

A. Moretto^{1,2}, C. Colosio^{1,3}

Valutazione dei dati sperimentali per la neurotossicità dello sviluppo dei pesticidi

¹ Dipartimento di Medicina del Lavoro, Università degli Studi di Milano, via San Barnaba, 8, 20122 Milano² International Centre for Pesticides and Health Risk Prevention (ICPS), Azienda Ospedaliera Luigi Sacco, via Stephenson, 94, 20157 Milano³ International Centre for Rural Health (ICRH), Azienda Ospedaliera San Paolo, via San Vigilio 43, 20142, Milano

RIASSUNTO. Studi epidemiologici sugli effetti sullo sviluppo del sistema nervoso dei pesticidi non sono conclusivi. Gli studi di neurotossicologia dello sviluppo, talora evidenziano effetti nei neonati a dosi inferiori a quelle dell'adulto; quasi sempre si tratta di effetti transitori, aspecifici, con modifiche disperate di parametri biochimici, molecolari o neurocomportamentali, spesso associati a somministrazioni in bolo. A basse dosi ripetute non si evidenziano effetti neurologici durante lo sviluppo a dosi inferiori a quelle che causano effetti nell'adulto. Poiché effetti di elevate dosi acute sono invece possibili, gli interventi sul campo dovrebbero concentrarsi nella prevenzione delle esposizioni a tali dosi.

ABSTRACT. EVALUATION OF EXPERIMENTAL DATA FOR DEVELOPMENTAL NEUROTOXICITY OF PESTICIDES. Epidemiological studies on neurodevelopmental effects of pesticides are inconclusive. Experimental developmental neurotoxicity studies, sometimes show effects on pups given doses lower than adults; most of the times these effects were transient, aspecific, with scattered biochemical, molecular or neurobehavioural changes, generally associated with high bolus doses. At repeated low doses, effects in pups did not occur at doses lower than in adults. Since the effects of high bolus doses are possible, preventive interventions should aim at reducing these exposures.

Key words: pesticide, development, neurotoxicity.

Per lo sviluppo normale del sistema nervoso centrale, sia in utero che dopo la nascita, è richiesto un ambiente adeguato che dipende da complesse relazioni ed equilibri fra diversi fattori. Alterazioni del sistema nervoso possono essere dovute a fattori sia genetici che esterni, che agiscono nelle varie fasi del suo sviluppo (Connors et al., 2008). Molte categorie di pesticidi agiscono con meccanismo neurotossico sia nella specie bersaglio che nei mammiferi adulti, fra cui l'uomo. La maggior parte di questi composti sono anticolinesterasici (esteri organo fosforici e carbammati), organo clorurati, e piretroidi, benché altri gruppi o singoli composti possono avere effetti neurotossici. Pertanto è comprensibile che sia stato sollevato il problema di possibili effetti neurotossici dei pesticidi sul normale sviluppo del sistema nervoso, in particolare del sistema nervoso centrale, e che le modalità e gli strumenti per identificare e quindi prevenire questi effetti siano oggetto di ampia discussione (Barlow et al., 2007; Eskenazi et al., 2008; Fitzpatrick et al., 2008; Raffaele et al., 2010). In particolare, negli Stati Uniti, l'approvazione nel 1996 del Food Quality Protection Act ha richiesto uno sforzo maggiore per la valutazione della potenziale tossicità dei pesticidi nei bambini, con particolare attenzione agli effetti tossici sullo sviluppo del sistema nervoso (Raffaele et al., 2010).

Piuttosto numerosi sono gli studi epidemiologici che sono stati condotti al fine di identificare possibili conseguenze sullo sviluppo neurologico dopo esposizione perinatale a pesticidi. Le conclusioni sono state ambigue e molti studi sono stati criticati (per una revisione degli studi vedi per esempio: Bjorling-Poulsen et al., 2008; Jurewicz e Hanke, 2008; Weselak et al., 2007). In particolare, numerosi studi sono stati criticati per la scarsa definizione dell'esposizione, l'incoerenza degli effetti osservati, e, soprattutto negli studi che hanno valutato gli effetti di esposizioni ripetute a basse dosi di pesticidi, l'assente o scarsa evidenza di un'associazione causale con gli effetti osservati. Date queste incertezze, ci si propone di esaminare l'evidenza sperimentale per definire se ci siano dati che possano supportare l'ipotesi che i pesticidi abbiano uno specifico effetto sullo sviluppo del sistema nervoso; in altre parole, è stato posto il problema di una possibile particolare vulnerabilità dell'organismo che si sta sviluppando agli effetti neurotossici, che quindi si potrebbero verificare a dosi inferiori a quelle che causano effetti neurotossici nell'adulto, in particolare nella madre durante la gravidanza.

