

EFFETTI DEGLI INTERFERENTI ENDOCRINI SULLE COMUNITÀ DI INVERTEBRATI MARINI

ROBERTA PENNATI (*)

SUNTO. – Inquinanti organici con attività distruttiva sul sistema endocrino, noti come interferenti endocrini, sono ampiamente diffusi sul Pianeta e raggiungono attraverso diverse vie l'ambiente marino che risulta essere l'accettore ultimo di queste sostanze. Numerose ricerche hanno evidenziato gli effetti acuti e cronici di questi inquinanti sullo sviluppo e la riproduzione di pesci e mammiferi acquatici. Studi rivolti a chiarire l'impatto degli interferenti endocrini sugli invertebrati marini sono più scarsi sebbene questi animali costituiscano la grande maggioranza della biodiversità marina. Le ricerche sono rese più complesse dalla scarsa conoscenza della endocrinologia e della fisiologia di molti gruppi animali e spesso sono limitate a pochi *phyla* maggiormente studiati, tra cui artropodi, anellidi e molluschi. Il caso di studio più rilevante in ambiente marino riguarda il fenomeno dello pseudoermafroditismo indotto nelle femmine di alcuni molluschi prosobranchi in seguito ad esposizione a *trybutyltin*, una molecola utilizzata come agente *antifouling* nelle vernici delle navi. Questa molecola ha un effetto avverso anche sui crostacei, nei quali interferisce con la via di segnalazione dell'ormone della muta. Diverse ricerche hanno in seguito evidenziato che molti invertebrati marini sono sensibili all'azione di sostanze estrogeniche (xeno-estrogeni) come il Bisfenolo A e il Nonilfenolo, utilizzati nella fabbricazione della plastica. Tuttavia, rimangono ancora da chiarire i meccanismi molecolari responsabili degli effetti osservati. Studi condotti nel mio laboratorio hanno dimostrato che anche animali come i tunicati che non hanno recettori degli estrogeni possono essere colpiti dall'azione di sostanze estrogeniche che agiscono legandosi a un diverso gruppo di recettori, gli *Estrogen Related Receptors*. Dal momento che tali recettori sono presenti anche nei mammiferi, risultati ottenuti negli invertebrati possono chiarire meccanismi patogenetici che possono essere presenti anche nell'uomo.

ABSTRACT. – Organic pollutants with disrupting activity on the endocrine system are known as endocrine disrupting compounds (ECDS) and are broadly diffuse on the Planet. By different pathways, they reach the marine environment that is the ultimate collector of these substances. Several researches pointed out acute and chronic effects of these pollutants on the reproduction and development of fish and marine mammals. Fewer studies

(*) Professore Associato di Zoologia presso l'Università degli Studi di Milano, Italia. E-mail: roberta.pennati@unimi.it.

have been dedicated to explore the effects of ECDs on marine invertebrates though these represent most of marine biodiversity. Researches are hampered by limited knowledge of endocrinology and physiology of several animal groups, which has been studied only for few *phyla* such as mollusks, annelids and arthropods. The clearest example of endocrine disruption by a chemical compound in marine environment is the pseudo-hermaphroditism caused in females of prosobranch mollusks by the exposure to *tributyltin*, an antifouling agent used in the paints for ships. This molecule has an adverse effect also on crustaceans in which it inhibits the signaling pathway of the molting hormone. Several studies evidenced that lot of marine invertebrate species are sensible to the action of estrogenic compounds (*xeno-estrogens*) such as Bisphenol A and Nonylphenol that are used in the manufacturing of the plastic materials. Nevertheless, molecular mechanisms responsible for the observed effects are still uncertain. In my laboratory, we demonstrated that tunicates, that do not have estrogen receptors, are sensible to the action of xeno-estrogens that act by binding to a different group of receptors, the *Estrogen Related Receptors*. Since these receptors are present also in mammals, our studies could help to clarify pathogenic mechanisms shared with humans.

