SNC. L’alterazione di importanti funzioni comportamentali, come il comportamento sociale e il gioco, possono influenzare lo sviluppo di adeguate competenze in età adulta, non essendo la differenziazione ormonale delle strutture del cervello l’unico fattore rilevante. In varie specie di mammiferi è stato infatti osservato come l’individuo raggiunga le appropriate competenze riproduttive in età adulta solo in seguito a un’adeguata esperienza socio-sessuale nel periodo peripuberale.

La perturbazione dei sistemi ormonali endogeni durante l'ontogenesi può interferire dunque non solo con la morfo-funzionalità degli organi riproduttivi, ma anche con il sistema nervoso in sviluppo e quindi con le risposte comportamentali degli animali che sono esposti a sostanze ormonalmente attive. Il comportamento sociale nel topo immaturo presenta chiare caratteristiche dimorfiche con femmine maggiormente sociali e gregarie e maschi maggiormente aggressive, e appare un paradigma praticabile per la valutazione mediante saggi *in vivo* delle proprietà xenoestrogeniche agoniste o antagoniste di microcontaminanti ambientali, in particolare per i loro effetti sullo sviluppo del sistema nervoso e del comportamento.

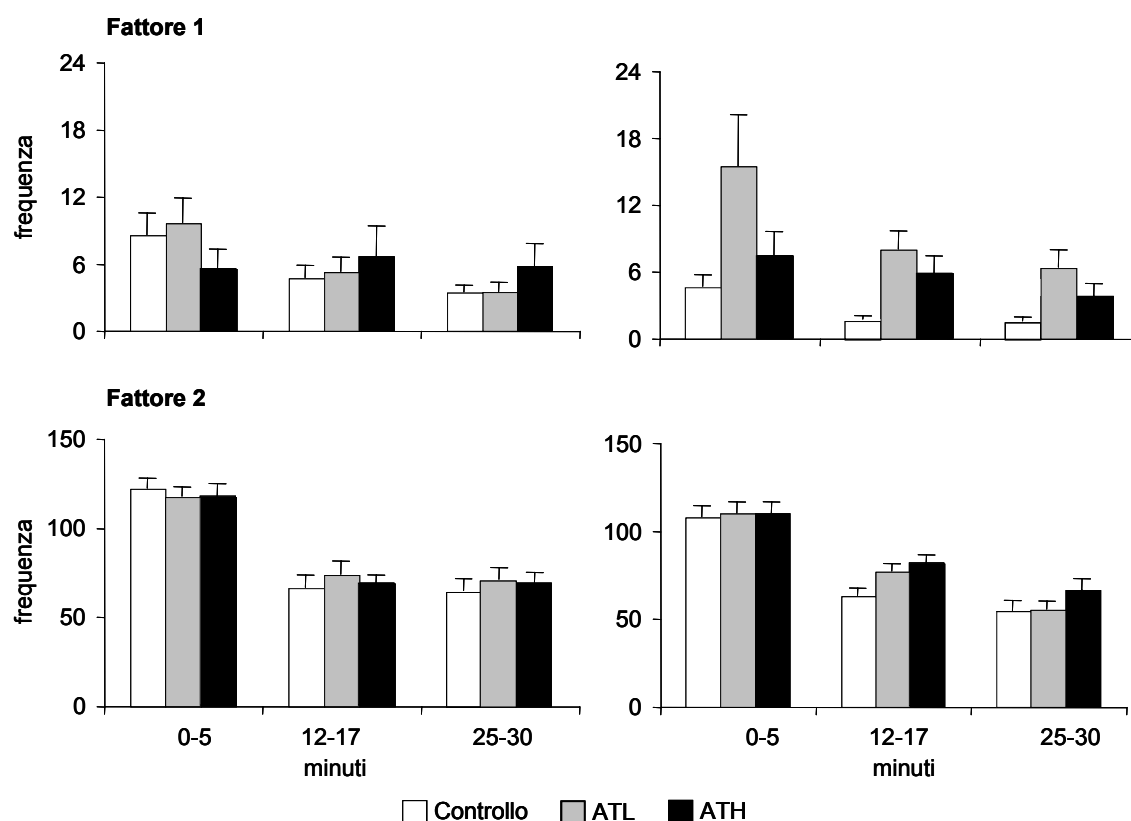


Figura 1. Effetti di somministrazioni perinatali di Atrazina (ATZ), sulla frequenza (media $\pm$ SE) di comportamenti di topo raggruppati secondo fattori (Analisi delle componenti principali). Fattore 1: *squire, genital sniff, following, allogrooming*; Fattore 2: *explore, wall rearing, sniff* in topi femmina (pannello a sinistra) e topi maschi (pannello a destra) al giorno postnatale 31. ATL, atrazina, dose bassa; ATH, dose alta

Bibliografia

1. Gammon DW, Aldous CN, Carr WC Jr, Sanborn JR, Pfeifer K.F. A risk assessment of atrazine use in California: human health and ecological aspects. *Pest Management Science* 2005;61:331-55.
2. Sanderson JT, Seinen W, Giesy JP, van den Berg M. 2-Chloro-striazine herbicides induce aromatase (CYP19) activity in H295R human adrenocortical carcinoma cells: a novel mechanism for estrogenicity? *Toxicol Sci* 2000;54:121-7.

Bibliografia di approfondimento

Alleva E, Francia N, Pandolfi M, De Marinis AM, Chiarotti F. and Santucci D. Organochlorine and heavy-metal contaminants in wild mammals and birds of the Urbino-Pesaro province, Italy: an analytic overview for potential bioindicators. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 2005;51:123-34.

Belloni V, Alleva E, Dessi-Fulgheri F, Zaccaroni M, Santucci D. Effects of low doses of atrazine on the neurobehavioural development of mice. *Ethology Ecology & Evolution* 2007;19:309-22.

Branchi I, Capone F, Vitalone A, Madia F, Santucci D, Alleva E, Costa LG. Early developmental exposure to PBDE 99 or Aroclor 1254 affects neurobehavioural profile: interference from the administration route. *Neurotoxicology* 2005;26:183-92.

Davies PE, Cook LSJ, Goenarso D Sublethal responses to pesticides of several species of Australian freshwater fish andn crustaceans and rainbow trout. *Environ Toxicol Chem* 1994;13(8):1341-54.

Giusi G, Facciolo RM, Canonaco M. Alleva E, Belloni V, Dessi-Fulgheri F, Santucci D. The endocrine disruptor atrazine accounts for a dimorphic somatostatinerbic neuronal expression pattern in mice. *Toxicological Sciences* 2006;89: 257-64.

Hayes TB, Collins A, Lee M, Mendoza M, Noriega N, Stuart AA, Vonk A. Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 2002;99:5476-80.

Puopolo M, Santucci D. Chiarotti F, Alleva E. Behavioural effects of endocrine disrupting chemicals on laboratory rodents: statistical methodologies and an application concerning developmental PCB exposure. *Chemosphere* 1999;39:1259-71.

Santucci D, Puopolo M, Chiarotti F, Alleva E. Neurobehavioural endpoints of endocrine disrupters in laboratory rodents: methodological and regulatory (testing guidelines) issues. *Umwelt Bundes Amt (UBA) Texte* 1998;50:114-28.

PARTE II

Contributi della rete di collaborazione italiana sugli interferenti endocrini

LA COMUNICAZIONE DEL RISCHIO: L'AREA TEMATICA "INTERFERENTI ENDOCRINI"

Francesca Baldi, Alberto Mantovani

Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Istituto Superiore di Sanità, Roma

L'uso sempre più quotidiano di Internet ha facilitato la reperibilità di informazioni scientifiche anche da parte di un pubblico non esperto ed ha permesso la diffusione di documentazione scientifica (compresa la letteratura grigia) che prima era rintracciabile solo sotto forma cartacea.

Negli ultimi anni nuovi strumenti sono stati sviluppati per selezionare informazioni scientifiche di qualità attraverso l'uso di portali specializzati; in aggiunta nuove metodologie di distribuzione delle informazioni quali i feed RSS, i podcast stanno introducendo nuovi standard comunicativi; tali strumenti stanno modificando non solo il comportamento del ricercatore che usa la rete per aggiornarsi, ma anche dell'utente non specializzato che si affida a essa per reperire maggiori informazioni.

Il *World Wide Web* è un potente strumento con cui è stato possibile sviluppare diversi siti e portali specializzati che riescono a fornire tutte le informazioni richieste in un linguaggio semplice e in grado di stimolare l'utente a ulteriori approfondimenti.

L'area tematica "interferenti endocrini" (IE), raggiungibile all'indirizzo www.iss.it/inte, all'interno del sito del Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, si propone di fornire informazioni aggiornate sulle attività e sugli aspetti emergenti a livello nazionale e internazionale, mediate una versione completa anche in lingua inglese, rappresentando così un utile strumento di lavoro per la ricerca, l'intervento, la formazione e l'informazione su un tema importante per la sicurezza alimentare nonché per l'ambito più generale della prevenzione primaria. L'area tematica è strutturata in varie sezioni: particolare rilievo viene dato a nuovi aspetti, (riportati nella sezione "Aspetti Emergenti"), come quelli associati a eventuali allarmi (esempi recenti sono i neonicotinoidi e gli idrocarburi policiclici aromatici). Infatti, la caratterizzazione dei possibili rischi associati all'esposizione a IE è una delle nuove priorità per la sicurezza degli alimenti e dell'ambiente. Altre sezioni di particolare rilievo sono: le "Note scientifiche", una vetrina di pubblicazioni dell'Istituto Superiore di Sanità nonché della ricerca italiana su temi inerenti gli IE, una sezione introdotta recentemente riguardante EDID: un database interamente dedicato alle interazioni tra IE e dieta; un'aggiunta al progetto iniziale del sito IE è stata la sezione dedicata all'infanzia identificata dalla Strategia Europea per l'Ambiente e la Salute come una fascia particolarmente a rischio per i possibili effetti a lungo termine sulla salute derivanti dall'esposizione ad IE e ad altri fattori associati all'alimentazione, agli stili di vita e all'ambiente.

L'Istituto Superiore di Sanità ricopre un ruolo di primo piano nella ricerca italiana sugli IE, contribuendo alla formazione di una rete multidisciplinare di competenze, interne ed esterne all'ISS, dalla biologia molecolare alla tossicologia sperimentale, dalla valutazione dell'esposizione alimentare e ambientale al monitoraggio biologico; l'area tematica IE ha contribuito alla diffusione della conoscenza di problematiche, relative alla ricerca che opera nel settore, allo stabilirsi della rete di collaborazioni e alla comunicazione del rischio verso gli operatori sanitari, i mass media e i cittadini.

EFFETTO DI SOSTANZE AMBIENTALI AD AZIONE ESTROGENICA SULLA SECREZIONE DI CITOCINE DA PARTE DELLA PLACENTA UMANA

Nicoletta Bechi (a), Roberta Romagnoli (a), Giuseppina Sorda (a), Ilaria Corsi (b), Tommaso Serchi (c), Marco Cencini (d), Gianmichele Galassi (e), Luana Paulesu (a), Francesca Ietta (a)

(a) Dipartimento di Fisiologia, Università di Siena

(b) Dipartimento di Scienze Ambientali, Università di Siena

(c) Dipartimento di Clinica Medica e Scienze Immunologiche, Unità di Reumatologia, Università di Siena

(d) Reparto di Ostetricia e Ginecologia, USL 7, Ospedale Campostaggia, Siena

(e) Dipartimento di Fisica, Statistica Medica, Università di Siena

Gli *Endocrine disrupter chemicals* (EDCs) (erbicidi, fungicidi, insetticidi, chimici industriali) sono inquinanti ambientali, derivati dalla lavorazione sia agricola che industriale, che possono influenzare la salute riproduttiva dell'uomo (1). Recentemente il nostro gruppo ha dimostrato che il *para*-nonilfenolo (*p*-NP), un metabolita degli alchilfenoli ampiamente utilizzato nelle industrie chimiche e manifatturiere, induce la differenziazione e l'apoptosi nella placenta al primo trimestre di gravidanza (2). In seguito a questi risultati, abbiamo ipotizzato che il *p*-NP possa influenzare la secrezione di citochine da parte della placenta umana. Lo scopo del presente studio è stato quello di analizzare l'effetto del *p*-NP sulla secrezione di citochine utilizzando un modello *in vitro* di espianti di placenta umana a primo trimestre di gravidanza. Le colture di espianti di placenta erano trattate con *p*-NP (10^{-13} , 10^{-11} , 10^{-9} M) o con il solo etanolo 0.1%, veicolo in cui è dissolto il *p*-NP (colture controllo). Dopo 24 ore di incubazione il terreno di coltura degli espianti era raccolto e analizzato con il metodo Luminex usando uno specifico Saggio Immunologico (*Human Multiplex Bead Immunoassay*) per le seguenti citochine: GM-CSF, IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- α . La citochina MIF era analizzata con un Saggio Immunologico Colorimetrico (ELISA). Il *p*-NP modula la secrezione di citochine, in particolare induce il rilascio di GM-CSF, IFN- γ , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8 e IL-10 mentre riduce la secrezione di MIF e TNF- α . I livelli di IL-2 e IL-5 rimanevano sotto il limite di detenzione sia nelle colture controllo che in quelle trattate con il *p*-NP. Uno sbilanciamento del network di citochine secrete all'interfaccia materno-fetale potrebbe comportare complicazioni durante la gravidanza come mancanza di impianto della blastocisti, aborto o patologie per la madre come la pre-eclampsia. Questi risultati sull'effetto del *p*-NP, sul rilascio di citochine da parte della placenta umana al primo trimestre di gravidanza, scatenano preoccupazioni sui possibili scenari che si possono presentare in caso di esposizione della donna in gravidanza a questo tipo di sostanze.

Bibliografia

1. Weiss B. A risk assessment perspective on the neurobehavioral toxicity of endocrine disruptors. *Toxicol Ind Health* 1998;14:341-59.
2. Bechi N, Ietta F, Romagnoli R, Focardi S, Corsi I, Buffi C, Paulesu L. Estrogen-like response to *p*-nonylphenol in human first trimester placenta and BeWo choriocarcinoma cells. *Toxicol Sci* 2006;93(1):75-81.

EFFETTI CEREBRALI DEGLI OBESOGENI

Elisabetta Bo, Daniela Sterchele, Carla Viglietti-Panzica, Giancarlo Panzica

Dipartimento di Anatomia, Farmacologia, Medicina Legale, Università degli Studi di Torino

Numerose sostanze naturali o artificiali presenti nell'ambiente e negli alimenti, note come "interferenti endocrini" sono in grado di interferire con i sistemi ormonali dei vertebrati. Tra queste sostanze troviamo la tributiltina (TBT), un biocida largamente usato nelle vernici per imbarcazioni, che agirebbe come obesogeno attivando i recettori RXR e PPAR e inducendo la sintesi di geni adipogenici responsabili del differenziamento degli adipociti (1).

Scopo di questo lavoro è stato valutare se l'esposizione precoce alla TBT potesse alterare irreversibilmente i circuiti preposti al controllo dell'assunzione di cibo e quindi predisporre in maniera congenita all'obesità.

Per l'esperimento sono stati utilizzati topi del ceppo Y1R/LacZ, che hanno il promotore del recettore Y1 legato al gene reporter LacZ che esprime la beta galattoridasi, la cui attività enzimatica può essere evidenziata con una reazione istochimica, rendendo facilmente localizzabile il recettore (2). La TBT, sciolta in olio di oliva, è stata somministrata per via orale alla dose di 0,025 µg/g peso corporeo ad animali adulti per un periodo di 4 settimane e a femmine gravide dall'ottavo giorno di gestazione fino al ventunesimo giorno di svezzamento dei cuccioli (sacrificio).

Gli adulti trattati di entrambi i sessi mostrano una riduzione significativa nel consumo di cibo rispetto ai controlli, mentre non si è rilevata nessuna differenza di peso. Al contrario si è osservata una forte riduzione dei livelli di leptina ematica nei trattati rispetto ai controlli. Questo dato suggerisce un effetto obesogeno indiretto: riduzione nell'assunzione di cibo ma non del peso e crollo dei valori di leptina, spia di una possibile alterazione dei circuiti per l'assunzione di cibo. Per quanto riguarda i cuccioli, abbiamo osservato una riduzione significativa del peso alla nascita nei topi nati da madri esposte alla TBT rispetto a topi nati da madri non esposte, accompagnata da livelli di leptina elevati al momento del sacrificio (P21). Il dato è in accordo con recenti studi in cui è stato dimostrato che trattamenti neonatali con leptina in ratti maschi normali possono provocare resistenza alla leptina e incrementare il peso corporeo nella vita adulta (3). Sono state, inoltre, analizzate sezioni di encefalo tagliate al criostato e processate per l'analisi immunoistochimica con l'anticorpo anti-NPY. I dati ottenuti indicano una riduzione significativa nell'espressione del peptide solo nei maschi trattati rispetto ai controlli, nei nuclei paraventricolare (PVN) e dorso mediale (DM). Questo dato è interessante se consideriamo i bassi livelli di leptina circolante, che avrebbero fatto ipotizzare una tendenza inversa.

Questi studi sono stati condotti con i finanziamenti della Regione Piemonte e dell'Università degli Studi di Torino.

Bibliografia

1. Grun F, Blumberg B. Environmental obesogens: organotins and endocrine disruption via nuclear receptor signaling. *Endocrinology* 2006;147:S50-S55.
2. Oberto A, Tolosano E, Brusa R, Altruda F, Panzica GC, Eva C. The murine Y1 receptor 5' upstream sequence directs cell-specific and developmentally regulated LacZ expression in transgenic mice CNS. *The European journal of neuroscience* 1998;10(10):3257-68.
3. Toste FP, De Moura EG, Lisboa PC, Fagundes AT, De Oliveira E, Passos MC. Neonatal leptin treatment programmes leptin hypothalamic resistance and intermediate metabolic parameters in adult rats. *Br J Nutr* 2006;95:830-7.

RESIDUI DI FITOSANITARI IN FLUIDI BIOLOGICI UMANI E VALUTAZIONE DELL'ESPOSIZIONE IN POPOLAZIONE GENERALE DI UN COMUNE SICILIANO: PROGETTAZIONE DI UNO STUDIO

Giuseppe Calamusa (a), Nino Romano (a), Alberto Firenze (a), Maria Di Pasquale (b), Emanuele Amodio (b), Anna Maria Di Noto (c), Cinzia Cardamone (c), Teresa D'Oca (c), Francesco Vitale (a)

(a) *Dipartimento di Scienze per la Promozione della Salute, Sez. Igiene, Università degli Studi di Palermo*

(b) *Scuola di Specializzazione Igiene e Medicina Preventiva, Università degli Studi di Palermo*

(c) *Istituto Zooprofilattico Sperimentale, Palermo*

Nel 2006 la Sicilia è stata la regione del mezzogiorno a più alto consumo di prodotti fitosanitari e con la più alta quantità distribuita per ettaro di superficie trattabile, con la provincia di Trapani che ne ha assorbito circa un terzo del totale (1). Pertanto, è stato programmato uno studio in un Comune ad alta vocazione agricola di questa provincia (circa 7000 abitanti), con l'obiettivo di stimare il reale impatto dei prodotti fitosanitari sulla salute umana e di individuare possibili segmenti di popolazione a maggior rischio. Lo studio si propone inoltre di valutare l'esposizione anche di tipo non lavorativo.

Saranno arruolati circa 800 soggetti, stratificati per età e sesso secondo la piramide dell'età, estratti random dall'anagrafe assistiti del Comune. I soggetti arruolati, secondo un calendario prestabilito e tramite i medici di medicina generale e pediatri di libera scelta, saranno sottoposti ad un questionario suddiviso in cinque sezioni (parte anagrafica, anamnesi personale, patologica prossima e remota, stili di vita, fonti d'esposizione) e ad un prelievo di sangue e di un campione d'urina delle 12 ore. Sui campioni biologici ottenuti sarà effettuata la ricerca dei biomarcatori e dei residui di DDT, lindano, endosulfan, parathion e parathion methyl, azinphos-metile, mancozeb, 2,4diclorofenossiacetico. Le analisi saranno effettuate mediante tecniche gascromatografiche e di cromatografia liquida (2).

La presenza di residui di fitofarmaci nei campioni biologici della popolazione osservata sarà rapportata con le possibili fonti di esposizione al fine di costituire una base di dati oggettivi sulla presenza di residui, valutare le possibili vie di esposizione in rapporto a quanto riscontrato, ipotizzare strategie di prevenzione mirate.

Bibliografia

1. Istituto Nazionale di Statistica. *La distribuzione per uso agricolo dei prodotti fitosanitari. Anno 2006*. Roma: ISTAT; 2007.
2. Aprea C, Colosio C, Mamone T, Minoia C, Maroni M. Biological monitoring of pesticide exposure: a review of analytical methods. *J Chromatog B* 2002;769:191-219.

VALUTAZIONE DELLA CONTAMINAZIONE DA DIOSSINE IN CAMPIONI DI LATTE E ALIMENTI ZOOTECNICI IN REGIONE CAMPANIA

Stefania Cavallo (a), Mauro Esposito (b), Germana Colarusso (a), Rosa D'Ambrosio (a), Pasquale Gallo (b), Loredana Baldi (a), Luigi Serpe (b)

(a) Osservatorio Regionale Sicurezza Alimentare (ORSA), Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno (IZSM), Portici, Napoli

(b) Dipartimento di Chimica, Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno (IZSM), Portici, Napoli

Diossine e PCB/dl sono un gruppo di sostanze molto note sia per la tossicità che per l'interferenza endocrina. In Campania la sorveglianza sulla contaminazione è garantita da diversi piani, sia nazionali che regionali.

Dal 1° gennaio 2008 al 31 agosto 2008 i piani nazionali e regionali hanno portato al campionamento di quasi tutti gli allevamenti bufalini campani e di un gran numero di aziende bovine e ovicaprine.