Lo studio degli effetti neurotossici durante lo sviluppo è molto complesso e per questo il protocollo sperimentale di questi studi, detti di “developmental neurotoxicity” (DNT), è stato oggetto di specifiche linee-guida, ma lo stesso rimangono numerosi problemi aperti. I principali problemi che si devono affrontare sono relativi alla normale variabilità dei parametri misurati (Raffaele et al., 2008), alla valutazione statistica (Holson et al., 2008), all’uso di controlli positivi adeguati (Crofton et al., 2008), e all’identificazione e interpretazione degli effetti (Tyl et al., 2008). Possibili effetti dovuti al trattamento possono sfuggire all’osservazione per l’eccessiva variabilità dei valori di base o di controllo, oppure, al contrario, modificazioni minime, ma statisticamente significative, possono essere considerate biologicamente significative e correlate al trattamento anche se in effetti possono ancora rientrare nell’intervallo di normalità (Raffaele et al., 2008). Poiché gli studi DNT, anche quelli non eseguiti secondo protocolli standardizzati, richiedono un elevato numero di confronti statistici, è stato raccomandato che l’analisi statistica sia programmata *a priori* e tenga conto di questo fatto. Per esempio, l’analisi degli studi consegnati alla US Environmental Protection Agency (EPA) ha mostrato che in molti casi l’approccio statistico era inadeguato: fra i problemi identificati si segnalano l’inadeguato controllo degli errori di tipo I, la mancata considerazione del potere statistico dello studio, e la mancata considerazione di sesso, tempo e nidità come fattori rilevanti per l’analisi. Si noti che in un test DNT tipico i test statistici e quindi il numero di valori p (p-value) può arrivare a 1300; questo vuol dire che considerando significativo $p < 0.05$, si ottengono 65 test da considerare positivi solo per effetto del caso (Holson et al., 2008). Inoltre, la maggior parte degli esperti ritiene che in tutti gli studi di DNT debba essere introdotto un controllo positivo (vedi Crofton et al., 2008 per una discussione) non solo per dimostrare la competenza del laboratorio che conduce lo studio, ma anche per meglio determinare il significato biologico di eventuali risultati positivi o ridurre l’incertezza sui valori negativi. Dati tutti questi problemi è evidente che l’individuazione, la misura e l’interpretazione degli effetti osservati non è semplice. È stato suggerito un approccio basato sull’evidenza (weight-of-evidence approach) in cui prendere in considerazione sia la qualità che la dimensione degli effetti, e il loro sviluppo temporale. Inoltre, tutti i risultati/effetti osservati devono essere contestualizzati e interpretati nel contesto di altri risultati/effetti nello stesso studio e in altri studi. Benché statisticamente significativi, gli effetti devono essere posti in questione e devono essere coerenti con, ad esempio, la dose o con altri effetti biologicamente correlati (Tyl et al., 2008).

Raffaele et al. (2010) riportano una revisione critica dei risultati degli studi DNT inviati all’US EPA fino al dicembre 2008; questi studi interessavano 72 principi attivi di pesticidi. Il disegno sperimentale prevedeva il trattamento delle gestanti (ratti) dal sesto giorno di gravidanza al giorno 11 o 21 post-partum. Da segnalare che la seconda opzione è la ritenuta preferibile per una adeguata esposizione dei lattanti. La progenie è stata trattata direttamente qualora il composto non venisse escreto con il latte materno. Il nu-