Sostanze organiche che interferiscono con il sistema riproduttivo sono definiti dalla letteratura anglosassone *Endocrine disrupting compounds* (ECDs). Possono essere di origine naturale o di origine antropica; queste ultime sono ampiamente utilizzate per diversi scopi, come fertilizzanti, come antiparassitari, come additivi delle materie plastiche e generalmente sono sostanze persistenti, difficilmente degradabili, che pervadono tutti gli ecosistemi del pianeta. Gli effetti degli ECDs sulla biologia riproduttiva sono stati inizialmente scoperti e studiati nell'uomo e negli animali terrestri, tra cui gli anfibi, per i quali è stato possibile verificare la correlazione tra l'esposizione a determinate molecole e alterazioni dello sviluppo degli organi riproduttivi e del successo riproduttivo. Un'attenzione inferiore è stata posta allo studio degli effetti degli ECDs sugli invertebrati e in particolare su quelli marini, nonostante gli invertebrati rappresentino una enorme parte della biodiversità e l'ambiente marino sia l'ultimo accettore degli inquinanti antropici. Infatti, attraverso il dilavamento, lo scarico delle acque reflue e altre vie gli inquinanti raggiungono l'ambiente marino dove si accumulano raggiungendo concentrazioni rilevanti per gli organismi acquatici.

Conoscere gli effetti degli ECDs sugli invertebrati marini è importante dal punto di vista conservazionistico, per comprendere e mitigare l'impatto che queste molecole possono avere sulle comunità marine di cui gli invertebrati sono una componente dominante. Queste conoscenze hanno anche mostrato la possibilità di utilizzare gli invertebrati come bioindicatori di alcuni tipi di inquinanti, come nel caso del *trybutyltin*

(TBT). Inoltre, hanno permesso di approfondire i meccanismi di azione di determinante sostanze, consentendo di fare previsioni su eventuali effetti avversi in vertebrati e uomo.

Gli invertebrati offrono degli indubbi vantaggi quando si tratta di studiare gli effetti biologici di sostanze esogene e di capirne i meccanismi d'azione, soprattutto se tali sostanze interferiscono con i meccanismi riproduttivi come nel caso degli ECDs. Infatti hanno cicli vitali generalmente più rapidi di quelli dei vertebrati come i pesci, e ciò permette di studiare le proprietà tossicologiche di una sostanza durante l'intero ciclo vitale, evidenziando gli stadi più sensibili e gli effetti transgenerazionali. Inoltre processi sensibili come la fecondazione e i primi stadi di sviluppo embrionale avvengono in acqua di mare, a diretto contatto con gli inquinanti.

Gli studi relativi agli ECDs sugli invertebrati sono resi più complessi dalla scarsa conoscenza dell'endocrinologia e della fisiologia di molti gruppi che tuttavia sono componenti ben rappresentati degli ecosistemi marini. Per esempio, solo in pochi *phyla* animali sono noti i passaggi chiave della sintesi degli steroidi che spesso sono il bersaglio dell'azione degli ECDs. Le attività catalitiche degli xenobiotici possono essere anche molto differenti nei diversi *phyla*. Ad oggi le conoscenze maggiori si hanno per specie appartenenti al gruppo dei protostomi, tra cui artropodi, anellidi e molluschi. Tra i deuterostomi non vertebrati, gli echinodermi sono stati tra gli animali più studiati mentre ancora sono agli albori le conoscenze di endocrinologia di tunicati e cefalocordati, che sono gli invertebrati più strettamente imparentati con i vertebrati¹.

Nonostante gli studi sull'azione degli ECDs siano tuttora rivolti prevalentemente ai vertebrati, uno dei più chiari esempi di distruzione endocrina ad opera di una sostanza chimica è stato segnalato nei molluschi gasteropodi esposti a *Tributyltin* (TBT)². TBT è una molecola organica contenente stagno usata nelle vernici *antifouling* e nelle vernici protettive per il legno. Blaber, nel 1970, notò che l'esposizione a questa molecola causava negli esemplari femminili del mollusco gonocorico *Nucella lapillus* lo sviluppo di una forma di pseudoermafroditismo nota come *imposex*. Le femmine mostravano lo sviluppo di un pene e/o di un vaso deferente. Da allora il fenomeno è stato descritto in 118 specie

¹ Janer – Porta 2007.

² Bettin *et al.* 1996.

appartenenti a 63 generi di molluschi prosobranchi. L'intensità del fenomeno è stata classificata secondo un sistema proposto da Blaber in sei stadi in base alla presenza del pene, dell'estensione del vaso deferente e dalla apertura vaginale intatta. Le malformazioni più gravi (stadio 6) causano la morte dell'animale³. Difetti a livello individuale si trasformano quindi in problemi a livello di popolazione con calo demografico e rischio di estinzione a livello locale⁴. C'è una forte correlazione tra la concentrazione di TBT in acqua marina e la percentuale di animali colpiti e l'intensità del fenomeno causato. La valutazione dell'*imposex* nei gasteropodi, per la sua alta specificità e sensibilità, è considerato un buon indicatore per monitorare l'inquinamento da TBT in ambiente, confrontabile per precisione all'utilizzo di tecniche di chimica analitica⁵. Attualmente l'analisi dell'*imposex* è una tecnica utilizzata per il monitoraggio dell'inquinamento marino da TBT⁶.