Nel periodo di riferimento sono stati effettuati 1001 prelievi per diossine: sono state campionate 472 aziende zootecniche, per un totale di 629 campioni di latte (di cui 611 refertati) e 372 di alimento zootecnico. Per il latte, i valori rispetto al contenuto in diossine sono:

- 209 campioni > 3 pg-TEQ/g di grasso (34,21%).
- 87 campioni compresi tra 2 e 3 pg-TEQ/g di grasso (14,24%).
- 315 campioni < 2 pg-TEQ/g di grasso (51,55%).

Dei 372 campioni di alimento zootecnico prelevati (di cui 365 refertati), i valori sono:

- 43 campioni > 0,75 pg-TEQ/g al 12% di umidità (11,78%).
- 17 campioni compresi tra 0,5 e 0,75 pg-TEQ/g al 12% di umidità (4,66%).
- 305 campioni < 0,5 pg-TEQ/g al 12% di umidità (83,56%).

Le aziende non conformi su latte hanno poi ricevuto campionamenti di controllo, i quali hanno evidenziato che delle 114 aziende zootecniche non conformi per latte il 50,88% era rientrata nei valori consentiti per la commercializzazione del latte, il 15,79% aveva raggiunto valori prossimi alla liberalizzazione, mentre il 33,33% presenta valori di diossine ancora superiori ai limiti massimi consentiti. Lo studio dei profili dei congeneri di PCDD e PCDF può essere utile per determinare le cause di contaminazione: in letteratura sono descritti molti casi di correlazioni tra pattern di differenti matrici (latte/alimenti zootecnici) e differenti specie oltre alla descrizione dell'influenza di siti di combustione termica sulla distribuzione dei congeneri.

I dati derivanti dall'attività di prelievo evidenziano che la maggior parte del territorio campano presenta livelli di diossine comparabili a quelli presenti in letteratura, circoscrivendo la zona maggiormente contaminata ad una porzione delle province di Caserta e Napoli, in particolare nei territori dell'ASL CE/2(83,33%), seguita dall'ASL CE/1 (12,28%) e dall'ASL NA/2(2,63%). I piani tuttora in corso hanno lo scopo di continuare l'attività di monitoraggio a garanzia della sicurezza alimentare dei consumatori.

Bibliografia

1. Alcock RE, Sweetman AJ, Anderson DR, Fisher R, Jennings RA, Jones KC. Using PCDD/F congener patterns to determine the source of elevated TEQ concentrations in cows milk: a case study. *Chemosphere* 2002;46:383-91.

ESPOSIZIONE A PCB DURANTE LO SVILUPPO E MODIFICAZIONI DELLE FUNZIONI NEUROENDOCRINE, METABOLICHE E DEL COMPORTAMENTO: UNO STUDIO INTEGRATO

Fabio Celotti (a), Daniela Cocchi (b), Angela Santagostino (c), Maria Valeria Vergoni (d)

(a) *Dipartimento di Endocrinologia Fisiopatologia e Biologia Applicata, UR INBB, Università degli Studi di Milano*

(b) *Dipartimento di Scienze Biomediche e di Biotecnologia, Div. Farmacologia e Tossicologia, Università di Brescia*

(c) *Dipartimento di Scienze Ambientali, Università di Milano-Bicocca*

(d) *Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Modena e Reggio Emilia*

Scopo dello studio è stato quello di valutare nel ratto (dalla nascita all'epoca adulta) gli effetti di un'esposizione prenatale e durante l'allattamento a una miscela dei PCB più abbondanti nei tessuti animali e nel latte (PCB 138, 180, 153, 126); sono stati esaminati numerosi parametri metabolici, endocrini e comportamentali strettamente correlati tra di loro, considerando separatamente gli effetti in maschi e femmine. La miscela è stata iniettata s.c. dal 15° al 19° giorno di gestazione alla dose di 10mg/kg/die. Durante l'allattamento le madri sono state trattate con una dose doppia due volte alla settimana fino allo svezzamento (PN21). Gli studi di accumulo nel fegato e nell'SNC dimostrano che, durante la gestazione, la placenta agisce come un'efficiente barriera che limita ma non annulla il passaggio dei PCB al feto, mentre il periodo di allattamento rappresenta la finestra temporale più rischiosa per la prole, come dimostrato dagli alti livelli di accumulo nei tessuti e dalla marcata induzione dei meccanismi epatici di detossificazione (CYP450) praticamente limitati al periodo di allattamento.

L'esposizione non ha prodotto effetti tossicologici rilevanti sui principali parametri di sviluppo della prole ad eccezione di una riduzione del peso corporeo, significativa a partire dallo svezzamento in entrambi i sessi. Gli effetti sull'asse somatotropo, misurati negli animali adulti, sono stati contrastanti: a fronte di un aumento del contenuto in somatostatina nei nuclei periventricolare e arcuato laterale dell'ipotalamo e della diminuzione del contenuto di GH ipofisario, si è osservato un aumento della concentrazione plasmatica di IGF-1 e un parallelo inspessimento della cartilagine tibiale. Non si sono osservate modificazioni di rilievo nei livelli circolanti di T3 e T4.

Risultati interessanti si sono ottenuti sulla mineralizzazione ossea: si è infatti osservato un decremento del contenuto minerale dell'osso associato alla diminuzione dello spessore della corticale, specificamente nel maschio.

Per quanto concerne il sistema riproduttivo, si è verificata una significativa anticipazione della pubertà nelle femmine trattate, mentre i maschi sono andati incontro a un ritardo nella discesa testicolare. Ciclicità estrale e comportamento lordotico non hanno subito modificazioni; nei maschi i livelli di testosterone non sono risultati alterati ma si è notato un generale rallentamento nei parametri di comportamento sessuale. A livello ipotalamico si sono riscontrate significative modificazioni tempo e sesso specifiche nell'espressione di enzimi coinvolti nella formazione di steroidi neuroattivi (aromatasi e 5alfa-riduttasi) e dei recettori degli ormoni sessuali. Sempre a livello comportamentale si è osservata un'importante riduzione nel mantenimento della ritenzione mnemonica a breve termine nel maschio, mentre non si sono

verificate variazioni né dei livelli di serotonina né delle caratteristiche (B_{max} e K_d) dei suoi recettori.

In conclusione, questo studio integrato ha prodotto risultati interessanti circa i possibili meccanismi alla base degli effetti tossici esercitati da un'esposizione ai PCB durante la gravidanza e/o l'allattamento sul sistema neuroendocrino e sulla qualità dell'osso. Le alterazioni si sono dimostrate spesso tempo- e sesso-specifiche. Dai dati di tossicocinetica appare chiaro che il periodo più critico per l'esposizione ai PCB è l'allattamento, anche se la gestazione rappresenta una finestra temporale a rischio in quanto la barriera emato-placentare non è in grado di evitare in modo completo il passaggio di PCB al feto.

SVILUPPO DI BIOSENSORI CELLULARI RICOMBINANTI BIOLUMINESCENTI PER ANALISI MULTIPLEXED DI INTERFERENTI ENDOCRINI IN CAMPIONI AMBIENTALI, ALIMENTARI E CLINICI

Luca Cevenini, Elisa Michelini, Laura Mezzanotte, Aldo Roda
Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università di Bologna

Una delle priorità della Commissione Europea riguarda lo sviluppo di nuove metodologie analitiche di screening, sia *in vitro* che *in vivo*, idonee per un efficiente monitoraggio ambientale e una più approfondita conoscenza dei meccanismi d'azione e della tossicità degli interferenti endocrini. Tale classe di composti è estremamente eterogenea dal punto di vista strutturale e ciò complica la messa a punto di metodi analitici convenzionali di screening rapidi e nello stesso tempo sensibili in grado di determinarne la concentrazione in matrici reali.

A questo scopo è stato sviluppato un biosensore cellulare bioluminescente che prevede l'impiego di cellule di lievito *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificate in modo da esprimere il recettore umano per gli androgeni, nelle quali è stato inoltre inserito un plasmide reporter in cui la sequenza *Androgen Responsive Element* (ARE) controlla l'espressione del gene reporter luciferasi (1). L'interazione del recettore con l'analita o con classi di composti con attività simil-ormonale causa la dimerizzazione del recettore con attivazione della sequenza specifica ARE e come conseguenza l'attivazione trascrizionale del gene reporter con produzione della proteina reporter luminescente. L'espressione della proteina reporter viene poi misurata tramite rivelazione luminescente mediante un fotomoltiplicatore o CCD. Per ingegnerizzare le cellule sono state utilizzate due luciferasi (2) con emissioni a diverse lunghezza d'onda (λ_{max} 556 e λ_{max} 613): una che consente di misurare l'attività androgenica del campione e l'altra utilizzata come controllo di vitalità cellulare.

Il biosensore consente di misurare l'attività delle luciferasi direttamente in piastra microtiter da 96 pozzetti semplicemente aggiungendo il substrato D-luciferina. L'inserimento di un controllo interno consente una correzione del segnale in presenza di stimoli aspecifici che possono alterare la vitalità cellulare, eliminando quindi la necessità di pre-trattare il campione e aumentando la robustezza del biosensore (variabilità intra-saggio 13% e variabilità inter-saggio 18%). Il biosensore è caratterizzato da un limite di rivelazione pari a 0,05 nM di testosterone, inoltre esso permette di effettuare analisi direttamente sul siero e campioni di urine utilizzando un volume di campione pari a 10 μL , con applicazioni anche nelle analisi anti-doping.

Le cellule sono state successivamente immobilizzate con altri biosensori cellulari ricombinanti specifici per estrogeni e altri distruttori endocrini (es. diossine e metalli pesanti) per ottenere un sistema di arrays con rivelazione ultra-sensibile mediante imaging a contatto con CCD o CMOS per consentire il monitoraggio sul campo e in tempo reale di campioni clinici, alimentari e ambientali.

Bibliografia

1. Michelini E, Magliulo M, Leskinen P, Virta M, Karp M, Roda A. *Clin Chem.* 2005;51(10):1995-8.
2. Michelini E, Cevenini L, Mezzanotte L, Ablamsky D, Southworth T, Branchini B, Roda A. *Anal Chem.* 2008;80(1):260-7.

L'ARSENICO INORGANICO NELLA DIETA: UN INTERFERENTE ENDOCRINO EMERGENTE

Silvia Ciardullo, Federica Aureli, Andrea Raggi, Alberto Mantovani, Francesco Cubadda
Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Istituto Superiore di Sanità, Roma

I composti dell'arsenico esistenti in natura sono alcune decine ed esiste un'ampia variabilità nella capacità dei diversi organismi animali e vegetali di accumulare alcuni di questi composti in luogo degli altri. La speciazione dell'arsenico, ovvero la sua distribuzione fra le diverse forme chimiche (specie), riveste un'importanza cruciale nella valutazione del rischio legato all'esposizione a questo elemento attraverso la dieta in quanto le diverse specie presentano differente tossicità. I composti inorganici dell'arsenico sono potenti cancerogeni umani; inoltre l'esposizione cronica a queste specie determina un aumento nel rischio d'insorgenza di numerose patologie non tumorali come ipercheratosi, ipertensione, diabete mellito e disturbi respiratori, neurologici, cardiovascolari. Fra le forme di arsenico inorganico, l'As trivalente è più tossico dell'As pentavalente. I composti mono e dimetilati dell'As pentavalente (acidi metilarsonico e dimetilarsinico) presentano tossicità inferiore. Vi è poi un gran numero di altre specie organiche dell'arsenico che sono ritenute atossiche, anche se il numero di composti identificati è in continua crescita e alcuni di essi non sono pienamente caratterizzati dal punto di vista tossicologico.

Gli organismi marini presentano concentrazioni molto elevate di arsenico totale, con una prevalenza di composti innocui – ad esempio l'arsenobetaina in pesci, crostacei, molluschi – o ritenuti tali, quali gli arsenoribosidi in molluschi e alghe. Nei prodotti ittici di acqua dolce, l'arsenobetaina riveste un ruolo meno preminente e la presenza di altre specie dell'arsenico, anche inorganiche, è molto legata all'esposizione ambientale. Al di fuori dei prodotti ittici, le concentrazioni di As totale negli alimenti sono generalmente basse ma aumenta il peso delle forme più tossiche. La matrice che desta maggiore preoccupazione è il riso, un alimento di base per estese popolazioni, nonché i prodotti da esso derivati (es. il latte di riso). Infine nelle matrici grasse (olio di pesce, pesci grassi) l'arsenico è presente sotto forma di arsenolipidi, composti che solo negli ultimi anni cominciano a essere studiati sistematicamente in termini d'identità chimica ed effetti biologici.

La presenza nell'acqua destinata al consumo umano di arsenico in concentrazioni vicine o superiori al valore guida provvisorio di 0,01 mg/L stabilito dall'OMS costituisce un problema sanitario che investe milioni di individui in numerose aree del mondo, trattandosi quasi esclusivamente di arsenico inorganico la cui origine risiede nella particolare geochimica degli acquiferi. Anomalie geochimiche possono determinare la presenza di elevate concentrazioni di As inorganico anche in alcune specie vegetali e animali che hanno limitate capacità di biotrasformazione delle forme inorganiche dell'elemento.

Ricerche recenti hanno stabilito che l'arsenico inorganico è un potente interferente endocrino che interagisce con la gran parte degli ormoni steroidei. A concentrazioni molto basse esso sembra alterare la funzione del recettore glucocorticoide quale fattore di trascrizione. L'alterazione dell'espressione genica mediante meccanismi recettoriali sembra coinvolgere anche gli ormoni mineralcorticoidi, il progesterone e gli androgeni. Particolare attenzione viene rivolta agli effetti a lungo termine conseguenti a un'esposizione durante lo sviluppo intrauterino e postnatale, sia per la facilità con cui l'arsenico inorganico attraversa la placenta sia per la vulnerabilità degli individui durante i primi stadi dello sviluppo.

Alla luce di queste evidenze, appare urgente disporre da un lato di un limite aggiornato per la massima assunzione tollerabile di As inorganico e dall'altro di accurate stime di esposizione all'As inorganico mediante la dieta per la popolazione italiana e in particolare per specifici gruppi potenzialmente a rischio in ragione di fattori specifici (abitudini alimentari, aree a rischio geochimico, fascia d'età).

SOSTANZE AD AZIONE FARMACOLOGICA E INDESIDERABILI IN ZOOTECNIA: EFFETTI TOSSICI E STRATEGIE DI CONTROLLO

Cinzia Civitareale, Paolo Stacchini, Maurizio Fiori

Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare Istituto Superiore di Sanità, Roma

La richiesta da parte del consumatore di un prodotto con determinate caratteristiche merceologiche (colore, preponderanza di massa magra con riduzione della componente grassa, potenziamento della produttività) ha indirizzato il settore zootecnico verso l'uso di sostanze in grado di modulare e modificare il metabolismo animale. Nella pratica zootecnica gli animali da reddito sono sottoposti a trattamenti di varia natura sia direttamente che attraverso il ricorso a mangimi opportunamente arricchiti.

Alcune sostanze farmacologicamente attive non solo vengono lecitamente usate a scopo terapeutico ma anche per aumentare, in modo fraudolento e illegale, la fibra muscolare/peso e diminuire i grassi di deposito. Tale pratica mette in pericolo la sicurezza degli alimenti oltre a ledere il benessere degli animali. Infatti composti come gli steroidi naturali e di sintesi, i tireostatici e i beta-agonisti possono provocare gravi alterazioni a carico degli organi bersaglio e il loro residuo nei prodotti di origine animale può rappresentare un grave rischio per la salute dei consumatori anche alla luce di potenziali effetti perturbatori a livello endocrino. Non può inoltre essere trascurata la modifica dei costituenti dell'alimento (profilo lipidico, proteico e alterazione del quadro microelementare) che sono conseguenti all'uso di tali sostanze.

Anche il grado di contaminazione da parte di composti presenti nell'ambiente delle materie prime utilizzate nella produzione dei mangimi (contaminazione di mangimi con diossine e PCB; metalli pesanti, micotossine, ecc.) influisce nel determinare il livello di salute animale e di conseguenza sulla qualità degli alimenti di origine animale.

In questo contesto la qualità delle produzioni zootecniche, sia attraverso la valutazione degli ingredienti di base che degli additivi utilizzati, costituisce il primo e ineludibile anello della catena di controllo nell'ambito delle diverse filiere alimentari.

Uno degli strumenti volto a garantire un alto grado di sicurezza, tanto per gli animali allevati quanto per la salute del consumatore, è il sistema nazionale dei controlli ufficiali che si esplica attraverso la predisposizione di piani nazionali per la ricerca dei residui (PNR) e per il controllo dei mangimi (PNAA).

Il potenziamento della ricerca nel settore mangimistico diviene fondamentale se si considera la scarsità di dati relativi al trasferimento di contaminanti dal mangime al prodotto destinato al consumo.

Inoltre l'esigenza di sviluppare e diffondere sistemi avanzati per la sorveglianza ambientale ed epidemiologica potrà rappresentare un impulso per il sistema ricerca e per l'innovazione tecnologica.

EFFETTI INTERATTIVI DELL'ESPOSIZIONE PERINATALE A METILMERCURIO E PCB153 SULLA DENSITÀ DEI RECETTORI COLINERGICI MUSCARINICI E SULL'ESPRESSIONE GENICA NEL TESSUTO NERVOSO

Teresa Coccini (a), Elisa Roda (b), Erminio Marafante (c), Graziella Cimino-Reale (c), Luigi Manzo (a, b)
(a) Servizio di Tossicologia, Centro Ricerche di Tossicologi Ambientale e Occupazionale, IRCCS

Fondazione Maugeri, Pavia

(b) Dipartimento di Medicina Interna, e Terapia Medica, Università degli Studi di Pavia

(c) Centro Comune di Ricerca, Istituto per la Salute e la Protezione del Consumatore, Ispra, Varese

Il metilmercurio (MeHg) e i bifenili policlorurati (PCB) sono contaminanti ambientali ampiamente diffusi con documentata azione neurotossica durante lo sviluppo e in particolare con effetti a carico delle funzioni cognitive. L'esposizione ai due contaminanti è assai comune e può essere simultanea trovandosi entrambi in prodotti ittici di ampia diffusione. Nel presente studio sono stati valutati gli effetti della co-esposizione a MeHg e PCB153 sul sistema colinergico in via di sviluppo, in particolare sui recettori colinergici muscarinici (MR) di cui è noto l'importante ruolo nei processi di apprendimento e della memoria. Mediante studi di saturazione condotti con tecniche di *receptor binding* è stata valutata la densità recettoriale (B_{max}) degli MR totali. Indagini di genomica (mRNA *microarray*) sono state effettuate per identificare le vie di espressione genica dei sottotipi recettoriali muscarinici (M1-M3 vs M2-M4) nel cervelletto e nella corteccia cerebrale di ratti alla nascita (PD1), allo svezzamento (PD21) e alla pubertà (PD36) dopo esposizione materna (da GD7 a PD21) a MeHg (0.5 mg/kg/die) e PCB153 (5 mg/kg/die) somministrati separatamente o in combinazione.

Nel cervelletto, il MeHg ha diminuito del 15% la densità degli MR negli animali di entrambi i sessi a PD21 (valori di controllo della B_{max} (media $\pm$ ES): 71 ± 14 e 76 ± 14 fmoli/mg proteine, rispettivamente nei maschi e nelle femmine). Limitatamente ai maschi, una ridotta B_{max} è stata rilevata anche a PD36 dopo esposizione a MeHg e/o PCB153. Nella corteccia cerebrale, una tardiva (PD36) diminuzione del 15% nella densità degli MR è stata osservata negli animali di entrambi i sessi dopo trattamento con MeHg, PCB153 e con la loro combinazione, senza però alcun effetto additivo. I valori di controllo erano 796.0 ± 121.8 e 793.9 ± 91.9 fmoli/mg proteine per la prole maschile e femminile, rispettivamente. Gli studi di espressione genica hanno mostrato rilevanti differenze tra maschi e femmine, e in rapporto alla fase dello sviluppo. In particolare, l'esposizione a MeHg e PCB153 induceva la modulazione di geni cerebellari nelle vie M1-M3 e M2-M4 nella prole femminile. Sia MeHg che la combinazione MeHg e PCB153 alteravano, a PD1 e PD21, l'espressione della proteina G, coinvolta nella cascata del segnale di trasduzione intracellulare muscarinico. MeHg somministrato da solo agiva sull'espressione di vari fattori di rilevante importanza fisiologica, quali (i) il complesso SNARE, una famiglia di proteine che media la fusione delle vescicole di trasporto con la membrana cellulare, a livello presinaptico (a PD1), (ii) la proteina chinasi C (PKC) della via M1-M3 (a PD21), e (iii) il recettore intracellulare per l'inositolo trifosfato IP3 della via M1-M3 (a PD36). I risultati hanno dimostrato effetti interattivi di MeHg e PCB153, con persistenti alterazioni nella densità recettoriale muscarinica e della corrispondente espressione genica in forme correlate al sesso, all'area cerebrale e alla fase dello sviluppo.

Studio finanziato dalla Commissione Europea (FOOD-CT-2003-506143) e Ministero della Salute.