mero di parametri funzionali, neurocomportamentali, morfologici e morfometrici misurati era piuttosto elevato, mentre nelle gestanti i parametri valutati erano numericamente molto inferiori e molto meno sensibili. Date queste differenze, gli effetti osservati e la determinazione dei relativi livelli di non effetto/effetto minimo (no/lowest-observable-adverse-effect levels, NOAEL/LOAEL) non sono strettamente confrontabili fra progenie e madri. Pertanto è difficile, talora addirittura impossibile, trarre conclusioni sulla presenza o meno di differenze nella sensibilità agli effetti fra progenie e madri. In circa il 20% dei casi, il NOAEL nella progenie era più basso che nella madre (stesso studio) o in generale nell’adulto (altri studi), e in un altro 20% dei casi probabilmente lo era ma non erano disponibili informazioni sufficienti per una conclusione certa. È importante rilevare che gli effetti sui quali sono definiti il NOAEL e il LOAEL non erano di solito di tipo neurotossico (ad esempio riduzione del peso o dell’incremento del peso corporeo) ed erano transitori (ad esempio osservati solo nei primi giorni di vita e non dopo una o più settimane di vita). In particolare, su 15 studi che hanno mostrato un NOAEL più basso per la progenie, in 11 studi l’effetto osservato al LOAEL è stata la riduzione del peso corporeo o la riduzione dell’incremento di peso corporeo, da soli o accompagnati da altri effetti sistemici, e in ulteriori due studi da ridotta sopravvivenza. Inoltre, non è stato analizzato l’intervallo di dose fra il NOAEL e il LOAEL negli studi DNT e negli altri studi, e non è stato quindi possibile verificare se davvero il LOAEL nello studio DNT era inferiore al NOAEL negli altri studi in adulti. Solo se gli effetti nella progenie (LOAEL) si osservavano a dosi inferiori a quelle senza effetto (NOAEL) nell’adulto si sarebbe potuto concludere per una effettiva maggiore sensibilità dei primi rispetto agli adulti. Concludendo, mentre, da una parte, alcuni di questi studi di DNT eseguiti secondo protocolli standardizzati possono evidenziare una maggiore sensibilità della progenie, rimane da verificare in quanti casi questa osservazione sia un artefatto legato alla scelta delle dosi e/o al numero limitato e alla relativamente bassa sensibilità dei parametri misurati nelle madri o in generale negli animali adulti. Da notare anche che i composti testati erano tutti neurotossici noti, in gran parte esteri organo fosforici, spesso c’era un solo effetto/parametro alterato al LOAEL, sia sistemico che, meno spesso, relativo allo sviluppo, e nel 30% dei casi è stato osservato un solo effetto transitorio neurologico. Nel loro insieme questi dati indicano che la sensibilità a sostanze neurotossiche degli animali giovani se determinata a dosi vicine al NOAEL/LOAEL non è generalmente maggiore, o significativamente maggiore, rispetto a quella dell’adulto.

Oltre agli studi condotti a scopo regolamentatorio, cioè al fine di ottenere la registrazione e autorizzazione al commercio del principio attivo, sono stati condotti molti altri studi che hanno usato diversi protocolli in cui sono stati misurati differenti parametri, ritenuti più sensibili. Questi studi sono stati in genere eseguiti per meglio definire e comprendere possibili effetti neurotossici durante lo sviluppo dell’organismo di vari composti, soprattutto pesticidi (vedi ad esempio: Levin et al., 2010; Slotkin et al., 2008a; 2008b; Timofeeva et al., 2008; Torres-Sanchez et al.,

2009). La maggior parte di questi studi sono stati condotti con esteri organo fosforici, e gli autori riportano spesso che le dosi utilizzate erano “basse” (low). Nella maggior parte dei casi, la categorizzazione “low” era applicata se la dose non causava effetti clinici evidenti o inibizione asintomatica dell’acetilcolinesterasi, bersaglio della tossicità degli esteri organofosforici; in ogni caso, però, queste dosi si collocavano attorno al NOAEL/LOAEL per l’inibizione dell’acetilcolinesterasi. Occorre ricordare che il ripristino dell’attività delle acetilcolinesterasi per sintesi di nuovo enzima è molto più rapido negli animali neonati/giovani che negli adulti. Pertanto, il momento in cui è misurata l’attività acetilcolinesterasica è critico, particolarmente nei neonati e nei giovani, e determinazioni eseguite, per esempio, 24 ore o più dopo la fine del trattamento, come è il caso nella maggior parte di questi studi, possono portare all’identificazione di una inibizione nell’adulto ma non identificare una inibizione più precoce, rapidamente recuperata per sintesi, nei neonati (Eaton et al., 2008). Questo fatto è particolarmente importante perché è noto che insulti acuti al cervello che si sta sviluppando, hanno conseguenze a lungo termine, perfino dopo che si è avuto un recupero “apparente” (Counotte et al., 2011, Pugh et al., 2011). In questi studi a “basse dosi” gli effetti biochimici, molecolari e/o neurocomportamentali osservati sono generalmente estremamente variabili, e talora in direzioni biologicamente/tossicologicamente opposte. Spesso, per spiegare questi dati, sono stati invocati effetti e meccanismi specifici per composto (perfino all’interno degli esteri organofosforici) o addirittura sesso-specifici. Da una parte è possibile che la maggior parte di questi effetti si siano verificati a dosi che causavano inibizione dell’acetilcolinesterasi, ed essere forse conseguenza di tale inibizione, dall’altra non è stata fornita alcuna spiegazione alternativa sull’origine o sul significato biologico di queste alterazioni. Al contrario, a dosi che causavano inibizione dell’acetilcolinesterasi, si sono osservati effetti chiari, sia nei neonati/giovani che negli adulti. Tutto questo rende di difficile interpretazione i risultati di questi studi a “basse dosi” e la loro applicazione per la valutazione di rischio per l’uomo. Infatti, le alterazioni erano incoerenti fra studi e talora all’interno dello stesso studio, non riproducibili fra studi, e di significato biologico sconosciuto o discutibile. Si ricorda inoltre che, mentre è assodato che in molti casi, per alcuni (gruppi di) composti, gli animali giovani sono più sensibili degli adulti agli effetti (neuro)tossici di una dose singola elevata, i dati disponibili indicano che probabilmente questo non avviene per dosi ripetute, più basse (Vidair, 2004). Di conseguenza è discutibile affermare che a dosi paragonabili a quelle alle quali l’uomo è esposto in conseguenza della presenza di contaminanti in traccia negli alimenti e nell’ambiente, gli animali giovani sono più sensibili degli adulti. Inoltre, è stata messa in discussione l’appropriatezza dell’extrapolazione all’uomo dei dati (NOAEL/LOAEL) osservati in neonati/giovani ai quali sia stata somministrata una dose acuta, soprattutto in bolo (ad esempio per “gavage”). Inoltre si segnala che la butirrilcolinesterasi, che sembra avere un qualche ruolo nello sviluppo del sistema nervoso (Eaton et al., 2008), in questi studi non è stata misurata.