Alcuni dei *pathways* molecolari sensibili all'azione degli EDCs sono condivisi tra invertebrati e vertebrati. Per esempio, un'azione combinata del citocromo P450 e di deidrogenasi degli steroidi catalizza la conversione di colesterolo a ormoni sessuali negli echinodermi e nei molluschi⁷. Lo sviluppo di caratteri maschili nei gasteropodi prosobranchi è dovuto all'inibizione dell'attività di P450 che catalizza la sintesi di estrogeni a partire da testosterone. L'accumulo di testosterone causa la mascolinizzazione degli individui femminili. Studi *in vitro* hanno dimostrato la capacità del TBT di inibire l'attività dell'aromatasi dipendente da P450 anche nei bivalvi delle specie *Crassostrea gigas* e *Ruditapes decussata*⁸.

Alcuni *pathways* della sintesi degli steroidi non sono presenti nei crostacei, nei quali gli ormoni simili all'ecdisione (ormone della muta) giocano un ruolo chiave nella regolazione della riproduzione e dello sviluppo embrionale⁹. Nei crostacei il differenziamento sessuale è controllato dalla ghiandola androgenica che produce un ormone insulina-simile che controlla lo sviluppo dei caratteri sessuali primari e secondari.

³ Blaber *et al.* 1970.

⁴ Roach – Wilson 2009.

⁵ Alzieu, 1996.

⁶ OSPAR convention 2006.

⁷ Porte *et al.* 2006.

⁸ Morcillo *et al.* 1998; Le Curieux-Belfond *et al.* 2001.

⁹ Lafont 2000.

L'esposizione a TBT causa nelle femmine di paguro *Clibanarius vittatus* disorganizzazione o atrofia ovarica che a lungo termine porta ad una diminuzione della popolazione¹⁰.

Gli ECDS più studiati nei vertebrati e negli invertebrati sono quelli che mimano o bloccano l'azione degli estrogeni, tra questi il dietilstilbestrolo (DES), il Bisfenolo A (BPA), l'atrazina, il Nonilfenolo (NP). Il BPA è stato scoperto nel 1936 come molecola con attività estrogenica. Successivamente è stato utilizzato nella produzione della plastica e oggi è una delle 50 molecole sintetiche maggiormente prodotte al mondo. Il BPA induce super-femminizzazione nel gasteropode *Nucella lapillus* con produzione di organi femminili extra e ipertrofia delle ghiandole accessorie. Le super-femmine hanno una mortalità molto elevata¹¹. Recentemente il mio gruppo di ricerca si è occupato di studiare gli effetti del BPA e del NP sullo sviluppo embrionale delle ascidie, un gruppo di animali marini sessili, ermafroditi, appartenenti al gruppo dei Tunicati, il gruppo fratello dei vertebrati¹². Questi animali come organismi modello per studiare l'effetto di EDC offrono infatti diversi vantaggi oltre a quello di facilitare il confronto con i vertebrati, data la vicinanza filogenetica. Gli adulti infatti sono filtratori e accumulano le sostanze presenti in ambiente, producono una grande quantità di gameti e embrioni sincroni possono essere ottenuti in elevato numero mediante fecondazione *in vitro*. Gli embrioni hanno uno sviluppo molto rapido (18 ore a 18°C), sono trasparenti e facilmente manipolabili. Le larve natanti sono formate da un numero limitato di cellule, circa 3000 nella ascidia più studiata *Ciona intestinalis*. Esse presentano i tipici caratteri da cordato con una notocorda che corre lungo la coda fiancheggiata da cellule muscolari. Il sistema nervoso dorsale tubulare è costituito da una vescicola anteriore che porta gli organi di senso e un tubo neurale posteriore. Per molte specie sono disponibili i genomi sequenziati¹³ che facilitano l'esplorazione dei meccanismi molecolari coinvolti nell'azione degli ECDS.

Il BPA causa alterazioni dello sviluppo negli embrioni nelle ascidie *Phallusia mammillata*, *Ciona intestinalis* e *C. robusta*¹⁴. Le due specie del

¹⁰ Sant'Anna *et al.* 2012.