STUDIO INTERDISCIPLINARE PER LA VALUTAZIONE DI ALTERAZIONI BIOCHIMICHE IN *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS* ESPOSTI A TBT

Maria Elisabetta Cosulich, Camilla Liscio, Erika Pistarino, Marina Di Carro, Barbara Santamaria, Micaela Tiso, Emanuele Magi
Dipartimento di Chimica e Chimica industriale, Università di Genova

Sono definiti interferenti endocrini (IE) quei composti in grado di alterare il normale funzionamento del sistema endocrino umano e animale. Uno degli esempi più completi di interferenza endocrina causata da un contaminante ambientale è documentato nei molluschi esposti a tributilstagno (TBT), un composto utilizzato nelle vernici antivegetative applicate sugli scafi delle navi. Nell'ambiente marino il TBT è presente insieme ai suoi prodotti di degradazione, il dibutilstagno (DBT) e il monobutilstagno (MBT), meno tossici per gli organismi acquatici. È stato dimostrato che i composti organostannici possono interferire con numerosi processi biologici, causando in particolare il fenomeno dell'*imposex* (sviluppo di caratteri sessuali maschili nelle femmine) nei gasteropodi (1) e il danneggiamento del citoscheletro in altre specie tra cui i molluschi (2). In questo studio è stata utilizzata la proteomica funzionale per valutare qualitativamente i cambiamenti potenzialmente indotti da TBT nel pattern proteico. Sono stati presi in considerazione tessuti branchiali di mitili stabulati in un'area marina caratterizzata da alte concentrazioni di TBT (Porto di Vado Ligure, Liguria), comparandoli quindi con tessuti di controllo. È stata valutata l'espressione proteica in entrambi i casi e sono state identificate diverse PES (*Protein Expression Signatures*) associate con l'esposizione al contaminante; gli spots che sono risultati significativamente incrementati nei campioni contaminati sono stati successivamente identificati come frammenti di β -tubulina mediante spettrometria di massa. La degradazione della β -tubulina è stata ulteriormente confermata ricorrendo ad un'analisi Western Blot con specifico anticorpo anti- β -tubulina.

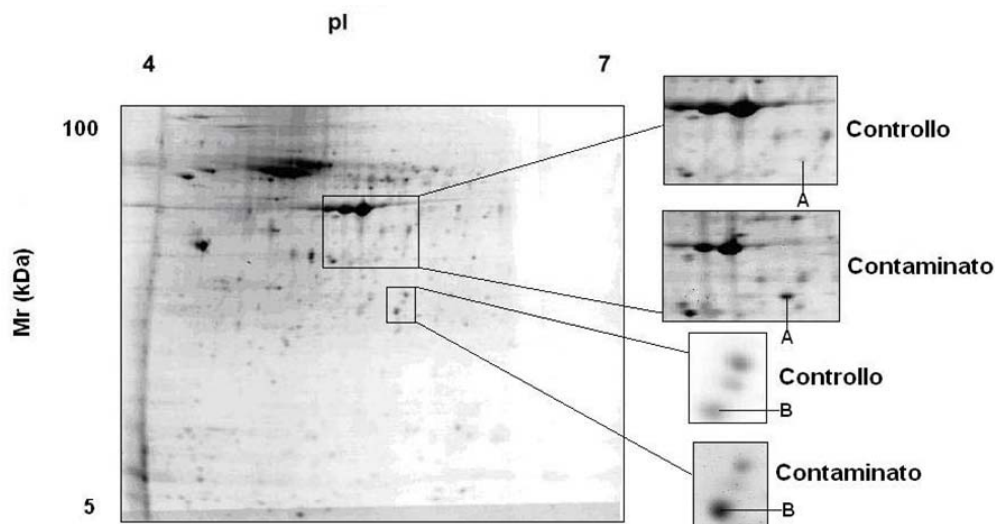


Figura 1. 2D-SDS-PAGE di branchie di mitilo (controllo e contaminato).
Le regioni evidenziate indicano le posizioni dei frammenti di β -tubulina (spot A, B)

Bibliografia

1. Zhou QH, Li ZH, Jiang GB, Yang RQ. Preliminary investigation of a sensitive biomarker of organotin pollution in Chinese coastal aquatic environment and marine organisms. *Environ Pollut* 2003;125:301-4.
2. Rodríguez-Ortega MJ, Grøsvik BE, Rodríguez-Ariza A, Goksøyr A, López-Barea J. Changes in protein expression profiles in bivalve molluscs (*Chamaelea gallina*) exposed to four models environmental pollutants. *Proteomics* 2003;3:1535-43.

CICLODESTRINE SPECIALIZZATE COME CHEMOSENSORI PER LA DETERMINAZIONE DI XENOESTROGENI E MICOTOSSINE

Pietro Cozzini (a, b), Gianluigi Ingletto (a), Francesca Spyraakis (a, b), Chiara Dall'Asta (c)

(a) Laboratorio di Modellistica Molecolare, Dipartimento di Chimica generale e Inorganica, Università di Parma

(b) INBB, Istituto Nazionale per le Biostrutture e i Biosistemi, Roma

(c) Dipartimento di Chimica Organica e Industriale, Università di Parma

Gli xenoestrogeni, alcune micotossine e alcuni metabolite delle droghe da abuso sono in grado di legarsi al recettore degli estrogeni interferendo con processi biologici di notevole importanza. Per far fronte alla sempre più urgente necessità di determinare la presenza di tali composti nell'ambiente e negli alimenti in tempi rapidi e con costi contenuti, è necessario poter sviluppare in tempi brevi molecole sempre più specializzate in grado da agire come chemo- o biosensori. Questo permette un enorme risparmio sia in termini di costi sia di tempo per il reparto agro-alimentare attraverso la prevenzione e la riduzione dei costi di trattamento e smaltimento. Il modo più veloce ed economico per riuscire a sviluppare in tempi brevi sensori specifici e adeguati si basa sull'utilizzo di tecniche di ingegneria molecolare in grado di simulare l'interazione tra un dato *guest* e diverse ciclodestrine studiate in modo da ottimizzare il riconoscimento del *guest* che verrà poi rivelato mediante fluorescenza. Un esempio è riportato in Figura 1 in cui sono rappresentate le varie posizioni di *docking* predette per il resveratrolo all'interno della cavità della β -ciclodestrina. Questo approccio permette infatti di guidare la sintesi in modo efficiente, diminuendo i tempi di progettazione e ottimizzando i costi di sviluppo.

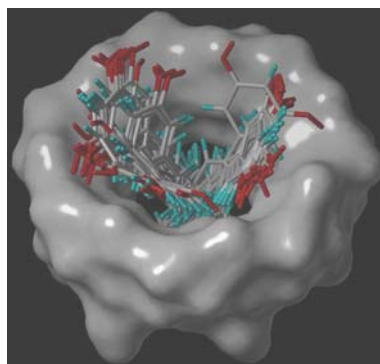


Figura 1. La figura mostra le 50 posizioni di *docking* predette per il resveratrolo all'interno della cavità della β -ciclodestrina

Bibliografia

1. Maragos CM, Emerging technologies for mycotoxin detection. *J Toxicol Toxin Rev* 2004;23:317-44.
2. Amadasi A, Dall'Asta C, Ingletto G, Pela R, Marchelli R, Cozzini, P. Explaining CD-mycotoxin interactions using a "natural" force field. *Bioorg Med Chem* 2007;15:4585-94.
3. Logrieco A, Arrigan DWM, Brengel-Pesce K, Siciliano P, Tothill I. DNA arrays, electronic noses and tongues, biosensors and receptors for rapid detection of toxigenic fungi and mycotoxins: A review. *Food Add Contam* 2005;22:335-44.

ADDITIVI ALIMENTARI COME XENOESTROGENI: UN APPROCCIO INVESTIGATIVO INTEGRATO IN SILICO E IN VITRO

Pietro Cozzini (a, b), Alessio Amadasi (c), Francesca Spyrakis (a, b), Andrea Mozzarelli (b, c), Clara Meda (d), Adriana Maggi (d)

(a) Dipartimento di Chimica Generale, Università di Parma

(b) Istituto Nazionale di Biostrutture e Biosistemi, Roma

(c) Dipartimento di Biochimica e Biologia Molecolare, Università di Parma

(d) Centro di Eccellenza sulle Malattie Degenerative, Università di Milano

Lo scopo del lavoro è quello di verificare se gli additive alimentari normalmente impiegati nell'industria e disponibili nelle banche dati possono essere considerate xeno estrogeni. Partendo dal e *Joint FAO-WHO database*, contenente 1500 composti utilizzati come *additive alimentary*, abbiamo applicato un protocollo integrato *in silico* e *in vitro* per valutare l'energetica dell'interazione di questi composti con il recettore degli estrogeni. Questa analisi ha evidenziato 31 potenziali ligandi del recettore, ridotti poi a 13 mediante l'applicazione di un filtro molto fine basato su diverse caratteristiche chimico-fisiche. Fra questi 13 potenziali xenoestrogeni, 4 erano già noti avere un'attività estrogenica e gli altri nove sono stati testate *in vitro* determinando I valori di *binding* col recettore e gli effetti biologici. Il Propyl gallato è risultato agire come un antagonista, mentre il 4-hexylresorcinolo come un potente trans attivatore ed entrambi sono risultati attivi a concentrazioni nano molari così come predetto dai test *in silico*. Questi risultati ci permettono di suggerire cautela nell'utilizzo di questi prodotti e indicano la necessità di ulteriori e più ampi controlli. I residui aminoacidici ARG394, GLY353 e His 524, che sono i residui interagenti con il ligando, sono evidenziati come tubi, mentre la proteina è rappresentata con la sua superficie solida per mostrare la profondità del sito (Figura 1).

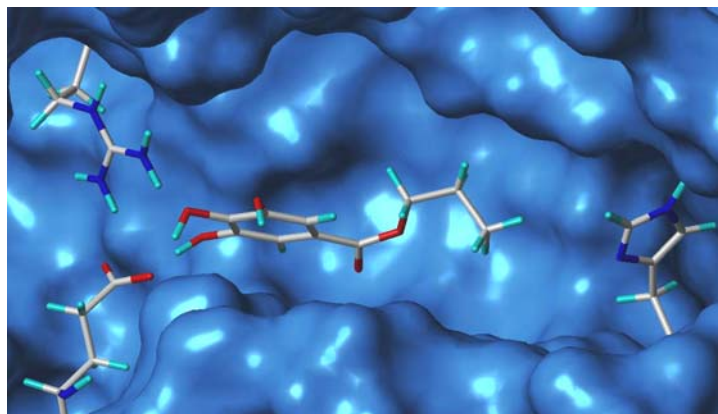


Figura 1. La figura mostra la posizione di un ligando nella cavità del sito di *binding* dell'isoforma alfa del recettore degli estrogeni

Bibliografia

1. Cozzini P, Kellogg GE, Spyraakis F, Abraham DJ, Costantino G, Emerson A, Fanelli F, Gohlke H, Kuhn LA, Morris GM, Orozco M, Perthinez TA, Rizzi M, Sottriffer C. Target flexibility: an emerging consideration in drug discovery and design. *J Med Chem* 2008;51(20):6237-55.
2. Amadasi A, Mozzarelli A, Meda C, Maggi A, Cozzini P. Identification of xenoestrogens in food additives by an integrated *in silico* and *in vitro* approach. *Chem Res Toxicol* 2009;22(1):52-63.
3. Spyraakis F, Kellogg GE, Amadasi A, Cozzini P. Scoring functions for virtual screening. *Frontiers in Drug Design and Discovery* 2007;3:317-79.

ESPOSIZIONE A INTERFERENTI ENDOCRINI CON EFFETTO TIREOSTATICO: L'AZIONE PROTETTIVA DELLA IODOPROFILASSI

Simona De Angelis (a), Emanuela Medda (b), Carla Fiumalbi (c), Angela Citrini (c), Alessandro Perico (c), Daniele Leandri (c), Fabrizio Franzellin (d), Cristina Fazzini (d), Enzo Gilardi (d), Maria Teresa Mechi (c), Ferruccio Santini (e), Teresa Rago (e), Rocco Valeriano (e), Paolo Vitti (e), Alberto Mantovani (f), Aldo Pinchera (e), Antonella Olivieri (a)

(a) *Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(b) *Centro Nazionale di Epidemiologia Sorveglianza e Promozione della Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(c) *Dipartimento di prevenzione, ASL 10, Firenze*

(d) *Servizio Medicina Nucleare, AS Bolzano, Bolzano*

(e) *Dipartimento di Endocrinologia e Metabolismo, Università di Pisa*

(f) *Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

La tiroide rappresenta uno dei principali bersagli degli interferenti endocrini, tra questi vi sono anche alcuni pesticidi. Un esempio è offerto dagli etilenbisditiocarbamati (EBDC), una famiglia di pesticidi diffusamente utilizzati in agricoltura. Studi *in vitro* hanno dimostrato il loro effetto tireostatico è essenzialmente dovuto all'etilentiourea (ETU), metabolita comune a tutti gli EBDC, che è in grado di inibire la perossidasi tiroidea, un enzima fondamentale nella sintesi degli ormoni tiroidei. Obiettivo di questo studio è stato quello di: 1) valutare l'effetto sulla funzione tiroidea dell'esposizione professionale al Mancozeb, uno degli EBDC più utilizzati nel nostro Paese e nel resto del mondo, in un campione rappresentativo di viticoltori e 2) valutare l'impatto sulla funzione tiroidea di tale esposizione in presenza di un adeguato o insufficiente apporto nutrizionale di iodio. A tale scopo sono stati reclutati 177 viticoltori maschi professionalmente esposti. Di questi, 29 operavano nell'area del Chianti e risiedevano in aree rurali limitrofe riconosciute come modicamente iodocarenti, mentre 148 erano residenti nella Provincia di Bolzano (BZ) dove dal 1982 viene effettuata con successo la iodoprofilassi. È stato inoltre arruolato un campione di 74 soggetti di controllo, non professionalmente esposti, dello stesso sesso e di età confrontabili. Di questi, 34 risiedevano a Firenze (CTRL-FI) e 40 a BZ (CTRL-BZ). Su tutti i soggetti è stata determinata la concentrazione urinaria di ETU, valutata la funzione tiroidea ed eseguita un'ecografia tiroidea. Il confronto dei viticoltori del Chianti con i relativi controlli ha messo in evidenza che, nonostante i più elevati livelli urinari di ETU riscontrati nei viticoltori, anche i CTRL-FI risultavano esposti ($20,7 \pm 36,5$ vs $6,9 \pm 3,4$ $\mu\text{g/L}$). Tuttavia i viticoltori mostravano livelli sierici di T4 significativamente più ridotti ($81,2 \pm 12$ vs $102,4 \pm 12$ ng/mL ; $P < 0,01$) e un valore medio del volume tiroideo significativamente più basso rispetto ai CTRL-FI ($10,4 \pm 4,8$ vs $11,6 \pm 2,7$ mL ; $P = 0,05$), con un'elevata frequenza di valori al di sotto della norma ($\leq 6\text{mL}$: 24% vs 0%) e di ipoecogenicità quale indicatore precoce di autoimmunità (34,5% vs 15,1%). Inoltre, la stima dei rischi di effetti tireostatici aggiustati per età ha mostrato un rischio più elevato di avere un volume tiroideo francamente ridotto ($\leq 6\text{mL}$: OR = 2,27), ipoecogenicità ghiandolare (OR = 6,0) e ridotti livelli ematici di FT3 (OR = 3,59) nei viticoltori con alta esposizione (ETU $> 7,0$ $\mu\text{g/L}$) rispetto a quelli con più bassa esposizione. Anche il confronto nell'area di BZ ha messo in evidenza che sia i viticoltori che i CTRL-BZ risultavano esposti ($28,6 \pm 56,8$ vs $14,1 \pm 9,2$ $\mu\text{g/L}$). Tuttavia in questo caso il confronto dei parametri biochimici tra viticoltori e controlli non ha mostrato differenze significative nei livelli sierici degli ormoni dosati e la stima dei rischi ha evidenziato solo un rischio aumentato di ipoecogenicità ghiandolare (OR = 2,12) nei viticoltori maggiormente esposti rispetto ai soggetti

con più bassa esposizione. Sono stati quindi confrontati i 2 gruppi di viticoltori, al fine di verificare ulteriormente l'ipotesi che la iodoprofilassi possa contribuire a preservare la funzione tiroidea dagli effetti dovuti all'esposizione a EBDC. A fronte di una maggiore esposizione rilevata nell'area di BZ, i livelli medi di T4 ($81,2 + 12,0$ vs $90,3 + 18,5$, $P=0,02$) e FT4 ($11,1+1,4$ vs $13,6+1,9$, $P=0,02$) sono risultati significativamente più ridotti nei viticoltori del Chianti rispetto ai viticoltori di BZ. I risultati di questo studio dimostrano la presenza di effetti tireostatici correlati all'esposizione professionale a EBDC in soggetti non protetti da un'adeguata iodoprofilassi. Inoltre i risultati ottenuti nei 2 campioni di controllo, pur evidenziando la presenza di un'esposizione non trascurabile, hanno mostrato l'assenza di evidenti effetti tireostatici in soggetti maschi adulti non professionalmente esposti al pesticida. Rimane da stabilire se simili esposizioni possano rappresentare un rischio per segmenti di popolazione più vulnerabili, quali bambini e donne in gravidanza.

EFFETTI DEL PIOMBO SULLA TIROIDE

Gianfranco Desogus

Azienda USL 7 di Carbonia c/o Ospedale CTO, Iglesias, Cagliari

Il contributo si propone di verificare l'azione del piombo sulla funzionalità tiroidea di una popolazione esposta professionalmente. Il campione è composto da 100 lavoratori, 95 maschi e 5 femmine, con un'età media di 41 ± 15 anni, i quali presentano un'anzianità lavorativa media di 12 anni e che svolgono la loro mansione presso un importante insediamento industriale della Sardegna. Il gruppo esposto professionalmente a piombo è costituito da 79 lavoratori maschi, con età media di 37 ± 22 anni con valori di piombemia di 49 ± 12 $\mu\text{g/dl}$, con una percentuale di fumatori del 34% (16 ± 9 sigarette/die) e di bevitori del 59%. Il campione controllo è costituito da 21 lavoratori (15 maschi, 5 femmine), con età media di 44 ± 6 anni, abitualmente destinati a svolgere attività di tipo amministrativo. È stata valutata la funzionalità tiroidea con test diagnostici per il dosaggio della tiroxina (T4), della triiodotironina (T3) e delle loro frazioni libere (FT4, FT3), della tireotropina (TSH) e degli anticorpi antitireoglobulina e microsomi tiroidei, per indagare sulla natura autoimmune di eventuali patologie tiroidee. Dall'analisi dei risultati emerge un quadro clinico-diagnostico che conferma la normale funzionalità della tiroide, con il 94% dei lavoratori esposti professionalmente a piombo che presenta valori nella norma e solo il 6% di essi risulta con valori ematici anticorpali alterati, superiori alla norma o di dubbia interpretazione. Il gruppo di controllo presenta parametri ormonali nella norma. Si può quindi concludere che l'esposizione professionale a piombo, per lavoratori che presentano concentrazioni di piombemia non troppo elevate, non altera complessivamente la regolare funzionalità della tiroide, risultato che è influenzato dalle misure di contenimento e di prevenzione utilizzate per ridurre il rischio tossicologico.

VALUTAZIONE DEL RISCHIO ECOTOSSICOLOGICO ATTRAVERSO IL BIOMONITORAGGIO DI POPOLAZIONI SENTINELLA DI VERTEBRATI (UCCELLI E PICCOLI MAMMIFERI)

Nadia Francia (a), Simona Miletta (a), Irene Pistella (a), Massimo Pandolfi (b), Daniela Santucci (a), Enrico Alleva (a)

(a) *Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze, Istituto Superiore di Sanità, Roma;*

(b) *Istituto di Scienze Morfologiche, Università degli Studi di Urbino "Carlo Bo", Urbino (PU)*

Le popolazioni animali nel loro ambiente naturale rappresentano validi indicatori o “sentinelle” dello stato di salute ambientale, potendo fornire importanti informazioni non solo sugli effetti biologici conseguenti all’esposizione cronica a singoli inquinanti chimici presenti nell’ambiente, ma anche sugli effetti “cooperativi” di più agenti inquinanti, nonché sul ruolo di altri fattori ambientali sulla risposta tossicologica complessiva (mortalità, carcinogenicità, sviluppo di patologie anche severe, anomalie riproduttive e alterazioni dello sviluppo, neurotossicità, alterazioni comportamentali, immunotossicità, ecc.). I pesticidi organoclorurati (quali per esempio Lindano e DDT) e i policlorobifenili (PCBs) sono contaminanti ubiquitari, che vengono immessi nell’ambiente come sottoprodotti derivanti dalle attività agricole e industriali. Analogamente, i metalli pesanti derivano da processi sia naturali (come per esempio la combustione fossile) sia antropici (rifiuti di origine industriale e gas di scarico urbano o delle fabbriche). Sebbene l’impiego di parecchi di tali composti sia stato bandito ormai da diversi anni in Italia, i pochi dati disponibili in letteratura dimostrerebbero come pesticidi e PCBs siano ancora largamente persistenti in diversi ecosistemi italiani. Tra il 1994 e il 1995, abbiamo condotto un’indagine di biomonitoraggio ambientale nella provincia di Pesaro-Urbino, attraverso la misurazione delle concentrazioni tissutali di PBCs, p-p’-DDE e di alcuni metalli pesanti (cadmio, Cd, piombo, Pb, cromo, Cr, e mercurio, Hg) in 56 specie di uccelli e 11 di mammiferi. In generale, i risultati di tale indagine confermano che le concentrazioni residue di contaminanti sono correlate al livello trofico occupato della specie animale all’interno di una catena o rete alimentare: i livelli di contaminazione da composti organoclorurati e metalli pesanti aumentano lungo la piramide alimentare. PCBs e p-p’-DDE sono i composti organoclorurati più diffusi nella fauna selvatica dell’area di studio, nonostante l’impiego di tali sostanze (soprattutto in agricoltura) sia ormai vietato dal 1970. Tra tutte le specie considerate, il riccio (*Erinaceus europaeus*) è risultato la specie più a rischio di contaminazione sia da pesticidi organoclorurati sia da specifici metalli pesanti quali il Pb, confermandosi un valido bioindicatore delle concentrazioni di tali inquinanti nella provincia di Pesaro-Urbino. Non è da escludersi che l’alta incidenza di mortalità per investimento automobilistico di questa specie sia correlabile all’effetto neurotossico conseguente all’esposizione all’inquinamento ambientale, che potrebbe ridurre la capacità di percezione e/o reazione.