In conclusione, i dati epidemiologici e sperimentali degli studi di DNT non sono di supporto all’ipotesi che alcuni pesticidi causino effetti neurotossici sullo sviluppo a dosi inferiori ai NOAEL identificati in altri studi sugli animali adulti; per esempio nel caso degli esteri organofosforici per dosi inferiori a quelle che causano inibizione dell’acetilcolinesterasi, né questi dati suggeriscono che, in seguito ad esposizione ripetuta a basse dosi, vi sia una sensibilità degli animali neonati/giovani significativamente maggiore di quella degli adulti. Alcuni dei parametri biochimici trovati alterati in certi studi non hanno una chiara spiegazione biologica. A questo proposito, è bene ricordare che deve essere evitato qualsiasi tentativo di testare un’ipotesi sugli stessi dati che l’hanno generata; per questo, devono essere disegnati esperimenti ad hoc (Holson et al., 2008). Comunque, è necessario ricordare che, come anche indicato da studi con altri composti (Counotte et al., 2011), il trattamento del cervello che si sta sviluppando con dosi di composti che causano effetti reversibili, per esempio sui recettori, possono avere effetti permanenti a lungo termine. Pertanto, per meglio chiarire il problema, sia gli studi epidemiologici che quelli sperimentali dovrebbero concentrarsi sulle conseguenze di esposizioni acute e (relativamente) elevate, per comprendere e valutare gli effetti a lungo termine. Per questi motivi, è di fondamentale importanza che gli interventi in sanità pubblica si focalizzino sulla prevenzione di tali esposizioni a pesticidi, sia dei giovani che degli adulti, visto che di solito tali esposizioni derivano da scarsa formazione e/o mancanza di adeguati mezzi di protezione.

Bibliografia

- 1) Barlow BK, Cory-Slechta DA, Richfield EK, Thiruchelvam M. The gestational environment and Parkinson’s disease: Evidence for neurodevelopmental origins of a neurodegenerative disorder. *Reproductive Toxicology* 2007; 23: 457-470.
- 2) Bjorling-Poulsen M, Andersen H, Grandjean P. Potential developmental neurotoxicity of pesticides used in Europe. *Environmental Health* 2008; 7: 50.
- 3) Connors S, Levitt P, Matthews S, Slotkin T, Johnston M, Kinney H, Johnson W, Dailey R, Zimmerman A. Fetal Mechanism in neurodevelopmental disorders. *Symposium Review* 2008; 38: 163-176.
- 4) Counotte D, Goriounova N, Li Wan K, Loos M, van der Schors R, Schetters D, Schoffelmeer A, Smit A, Mansvelter H, Pattij T, Spijker S. Lasting synaptic changes underlie attention deficits caused by nicotine exposure during adolescence. *Nature Neuroscience* 2011; 14(4): 417-419.
- 5) Crofton K, Foss J, Hass U, Jensen K, Levin E, Parker S. Undertaking positive control studies as part of developmental neurotoxicity testing. A report from the ILSI research foundation/risk science institute expert working group on neurodevelopmental endpoints 2008; 30: 266-287.
- 6) Eaton D, Daroff R, Autrup H, Bridges J, Buffler P, Costa L, Coyle J, McKhann G, Mobley W, Nadel L, Neubert D, Schulte-Hermann R, Spencer P. Review of the toxicology of chlorpyrifos with an emphasis on human exposure and neurodevelopment. *Critical Reviews in Toxicology* 2008: 1-125.
- 7) Eskenazi B, Rosas L, Marks A, Bradman A, Harley K, Holland N, Johnson C, Fenster L, Barr D. Pesticide toxicity and the developing brain. *The Authors journal compilation* 2008; 102: 228-236.
- 8) Fitzpatrick J, Mendez E, Walls I. Introduction to the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute reports from the expert working group on neurodevelopmental endpoints. *Neurotoxicology and Teratology* 2008; 30: 263-265.