¹¹ Oehlmann *et al.* 2000.

¹² Delsuc *et al.* 2006.

¹³ < url: <https://www.aniseed.cnrs.fr/> >.

¹⁴ Messinetti *et al.* 2018, Mercurio *et al.* 2022.

genere *Ciona* hanno dimostrato una uguale sensibilità nei confronti della molecola; la concentrazione che causa la malformazione nel 50% degli embrioni esposti è 8.25 M per *C. intestinalis* e 7.04 M per *C. robusta*¹⁵. Le malformazioni osservate sono principalmente a livello del sistema nervoso con un aumento del numero dei neuroni dopaminergici¹⁶. In *P. mammillata* le malformazioni sono principalmente a carico degli organi pigmentati, che risultano fusi o assenti¹⁷. Analoghe malformazioni si rilevano anche in *C. intestinalis* (Fig. 1).

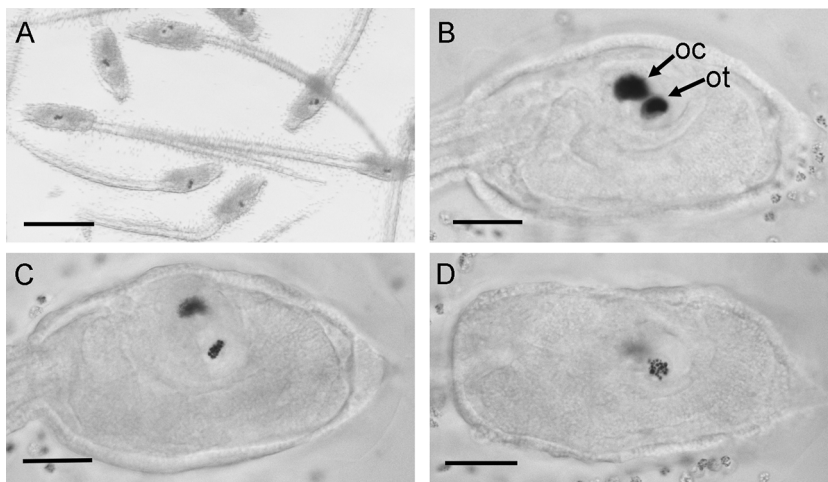


Fig. 1. Larve di *Ciona intestinalis*. A) Larve di controllo, in cui si osserva la tipica forma a girino formata da un tronco e una coda. B) Ingrandimento della regione del tronco di una larva di controllo. Si osservano i due organi di senso pigmentati, l'ocello (OC) e l'otolite (OT). C), D): ingrandimenti della regione del tronco di due larve trattate con BPA 10 μ M. Si osserva la riduzione del pigmento presente negli organi pigmentati. Scale bar: A, 200 μ m, B-D, 20 μ m. In B)-D) le larve sono orientate con l'estremità anteriore verso destra.

In questa specie la co-esposizione a BPA e a 4-OHT, un antagonista selettivo dei recettori degli estrogeni (ER), riduce significativamente la gravità delle malformazioni e la loro incidenza. Ciò suggerisce che il

¹⁵ Mercurio *et al.* 2022.

¹⁶ Messinetti *et al.* 2019.

¹⁷ Messinetti *et al.* 2018.

meccanismo d'azione del BPA coinvolga il suo legame agli ER. Tuttavia, esaustive analisi del genoma di diverse specie di tunicati non hanno individuato sequenze relative a tali recettori. Ciò ha portato a dirigere l'attenzione verso un'altra classe di recettori quella dei recettori correlati agli estrogeni *estrogen related receptors*, ERR. I membri di questa classe sono recettori nucleari orfani, di cui non si conosce il ligando naturale, costitutivamente attivi con struttura simile agli ER. Nei mammiferi sono presenti tre tipi di recettori (α , δ , γ); negli invertebrati è presente un solo recettore di tipo γ . In *C. robusta* trascritti del recettore sono presenti nelle prime fasi della segmentazione, fino allo stadio di 64 cellule, e ritornano presenti nelle fasi terminali dell'embriogenesi¹⁸. È noto che gli ERR regolano il differenziamento dei neuroni dopaminergici attivando la via di segnale GSK3 /NFAT nelle cellule SH-SY5Y¹⁹. I nostri risultati sono quindi coerenti con una attivazione da parte del BPA dei recettori ERR negli embrioni di ascidia che porta ad una up regolazione dei neuroni dopaminergici. Anche nell'uomo è stato dimostrato che BPA lega gli ERR²⁰ suggerendo l'esistenza di un meccanismo patogenetico condiviso.