SISTEMA PER IL CONTROLLO DELLA SALUBRITÀ IN FILIERA ALIMENTARE E NELL'AMBIENTE MEDIANTE INDICI DI TOSSICITÀ E RELATIVO METODO PER LA RILEVAZIONE E ANALISI DEI DATI (BEST)

Chiara Frazzoli (a), Alberto Mantovani (a), Luigi Campanella (b), Roberto Dragone (c)

(a) *Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare e Centro di Collaborazione
OMS/FAO per la Sanità Pubblica Veterinaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(b) *Dipartimento di Chimica, Università Sapienza di Roma*

(c) *Istituto dei Sistemi Complessi, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Roma*

L'esposizione a interferenti endocrini (IE) tramite le filiere alimentari può avvenire in diverse fasi della produzione e in diversi punti critici di rischio, ad esempio in seguito all'uso di sostanze (es. taluni antiparassitari) nella produzione delle materie prime, a contaminazione ambientale, al rilascio da materiali a contatto, nonché alla presenza di componenti "naturali" indesiderate sia nell'ambiente (es. taluni metalli e micotossine) sia durante i processi di trasformazione (es. Idrocarburi Policiclici Aromatici, IPA). Le Buone Pratiche di Produzione e il sistema HACCP (*Hazard Analysis and Critical Control Points*) sono gli strumenti comunemente utilizzati per valutare l'intera catena alimentare e identificare i punti critici di controllo (CCP). Inoltre, la stretta correlazione fra produzione alimentare e impatto ambientale rende cruciale la valutazione dell'ecotossicità associata alle pratiche agrozootecniche. In questo scenario, dove è necessario sviluppare approcci innovativi, la Commissione Europea raccomanda sia l'ottimizzazione di sistemi già disponibili (1) sia l'estensione della verifica di salubrità dal prodotto finito ai processi di produzione (2, 3) mediante sistemi rapidi, affidabili e utilizzabili per applicazioni di routine (4).

BEST (*Integrated Toxicity (Bio) Sensors' System for hazard analysis and management in the food chain and the environment*), introduce gli indici di tossicità nel controllo delle filiere mediante un sistema prototipo basato sull'integrazione dei dati da sonde operanti in parallelo.

– Tecnologia

Il dispositivo di controllo e acquisizione dati è provvisto di n interfacce per la trasduzione simultanea e indipendente del segnale. Ogni interfaccia riceve un segnale *in continuum* dalla sonda. I segnali sono inviati a un computer, dove le informazioni sono convertite secondo l'approccio *data in-graphic out*. BEST consente di installare una centrale operativa per il coordinamento in rete – intranet o internet – di più postazioni di monitoraggio anche collocate in diverse aree geografiche, senza perdita di performance.

– Struttura

Il sistema prototipo è flessibile nei suoi parametri, ovvero una specifica gamma di parametri può essere selezionata per un dato problema. Le sonde sono separate in 4 gruppi, detti A, B, C, e D; le sonde sono, in generale, volte alla valutazione della tossicità sugli enzimi del metabolismo. Il gruppo A è costituito da sonde elettrochimiche/ottiche accoppiate con cellule aerobiche facoltative (es. cellule di lievito) o obbligate (es. linee cellulari umane), per la valutazione dell'indice di tossicità integrale (aspecifica) mediante misura della respirazione cellulare; il gruppo B è costituito da sonde elettrochimiche/ottiche accoppiate con indicatori generali di attività enzimatica ossidoreduttasica: enzimi cellulari antiossidanti (catalasi, superossidodismutasi; glutazione perossidasi), del metabolismo del glucosio (glucosio ossidasi); il gruppo C è costituito da sonde per la misura di indici secondari, a sostegno delle informazioni ottenute da A e B, ad esempio accoppiate con enzimi escretivi (ureasi, applicabile in modo specifico per i metalli pesanti), con enzimi inibiti dalla

presenza di concentrazioni attive di pesticidi organofosforici e carbammati (enzima tirosinasi), o da sonde per la misura della domanda biologica di ossigeno (BOD) o per l'analisi di anioni, come ad esempio i nitrati (elettrodo ionoselettivo, ISE); il gruppo D è costituito da sonde di supporto, che misurano parametri che possono anche influenzare la cinetica delle reazioni enzimatiche, come pH e temperatura, o la conducibilità, il potenziale redox, la domanda chimica di ossigeno (COD).

– *Gestione dei dati*

L'analisi rapida richiede la rapida interpretazione dei risultati. Un software sviluppato *ad hoc* gestisce tutti i dati in tempo reale. La complessità del sistema necessita di un controllo multivariato. L'analisi multivariata applicabile all'elaborazione dei risultati del BEST, può gestire le informazioni utili, le informazioni specifiche, le informazioni ridondanti, gli effetti non-lineari, gli effetti additivi, compensativi o sinergici, la correlazione e il segnale di fondo.

– *Interpretazione dei dati*

Per l'utilizzo in filiera, un segnale acustico/luminoso segnala se/quando i parametri di salubrità/conformità vanno fuori controllo. Il criterio per l'emissione di tale segnale si basa sull'approccio del limite di allerta (2σ) e di intervento (3σ).

– *Risultati attesi*

capacità di identificare CCP per il rischio tossicologico durante il processo produttivo; capacità di discriminare fra i lotti, dalla materia prima al trattamento e al prodotto finito; capacità di segnalazione di situazione di allerta e allarme.

– *Campo di applicazione*

Applicabilità generale; il sistema è versatile.

– *Prestazioni*

Il sistema multi-interfaccia consente la definizione di parametri di validazione.

– *Limiti*

Metodi rapidi come il BEST si propongono per lo screening, preliminare a successive e più costose analisi di conferma (metodi ufficiali per i livelli consentiti) sui campioni positivi. Alcuni indici di sicurezza alimentare per i CCP nelle diverse realtà produttive potrebbero essere insufficienti, ma il sistema costituisce la prima applicazione nell'identificazione e gestione del rischio tossicologico nelle catene alimentari ed è strutturato in modo tale da poter rapidamente ricevere implementazioni.

Bibliografia

1. Comunità Europea. *European Environment and Health Strategy*. Disponibile all'indirizzo <http://ec.europa.eu/environment/health/strategy.htm>; ultima consultazione 01/06/2009.
2. Comunità Europea. *Libro bianco sulla sicurezza alimentare*. Bruxelles, 12 gennaio 2000. Disponibile all'indirizzo http://ec.europa.eu/dgs/health_consumer/library/pub/pub06_it.pdf; ultima consultazione 01/06/2009.
3. Comunità Europea. Regolamento N. 178/2002. *Principi e i requisiti generali della legislazione alimentare, istituisce l'Autorità europea per la sicurezza alimentare e fissa procedure nel campo della sicurezza alimentare*. Gazzetta Ufficiale Comunità Europea n. L31 del 01/02/2002.
4. ISO 22005:2007. Traceability in the feed and food chain - General principles and basic requirements for system design and implementation.

EFFETTI DELL'ESPOSIZIONE PRENATALE A BASSE DOSI DI BISFENOLO A E ALFA-ETINIL-ESTRADIOLO SUL COMPORTAMENTO RIPRODUTTIVO E PARENTALE DI MASCHI E FEMMINE DI TOPO

Laura Gioiosa (a, b), Valentina Sanghez1 (c), Stefano Parmigiani (a), Paola Palanza (a)

(a) *Dipartimento di Biologia Evolutiva e Funzionale, Università degli Studi di Parma*

(b) *Istituto di Neurobiologia e Medicina Molecolare, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Roma*

(c) *Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

Gli interferenti endocrini ad attività estrogenica sono sostanze ormonalmente attive che si legano ai recettori degli estrogeni. A questa categoria di molecole appartiene il bisfenolo A (BPA), sostanza che si può ritrovare in contenitori per alimenti di plastica e nelle resine epossidiche ad uso odontoiatrico. Esiste un'ampia letteratura sugli effetti dell'esposizione a BPA durante le fasi critiche per lo sviluppo di fenotipi sessualmente differenziati. L'esposizione di femmine gravide a basse dosi di BPA induce nei topi alterazioni nel tasso di crescita corporea della prole maschile e femminile, accelera la pubertà nelle femmine e riduce la spermatogenesi nei maschi, mentre nei ratti altera il comportamento esploratorio, sessuale e di gioco in età successive all'esposizione. L'alfa-etinil-estradiolo (AEE) è anch'esso un estrogeno ambientale, in quanto composto principale della pillola anticoncezionale, si può trovare nelle acque reflue, ma allo stesso tempo nel nostro studio funge da controllo positivo per l'azione estrogenica pura. Per investigare gli effetti dell'esposizione diretta di femmine gravide a BPA e AEE sul comportamento spontaneo materno, e sullo sviluppo precoce, la riproduzione e il comportamento parentale effettuato dalla loro prole in età adulta (esposizione prenatale), abbiamo addestrato femmine gravide di topo CD-1 a bere olio di mais con o senza BPA e AEE a dosi basse e comparabili con quelle riscontrabili nell'ambiente (BPA 2 e 10 microg per kg di peso corporeo al giorno e AEE 0,004 e 0,04 microg per kg di peso corporeo al giorno) durante l'ultima settimana di gravidanza. Abbiamo quindi osservato il comportamento spontaneo materno non riscontrando effetti significativi del trattamento. In seguito, in maschi e femmine della prole adulta, abbiamo analizzato gli effetti dell'esposizione prenatale a BPA e AEE su comportamento sessuale, successo riproduttivo e comportamento spontaneo parentale. Perciò, a 3 mesi d'età, maschi e femmine della prole sono stati accoppiati con topi appartenenti allo stesso gruppo di esposizione prenatale. Il comportamento sessuale e il successo riproduttivo non sono stati influenzati dall'esposizione in fase prenatale alle diverse dosi di BPA e AEE. Abbiamo invece rilevato che i maschi, esposti a BPA e ad AEE, dedicavano più tempo a curare la prole rispetto ai maschi di controllo. Questi dati confermano che l'esposizione prenatale, per via materna, a basse dosi di estrogeni ambientali nel periodo della differenziazione sessuale del sistema nervoso centrale può influenzare il comportamento in animali adulti.

ANALISI DI CAMPIONI VEGETALI NELL'AREA DI MANTOVA: IL ROSMARINO COME BIO-INDICATORE DEI LIVELLI AMBIENTALI DI PCB?

Paola Grassi, Caterina Generoso, Elena Fattore, Ettore Zuccato, Marinella Palmiotto, Roberto Fanelli
Dipartimento Ambiente e Salute, Istituto di Ricerche Farmacologiche "Mario Negri", Milano

Policloro dibenzo-p-diossine (PCDD), dibenzofurani (PCDF) e policlorobifenili (PCB) sono stati misurati in campioni di frutta e verdura vicino a Mantova in una zona ad elevata densità industriale a causa della presenza sul territorio di un polo chimico e di un inceneritore. Lo scopo dello studio era di valutare il livello di contaminazione nei campioni vegetali raccolti nella zona anche in relazione alla distanza dalla potenziale sorgente di contaminazione e di valutare se l'esposizione attraverso il consumo di tali alimenti potesse rappresentare un rischio per la popolazione.

Un totale di 111 campioni sono stati raccolti in giardini privati dell'area sotto indagine e analizzati seguendo la procedura EPA 1613 e utilizzando la gas cromatografia accoppiata alla spettrometria di massa in alta e bassa risoluzione.

I risultati hanno mostrato una contaminazione da PCDD e PCDF piuttosto bassa, con gran parte dei congeneri al di sotto del limite di sensibilità della procedura analitica. I livelli di PCB sono risultati in linea con i valori determinati in altri studi europei non determinando un rischio di esposizione alimentare dovuto al consumo di tali alimenti; inoltre non è stata trovata una correlazione tra la distanza dal polo chimico o l'inceneritore e i livelli di contaminazione.

I campioni vegetali appartenenti alla famiglia delle Lamiaceae, e in particolare quelli di rosmarino, hanno mostrato concentrazioni di PCB da uno a due ordini di grandezza più elevati di quelli misurati negli altri campioni vegetali. L'analisi delle componenti principali ha indicato anche una differenza nella abbondanza relativa dei singoli congeneri, infatti i congeneri basso clorurati quali il PCB 118, 105, 77, 99 e 126 sono risultati relativamente più abbondanti nei campioni di rosmarino rispetto agli altri campioni, suggerendo che la contaminazione origini dalla deposizione atmosferica. Come è stato riportato per gli aghi di pino, quindi, anche il rosmarino sembrerebbe accumulare PCB e potrebbe essere utilizzato come campionatore passivo o come pianta "sentinella" per la contaminazione ambientale da questi composti.

MONITORAGGIO DELL'IMPOSEX DA TRIBUTILSTAGNO (TBT) IN MOLLUSCHI ACQUATICI BIO-INDICATORI IN LAGUNA SUD DI VENEZIA E FASCIA COSTIERA

Lucio Grassia (a), Marco Massironi (a), Valerio Rizzo (a), Giuseppina Fantauzzo (b), Maurizio Vidali (c)

(a) CIRSP (Centro Italiano Ricerche e Studi per la Pesca), Roma

(b) Facoltà di Biologia Marina, Università di Palermo

(c) Dipartimento di Chimica generale, Università di Padova

Il tributilstagno (TBT) è uno tra i composti organostannici di più largo impiego in vari ambiti. Notevolissime sono le quantità usate come stabilizzante del PVC e dagli anni '70 come biocida all'interno delle vernici antivegetative applicate sulle imbarcazioni e sugli scambiatori termici industriali e di centrali termoelettriche per evitare la crescita di epibionti. A causa dei gravissimi danni arrecati alla fauna acquatica e in particolare alle ostriche francesi in allevamento, l'uso delle vernici antifouling a base di TBT è stato regolamentato nel 1982 prima in Francia e poi dal 2003 proibito in UE anche per gli scafi commerciali di oltre 25 m. Più recentemente la letteratura riferisce dell'uso del TBT e altri organostannici quali additivi/impregnanti su materiali di uso civile e personale quali tappezzerie, indumenti sportivi, assorbenti sanitari ecc. al fine di sfruttarne la proprietà d'impedire la formazione di muffe e la produzione di odori sgradevoli. Riconosciuto è il suo assorbimento percutaneo. Dalla fine degli anni '70, gli studi condotti sul TBT ne hanno confermato la duplice azione come interferente endocrino ma anche come composto immuno-soppressore che penetra nella catena alimentare attraverso svariati organismi acquatici che lo bioaccumulano. Molti gasteropodi acquatici in presenza di lievissime concentrazioni di TBT manifestano il fenomeno dell'*imposex* ovvero la superimposizione di caratteri maschili su soggetti femminili che si manifestano con la crescita di uno pseudopene e di un vaso deferente. Misurazioni al microscopio stereoscopico di tali anomalie anatomiche permettono la quantificazione dell'*imposex* attraverso i due indici: VDSI (*Vas Deferens Sequence Index*) e RPLI (*Relative Penis Length Index*). La concentrazione del TBT sia ambientale che accumulato nei gasteropodi acquatici mostra una buona correlazione statistica con i due indici permettendo di effettuare un facile monitoraggio ambientale sulla presenza di TBT a prescindere dalle determinazioni analitiche che peraltro vengono eseguite in rari centri specializzati. Il TBT in soluzione può degradarsi in alcuni mesi mentre quello presente nei sedimenti mantiene la sua stabilità per circa 20 anni. Tale circostanza va considerata durante il sommovimento di fondali di aree portuali o nell'intorno di fabbriche di PVC dove esso si è accumulato. Lo studio realizzato nel 2003-04 per il CIRSPE/Prov. di VE (Prog. 59 Patto Territoriale Spec. Chioggia) sia in laguna Sud di Venezia che lungo il litorale di Chioggia ha riguardato la determinazione dei due indici sull'*imposex* su 49 sub popolazioni del gasteropode *Nassarius nitidus* (*N. reticulatus*) pescate in stazioni ubicate in laguna e in mare. L'*imposex* era presente al 100% in laguna, quasi altrettanto in mare e l'alto valore riscontrato negli indici è ben correlato alla concentrazione del TBT presente nei sedimenti e nel biota confermando la presenza del TBT in mare e in laguna con una notevole e ingiustificata presenza in prossimità di cantieri di rimessaggio nautico e darsene da diporto.

Bibliografia

1. Berto D, Giani M, Boscolo R, Covelli S, Giovanardi O, Massironi M, Grassia L, Organotins (TBT and DBT) in water, sediments, and gastropods of the southern Venice lagoon. *Marine Pollution Bulletin* 2007;55:425-35.
2. ARPAV (Agenzia Regionale per la Prevenzione e Protezione Ambientale del Veneto) *Studio triennale dell'accumulo di composti organostannici nell'ecosistema lagunare di Venezia*. Maggio 2004. Rapporto finale disponibile all'indirizzo: http://www.venetoambiente.net/chi_e_arpav/htm/documenti_dapve.asp; ultima consultazione 01/06/2009.

INTERFERENTI ENDOCRINI NEL LATTE MATERNO: LIVELLI, ANDAMENTO TEMPORALE E STIMA DELL'ASSUNZIONE DA PARTE DEI LATTANTI

Cristiana Guerranti Perra, Silvano E. Focardi

Dipartimento di Scienze Ambientali, Università degli Studi di Siena

La tematica sviluppata in questo studio riguarda la presenza di alcuni contaminanti ambientali con azione di interferenti endocrini (PCB, HCB e p,p'-DDE e PBDE) in campioni di latte materno.

Le indagini sono state effettuate su campioni di latte di donne residenti nella città di Siena e provincia; i risultati di questo lavoro si aggiungono a quelli di uno studio precedentemente condotto nella stessa area di studio (1).

Le analisi hanno evidenziato la presenza in tutti i campioni del p,p'-DDE e della maggioranza dei congeneri di PCB ricercati; l'HCB e i PBDE, invece, sono stati riscontrati solo in alcuni campioni. Tra i contaminanti analizzati, il prevalente è risultato il p,p'-DDE (media: 1007,67 ng/g base lipidica), in tutti i campioni analizzati; i valori medi degli altri contaminanti di interesse sono invece risultati: PCB 608 ng/g bl, HCB 35 ng/g bl e PBDE 56,27 ng/g bl.

Il latte umano rappresenta in molti casi l'unico alimento assunto dal neonato nei primi mesi di vita, quindi la sua analisi permette di stimare l'assunzione degli contaminanti in maniera più semplice e più vicina alla reale assunzione, di quanto si possa fare in un organismo in cui la dieta è più complessa. L'*intake* di interferenti endocrini attraverso il consumo di latte materno da parte del lattante è risultato di 8,61 µg per il p,p'-DDE, 0,36 µg per l'HCB, 5,38 µg per i PCB e 0,59 µg per i PBDE.

Il confronto dei risultati delle analisi con quelli del lavoro svolto in precedenza nell'area senese ha mostrato che le concentrazioni medie dei contaminanti analizzati sono in diminuzione, soprattutto per quanto riguarda il p,p'-DDE: per tutti i composti ricercati si nota una spiccata tendenza alla diminuzione, con i valori medi dei contaminanti analizzati che risultano ridotti almeno di circa il 40%.

Per quanto riguarda la diminuzione dei livelli di contaminanti, verificata nell'ultimo ventennio, i risultati ottenuti sono incoraggianti: infatti l'esposizione ad interferenti endocrini può rappresentare un elemento importante nel determinare problemi sempre più diffusi nei bambini, quali ad esempio quelli legati allo sviluppo. L'OMS favorisce e promuove l'allattamento al seno, in assenza di evidenze scientifiche sufficienti sui rischi legati alla presenza di contaminanti nel latte stesso e considerandone l'importanza a livello nutrizionale e psicologico, ma ulteriori provvedimenti devono essere presi per garantire che il declino delle concentrazioni di inquinanti, iniziato negli anni '90, prosegua nel tempo. I benefici dell'allattamento al seno sono sostanziali, e il miglior modo di massimizzare tali benefici è ridurre l'esposizione materna, principalmente evitando o riducendo l'assunzione di cibi potenzialmente contaminati.

Bibliografia

1. Focardi S, Fossi C, Fossi E. Livelli di pesticidi clorurati e policlorobifenili nel latte umano. *Rivista Italiana di Pediatria* 1984;10:286-90.

LIVELLI DI INTERFERENTI ENDOCRINI IN ALIMENTI BIOLOGICI E CONVENZIONALI

Cristiana Guerranti Perra, Silvano E. Focardi

Dipartimento di Scienze Ambientali, Università degli Studi di Siena

Nelle pratiche di allevamento “biologico” è vietato utilizzare sostanze stimolatrici della crescita o della produzione, come gli antibiotici, mentre sono ammessi enzimi, microrganismi probiotici e vitamine, inoltre i mangimi e i foraggi somministrati devono essere di origine biologica e il pascolo deve costituire la base dell'alimentazione. È per questi motivi che i prodotti biologici sono presentati, e considerati dalla maggior parte dei consumatori, come esenti da residui di prodotti chimici di sintesi e perciò più sicuri per la salute umana, rispetto ai prodotti convenzionali. Spesso però i benefici per la salute dei prodotti biologici sono supportati più da convinzioni ideologiche e da fattori emotivi che non da studi scientifici, creando i presupposti per un'informazione non proprio corretta; già nel 1991 le Autorità europee, tramite il regolamento n. 2092/1991 sulla commercializzazione dei prodotti biologici, si erano espresse sul fatto che né pubblicità né etichetta debbano suggerire all'acquirente che la conformità al metodo di produzione biologico costituisca una garanzia di superiore qualità organolettica, nutritiva o sanitaria.