- 9) Holson R, Freshwater L, Maurissen J, Moser V, Phang W. Statistical issue and techniques appropriate for developmental neurotoxicity testing. A report from the ILSI research foundation/risk science institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. *Neurotoxicology and teratology* 2008; 30: 326-348.
- 10) Jurewicz J, Hanke W. Prenatal and childhood exposure to pesticides and neurobehavioral development: review of epidemiological studies. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health* 2008; 21(2): 121-132.
- 11) Levin E, Timofeeva O, Yang L, Petro A, Ryde I, Wrench N, Seidler F, Slotkin T. Early postnatal parathion exposure in rats causes sex-selective cognitive impairment and neurotransmitter defects which emerge in aging. *Behavioural Brain Research. Behavioural Brain Research* 2010; 208: 319-327.
- 12) Pugh P, Adlaf E, Zhao C, Markwardt S, Gavin C, Wadiche J, Overstreet-Wadiche L. Enhanced integration of newborn neurons after neonatal insults. *Frontiers in Neuroscience* 2011; 5(45): 1-11.
- 13) Raffaele K, Fisher J, Handcock S, Hazelden K, Sobrian S. Determining normal variability in a developmental neurotoxicity test. A report from the ILSI research foundation/risk science institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. *Neurotoxicology and teratology* 2008; 30: 288-325.
- 14) Raffaele K, Rowland J, May B, Makris S, Schumacher K, Scarano L. The use of developmental neurotoxicity data in pesticide risk assessments. *Neurotoxicology and Teratology* 2010; 32: 563-572.
- 15) Slotkin T, Bodwell B, Levin E, Seidler F. Neonatal exposure to low doses of diazinon: long-term effects on neural cell development and acetylcholine systems. *Environmental Health Perspectives* 2008a; 116(3): 340-348.
- 16) Slotkin T, Bodwell B, Ryde I, Levin E, Seidler F. Exposure of neonatal rats to parathion elicits sex-selective impairment of acetylcholine systems in brain regions during adolescence and adulthood. *Environmental Health Perspectives* 2008b; 116(10): 1308-1314.
- 17) Timofeeva O, Sanders D, Seemann K, Yang L, Hermanson D, Regenbogen S, Agoos S, Kallepalli A, Rastogi A, Braddy D, Wells C, Perraut C, Seidler F, Slotkin T, Levin E. Persistent behavioural alterations in rats neonatally exposed to low doses of the organophosphate pesticide, parathion. *Brain Research Bulletin* 2008; 77: 404-411.
- 18) Torres-Sánchez L, Schanaas L, Cebrian E.M, Hernandez M, Valencia O, Hernandez R, López-Carrillo L. Prenatal Dichlorodiphenyldichloroethylene (DDE) exposure and neurodevelopment: A follow-up from 12 to 30 months of age. *NeuroToxicology* 2009; 30: 1162-1165.
- 19) Tyl R, Crofton K, Moretto A, Moser V, Sheets L, Sobotka T. Identification and interpretation of development neurotoxicity effects. A report from the ILSI research foundation/risk science institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. *Neurotoxicology and teratology* 2008; 30: 349-381.
- 20) Vidair C. Age dependence of organophosphate and carbamate neurotoxicity I the postnatal rat: extrapolation to the human. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2004; 196: 287-302.
- 21) Weselak M, Arbuckle T, Foster W. Pesticide exposure and developmental outcomes: the epidemiological evidence. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 2007; 10: 41-80.

Richiesta estratti: A. Moretto, E-mail: angelo.moretto@unimi.it