BIBLIOGRAFIA

- Alzieu, C. 1996 *Biological effects of tributyltin on marine organisms*, in S. J. De Mora (edited by), *Tributyltin: Case Study of an Environmental Contaminant*, Cambridge – New York, Cambridge University Press, 167, 211.
- Bettin, C. – Oehlmann, J. – Stroben, E. 1996 *TBT-induced imposex in marine neogastropods is mediated by an increasing androgen level*, *Helgolander Meeresunters*; 50: 299-317.
- Blaber, S. J. M. 1970 *The occurrence of a penis-like outgrowth behind the right tentacle in spent females of Nucella lapillus*, *Proc malac Soc Lond*; 39: 231-233.
- Delsuc, F. – Brinkmann, H. – Chourrout, D. – Philippe, H. 2006 *Tunicates and not cephalochordates are the closest living relatives of vertebrates*, *Nature*; 439: 965-968.
- Janer, G. – Porte, C. 2007 *Sex steroids and potential mechanisms of non-genomic endocrine disruption in invertebrates*, *Ecotoxicol*; 16: 145-160.

¹⁸ <url: <https://www.aniseed.cnrs.fr/> >.

¹⁹ Lim *et al.* 2015.

²⁰ Takayanagi 2006.

- LaFont, R. 2000 *The endocrinology of invertebrates*, Ecotoxicol; 9: 41-57.
- Le Curieux-Belfond, O. – Moslemi, S. – Mathieu, M. – Seralini, G. E. 2001 *Androgen metabolism in oyster Crassostera gigas: evidence for 17 β -HSD activities and characterization of an aromatase-like activity inhibited by pharmacological compounds and a marine pollutant*, J Steroid Biochem Mol Biol; 78: 359-366.
- Lim, J. – Choi, H. S. – Choi, H. J. 2015 *Estrogen-related receptor gamma regulates dopaminergic neuronal phenotype by activating GSK3/NFAT signaling in SH-SY5Y cells*, J Neurochem; 133: 544-557.
- Mercurio, S. – Messinetti, S. – Barzaghi, B. – Pennati R. 2022 *Comparing the sensitivity of two cogenetic ascidian species to two plastic additives: Bisphenol A and the flame retardant tris(chloro-propyl) phosphate*, Eur Zool J; 80: 437-445.
- Messinetti, S. – Mercurio, S. – Pennati, R. 2018. *Effects of bisphenol A on the development of pigmented organs in the ascidian Phallusia mammillata*, Invertebr Biol; 137: 329-338.
- Messinetti, S. – Mercurio, S. – Pennati, R. 2019 *Bisphenol A affects neural development of the ascidian Ciona robusta*, J Exp Zool Part A Ecol Integr Physiol; 331: 5-16.
- Morcillo, Y. – Ronis, M. J. J. – Porte, C. 1998 *Effects of tributyltin on the Phase I testosterone metabolism and steroid titres of the clam Ruditapes decussata*, Aquat Toxicol; 42: 1-13.
- Oehlmann, J. – Schulte-Oehlmann, U. – Tillmann, M. *et al.* 2000 *Effects of Endocrine Disruptors on Prosobranch Snails (Mollusca: Gastropoda) in the Laboratory. Part I: Bisphenol A and Octylphenol as Xeno-Estrogens*, Ecotoxicol; 9: 383-397.
- Porte, C. – Janer, G. – Lorusso, L. C. – Ortiz-Zarragoitia, M. – Cajaraville, M. P. – Fossi, M. C. – Canesi, L. 2006 *Endocrine disruptors in marine organisms: approaches and perspectives*, Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol; 143: 303-15.
- Sant'Anna, B. S. – Santos, D. M. – Marchi, M. R. – Zara, F. J. – Turra, A. 2012 *Effects of tributyltin exposure in hermit crabs Clibanarius vittatus as a model*, Environ Toxicol Chem; 31: 632-8.
- Takayanagi, S. – Tokunaga, T. – Turra, A. 2012 *Endocrine disruptor bisphenol A strongly binds to human estrogen-related receptor gamma (ERRgamma) with high constitutive activity*, Toxicol Lett; 167: 95-105.
- Vogt, G. 2018 *Effects of Organotins on Crustaceans: Update and Perspectives*, Front Endocrinol; 9.