Per quanto riguarda gli agenti chimici trasmessi principalmente tramite l'ambiente, e non direttamente impiegati nell'allevamento, come i composti organoalogenati, i cibi biologici e quelli convenzionali sono comunque ugualmente a rischio.

In questo studio sono stati determinati i livelli di PCB, pesticidi clorurati, PCDD, PCDF e PBDE in 6 *pool* di campioni di latte, 12 di latticini, 4 di uova e 32 di carne, provenienti sia da produzioni biologiche che convenzionali. Il metodo analitico seguito è simile a quello descritto da Kannan *et al.* (1). I risultati ottenuti hanno mostrato che anche i prodotti biologici, al pari dei convenzionali, possono essere contaminati dai composti sopra elencati e in alcuni casi i primi sono risultati più contaminati rispetto ai secondi.

Tra i campioni di carne, ad esempio, i livelli di PCB, DDT e HCB, sono risultati superiori nei prodotti biologici rispetto ai convenzionali (livelli medi nella carne: PCB 4,48 ng/g base lipidica nei biologici e 1,39 ng/g bl nei convenzionali; Σ DDT 1,88 ng/g bl nei biologici e 0,05 ng/g bl nei convenzionali; HCB 0,84 ng/g bl nei biologici e 0,05 ng/g bl nei convenzionali).

Al contrario nei campioni di uova i livelli medi di tutti i composti ricercati sono risultati maggiori nei prodotti convenzionali rispetto ai biologici (i livelli medi nelle uova sono risultati i seguenti: PBDE <LOD per entrambe le tipologie di prodotto; PCB 13,79 ng/g bl nelle uova biologiche e 20,02 ng/g bl in quelle convenzionali; Σ DDT < LOD nelle biologiche e 0,29 ng/g bl nelle convenzionali; HCB < LOD nelle biologiche e 0,34 ng/g bl nelle convenzionali; PCDD, PCDF e PCB espressi in WHO-TEQ(2) 0,27 pg/g bl e 0,17 pg/g bl, rispettivamente nelle uova biologiche e convenzionali).

I risultati ottenuti mostrano che, nonostante ci siano benefici nel consumo di alimenti biologici, la presenza di composti con azione di interferenti endocrini rappresenta comunque un pericolo.

Bibliografia

1. Kannan K, Hilscherova K, Yamashita N, Williams LL, Giesy JP. Polychlorinated naphthalenes, -biphenyls, -dibenzo-p-dioxins, and -dibenzofurans in double-crested cormorans and herring gulls from Michigan waters of Great Lakes. *Environ Sci Technol* 2001;35:411-47.
2. Van den Berg M, Birnbaum LS, Denison M, De Vito M, Farland W, Feeley M, Fiedler H, Hakansson H, Hanberg A, Haws L, Rose M, Safe S, Schrenk D, Tohyama C, Tritscher A, Tuomisto J, Tysklind M, Walker N, Peterson RE. The 2005 World Health Organization Re-evaluation of Human and Mammalian Toxic Equivalency Factors for Dioxins and Dioxin-like Compounds. *Toxicol Sci* 2006;93:223-41.

LINDANO CAUSA APOPTOSI NELLE CELLULE GERMINALI PRIMORDIALI DI TOPO

Gina La Sala, Donatella Farini, Massimo De Felici

Dipartimento di Sanità Pubblica e Biologia Cellulare, Università di Tor Vergata, Roma

Il lindano (γ -esaclorocicloesano) è un insetticida classificato come interferente endocrino. Numerosi studi *in vivo* e *in vitro* hanno dimostrato che esso può avere effetti negativi sull'apparato riproduttivo sia maschile che femminile, anche se i meccanismi con cui esso esplica tali effetti sono stati poco chiariti.

Utilizzando il topo come modello sperimentale, abbiamo studiato se l'esposizione al lindano durante la gametogenesi embrionale iniziale, in particolare nel periodo in cui le cellule germinali primordiali (PGCs) stabiliscono la popolazione dei gameti nella gonade, possa interferire con questo delicato processo della riproduzione.

Il lindano somministrato per via orale (15 e 30 mg/kg/bw/day) nel periodo fetale compreso tra E 8.5-11.5, causava una forte diminuzione del numero delle PGC a E 12.5 ($\cong$ 50%) sia nei testicoli che nelle ovaie in formazione. Abbiamo inoltre osservato che l'incubazione in presenza di lindano per 3 ore, causava una diminuzione dose-dipendente del numero delle PGC quando queste venivano coltivate *in vitro* per ulteriori 24 ore.

Successivi esperimenti hanno permesso di verificare che il decremento del numero delle PGCs indotto dal lindano osservato *in vitro*, non era dovuto ad una diminuita proliferazione bensì all'aumento dei fenomeni apoptotici, come rivelato dalla conta delle PGCs TUNEL+ dopo 24h (controllo 20% vs lindano 40%). L'induzione dell'apoptosi causata dal lindano è stata confermata da esperimenti di Western Blotting (WB) che mostravano l'attivazione di PARP e della caspasi-3 in tali cellule incubate per 3 ore con 10–5 M lindano. Infine si è visto che gli effetti pro-apoptotici causati dal lindano non erano dovuti alla sua possibile azione estrogenica, in quanto l'inibitore del recettore degli estrogeni ICI 182,764 non revertiva tale effetto, ma erano associati alla defosforilazione/inattivazione della chinasi AKT la cui attività è essenziale per la sopravvivenza delle PGCs. Difatti, esperimenti di W.B. mostravano che una breve incubazione (15 min) delle PGCs con lindano 10–5M, causava una diminuzione dei livelli basali di fosforilazione nella Ser 473 della AKT e inibiva la sua fosforilazione indotta attraverso l'attivazione del recettore KIT da parte del suo ligando KL.

Questi risultati suggeriscono che l'esposizione al lindano durante le prime fasi della gametogenesi può causare una significativa diminuzione del numero dei gameti nelle gonadi dell'embrione. Il lindano difatti sembra interferire con la sopravvivenza delle PGC attraverso un'azione pro-apoptotica diretta, indipendente dai meccanismi di azione estrogenica causata con ogni probabilità dal suo effetto negativo sull'attività della chinasi AKT.

STUDIO DELL'EFFETTO DI INTERFERENTI ENDOCRINI SULL'ATTIVITÀ CATALITICA DI ANIDRASI CARBONICA II

Lionetto Maria Giulia, Erroi Elisa, Schettino Trifone

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche e Ambientali, Università del Salento, Lecce

L'anidrase carbonica è un metalloenzima che catalizza la reazione reversibile di idratazione della CO_2 in H^+ e HCO_3^- . Tale enzima è coinvolto in un'ampia varietà di processi fisiologici, quali la respirazione, la regolazione acido-base, la secrezione e riassorbimento di elettroliti, il riassorbimento osseo, il processo di calcificazione e svariate reazioni biosintetiche che richiedono lo ione bicarbonato come substrato (ad esempio la litogenesi, la gluconeogenesi e l'ureagenesi). Nei mammiferi sono state descritte 16 isoforme di anidrase carbonica. Tra queste l'anidrase carbonica II, avente una localizzazione citosolica, è quella maggiormente espressa nella maggior parte dei tessuti, come ad esempio l'epitelio renale, l'epitelio del tubo digerente, i globuli rossi, gli epitelii degli organi riproduttori e il sistema nervoso centrale. L'anidrase carbonica II è l'isoforma predominante nel cervello di mammifero e svolge un ruolo molto importante nella secrezione del liquido cerebrospinale. Tale enzima è espresso, inoltre, in diversi tessuti endocrini quali la corticale del surrene, le cellule del Langerhans, l'ipofisi e la sua attività catalitica risulta essere legata alla regolazione della biosintesi e/o secrezione di diversi ormoni. Nell'uomo la sindrome di deficienza di tale enzima provoca alcune patologie come l'osteopetrosi, l'acidosi del tubulo renale e la calcificazione cerebrale. Pertanto, alterazioni nel funzionamento di anidrase carbonica possono comportare gravi alterazioni patologiche.

Nel presente lavoro di ricerca è stato condotto uno studio *in vitro* sulla sensibilità dell'attività catalitica di tale enzima a varie classi di contaminanti chimici noti per la loro attività di interferenti endocrini quali ftalati, *brominated flame retardants* (BFRs), policlorobifenili e pesticidi organofosfati. In particolare le sostanze chimiche testate sono state rispettivamente il dietil ftalato, il tetrabromobisfenolo A, l'esabromociclododecano, il malathion e l'arochlor 1248. L'attività enzimatica è stata dosata elettrometricamente misurando le micromoli di H^+ sviluppate nella miscela di reazione contenente CO_2 come substrato. Nel calcolo delle unità di attività enzimatica è stato sottratto il contributo della reazione non catalizzata, determinato aggiungendo acetazolamide ($1 \mu\text{M}$), noto inibitore di anidrase carbonica, nella miscela di reazione. Per i dosaggi di attività enzimatica è stata utilizzata l'isoforma II di anidrase carbonica bovina, la quale presenta un elevato grado di omologia con l'isoforma umana. Per tutte le sostanze testate l'attività dell'anidrase carbonica ha manifestato un significativo decremento all'aumentare della concentrazione del contaminante presente nella miscela di reazione. Tuttavia, come emerso dal calcolo dei valori di IC_{20} e di IC_{50} , la sensibilità dell'enzima è risultata differente per le diverse classi di xenobiotici analizzati. I composti che esercitano la maggiore inibizione sono rappresentati dagli organofosfati e i PCB, con valori di IC_{50} rispettivamente di 10^{-6} e 10^{-5} g/L, seguiti da ftalati e *brominated flame retardants*.

In conclusione, per la prima volta è stato dimostrato come l'enzima anidrase carbonica, che svolge un ruolo fondamentale in numerosi aspetti della fisiologia dell'organismo, possa rappresentare un target per l'azione di svariate classi di xenobiotici, quali policlorobifenili, pesticidi organofosfati, ftalati e *brominated flame retardants*, rendendo vulnerabili all'azione di tali sostanze i processi fisiologici che da essa dipendono.

LA TOSSICOGENOMICA COME STRATEGIA *IN VITRO* PER LA CARATTERIZZAZIONE DI SOSTANZE CHE INTERFERISCONO CON IL RECETTORE ANDROGENO: IL PROGETTO REPROTECT

Stefano Lorenzetti (a), Vincenzo Lagatta (a), Ilaria Altieri (a), Federica Aureli (a), Francesco Cubadda (a), Daniele Marcoccia (a), Francesca Maranghi (a), Eleonora Arico' (b), Irene Canini (b), Luciano Castello (b), Stefania Parlato (b), Lucia Gabriele (b), Alberto Mantovani (a)

(a) Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Istituto Superiore di Sanità, Roma

(b) Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Le nuove politiche europee sull'analisi e valutazione di composti chimici contemplano anche lo sviluppo e messa a punto di nuove strategie *in vitro* per lo studio della tossicità di sostanze chimiche (contaminanti ambientali e/o alimentari) in modo da limitare nella sperimentazione l'uso di test *in vivo* e quindi il numero di animali utilizzati.

L'avvento delle nuove tecniche di biologia molecolare, le cosiddette OMICS – dai suffissi di *transcript-omics*, *prote-omics* e *metabol-omics* – consentono lo studio dei cambiamenti cellulari mediante l'analisi dei profili, rispettivamente, dell'espressione genica, proteica e della produzione di metaboliti. Esse inoltre permettono di rivelare in una fase molto precoce lo sviluppo di un'alterazione cellulare o tissutale: in tal modo, mediante lo studio degli effetti e dei meccanismi d'azione delle sostanze in esame è possibile valutare quali siano i cambiamenti molecolari che precedono l'evento tossico in sé, definendo così una "impronta digitale" (*toxicological signature*), potenziale biomarcatore d'effetto per uno specifico composto o per un gruppo di composti con analogo meccanismo/bersaglio.

Un obiettivo del Progetto Europeo ReProTect (finalizzato allo sviluppo di strategie *in vitro* per la valutazione di sostanze tossiche per la riproduzione: www.reprotect.eu), è la messa a punto dell'approccio tossicogenomico per l'identificazione dei composti che interferiscono con il recettore androgeno (AR) mediante caratteristici profili di espressione genica. La strategia sperimentale adottata comprende l'uso di due linee cellulari di prostata umana, PNT-2A e LNCaP, con differente espressione di AR e diverso potenziale tumorigenico; la prostata è stata selezionata in quanto tessuto fortemente dipendente dalla modulazione androgena. Lo studio del profilo di espressione genica viene effettuato mediante un gruppo di sostanze modello: gli agonisti di AR diidrotestosterone e metiltestosterone, gli antagonisti 2-idrossi-flutamide e linuron (un erbicida che lega AR) e il dibutil-ftalato, un plasticizzante che ha effetti antiandrogeni *in vivo* senza legare AR. Tale approccio permetterà di sviluppare un "chip microarray dedicato" capace di distinguere gli effetti (anti)androgenici di composti chimici su linee cellulari di prostata umana e, in prospettiva, di selezionare *in vitro* ("prioritizzazione") e in maniera specifica, accurata ed efficiente i potenziali interferenti endocrini in grado di interferire con AR. Gli esperimenti di tossicogenomica finora effettuati hanno evidenziato l'esistenza di una risposta specifica agli (anti)androgeni per ciascuna delle due linee cellulari utilizzate.

Un ulteriore aspetto è la valutazione della reale significatività della modulazione dei profili d'espressione genica in rapporto alla predizione di alterazioni morfo-funzionali (*phenotypic anchoring*). Sulle stesse linee cellulari (utilizzando i terreni di coltura delle cellule in crescita sotto trattamento), sono stati determinate le concentrazioni di due marcatori d'effetto: i) la secrezione di *Prostate Specific Antigen-PSA* (mediante fluorimetria a tempo risolto), un riconosciuto biomarcatore clinico per il monitoraggio dell'adenocarcinoma prostatico; ii) il rilascio dello zinco (mediante ICP/MS), un marcatore metabolico della funzionalità della

prostata. Anche negli esperimenti di *phenotypic anchoring* finora effettuati è stata messa in evidenza la specificità cellulare della risposta funzionale agli (anti)androgeni oggetto dello studio. Pertanto, i dati confermano che le caratteristiche dell'ambiente cellulare (differenziazione, espressione di recettori nucleari) vanno accuratamente considerate nello sviluppo delle strategie di tossicogenomica.

EFFETTO DEGLI FTALATI SULLA FISIOLOGIA RIPRODUTTIVA DEL TELEOSTEO *DANIO RERIO*

Francesca Maradonna (a, b), Matteo Evangelisti (a), Damiano Gustavo Mita (b), Oliana Carnevali (a, b)
 (a) Dipartimento di Scienze del Mare, Università Politecnica delle Marche, Ancona
 (b) Istituto Nazionale Biostrutture e Biosistemi, Roma

Recentemente, la legislazione che regola il rilascio nell'ambiente del di(2-etilexil)ftalato (DEHP), plastificante principe del PVC, ha sancito una progressiva restrizione del suo utilizzo. La maggior parte dei dati relativi all'effetto tossico degli ftalati derivano da studi condotti sui mammiferi, dove si è osservato che i metaboliti degli ftalati possono determinare danni al fegato, ai testicoli, anomalie della steroidogenesi e nella progenie. Poche sono invece le informazioni relative all'effetto di questi interferenti endocrini (IE), tra cui il DEHP, sui vertebrati non mammiferi.

In questo studio, l'effetto del DEHP è stato analizzato in colture di epatociti isolati da maschi e femmine di *zebrafish*, *Danio rerio*, esposti per 48 ore a due dosi di DEHP (10 e 100 nM). Ipotesizzando la natura estrogenica di questo inquinante, i dati ottenuti sono stati paragonati a quelli ottenuti con l'esposizione all'etinilestradiolo (EE2, 10 µM). Mediante Real time PCR, è stata analizzata l'espressione di geni chiave nella fisiologia della riproduzione quali la vitellogenina (*vtg1*), i recettori degli estrogeni (*ERα*, *ERβ1*, *ERβ2*), le aromatasi (*CYP19a*, *CYP19b*) e i recettori attivati dai proliferatori perossisomiali (*PPARα*, *PPARβ*), noti come target primari degli ftalati e coinvolti anche nella steroidogenesi.

I risultati ottenuti hanno evidenziato la capacità del DEHP di interferire con la fisiologia riproduttiva di *D. rerio* stimolando la trascrizione della *vtg* e inibendo quella del *CYP19*.

Sono state osservate differenze significative tra maschi e femmine per ciò che riguarda la trascrizione dei geni *ERα*, *ERβ1*, *ERβ2* indicando una chiara risposta sesso specifica. In particolare, gli organismi maschili hanno mostrato una maggiore sensibilità all'esposizione allo ftalato.

Concludendo, questo studio *in vitro* fornisce indicazioni chiare sull'effetto del DEHP a livello epatico e suggerisce l'uso dei geni qui studiati come possibili biomarkers di tossicità per il monitoraggio degli ftalati ambientali.

Data l'elevata similarità genetica tra *D. rerio* e l'uomo, questo modello sperimentale recentemente è molto utilizzato negli studi tossicologici. In questa direzione, lo studio qui presentato migliora le conoscenze del *pathway* molecolare coinvolto nella risposta epatica ad uno dei più comuni inquinanti presenti nell'ambiente.

EFFETTI ISTOPATOLOGICI PRELIMINARI DI 2,3,7,8-TCDD, PCB-153, PBDE-47 E HBCD SOMMINISTRATI PER 28 GIORNI IN UNA DIETA A PARZIALE CONTENUTO PROTEICO ITTICO A FEMMINE DI TOPO BALB/C IN FASE PRE-PUBERALE

Francesca Maranghi (a), Gabriele Moracci (a), Roberta Tassinari (a), Josef D. Rasinger (a), Thomas S. Carroll (b), Christer Hogstrand (b, c), Marte Haave (c), Anne Katherine Lundebye (c), Alberto Mantovani (a), Agostino Macri (a)

(a) *Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(b) *Dipartimento di Biochimica, Divisione di ricerca di scienze nutrizionali, School of Biomedical & Health Sciences, Londra*

(c) *Istituto Nazionale di Ricerca della nutrizione e frutti di mare, Bergen, Norvegia*

Introduzione. Una priorità della ricerca in materia di sicurezza alimentare è rappresentata dagli alimenti ittici, come fonte di sostanze nutritive quali proteine, acidi grassi, vitamine e minerali. Tuttavia i benefici nutrizionali del consumo di pesce devono essere accuratamente valutati tenendo conto dei rischi potenziali dovuti alla presenza di contaminanti. Nel pesce, sia pescato che allevato, infatti, si ritrovano spesso concentrazioni significative di xenobiotici con effetto endocrino (interferenti endocrini, IE) soprattutto contaminanti organici persistenti (*Persistent Organic Pollutants*, POPs) che si accumulano aumentando di concentrazione nella catena alimentare rappresentando una fonte di rischio per la salute dei consumatori, in particolare di fasce vulnerabili di popolazione come le donne in gravidanza e/o i bambini. Obiettivo del presente studio è di caratterizzare, attraverso un modello murino, i potenziali effetti istopatologici dei principali contaminanti, tradizionali o emergenti, presenti nel pesce pescato e/o di allevamento, con specifica attenzione alla fase di sviluppo prepuberale particolarmente suscettibile all'azione degli IE.

Materiali e metodi. 90 topi femmina BALB/c sono state divise in 9 gruppi sperimentali e trattate per 28 giorni attraverso la dieta con i seguenti contaminanti: 2,3,7,8-TCDD, PCB-153, PBDE-47 e HBCD. Le sostanze sono state aggiunte singolarmente alla dieta standard per roditori AIN 93G a due livelli di dose: la bassa dose che corrisponde alla più alta concentrazione di sostanza ritrovata nei filetti di salmone, mentre l'alta dose al LOEL più alto per effetti nel topo (2,3,7,8-TCDD: 100 ng/kg e 6 pg/kg; PCB-153: 274 µg/kg e 9 µg/kg, PBDE-47: 375 µg/kg e 4 µg/kg; HBCD: 200 mg/kg e 200 µg/kg). Un gruppo di controllo è stato nutrito con la sola dieta standard. Durante il trattamento gli animali sono stati controllati giornalmente per le condizioni di salute; il peso e il consumo di mangime sono stati registrati quotidianamente. Il giorno successivo all'ultimo trattamento gli animali sono stati sacrificati. Tiroide, surreni, cervello, timo, milza e utero sono stati prelevati, pesati, fissati e conservati per l'esame istologico e istomorfometrico.

Risultati. Non si registrano differenze statisticamente significative nell'incremento ponderale e nel consumo di mangime. Si osserva un aumento significativo del peso relativo del fegato per gli animali trattati con HBCD al livello di dose maggiore. Tiroide: trattamento ad alta dose -incremento della desquamazione nel lume follicolare (PBDE 71% - $P \leq 0.05$; PCB 43%; TCDD 43%; HBCD 14% vs 0% del gruppo di controllo); -incremento dell'aspetto schiumoso della colloide (PBDE 43%; PCB 43%; TCDD 43%; HBCD 14% vs 14% del gruppo di controllo). Milza: trattamento ad alta dose -iperplasia linfatica con conseguente riduzione delle

zone di eritropoiesi (PCB 100%, PBDE 90%, TCDD 100%, HBCD 60% vs 40% del gruppo di controllo); -aumento delle infiltrazioni nelle polpa rossa e nelle zone periarteriolari (PCB 80%, PBDE 50%, TCDD 40% vs 0 del gruppo di controllo). L'esame istopatologico per i gruppi di trattamento a bassa dose e per gli altri organi target è in corso di svolgimento.

