SOSTANZE AMBIENTALI CON ATTIVITÀ ENDOCRINE (INTERFERENTI ENDOCRINI): VALUTAZIONE DEL RISCHIO

Alberto Mantovani

Dip. Sicurezza alimentare, Nutrizione, Sanità pubblica veterinaria

Istituto Superiore di Sanità, Roma

Esperto EFSA, ECHA, OECD:

alberto.mantovani@iss.it

Area web iss "Interferenti endocrini"

http://www.iss.it/inte

Interferenti Endocrini (IE)

- un eterogeneo gruppo di sostanze in grado di indurre effetti negativi sulla salute alterando il funzionamento del sistema endocrino,
cioè la complessa rete di segnali che regola il funzionamento e soprattutto lo sviluppo di altri sistemi (riproduttivo, nervoso, immunitario, osseo..) attraverso svariati meccanismi e bersagli (recettoriali, metabolici, ecc.)

Questa "interferenza" -anche in assenza di una conclamata tossicità, es., mutagenesi o teratogenesi- causa effetti avversi insidiosi sulla salute, il cui tipo ed entità sono modulati da fase del ciclo vitale e genere

Interferenti Endocrini (II)

Criterio per identificare un IE in Unione Europea:
una sostanza che causa effetti avversi plausibilmente correlati a meccanismi endocrini, che ne forniscono la spiegazione migliore (ECHA/EFSA 2018)

- Le attuali conoscenze indicano che l'omeostasi degli ormoni steroidi (in particolare l'eqilibrio estrogeni/androgeni) e della tiroide

e quindi la salute riproduttiva, lo sviluppo prenatale e l'infanzia

sono i principali bersagli degli effetti degli IE

Questo non esclude *l'importanza di ulteriori bersagli* (ad es. insulina, v. dopo) se indicati da evidenze scientifiche

Chi sono gli IE?

Una lista "ufficiale" di IE *non esiste*,
salvo le sostanze che sono *progressivamente classificate* come IE
dall'Agenzia Europea per le Sostanze Chimiche (ECHA)

In Europa
Gli IE sono considerati "*equivalenti*"
alle classiche sostanze "*altamente preoccupanti*"
(mutageni/cancerogeni, sostanze tossiche per riproduzione e sviluppo, sostanze persistenti e che bioaccumulano)
identificate dall'ECHA nell'ambito del REACH
il grande programma UE di registrazione delle sostanze chimiche

Il consenso della comunità scientifica indica..

Chi sono gli IE?

Contaminanti persistenti (PCB, diossine, PBDE, PFAS -anche alcuni metalli: cadmio, arsenico..: *bioaccumulo in organismi animali e vegetali*)

Pesticidi, biocidi, sostanze utilizzate in zootecnia (dicarbossimidi, triazoli, ETU…: *molto attivi, ma anche controllati. Multiresidui problema emergente*)

Sostanze industriali/prodotti di consumo (*plastiche, conservanti, detergenti*: bisfenoli, ftalati, parabeni, alchilfenoli: *esposizione diffusa, non ben controllati*)

- Composti "naturali"(dalla micotossina zearalenone -un contaminante dei cereali ad azione estrogenica
a sostanze presenti negli alimenti che possono porre problemi *ad alte dosi in supplementi o alimenti "salutistici"*: isoflavoni della soia, iodio)

Perché gli IE ci preoccupano

- **Suscettibilità dell'organismo in via di sviluppo**

Gli ormoni sono fondamentali per regolare i processi di sviluppo *dalla vita prenatale alla pubertà*.
L'organismo in via di sviluppo è suscettibile a livelli di esposizione che possono essere di limitata rilevanza per l'adulto (*persistenza di un danno temporaneo*)

EFSA: livelli "tollerabili" di IE (bisfenoli, ftalati, diossine) determinati sulla base di effetti sullo sviluppo

Es. ftalati (plasticizzanti usati in PVC, etc.): inibita produzione di androgeni nel testicolo fetale con ridotta fertilità nell'adulto (studi su roditori, con alcune evidenze nell'uomo) (EFSA 2020)

Perché gli IE ci preoccupano (II)

Molteplicità di effetti e modulazione della suscettibili (= *complessità*)

Un IE con un determinato bersaglio cellulare/biochimico: molteplici effetti, in correlazione confase della vita e sesso (*status endocrino*)

ad es., l'inibita produzione di ormone tiroideo, senza ipotiroidismo conclamato (il "gozzo endemico" da carenza di iodio)

in utero e infanzia: *sviluppo neurocomportamentale*, crescita
Adulti: *metabolismo basale*
Donna adulta: *fertilità, rischio di aborto*