Conclusioni. Gli effetti evidenziati a livello tiroideo sottolineano una differenza di tossicità tra i POPs esaminati nell'indurre effetti sottili a carico di tale organo, confermata dagli effetti (ad alte dosi) a livello della milza. Tali dati in fase preliminare confermano come la ghiandola tiroidea e il sistema immunitario rappresentino potenziali bersagli dell'azione dei POPs. Inoltre, l'utilizzo di un modello murino immaturo, fase critica di suscettibilità agli IE, contribuisce a migliorare il processo di valutazione del rischio mirato alla sicurezza alimentare.

Ringraziamenti. Studio effettuato nell'ambito del Progetto AQUAMAX (VI FP Contr. N. 016249-2).

ESPOSIZIONE A PESTICIDI E AUMENTATO RISCHIO DI PATOLOGIE TIROIDEE: STUDIO EPIDEMIOLOGICO SU UNA COORTE DI LAVORATORI AGRICOLI

Emanuela Medda (a), Michele Roberti (b), Silvio Pascarella (b), Ciro Pascarella (b), Antonio Natale (b), Filippo D'Addio (b), Alessandro Correrà (b), Silvio Canzano (b), Antonio Anastasio (b), Simona De Angelis (c), Daniela Rotondi (a), Alberto Mantovani (d) Antonella Olivieri (c)

(a) *Centro Nazionale di Epidemiologia, Sorveglianza e Promozione della Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(b) *Asl Caserta 1, Distretto 27, Maddaloni, Caserta*

(c) *Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(d) *Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

L'esposizione a pesticidi e fertilizzanti riguarda ampi strati della popolazione. L'assorbimento di queste sostanze può infatti avvenire secondo diverse modalità: diretta, per chi li produce e per chi li usa nelle operazioni agricole; indiretta, per chi vive o frequenta gli ambienti in cui i pesticidi vengono utilizzati; alimentare, a cui sono potenzialmente tutti esposti. Studi sperimentali hanno mostrato che sostanze chimiche di sintesi, quali pesticidi e fertilizzanti, sono in grado di interferire con l'omeostasi tiroidea. Nonostante l'elevato potenziale di esposizione a queste sostanze e le evidenze su modelli sperimentali, pochi sono gli studi condotti su campioni rappresentativi di popolazione finalizzati alla valutazione dei possibili rischi per la salute umana.

Lo studio si propone di stimare il rischio di patologie tiroidee nei lavoratori agricoli e in soggetti residenti in aree urbane o rurali non professionalmente esposti.

Per il raggiungimento degli obiettivi l'indagine è stata condotta su 10.789 soggetti adulti residenti in un'area geografica caratterizzata da un'intensa attività agricola. I dati demografici e clinici sono stati estratti dagli archivi elettronici di 8 medici di medicina generale attivi sul territorio del Comune di Maddaloni.

L'analisi dei dati è stata mirata alle stime di prevalenza delle patologie tiroidee e ad altri disturbi endocrini (classificati in base alla classificazione internazionale) nei diversi sottogruppi di popolazione in studio e alla stima dei rischi associati alle diverse esposizioni (residenza rurale e urbana, attività professionale, età, sesso) attraverso tecniche di analisi multivariata.

È stata stimata una prevalenza complessiva di patologie tiroidee pari al 5,8% e un'analisi per sesso (9,6% nelle femmine, 1,8% nei maschi), zona di residenza (5,5% nei residenti in aree urbane, 7,1% nei residenti in aree rurali) e attività lavorativa (13,1% per gli addetti agricoli, 5,6% per chi svolge altre professioni) ha consentito di stimare le percentuali di affetti nei diversi gruppi.

Inoltre, l'analisi delle singole patologie tiroidee ha mostrato un rischio significativamente aumentato di ipotiroidismo negli agricoltori (OR=2,68; IC 95%: 1,52-4,73) e, come atteso, il rischio di gozzo risultava significativamente aumentato nei soggetti con residenza rurale OR = 1,41; IC 95%: 1,08-1,85), indipendentemente dal tipo di attività lavorativa svolta.

A conferma dei risultati ottenuti, nessuna differenza significativa è stata osservata nell'insorgenza del diabete.

In conclusione, lo studio di un consistente campione di popolazione ha messo in evidenza una più elevata frequenza di patologie tiroidee e, in particolare, di ipofunzione tiroidea in soggetti con esposizione professionale a pesticidi e fertilizzanti.

Considerato il non trascurabile ruolo delle esposizioni non professionali, quali dieta e residenza in zone a contaminazione ambientale, sono state avviate nella stessa zona nuove indagini al fine di una più accurata definizione del rischio in funzione della dose e di promozione di strategie di prevenzione.

ENZIMI TERMOSTABILI PER LA RILEVAZIONE E DECONTAMINAZIONE DI ORGANOFOSFATI

Luigia Merone, Luigi Mandrich, Mosè Rossi, Giuseppe Manco
 Istituto di Biochimica delle Proteine, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Napoli

Tra gli interferenti endocrini, gli organofosfati sono fosfoesteri di natura sintetica comparsi sul pianeta nella seconda metà del secolo scorso. Essi sono altamente tossici in quanto inibiscono irreversibilmente le “esterasi a serina” e in particolar modo l’Acetil colinesterasi, un enzima chiave del sistema nervoso centrale dei mammiferi. Negli ultimi decenni il massivo utilizzo degli OPs nell’agricoltura ha comportato il crescente interesse della ricerca scientifica verso lo studio di sistemi di rilevazione (biosensori) e decontaminazione ambientale alternativi all’uso di metodi chimici e fisici (inceneritori), a loro volta altamente inquinanti.

La “rilevazione/decontaminazione bio-sostenibile” operata da enzimi idrolitici capaci di riconoscere e/o catalizzare specificamente l’idrolisi di sostanze tossiche di interesse sta prendendo piede in quanto tali catalizzatori sono capaci di agire in maniera specifica, generalmente rapida e in condizioni di reazione blande.

Recentemente è stato condotto uno studio approfondito sull’inibizione dell’esterasi dall’organismo termofilo *Alicyclobacillus acidocaldarius* (EST2) e sul suo utilizzo per la costruzione di biosensori (1). Tale enzima mostra un’attività catalitica prossima al limite di diffusione molecolare nei confronti di carbossilesteri del p-nitrofenolo e una temperatura ottimale di 70 °C. Il sito catalitico dell’enzima è fortemente inibito dal paraoxon con costanti di inibizione irreversibile di circa 2µM. Questo lo rende un ottimo candidato sia per un utilizzo biosensoristico, determinazione di acque/suoli contaminati, che di decontaminazione, intrappolamento di organofosfati nel sito catalitico.

Negli ultimi anni due lattonasi fosfotriesterasi like (*Phosphotriesterase Like Lactonase*, PLL) sono state isolate dal microorganismo ipertermofilo *Archaeon Sulfolobus*: SsoPox (da *S. solfataricus*) e SacPox (da *S. acidocaldarius*) (2). Cataliticamente possiedono attività idrolitica nei confronti di molti pesticidi fosfotriesteri (paraoxon, parathion, coumaphos, ecc.), con, tuttavia, costanti catalitiche relativamente basse ($k_{cat}=4 \cdot 10^3 \text{ s}^{-1}$). Mostrano, inoltre, un’elevata termofilia ($T_{opt}=85 \text{ °C}$ - 90 °C) e un’eccezionale termostabilità ($t_{1/2}$ a $95 \text{ °C} = 2\text{-}4\text{h}$) che le rende appetibili per processi industriali. Sono state già ottenute con successo forme mutate dell’enzima SsoPox che hanno consentito incrementi di specificità sul pesticida paraoxon fino a 15 volte la specificità dell’enzima *wilde type*, senza comprometterne la termostabilità. Recentemente è stata anche risolta la struttura della fosfotriesterasi di SsoPox3. La sua conoscenza consentirà di certo una più rapida evoluzione *in vitro* dell’enzima volta a migliorare la specificità anche verso altri tipi di organofosfati.

Bibliografia

1. Febbraio F, D'Andrea SE, Mandrich L, Merone L, Rossi M, Nucci R, Manco G. *Extremophiles* 2008;12:719-28.
2. Merone L, Mandrich L, Rossi M, Manco G., *Current Chemical Biology Review* 2008, 2:237-48.
3. Elias M, Dupuy J, Merone L, Mandrich L, Porzio E, Moniot S, Rochu D, Lecomte C, Rossi M, Masson P, Manco G, Chabriere E. *Journal of Molecular Biology* 2008;379:1017-28.

EFFETTI ORGANIZZAZIONALI DEL BISFENOLO-A SULL'ESPRESSIONE DELLA KISSPEPTINA E DELLA NOS NELL'IPOTALAMO DI TOPI CD-1

Dèsirée Miceli (a), Mariangela Martini (a), Isabelle Franceschini (b), Paola Palanza (c), Carla Viglietti-Panzica (a), Giancarlo Panzica (a)

(a) *Laboratorio di Neuroendocrinologia, Dipartimento di Anatomia, Farmacologia e Medicina Legale, Università di Torino*

(b) *UMR 6175 INRA/CNRS/ Tours University, Tours, Francia*

(c) *Dipartimento di Biologia Evolutiva e Funzionale, Università di Parma*

Tra i diversi distruttori endocrini (EDs), il bisfenolo-A (BPA) è stato ampiamente studiato per la sua capacità di indurre, anche a basse concentrazioni, numerosi effetti biologici negativi quale l'alterazione del normale processo di differenziazione sessuale a livello encefalico e comportamentale. In particolare, topi esposti durante il periodo perinatale al BPA presentano, da adulti, alterazioni nei comportamenti di esplorazione e nelle risposte emotive, oltre che un anticipo della pubertà (1). Recentemente, numerosi studi hanno cercato di chiarire le basi morfofunzionali delle alterazioni comportamentali indotte dall'esposizione a EDs (2). Visti gli effetti comportamentali, tra i bersagli potenziali del BPA si possono annoverare i circuiti a kisspeptina (un peptide considerato oggi la molecola chiave per l'induzione della pubertà) e quelli a monossido di azoto (NO), un neurotrasmettitore profondamente coinvolto nella regolazione di diversi comportamenti estrogeno-dipendenti. Entrambi questi sistemi, giocano poi un ruolo chiave nella regolazione centrale della fertilità in quanto regolano direttamente i neuroni produttori di GnRH.

Tre differenti concentrazioni di BPA (10, 20, 40 µg/kg/die) sono state somministrate per via orale a femmine di topo CD1 a partire dal giorno 11 di gestazione fino al giorno 8 post parto. Nella prole adulta di entrambi i sessi abbiamo analizzato, con tecniche immunoistochimiche, la distribuzione del sistema a kisspeptina e a NO-sintasi (NOS) in alcune aree chiave quali i nuclei della stria terminale (BST), arcuato (Arc), periventricolare (PeN), anteroventrale periventricolare (AVPe) e preottico mediale (POM). L'analisi quantitativa dell'espressione della kisspeptina in AVPV, PeN e Arc degli animali di controllo, dimostra in tutti i nuclei la presenza di uno spiccato dimorfismo sessuale con una maggiore immunoreattività nelle femmine sia per il numero di cellule sia per la densità di fibre. Nei maschi trattati con BPA si è osservato che, in tutti i nuclei, è presente un notevole incremento del segnale con una tendenza alla scomparsa del dimorfismo. Per quanto riguarda il sistema a NOS, effetti significativi del trattamento sono stati riscontrati solo nel POM e nella porzione ventrale del BST. Nel POM, le dosi più alte di BPA inducono una riduzione del numero di cellule nei maschi e un aumento nelle femmine. Nel BSTv, le dosi intermedie determinano, solo nei maschi, una significativa riduzione delle cellule a NOS (3).

In conclusione, i nostri dati suggeriscono un significativo effetto organizzazionale del BPA su specifici *pathways* neuronali quali i circuiti a kisspeptina e NOS, potenzialmente in grado di controllare il circuito a GnRH e lo sviluppo della pubertà.

Ringraziamenti. Questa ricerca è stata finanziata dalla Regione Piemonte (GCP, CVP).

Bibliografia

1. Gioiosa L, Fissore E, Ghirardelli G, Parmigiani S, Palanza P. Developmental exposure to low-dose estrogenic endocrine disruptors alters sex differences in exploration and emotional responses in mice. *Horm Behav* 2007;52:307-16.
2. Panzica GC, Viglietti-Panzica C, Mura E, Quinn MJ Jr, Palanza P, Ottinger MA. Effects of xenoestrogens on the differentiation of behaviorally-relevant neural circuits. *Front Neuroendocr* 2007;28(4):179-200.
3. Panzica GC, Mura E, Miceli D, Martini M, Gotti S, Viglietti-Panzica C. Behavioral and Neural action of xenoestrogens in birds and mammals. *Ann N York Acad Sci*, 2009; in press

DETERMINAZIONE MEDIANTE HPLC-MS DI ACIDO PERFLUORO-OTTAN-SULFONICO (PFOS) E ACIDO PERFLUORO-OTTANOICO (PFOA) IN TESSUTI BIOLOGICI PRELEVATI POST MORTEM IN UN GRUPPO DI SOGGETTI DELLA POPOLAZIONE GENERALE

Sara Negri (a), Luciano Maestri † (a), Giulia Esabon (a), Massimo Ferrari (b), Ornella Pastoris (c), Danilo Cottica (a)

(a) Centro Ricerche Ambientali, Padova-Pavia, Fondazione Salvatore Maugeri, IRCCS, Pavia

(b) Unità Operativa di Medicina Ambientale e Medicina Occupazionale, Fondazione Salvatore Maugeri, IRCCS, Pavia

(c) Dipartimento di Scienze Fisiologiche-Farmacologiche Cellulari-Molecolari, Università degli Studi di Pavia

L'acido perfluoro-ottan-sulfonico (PFOS) e l'acido perfluoro-ottanoico (PFOA) sono composti chimici fluorurati con proprietà tensioattive che appartengono alla famiglia dei PFAS (sostanze perfluoroalchiliche). Il PTFE, commercialmente noto come Teflon, è il capostipite di tutti i fluoropolimeri e viene utilizzato dagli anni '40 in molti settori (industria tessile, cartacea, settore chimico e delle schiume antincendio). Ad oggi gli effetti che i PFAS provocano sulla salute umana e sull'ambiente sono poco chiari: per questo motivo negli ultimi anni sono stati realizzati diversi studi sugli animali e sull'ambiente con lo scopo di definire con maggiore chiarezza gli effetti nocivi di queste molecole. Fra le caratteristiche più importanti che sono emerse si evidenzia: la persistenza nell'ambiente, la capacità di bioaccumularsi e di interferire con il sistema endocrino animale, la neurotossicità e la capacità di interferire con lo sviluppo fetale; inoltre, nel 2006 l'EPA ha decretato che entro il 2015 tutte le emissioni di PFOA devono essere eliminate. Nello stesso anno il *Science Advisory Board* dell'EPA suggerì l'inserimento del PFOA fra le sostanze *likely carcinogen*.

In questo lavoro sono stati determinati per la prima volta i livelli post mortem di PFOA e di PFOS nei tessuti di otto soggetti non esposti professionalmente a queste sostanze; i tessuti analizzati erano: fegato, reni, tessuto adiposo, cervello, nuclei della base, ipofisi, tiroide, gonadi, pancreas, polmoni, muscolo scheletrico e sangue. Come tecnica analitica è stata utilizzata una HPLC abbinata ad uno spettrometro di massa (LC/MS). Lo scopo era quello di capire quanto e in quali organi queste due sostanze tendono ad accumularsi in maniera preferenziale. In tutti i tessuti (tranne il tessuto adiposo) i limiti di rilevabilità (rapporto segnale/rumore =3) erano 0,1 ng/g sia per il PFOA che per il PFOS; nel tessuto adiposo il limite era circa uguale a 0,2 ng/g. Il contenuto degli analiti nei tessuti variava da 0,3 a 3,8 ng/g (rispettivamente: nuclei della base e polmoni) per il PFOA, e da 1,0 a 13,6 ng/g (rispettivamente: muscolo scheletrico e fegato) per l'isomero lineare del PFOS. In particolare si è osservata un'evidente correlazione tra la concentrazione di PFOA nella tiroide e l'età dei soggetti esaminati.

Alla luce di questi primi risultati e delle ultime evidenze sperimentali in letteratura riguardo gli effetti a carico di questo organo (deplezione *in vivo* dell'ormone tiroideo serico associata alla interferenza dei geni deputati al loro metabolismo), ci sembra opportuno il dosaggio dei PFAS in campioni biotipici tiroidei prelevati da pazienti noti per diverse tireopatie.

INTERFERENTI ENDOCRINI NELLE ACQUE PER CONSUMO UMANO

Massimo Ottaviani

Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Le indagini ad oggi disponibili, che mirano a valutare le vie e modalità di esposizione della popolazione agli interferenti endocrini (ED, *Endocrine Disruptors*), hanno evidenziato che essa avviene in massima parte attraverso l'ingestione di alimenti, con un minimo apporto per via cutanea e respiratoria. Concentrazioni assai modeste di queste sostanze sono state finora rilevate nelle acque grezze superficiali, nelle acque profonde e nelle acque trattate. Sia pure sulla base di dati piuttosto scarsi e incompleti si può ritenere che alcune di queste sostanze sono talora presenti, a concentrazioni assai esigue, anche nell'acqua destinata al consumo umano (1).

Sulla base di tale premessa Fondazione AMGA in collaborazione con l'Università di Genova - DISSAL, ha promosso una valutazione preliminare sulla presenza degli ED nelle acque in generale, e in particolare nelle acque destinate al consumo umano, che è stata resa nota nel rapporto "Stato dell'arte sulla presenza nelle acque di sostanze denominate *Endocrine Disruptors*" (2).

Visto l'interesse suscitato dall'iniziativa, è stato costituito un gruppo di Esperti per approfondire le tematiche relative alla messa a punto dei metodi analitici chimici per la determinazione degli ED nelle acque destinate al consumo umano; valutare il possibile impiego di test biologici come screening per la presenza degli ED e infine verificare l'efficacia dei sistemi di potabilizzazione attualmente in uso. Ulteriore obiettivo è quello di fornire ai gestori degli acquedotti italiani un modello operativo costruito sulla base del *know-how* degli Enti e Istituti di Ricerca rappresentati, e delle realtà acquedottistiche già coinvolte.

Al Gruppo hanno aderito l'Istituto Superiore Sanità (ISS), Fondazione Mario Negri, diverse Università italiane (Genova, Pisa, Trento, Milano, Venezia) ed Enti stranieri quali il *Fraunhofer Institute for Molecular Biology and Applied Ecology* (IME) in Germania. Inoltre partecipano al progetto alcune importanti realtà acquedottistiche italiane (ACSM di Como, Acquedotto Pugliese di Bari, Publiacqua di Firenze, Hera di Bologna, Iride Acqua Gas di Genova, SMAT di Torino). La composizione dell'intero Gruppo è riportata nel sito web (www.edinwater.com) appositamente allestito.

L'attività del Gruppo, avviata nel 2007, ha previsto varie fasi e attualmente l'Istituto Superiore di Sanità ha completato le prove sperimentali e la messa a punto dei metodi analitici utilizzabili per la determinazione delle sostanze individuate come prioritarie nel progetto (17 α -etinilestradiolo, estrone, β -estradiolo, bisfenolo A, 4-octilfenolo, nonilfenolo) e di altre sostanze ad azione endocrina come i surfattanti perfluorurati. Analogamente l'Università di Pisa e di Genova e l'ISS hanno messo a punto i test biologici (su linee cellulari, test biochimici, test di biologia molecolare) per la determinazione degli ED nelle acque destinate al consumo umano.

Attualmente sono in corso le prove preliminari di analisi chimiche e test biologici di miscele standard di ED in vista dei campionamenti delle acque grezze e trattate di diverse realtà acquedottistiche italiane.

Bibliografia

1. Wenzel A, Müller J, Ternes T. *Study on endocrine disrupters in drinking water. Final Report*. ENV.D.1./ETU/2000/083, 2003. Disponibile all'indirizzo: http://ec.europa.eu/research/endocrine/pdf/drinking_water_en.pdf; ultima consultazione 20/07/2009.
2. Fondazione AMGA e Dipartimento di Scienze delle Salute dell'Università di Genova. *Stato dell'arte sulla presenza nelle acque destinate al consumo umano di sostanze denominate "Endocrine Disruptors"*. Genova: Editore Utilitatis pro acqua energia ambiente; 2006.

AMBIENTI DI LAVORO E INTERFERENTI ENDOCRINI: CARATTERIZZAZIONE DEI RISCHI POTENZIALI

Bruno Papaleo, Lidia Caporossi

Dipartimento di Medicina del Lavoro, Istituto Superiore per la Prevenzione e la Sicurezza del Lavoro (ISPESL), Monteporzio Catone, Roma

Le preoccupazioni sanitarie legate all'incremento di patologie endocrine negli ultimi decenni, hanno spinto molti ricercatori ad interrogarsi sugli elementi ambientali che possano influire sull'eziologia di queste patologie. La diffusione notevolissima di composti interferenti endocrini (IE) in ambienti di vita e la loro presenza in un numero considerevole di processi produttivi, richiede indagini mirate ai comparti e alle patologie per poter caratterizzare questo specifico rischio e attivarsi quindi per una prevenzione e protezione efficace della salute dei lavoratori. I comparti coinvolti spaziano dall'agricoltura alla termodistruzione dei rifiuti, dall'industria dei coloranti a quella elettrica ed elettronica, dalla produzione della gomma e della plastica all'industria petrolchimica, coinvolgendo anche il settore metallurgico, la cantieristica navale e molti altri. Gli studi clinico-epidemiologici condotti finora su popolazioni lavorative hanno evidenziato effetti sulla salute connessi principalmente con alterazioni del sistema riproduttivo, sia maschile che femminile, e dei livelli degli ormoni tiroidei. Il sistema riproduttivo maschile è vulnerabile alle sostanze chimiche principalmente nella fase della spermatogenesi. Quello femminile è vulnerabile ma i dati di letteratura non sono sufficientemente numerosi da consentire l'individuazione di un preciso meccanismo biologico di danno. È documentata poi la possibilità che l'esposizione occupazionale dei genitori possa avere delle conseguenze per la progenie con malformazioni e difetti degli apparati riproduttivi (ipospadia e criptorchidismo). Spesso negli studi sull'uomo sono carenti i dati di esposizione e risulta difficile attribuire alcuni effetti negativi all'esposizione ad un solo composto; la valutazione dei potenziali fattori di confondimento, poi, rappresenta un elemento critico di valutazione. In ambito agricolo si è evidenziata un'associazione positiva tra occupazione e incidenza di sterilità, malformazioni congenite, aborto spontaneo, basso peso alla nascita, nascita pretermine e mortalità perinatale, con significatività non sempre confrontabile, legata al disegno degli studi epidemiologici condotti. L'esposizione a metalli quali Pb, Cd e Hg ha mostrato in media conte spermatiche inferiori, ridotto volume, densità e motilità degli spermatozoi, alterata morfologia. Un livello elevato di piombo ematico è stato associato ad un'inibizione della deiodinazione del T4, e quindi ad un'alterazione della funzionalità tiroidea.

L'esposizione occupazionale a solventi organici di uso industriale è stata correlata a diversi disturbi della salute riproduttiva tra i quali disturbi mestruali, diminuzione della fertilità ed effetti avversi sulla gravidanza. L'esposizione allo stirene causa una significativa riduzione della conta spermatica. Gli effetti dello stirene sulla funzionalità della ghiandola tiroidea sono fortemente sospettati e indagati seppur non si è ancora giunti ad elementi conclusivi.

Tra le sostanze chimiche più studiate per le loro proprietà estrogeniche ci sono gli ftalati, il bisfenolo A e il nonilfenolo, in particolar l'esposizione ad alcuni ftalati comporta importanti alterazioni dello sviluppo del sistema riproduttivo maschile (1).

Bibliografia

1. Papaleo B, Caporossi L, Marcellini L, De Rosa M, Pera A. Occupational Exposure to endocrine disrupters chemicals (EDCs). In: Marino M, Mita DG. (Ed.) *The endocrine disruptors*. Kerala, India: Transworld Research Network Trivandrum; 2007. p. 129-158.

ESPOSIZIONE DI PRE-ADIPOCITI UMANI A PCB: RISULTATI PRELIMINARI

Elisabetta Pazzano (a), Maria Grazia Aluigi (a), Sergio Bottero (a), Alessandra Cevasco (a), Rossella Coradeghini (b), Paolo Fardin (c), Chiara Generoso (d), Chiara Guida (b), Caterina Scanarotti (b), Barbara Vivaldi (e), Alberta Mandich (a)

(a) Dipartimento di Biologia (DIBIO), Università di Genova

(b) Dipartimento di Discipline Chirurgiche, Morfologiche e Metodologie Integrate (DICMI), Università di Genova

(c) Laboratorio di Biologia Molecolare, Istituto G. Gaslini, Genova

(d) Istituto di Ricerche Farmacologiche "Mario Negri", Milano

(e) Laboratorio Chimico, Istituto Zooprofilattico Sperimentale Liguria, Genova

I contaminanti lipofili come i policlorobifenili (PCB) possono essere accumulati nell'ambiente concentrandosi ai livelli più elevati delle catene trofiche e raggiungendo valori potenzialmente tossici per gli organismi e rischiosi per la salute umana. Organismi filtratori come i molluschi bivalvi accumulano contaminanti organici associati a materiale particolato sospeso ma non biotrasformano gli xenobiotici e sono utilizzati comunemente come specie indicatrici della qualità dell'ambiente acquatico. Tra i PCB, il congenere 153 si è rivelato quasi sempre il più rappresentato e abbondante (circa 20%) in tutti i campionamenti di mitili e costituisce con il PCB 138 il 40-60% dei congeneri totali e, insieme con il PCB 180 sono quasi sempre riscontrati nel tessuto adiposo umano. Il tessuto adiposo bianco (WAT), considerato a lungo esclusivamente come organo chiave dell'omeostasi energetica, viene attualmente considerato il più esteso organo endocrino del corpo (1). Tra i numerosi inquinanti con attività di interferenti endocrini, i PCB sono stati misurati nel WAT (2). Questi composti lipofili sono in grado di modificare l'attività dei ligandi endogeni dei fattori di trascrizione nucleare, fondamentali per il differenziamento, il metabolismo e la funzione degli adipociti. Gli adipociti sono quindi sempre più spesso proposti come interessante modello cellulare per lo studio della modulazione genica, essendo in grado di mimare gli effetti di queste sostanze sull'organismo *in toto*.

Durante lo studio, campioni di mitilo (*Mytilus gallusprovincialis*) sono stati raccolti per un anno, con scadenza ogni 10 giorni da novembre ad aprile e ogni 5 giorni da maggio a ottobre, estratti in acetone-esano (1:1), analizzati in gas-massa per la loro concentrazione in PCB e utilizzati per l'esposizione *in vitro*. I pre-adipociti utilizzati sono stati isolati dal tessuto adiposo proveniente da donatori umani sani, sottoposti ad interventi di liposuzione. La popolazione cellulare presente nel lipoaspirato è molto eterogenea, include adipociti e pre-adipociti, fibroblasti, cellule muscolari, cellule endoteliali, cellule ematiche, cellule del sistema immunitario. I pre-adipociti (cellule adulte multipotenti di origine mesenchimale) sono ottenuti dopo un lungo processamento, che consiste nella digestione del tessuto proveniente dal lipoaspirato con una soluzione di collagenasi (2 mg/mL), ripetuti lavaggi in PBS, centrifugazioni e lisi dei globuli rossi rimanenti con cloruro di ammonio. Dopo aver esposto i pre-adipociti a tre concentrazioni scalari di PCB 153 e di estratto di mitilo per 24, 48 e 72 ore, è stata valutata la vitalità cellulare con Crystal violetto per l'identificazione della concentrazione e del tempo di incubazione ottimali per le successive esposizioni. L'mRNA è stato poi estratto e analizzato con Genechip Affymetrix HG-133 Plus 2.0.

I risultati preliminari hanno evidenziato nei pre-adipociti, esposti a PCB 153 (0,1ng/mL), una parziale alterazione dei geni, che si è esplicata con una più spiccata *down regulation*. I prossimi studi saranno focalizzati sull'identificazione delle vie metaboliche coinvolte.

Bibliografia

1. Müllerová D, Kopecký J. White adipose tissue: storage and effector site for environmental pollutants. *Physiol Res*. 2007;56(4):375-81.
2. Smeds A, Saukko P. Identification and quantification of polychlorinated biphenyls and some endocrine disrupting pesticides in human adipose tissue from Finland. *Chemosphere* 2001;(6):1463-71.

LIVELLI DI COMPOSTI PERFLUORURATI IN CAMPIONI DI LATTE UMANO E DI PRODOTTI ALIMENTARI

Guido Perra, Cristiana Guerranti Perra, Ilaria Bisogno, Simonetta Corsolini, Silvano E. Focardi
Dipartimento di Scienze Ambientali, Università degli Studi di Siena

I composti perfluorurati (PFC) sono sostanze di sintesi ampiamente utilizzate in diversi settori applicativi, per la protezione di materie plastiche e di tessuti, e in materiali elettrici, antiaderenti e pellicole fotografiche. I PFC includono composti basati sul perfluorottano sulfonil fluoruro (POSF) che, in seguito alla degradazione dovuta, ad esempio, a fattori ambientali, o alla metabolizzazione da parte di organismi, dà origine alla formazione di composti di rilevanza tossicologica, come, tra gli altri, il perfluorottano sulfonato (PFOS) e l'acido perfluorottanico (PFOA). L'elevata stabilità rende queste molecole in grado di accumularsi negli organismi, per i quali risultano nocive. PFOS e PFOA fanno parte del gruppo degli interferenti endocrini; attualmente alcuni ricercatori stanno cercando di evidenziare eventuali correlazioni tra l'esposizione a PFOS e PFOA e la presenza di alcune patologie. Nonostante l'importanza dei PFC come contaminanti ambientali e l'individuazione di questi composti in diverse matrici animali in numerose aree del mondo, poco è noto sulla loro presenza e la distribuzione ambientale in Italia. In questo lavoro sono riportati i risultati di uno studio sulla distribuzione e i livelli di PFOS e PFOA nel latte umano e in campioni di prodotti alimentari provenienti dall'area Senese (Italia centrale).

La procedura analitica per la determinazione di PFOS e PFOA nei campioni è stata quella descritta da Corsolini *et al.* (1). PFOS e PFOA sono stati estratti con una procedura liquido-liquido e determinati con HPLC accoppiata, tramite interfaccia elettrospray, ad uno spettrometro di massa (LOD = 1 ng/g peso fresco, p.f.). Sono stati analizzati 41 campioni di latte (raccolto entro una settimana dopo il parto) da donne che vivono nella città di Siena e la sua provincia e 70 campioni di prodotti alimentari acquistati in un supermercato della città di Siena.

Il PFOS è stato determinato in 13 dei campioni di latte analizzati (valore medio $\pm$ DS: 0,76 $\pm$ 1,27 ng/g peso fresco), mentre il PFOA è stato individuato in un solo campione (8,04 ng/g pf). Basandosi sui risultati conseguiti, abbiamo valutato l'*intake* di inquinanti da parte del neonato allattato al seno:

PFOA: range 0-1,21 μ g al giorno

PFOS: media 0,1 μ g al giorno, range 0-0,65 μ g al giorno.

Nei campioni di prodotti alimentari analizzati abbiamo rilevato solo la presenza di PFOS. I prodotti ittici sono risultati i più contaminati, (valore medio $\pm$ DS: 34,21 $\pm$ 7,65 ng/g pf). Le concentrazioni medie di PFOS in carne e latticini sono risultate simili: 1,43 $\pm$ 7,21 ng/g pf e 1,35 $\pm$ 3,45 ng/g pf, rispettivamente). In tutti i campioni analizzati tra le categorie di alimenti a base di cereali, uova, vegetali e bevande PFOS e PFOA sono risultati al di sotto del LOD.

Bibliografia

1. Corsolini S, Guerranti C, Perra, G, Focardi S. Polybrominated diphenyl ethers, perfluorinated compounds and chlorinated pesticides in swordfish (*Xiphias gladius*) from the Mediterranean Sea. *Environ Sci Technol.* 2008;42:4344-9.

INTERFERENTI ENDOCRINI: UN MODELLO DI TEST A BREVE TERMINE *IN VITRO* PER IDENTIFICARE I POSSIBILI RISCHI PER LA SALUTE DELLA POPOLAZIONE CONNESSI AD ESPOSIZIONE A COMPOSTI ESTROGENOMIMETICI

Barbara Pinto, Paolo Bizzozero, Katy Sanfilippo, Daniela Reali
 Dipartimento di Patologia Sperimentale, Biotecnologie Mediche, Infettivologia ed Epidemiologia-
 Università di Pisa

Numerose sostanze di origine naturale o sintetica sono in grado di interferire con il sistema endocrino. La popolazione è esposta a tali sostanze attraverso la via alimentare, la via professionale e l'ambiente.

Per identificare l'attività estrogeno mimetica di composti e miscele complesse, è stato utilizzato un test a breve termine *in vitro* che utilizza una linea di lievito ricombinante (RMY326 ER-ERE) contenente il recettore α umano per gli estrogeni e un elemento di riposta agli estrogeni a monte del gene reporter codificante per l'enzima β -galattosidasi (1). Sono stati testati oltre 190 campioni: organismi marini da acquacoltura e da cattura, mangimi per acquacoltura, 7 congeneri di PCBs identificati dall'*International Council for the Exploration of the Seas* (ICES) come markers del grado di contaminazione ambientale, estratti di piante leguminose e di pomodoro, prodotti fitoterapici e acque minerali imbottigliate. L'estrogenicità dei campioni può essere espressa sia come percentuale (RIE) dell'attività indotta dal 17 β -estradiolo (E2) 10nM sia come *Estradiol Equivalents* (EEQs ng/L).

Gli organismi marini (orate, spigole, mitili) provenienti da impianti di acquacoltura hanno elicitato un'attività massima del 30,6%, mentre quelli da cattura (varie specie di pesci, molluschi e crostacei) del 41,6%. I mangimi hanno mostrato una potenza estrogenica massima del 7,0%. I sette PCBs standard determinati nei mangimi e negli organismi marini hanno mostrato un diverso grado di attività estrogeno-mimetica secondo il gradiente: PCB 101<138<180<153<28<52<118 (*dioxin like*). Il congenere 118 ha dato una RIE dell'80%. I flavonoidi, (Genisteina, Isopruneina, Luteolina e rispettivi glucosidi, Daidzeina e Licoflavone C) purificati da due specie di piante leguminose dell'area mediterranea, hanno mostrato un range di attività compreso tra 0,95% e 82,3%. Estratti di polpa di pomodoro hanno elicitato un'attività massima del 17,4%. Un prodotto fitoterapico utilizzato per alleviare i sintomi della menopausa non ha indotto una risposta biologica significativa. Estratti di acque minerali hanno dato una RIE massima dell'11,3%.

Riteniamo che il test YES possa rappresentare un utile strumento per l'attività di screening di I livello su matrici alimentari e ambientali per evidenziare il rischio di esposizione della popolazione ad interferenti endocrini che agiscono sul sistema estrogenico.

Bibliografia

1. Liu JW, Jeannin E, Picard D. The anti-estrogen Hydroxytamoxifen is a potent antagonist in a novel yeast system. *BiolChem* 1999;380:1341-5.
2. Pinto B, Picard D, Reali D. A recombinant yeast strain as a short term bioassay to assess estrogen-like activity of xenobiotics. *Ann Ig* 2004;16:579-85.

IL TOPO ERE-LUC: UN MODELLO PER IDENTIFICARE E STUDIARE GLI INTERFERENTI ENDOCRINI PRESENTI NEL CIBO

Balaji Ramachandran, Paolo Ciana, Adriana Maggi
*Centro di Eccellenza sulle malattie NeuroDegenerative, Dipartimento di Scienze Farmacologiche,
Università degli Studi di Milano*

La presenza di sostanze chimiche disperse nell'ambiente è in fine responsabile dell'accumulo di interferenti endocrini (ED) nell'uomo e negli animali attraverso la catena alimentare: diversi inquinanti ambientali infatti sono in grado di alterare il sistema endocrino. Nonostante l'esposizione quotidiana a queste sostanze sia molto limitata, il relativo accumulo nel tempo può portare ad uno sbilanciato quadro endocrino-metabolico. Si rende quindi necessario disporre di modelli per studiare e caratterizzare la presunta tossicità di queste sostanze in funzione del periodo di esposizione. Le metodologie attuali, avvalendosi per lo più di saggi *in vitro*, permettono di avere un'idea parziale dell'effetto di queste sostanze, limitata al tipo di cellula/tessuto preso in esame. Un quadro più esauriente può essere ottenuto soltanto studiando l'intero organismo come sistema integrato, tuttavia gli studi sull'animale hanno lo svantaggio di essere più costosi e di generare problemi etici. Lo sviluppo delle nuove tecnologie di *molecular imaging*, accoppiate all'ingegneria animale permette di concettualizzare nuovi modelli (topi reporter) che permetterebbero di monitorare nell'organismo vivente un largo spettro di meccanismi molecolari senza dover uccidere o comunque causare stress all'animale da esperimento. Nel nostro laboratorio stiamo sviluppando modelli per valutare l'azione di svariate molecole sull'attività dei recettori nucleari. Il prototipo di questi modelli è il topo transgenico ERE-luc, che permette di caratterizzare sostanze estrogeniche. In questo studio, abbiamo alimentato topi ERE-luc con varie tipologie di pane contenenti diverse concentrazioni di cadmio (interferente endocrino) e lignani (fitoestrogeni). Gli esperimenti presentati evidenziano un marcato effetto estrogenico di queste sostanze, suggerendo come questo modello possa essere impiegato per lo screening di potenziali interferenti endocrini.

DIFFERENTE EFFETTO DI ISOFLAVONI E LATTE DI SOIA SULL'ATTIVITÀ DEL RECETTORE DEGLI ESTROGENI NEL TOPO

Gianpaolo Rando, Balaji Ramachandran, Monica Rebecchi, Paolo Ciana e Adriana Maggi
*Centro di Eccellenza sulle malattie NeuroDegenerative, Dipartimento di Scienze Farmacologiche,
Università degli Studi di Milano*

A causa della complessa regolazione dell'attività del recettore degli estrogeni, l'attività fitoestrogenica degli isoflavoni derivati dalla soia (genisteina e daidzeina) non è ancora ben caratterizzata. Per investigare gli effetti di prolungate o acute esposizioni a questi isoflavoni quando somministrati come pure molecole (integratori alimentari) o come parte integrante di una dieta a base di soia, abbiamo utilizzato il topo reporter ERE-luc. Questo modello esprime un gene reporter (luciferasi) sotto diretto controllo trascrizionale del recettore degli estrogeni, permettendo quindi di valutare l'effetto di sostanze estrogeniche in ogni singola cellula dell'organismo vivente mediante l'imaging a bioluminescenza. Somministrazioni acute di genisteina o di latte di soia hanno comportato un aumento di 3-4 volte dell'attività del recettore degli estrogeni epatico. Tuttavia, quando il trattamento è stato prolungato per 20 giorni, la genisteina ha perso attività nel tempo, mentre il latte di soia l'ha mantenuta. Una miscela di genisteina e daidzeina, formulata con lo scopo di mimare un latte di soia sintetico, non è stata in grado di indurre differenze significative rispetto ai controlli durante i 20 giorni di trattamento, suggerendo che altre componenti del latte di soia, oltre ai noti fitoestrogeni, possano essere importanti nel veicolare l'effetto estrogenico. Questa ipotesi è stata infine testata comparando in parallelo gli effetti del latte di soia liofilizzato rispetto agli isoflavoni liberi a parità di dose e tempo di esposizione. Il presente studio evidenzia la complessità di azione dei fitoestrogeni nella fisiologia dei mammiferi e l'importanza della matrice alimentare nel sostenere l'effetto estrogenico, sottolineando l'importanza di condurre appropriati studi longitudinali per comprendere appieno l'effetto di qualsiasi sostanza ritenuta estrogenica e ottenere così una corretta caratterizzazione degli interferenti endocrini.

EFFETTI *IN VITRO* DELLA GENISTEINA SULLA CONTRATTILITÀ OVARICA NELLA SPECIE BOVINA

Annalisa Rizzo, Claudia Cosola, Massimo Spedicato, Giuseppe Minoia, Maddalena Mutinati, Carmelinda Trisolini, Stefano Punzi, Maria Teresa Roscino, Marianna Pantaleo, Raffaele Luigi Sciorsci
Dipartimento di Produzione Animale, Università degli Studi di Bari

La genisteina appartiene a un gruppo di sostanze note come fitoestrogeni contenute nei sottoprodotti della soia, utilizzati come fonte proteica di elevato valore biologico nell'alimentazione del bestiame. La genisteina possiede caratteristiche strutturali in comune con il 17β -estradiolo, in grado di comportarsi come ligando dei recettori per gli estrogeni (ER), alfa e beta (1). Può esercitare sia attività estrogenica che antiestrogenica, in funzione della concentrazione e del *binding* degli estrogeni agli stessi recettori (2). Obiettivo di questa sperimentazione, è stato esaminare, *in vitro*, gli effetti della genisteina sulla contrattilità di follicoli preovulatori e di follicoli cistici.

In questa sperimentazione sono stati utilizzati venti apparati genitali ottenuti da bovine macellate in un mattatoio locale. La fase del ciclo estrale e l'attività ovarica sono state determinate *ante mortem*, tramite visita clinica, esame ecografico e determinazione quantitativa della concentrazione sierica del progesterone (P4) (Vidas® Progesterone-Bio Meriaux A, Lyon, France; sensibilità 0,05 ng/mL; specificità 100%) e *post mortem* mediante esame visivo delle ovaie. I follicoli sono stati classificati come preovulatori o cistici in base all'esame clinico e alla morfologia: follicoli preovulatori, diametro tra 17 e 20 mm; follicoli cistici, diametro >20 mm, parete di spessore < 3 mm, in assenza di corpo luteo.

Strip (5x10 mm) della parete di 10 follicoli preovulatori e 10 follicoli cistici sono stati posizionati in un bagno d'organo isolato (Ugo Basile) contenente soluzione di Krebs (pH 7.4), sospesi tra due uncini paralleli e connessi ad un trasduttore isometrico (Ugo Basile). Sono stati sottoposti alla tensione di 1g e lasciati equilibrare per 30-40 minuti a 37 °C, aerati con 95% O₂ e 5% CO₂. La contrattilità spontanea è stata registrata con un poligrafo e un registratore digitale. Dopo la stabilizzazione i preparati sono stati esposti a concentrazioni cumulative (1×10^{-7} – 1×10^{-4}) di genisteina (Sigma-Aldrich) per periodi di 20 minuti, valutando la tensione (grammi) e la frequenza (numero di picchi/20minuti) delle contrazioni, prima (base) e dopo l'applicazione della stessa. I valori sono stati espressi come media $\pm$ S.E.M. e valutati per la significatività statistica ($p < 0,05$) con ANOVA a una via e test t di Student.

La genisteina ad alte dosi (1×10^{-6} M– 1×10^{-4} M) ha indotto un aumento significativo della contrattilità in strip di follicoli preovulatori, mentre ha indotto rilassamento in strip di cisti follicolari.