Interazioni con *aspetti nutrizionali*: ad es., iodio per gli IE che agiscono a livello di tiroide
Perclorato (*competitore dello iodio*: contaminante di vegetaki e acqua soprattutto da fertilizzanti) maggiore suscettibilità nelle popolazioni con *carenza subclinica* (EFSA, 2014)
Mancozeb (fungicida, *inibitore tiroperossidasi* con il metabolita ETU): ruolo protettivo del consumo di *sale iodato* (Medda et al. 2017)

Tipo di effetti e fase di sviluppo

Ftalati (EFSA 2021 sul composto più studiato, il DEHP)
Alterata regolazione della sintesi degli steroidi attraverso l'iinterazione con il recettore nucleare *PPAR-alfa*
Conseguenze: ridotta maturazione degli spermatociti.
minori dimensioni di prostata e testicoli

Perché *nella fase fetale* è così importante l'*effetto inibitorio diretto* sulla sintesi di testosterone fetale
E *non altri bersagli*, pure osservati per il DEHP in altri fasi biologiche?

Ovaio: la steroidogenesi ovarica è quiescente e quindi non è suscettibile all'inibizione da parte del DEHP

Asse ipotalamo-ipofisi-testicolo: non è attivo: regolazione della steroidogenesi testicolare tramite LH solo dopo la nascita.

Negli esseri umani la steroidogenesi fetale *dipende dall'hCG placentare*
(nell'uomo il DEHP può avere effetti simili attraverso un bersaglio diverso)

Perché gli IE ci preoccupano (III)

Esposizione diffusa: importanti i dati di *esposizione interna* a sostanze *insufficientemente controllate* (esempi da studi ISS)

PBDE (ritardanti di fiamma: bioaccumulano e interagiscono con il trasporto e la sintesi ormonale) bambine italiane (4-9 anni)(*Deodati et al. 2016)*

- livelli riscontrati nello studio si situano nella parte alta del range dei livelli nell'infanzia in studi internazionali (*e questo è già un segnale*)

- livelli più alti associati con l'età, il BMI e nei casi di telarca precoce

Progetto PREVIENI: esposizione a bisfenolo A, dietil-esil ftalato (come metabolita: MEHP) e PFAS in adulti ambosessi italiani in età fertile *(La Rocca et al. 2014, 2015)*

- esposizione diffusa (comparabile alla letteratura internazionale), significativamente maggiore in:

chi vive in aree urbane (Bisfenolo, MEHP)

nei soggetti infertili (*in particolare* Bisfenolo in area urbana)

- (Bisfenolo, MEHP) correlati all'aumentata espressione nei leucociti di recettori nucleari bersaglio di IE (ERalfa e beta, AR, AhR, PXR)

Perché gli IE ci preoccupano (IV)

- Sostanze che, più che danneggiare una cellula/organo/tessuto, lo fanno *funzionare in maniera erronea*
(un cambio di visuale?)

- Esiste una "soglia" per gli effetti IE?
Sì, ma è probabilmente bassa per le sostanze che interagiscono con i recettori nucleari coinvolti nel sistema ormonale

Possibilità di effetti diversi a diversi livelli di esposizione (*complessità*):
Quindi relazioni dose-risposta *non lineari*

Alle basse dosi (ambientali?) non cerchiamo un effetto più debole
Ma un *effetto diverso*

Perché gli IE ci preoccupano (IV)

Possibilità di effetti diversi a diversi livelli di esposizione *(complessità):*

(EFSA 2021) effetti sullo *sviluppo postnatale neurocomportamentale* del principale ftalato (DEHP)

A basse dosi l'iniziale inibizione della sintesi di testosterone attraverso l'asse ipotalamo-ipofisi risulta, per un *meccanismo a feed-back, in una iperproduzione di testosterone* (anche inibizione dell'aromatasi che converte il testosterone in estradiolo) = androgenizzazione
con impatto su aspetti dello sviluppo attinenti a
ADHD, differenziazione sessuale
(indicatori anche negli esseri umani alle "basse dosi" ambientali)

Mentre,
ad alte dosi *l'effetto inibitorio è diretto ed evidente*

In tali casi, gli effetti osservati alle basse dosi sono critici per la valutazione del rischio *(EFSA 2021)*

Perché gli IE ci preoccupano (V)

Vita reale: difficile essere esposti ad una *sostanza ambientale alla volta.*

Esiste l'effetto cocktail ?
Secondo EFSA Sì.