La genisteina ha effetti opposti sulla contrattilità di strip di follicoli preovulatori e cistici, questi ultimi caratterizzati da alterazioni dei recettori steroidei (3). È ipotizzabile che la sensibilità dei recettori per gli ER sia scarsa nella parete dei follicoli cistici e, pertanto una prolungata esposizione alla genisteina potrebbe condizionare la persistenza della condizione cistica, a causa della ridotta motilità della parete.

Bibliografia

1. Saarinen NM, Bingham C, Lorenzetti S, Mortensen AA, Makela S, Penttinen P, Sorensen IK, Valsta LM, Virgili F, Vollmer G, Warri A, Zierau O. Tools to evaluate estrogenic potency of dietary phytoestrogens: a consensus paper from the EU thematic network "Phytohealth" (QLKI-2002-2453) *Genes and nutrition*. 2006;1:143-58.
2. Ratna WN. Inhibition of estrogenic stimulation of gene expression by genistein. *Life Sci*. 2002;71:865-77.
3. Odore R, Re G, Badino P, Donn A, Vigo D, Biolatti B, Girardi C. Modifications of receptor concentrations for adrenaline, Steroid hormones, prostaglandin F2 α and gonadotropins in hypophysis and ovary of dairy cows with ovarian cysts. *Pharmacological Research*. 1999;39(4):297-304.

VARIAZIONE DEL PATTERN DI ESPRESSIONE GENICA IN MASCHI DI *ZEBRAFISH* (*DANIO RERIO*) ESPOSTI AD ESTRADIOLO-17BETA E 4-NONILFENOLO

Barbara Ruggeri (a), Massimo Ubaldi (b), Ambarasu Lourdusamy (a), Laura Soverchia (a), Roberto Ciccocioppo (a), Gary Hardiman (c, d), Michael E Baker (d), Francesco Alessandro Palermo (b), Alberta Maria Polzonetti-Magni (b)

(a) *Reparto di medicina sperimentale e di sanità pubblica, Università di Camerino, Macerata*

(b) *Reparto sperimentale delle scienze morfologiche e della biochimica comparativa, Università di Camerino, Macerata*

(c) *BIOGEM (Biomedical Genomics Microarray Facility) Università della California, San Diego, La Jolla, USA*

(d) *Reparto di Medicina, Università della California, San Diego, La Jolla*

Negli ultimi anni ha destato molta preoccupazione l'incremento nell'ambiente di composti chimici di sintesi capaci di mimare gli effetti degli ormoni endogeni e quindi indurre modificazioni significative del sistema endocrino; gli xenoestrogeni, ad esempio, alterano il differenziamento, lo sviluppo e la riproduzione degli animali selvatici provocando profonde alterazioni della biodiversità. Tra questi composti, il 4-nonilfenolo (4-NP) è uno degli xenoestrogeni più studiati a causa della sua estesa diffusione nei sedimenti e il conseguente bioaccumulo negli organismi acquatici. In questo studio, abbiamo messo a punto un DNA *microarray* per *zebrafish*, selezionando 16.339 geni, al fine di poter studiare gli effetti del 4-NP e dell'estradiolo-17 β (E2) in maschi adulti di *zebrafish* e chiarire il meccanismo d'azione del 4-NP comparandolo con quello dell'E2. In totale, rispetto ai gruppi di controllo 425 geni risultano differentemente espressi in risposta al trattamento con il 4-NP e 153 in risposta al trattamento con l'E2. I risultati del *microarray* hanno dimostrato che il 4-NP e l'E2 inducono una chiara espressione della vitellogenina (VTG), il precursore delle proteine del tuorlo nei vertebrati ovipari; infatti, la sintesi epatica di VTG è controllata dagli estrogeni ed è considerata un ottimo biomarcatore degli effetti estrogenici causati dagli interferenti endocrini (EDs). Entrambi i trattamenti hanno indotto un elevato turnover proteico attraverso una sovraregolazione sia delle proteine coinvolte nei meccanismi proteolitici sia di quelle costituenti il ribosoma. Molti geni regolati sia dal 4-NP che dall'E2 sono coinvolti nel metabolismo energetico, nei meccanismi di difesa dallo stress ossidativo, nel metabolismo degli xenobiotici, e nel metabolismo dei lipidi. Fra tutti i geni differentemente espressi in seguito al trattamento con il 4-NP è importante menzionare la proteina apoptotica caspasi-8 e la proteina simile alla prominina-2; l'esposizione all'estradiolo-17 β comporta invece una sovraregolazione delle proteine plasmatiche quali la proteina legante il retinolo 4 e il fibrinogeno. Un diverso pattern di espressione in seguito ad i due trattamenti è stato trovato anche nei geni coinvolti nello stress ossidativo, poiché l'E2 sembra capace di indurre i meccanismi di detossificazione, mentre il 4-NP sembra inibire i meccanismi protettivi della cellula. Nell'insieme, i risultati ottenuti dimostrano come il *microarray* può dare un contributo significativo alla comprensione delle variazioni del pattern di espressione genica indotto sia dall'E2 che dal 4-NP in maschi di *zebrafish*; inoltre, sembra che il 4-NP sia capace di agire anche attraverso vie metaboliche alternative rispetto al meccanismo d'azione attivato dagli estrogeni poiché, sia l'estradiolo-17 β che lo xenoestrogeno, 4-nonilfenolo, in alcuni casi modulano l'espressione dello stesso gene in maniera differente.

ESPOSIZIONE PRENATALE AL CLORPIRIFOS: EFFETTI COMPORTAMENTALI DELLA FLUVOXAMINA SUL TOPO ADULTO

Valentina Sanghez, Aldina Venerosi, Angela Rungi, Laura Ricceri, Gemma Calamandrei
Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Il clorpirifos (CPF) è un insetticida organofosforico comunemente utilizzato in agricoltura e per uso domestico. La neurotossicità di questo agente è tradizionalmente associata all'inibizione dell'attività dell'enzima acetilcolinesterasi (AChE) sia nel sistema nervoso centrale che periferico. Nell'ultimo decennio sono stati condotti numerosi studi sperimentali sulla neurotossicità del CPF in roditori di laboratorio. È stato osservato che la neurotossicità neonatale del CPF si verifica per esposizioni a dosi che non producono intossicazione sistemica, e in assenza di inibizione significativa della AChE cerebrale. Studi condotti su ratti hanno dimostrato che l'esposizione ad una dose sub-tossica di CPF, durante fasi diverse della finestra temporale perinatale (GD17-PND14), non interferisce solo con la neurotrasmissione colinergica ma determina una modificazione a lungo termine nella trasmissione serotoninergica (5HT) in particolare per esposizioni durante la fase prenatale e/o neonatale precoce. Nel sistema nervoso centrale (SNC) la serotonina è coinvolta nella regolazione del comportamento aggressivo e sessuale e la riduzione nei livelli fisiologici di questo neurotrasmettitore è associata a disturbi neuropsichiatrici come depressione e ansia. In questo studio si è voluto verificare se le risposte comportamentali all'agonista serotoninergico fluvoxamina, che agisce da inibitore della ricaptazione della serotonina a livello sinaptico, fossero modificate in topi esposti prenatalmente a CPF rispetto ai controlli.

Femmine gravide di topo CD-1 sono state esposte al CPF o al relativo veicolo tramite somministrazione orale dal giorno gestazionale (GD) 15 fino al GD 18. La dose selezionata in questo studio (6 mg/kg) non induce tossicità sistemica nelle madri, non influenza il peso dei piccoli alla nascita e non provoca inibizione della AChE sierica o cerebrale nella progenie. Per ogni nidiata, due maschi e due femmine sono stati saggiati all'età adulta nel test di Porsolt (24 maschi e 12 femmine) e nel test di aggressività materna (25 femmine). In particolare, il test di Porsolt è ampiamente validato in letteratura per saggiare gli effetti antidepressivi degli inibitori della ricaptazione della serotonina come la fluvoxamina, e questi stessi agenti riducono significativamente le risposte di difesa del nido verso un maschio adulto nelle femmine di topo in allattamento. I risultati hanno indicato che la fluvoxamina, somministrata alla dose di 30 mg/kg 30 minuti prima del test riduceva significativamente sia l'immobilità che il floating nei topi di controllo ma non aveva effetto negli animali esposti al CPF. Tale effetto non si osservava nel test di aggressività materna: la fluvoxamina riduceva efficacemente le risposte di difesa del nido nelle femmine in allattamento, indipendentemente dal trattamento prenatale ricevuto. Questi risultati preliminari indicano che una breve esposizione prenatale al CPF riduce marcatamente all'età adulta la risposta comportamentale a un farmaco antidepressivo nel test di Porsolt. I meccanismi alla base di questa alterazione devono essere indagati più approfonditamente, anche alla luce del ruolo della serotonina nella modulazione degli stati affettivi/emozionali e nei meccanismi neuroendocrini associati a questi stati.

EFFETTI DEL MANCOZEB SULLE CELLULE DELLA GRANULOSA DI TOPO

Adriana Santilli, Gianna Rossi, Rita Paro, Hamid Deldar, Guido Macchiarelli, Sandra Cecconi
Dipartimento di Scienze della Salute, Università di L'Aquila

Il mancozeb è un etilenbisditiocarbamato comunemente usato per proteggere prodotti ortofrutticoli, piante ornamentali ed erbe medicinali, quali il ginseng, dall'attacco di parassiti e funghi. Questo composto è caratterizzato da una bassa tossicità acuta nei mammiferi e da una limitata persistenza ambientale; tuttavia, il suo principale composto di degradazione, l'etilentiourea (ETU), è considerato una sostanza in grado di indurre tumori. Anche se non è stato dimostrato un effetto mutagenico, il mancozeb può avere effetti genotossici, mentre quelli teratogenici rimangono ancora da definire. Per quanto riguarda l'apparato riproduttivo femminile, l'esposizione al mancozeb causa un significativo aumento nella percentuale di follicoli atresici ovarici e una significativa diminuzione nel *rate* di impianto embrionale. Inoltre, gli ovociti esposti a concentrazioni crescenti di mancozeb, mostravano alterazioni dose-dipendente nella struttura del fuso meiotico e una riduzione nella percentuale di fecondazione (1). Per chiarire ulteriormente l'effetto citotossico del mancozeb, abbiamo analizzato gli effetti delle concentrazioni crescenti del fungicida sulle cellule della granulosa testando il livello d'espressione della proteina p53.

Le cellule della granulosa di topo sono state coltivate per 36 ore in assenza (controllo) o in presenza di concentrazioni crescenti di mancozeb (0,003-0,5 µg/mL). Per determinare il livello d'espressione dell'mRNA e della proteina p53, i campioni sono stati analizzati mediante *real-time PCR* e *western blot* rispettivamente. È stato realizzato anche il sequenziamento genico dell'esone 5 e degli esoni 6,7,8,9. Due coppie di primer specifici per l'esone 5 e per gli esoni 6,7,8,9 sono stati disegnati per appaiarsi al frammento genico murino della p53. I frammenti di DNA ottenuti tramite PCR sono stati sequenziati su entrambi i filamenti mediante *deoxy-chain termination* usando un sequenziatore automatico ABI-PRISM 310.

Le analisi di *real-time PCR* e *western blot* hanno rivelato che il trattamento di cellule della granulosa con 0,003 µg/mL o 0,005 µg/mL di mancozeb causava un significativo aumento del contenuto dell'mRNA e della proteina p53 rispetto al controllo, mentre le concentrazioni più alte di mancozeb (0,01, 0,1, 0,5 µg/mL) causavano un forte decremento fino alla completa inibizione della trascrizione e della traduzione di p53. Ulteriormente, il livello di mRNA di p53 nelle cellule della granulosa trattate con mancozeb alle concentrazioni di 0,01, 0,1 e 0,5 µg/mL era significativamente diminuito già dopo 12 ore di esposizione. Il sequenziamento genico ha mostrato l'assenza di mutazioni nucleotidiche negli esoni esaminati. Da questi risultati è evidente che il mancozeb influenza specificatamente le cellule della granulosa di topo danneggiando il livello di espressione della p53 e quindi il fungicida può essere considerato come potenziale agente carcinogenetico.

Bibliografia

1. Cecconi S, Paro R, Rossi G, Macchiarelli G. The effects of the endocrine disruptors dithiocarbamates on the mammalian ovary with particular regard to mancozeb. *Current Pharmaceutical Design*, 2007;13:2989-3004.

RESVERATROLO: UN POSSIBILE MODULATORE DELL'ATTIVITÀ CITOTOSSICA DEL CONDENSATO DI SIGARETTA SU DIVERSE LINEE CELLULARI

Sabrina Tait, Cristina Andreoli

Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Il resveratrolo è un fitoestrogeno naturale appartenente alla famiglia degli stilbeni e principalmente contenuto nel vino rosso. Data la sua struttura simili-estrogenica, è in grado di agire da agonista dei recettori estrogenici, ER α ed ER β , pertanto appartiene alla classe degli interferenti endocrini (IE). Negli anni recenti, inoltre, è stato indicato come possibile agente antiossidante e anti-infiammatorio naturale con una potenziale attività chemopreventiva.

Lo scopo di questo lavoro è di valutare l'effetto del resveratrolo sulla sopravvivenza cellulare nonché di indagare il suo possibile ruolo protettivo sul danno ossidativo provocato dall'esposizione al condensato di fumo di sigaretta (CSC), noto per aumentare la concentrazione intracellulare delle specie reattive dell'ossigeno (ROS). A tal fine, come modello sperimentale *in vitro*, sono state scelte due linee cellulari di diversa origine embrionale, quali cellule umane di neuroblastoma (SH-SY5Y) e fibroblasti murini (Swiss 3T3).

La sopravvivenza cellulare è stata valutata su entrambe le linee mediante il test di citotossicità MTT in seguito a trattamento per 24 ore con resveratrolo (10÷200 μ M) e CSC (25 and 50 μ g/mL), sia singolarmente sia in combinazione.

Risultati preliminari indicano che il resveratrolo ha effetti diversi sulle due linee cellulari, in particolare:

- nei fibroblasti Swiss 3T3 diminuisce la sopravvivenza cellulare dopo il trattamento singolo e aumenta la mortalità cellulare indotta dal CSC;
- nelle cellule SH-SY5Y, il resveratrolo è citotossico solo alla dose più alta (200 μ M) e sembra aumentare la sopravvivenza cellulare nel trattamento con CSC alla dose più bassa 25 μ g/mL.

Comunque, non è stata osservata una chiara relazione dose-risposta, per cui saranno necessari ulteriori esperimenti.

Da questi risultati preliminari si evince una differente sensibilità delle due linee cellulari al trattamento con resveratrolo e CSC, probabilmente dovuta alle differenti origini istogenetiche e al differente background biochimico e genetico, con un possibile effetto protettivo osservato solo nelle cellule di neuroblastoma. Ulteriori indagini verteranno sull'analisi dei livelli di marcatori di danno ossidativo (es. citochine e recettori di risposta ossidativa) per meglio comprendere il meccanismo alla base dell'azione del resveratrolo.

UTILIZZO DI BIOMARCATORI DI EFFETTO NEL RATTO IN SEGUITO AD ESPOSIZIONE PRE- E/O POST-NATALE AD INTERFERENTI ENDOCRINI DEGLI ALIMENTI: GLI EFFETTI CHE NON TI ASPETTI

Roberta Tassinari (a), Francesca Maranghi (a), Daniele Marcoccia (a), Antonietta D'Ambrosio (a), Gabriele Moracci (a), Agostino Eusepi (b), Antonio Di Virgilio (b), Antonella Olivieri (c), Simona De Angelis (c), Stefano Lorenzetti (a)

(a) *Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(b) *Servizio Biologico e per la Gestione della Sperimentazione Animale, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(c) *Dipartimento Biologia Cellulare e Neuroscienze, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

L'esposizione ad interferenti endocrini (IE) durante il periodo pre- e/o peri-natale può causare alterazioni con conseguenze rilevabili in fase puberale o nell'età adulta. La caratterizzazione di biomarcatori specifici ha significato strategico nella valutazione del rischio. I livelli degli steroidi sessuali associati ad altri parametri di sviluppo e funzionalità del sistema riproduttivo possono rappresentare degli efficaci biomarcatori e fornire indicazioni sul meccanismo e sulla patogenesi dell'alterazione dovute sia ad effetti diretti che indiretti. Effetti indiretti sul sistema riproduttivo possono essere dovuti, ad esempio, all'azione sulla tiroide attraverso l'asse ipotalamo-ipofisi-tiroide-gonadi. Verranno qui esposti due esempi di potenziali IE, la semicarbazide (SEM) e l'etilene tiourea (ETU), cui si è esposti attraverso gli alimenti. Per entrambi non è stato evidenziato alcun effetto sul sistema riproduttivo a seguito di un'esposizione peri-puberale e/o pre- e post-natale. ETU: Ratte gravide CD sono state trattate con 0, 0,1, 0,3, 1 mg/kg pc pro die ETU nei giorni di gestazione 7-20, nei giorni post-natali (GPN) 1-22 e la generazione F1 dallo svezzamento fino a maturità sessuale (GPN 23-61). Sono stati registrati: le condizioni generali di salute, il peso e il consumo di mangime. Madri F0. Al GPN 1 è stato effettuato il prelievo ematico per la valutazione degli ormoni tiroidei (T3 e T4) e del TSH. Al momento del sacrificio (GPN 23) è stata prelevata e pesata la tiroide. F1. Al GPN 61, è stato prelevato il sangue per la determinazione di T3, T4, TSH; 17 β -estradiolo (E2), testosterone (T) e diidrotestosterone (DHT). SEM: ratti femmina CD sono stati trattati con 0, 40, 75 e 140 mg/kg pc pro die SEM per 28 giorni dal GPN 23-52 e sacrificati al GPN 60. Sono state registrate le condizioni di salute generali, il peso e il consumo di mangime. Dal GPN 35 è stata controllata l'apertura della vagina. Prima del sacrificio è stato prelevato il sangue per la determinazione dell'E2. ETU. Nelle madri si osserva: aumento del peso a 0,1 e 0,3 mg/kg in gravidanza e allattamento una diminuzione. Alla dose maggiore solo una riduzione in gravidanza. Il peso relativo della tiroide è aumentato a 0,1 mg/kg. T3, T4 e TSH sono diminuiti a tutti i livelli di dose. Nei maschi F1 si osserva la riduzione del peso relativo della prostata a 1,0 mg/kg e del DHT a tutti i livelli di dose. I livelli di T risultano ridotti al livello di dose basso e aumentati a 1,0 mg/kg mentre l'E2 aumenta ai livelli di dose bassa e intermedia. SEM. Si osserva la riduzione statisticamente significativa di: incremento ponderale a livello di dose maggiore, dei livelli sierici di E2 a tutti i livelli di dose e ritardo dell'apertura della vagina a 75 e 140 mg/kg. I risultati ottenuti evidenziano, per la SEM, effetti endocrini fino ad ora ignorati e identificano lo sviluppo peri-puberale come fase critica. Per l'ETU, biomarcatori ormonali e parametri funzionali hanno permesso di individuare nuovi potenziali bersagli, come la riproduzione, direttamente e/o indirettamente mediati dalla tiroide.

VALUTAZIONE DELL'ESPOSIZIONE A METALLI PESANTI TRAMITE L'ASSUNZIONE DI PESCE NELL'AREA DELL'ALTO ADRIATICO

Annalisa Zaccaroni, Dino Scaravelli

Acquacoltura e Igiene delle Produzioni Ittiche, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Bologna

L'utilizzo delle specie ittiche nell'alimentazione umana viene ritenuta un importante fattore protettivo contro diverse patologie anche a carattere degenerativo e viene quindi incentivata e consigliata. Ciononostante per le loro caratteristiche ecologiche le specie ittiche possono accumulare in grandi quantità contaminanti di varia natura, la cui pericolosità per la salute umana è ormai da tempo riconosciuta.

Nel presente lavoro vengono riportati i risultati di una valutazione del rischio relativa all'assunzione di metalli pesanti (Pb, As, Cd, Hg) tramite il consumo di pesce nell'area dell'Alto Adriatico. A tal fine si è provveduto a valutare il contenuto di metalli nei tessuti di diverse specie marine (*Tapes philippinarum*, *Solea lutea*, *Solea solea*, *Engraulis encrasicolus*, *Sprattus sprattus*, *Sardina pilchardus*, *Scomber scombrus*, *Sepia officinalis*, *Carcinus mediterraneus*) che rientrano comunemente nell'alimentazione della popolazione della zona, definita sulla base di quanto disponibile in letteratura e dai dati statistici di vendita delle differenti tipologie di pescato. Successivamente si è provveduto ad effettuare una valutazione del rischio applicando il metodo descritto da Hung *et al.* (1) e utilizzando quali NOAEL i valori riportati dall'USEPA nel Sistema Integrato di Informazione sul Rischio (IRIS).

Una prima analisi dei dati pare evidenziare come in linea generale le specie considerate non rappresentino un rischio per la salute umana, in quanto solo in pochi casi sporadici vengono superati i limiti definiti dal Reg. CE 466/2001. Anche dal punto di vista della valutazione del rischio il modello di previsione non evidenzia particolari rischi per la salute umana anche in considerazione di un elevato consumo di specie marine. Per quanto concerne quindi i metalli pesanti il sistema di relazione alimento-salute si può considerare sicuro. Il sistema potrebbe invece divenire potenzialmente più pericoloso per le specie marine di vertice, quali tartarughe e cetacei. Gli studi in tale direzione attualmente in corso presso l'unità di ricerca confermano il maggior rischio per queste specie e la loro validità quali indicatori ambientali.

Bibliografia

1. Hung CLH, So MK, Connell DW, Fung CN, Lam MHW, Nicholson S, Richardson BJ, Lam PKS. A preliminary risk assessment of trace elements accumulated in fish to the Indo-Pacific Humpback dolphin (*Sousa chinensis*) in the North western waters of Hong Kong. *Chemosphere* 2004;56:643-51.

*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.