- sostanze che hanno strutture chimiche e meccanismi simili (e che spesso si trovano insieme): la miscela agisce come una sola "sostanza". ogni composto contribuisce in base alla *presenza* e alla"*potenza*" (capacità di attivare il meccanismo X) (Diossine, 2018; Ftalati, 2020)

- multiresidui di pesticidi (in oltre il 20% degli alimenti vegetali in UE)
oltre 150 pesticidi possono avere effetti sulla tiroide, ma con meccanismi molto diversi (sintesi dell'ormone, trasporto, aumentato catabolismo).
Questi diversi meccanismi possono tutti confluire nell'effetto fenotipico "ipertiroidismo"
Il principio della valutazione del "cocktail" è lo stesso, ma la potenza è la soglia per l'effetto negli studi di laboratorio
(dati umani validi sui pesticidi molto limitati)

Perché gli IE ci preoccupano (VI)

Non solo laboratorio!

Un numero sempre crescente di studi mette in correlazione livelli interni di specifici IE e

- Sindrome da disgenesia testicolare. (esposizione prenatale a IE e) ridotta fertilità, maschile, aumento di malformazioni (ipospadia, criptorchidismo), aumento di tumore testicolare
- Disturbi della fertilità femminile: pubertà precoce, abortività
***sospetti*: (?) effetti sulla placenta (ridotta crescita, parto prematuro) (?) endometriosi, (?) policistosi ovarica**
- Aumentato rischio (incidenza e/o gravità) di tumore mammario
- Alterazioni e ritardi dello sviluppo neurocomportamentale
- Indicatori di ipotiroidismo

Per alcune *importanti patologie a base endocrina*,
es. diabete insulino dipendente e osteoporosi,
vi è stato un sorprendente *ritardo di attenzione*.

Perché gli IE ci preoccupano (VI)

Non solo laboratorio!

Un numero sempre crescente di studi mette in correlazione

livelli interni di specifici IE e

specifiche parologie umane con base endocrina
Soprattutto riguardo a
salute riproduttiva ed età evolutiva

Per alcune *importanti patologie a base endocrina*,
es. osteoporosi,
Patologie della prostata (neoplastiche e non)
vi è stato un sorprendente *ritardo di attenzione*.

Non solo laboratorio

Fermo restando che

Occorre una *robusta struttura epidemiologica* (biobanche madre-bambino, studi di coorte) per identificare associazioni fra esposizioni nelle prime fasi della vita ed effetti nell'adulto

Occorrono biomarcatori predittivi per valutare gli effetti sul "programming" in materiali biologici come ad es., il sangue di cordone ombelicale

E'importante considerare anche gli studi negativi (perché non c'è un'associazione? Genetica? Alimentazione? Altre esposizioni non considerate?-)

- Oramai la quantità di dati non può essere ignorata

Non solo laboratorio

IE e patologie umane

Sindrome da disgenesia testicolare (aumentato rischio di malformazioni urogenitali, infertilità maschile, tumori al testicolo per esposizione prenatale)
Infertilità maschile per esposizione in età adolescenziale/adulta

Salute riproduttiva femminile: Pubertà precoce, abortività precoce, endometriosi
effetti sulla placenta (ridotta crescita fetale, parto prematuro)
(probabilmente) policistosi ovarica
Tumore mammario (incidenza e gravità)

Ritardi e disturbi neurocomportamentali (esposizione prenatale e infantile): apprendimento, comportamento

Indicatori di ipotiroidismo

Aspetti della sindrome metabolica (v. dopo)

ADVERSE OUTCOME PATHWAYS
(*Leist et al. Arch Toxicol, 2017*)

Approccio formalizzato e basato sulla valutazione delle evidenze per connettere
un meccanismo molecolare (ad es., agonismo con ERalfa)
Attraverso una catena di eventi subcellulari e cellulari
Con un effetto avverso a livello di tessuto/organo/organismo

es. (*Lorenzetti et al., Annali ISS, 2015*)
Fase prenatale
Antagonismo con il recettore androgeno
porta a
Ridotta funzione delle cellule di Leydig
porta a
Insufficienza androgena
porta a
Ipospadia/criptorchidismo

ADVERSE OUTCOME PATHWAYS
(continua)

Fase prenatale

1) Agonismo estrogenico

porta a

2) Alti livelli di estradiolo 17 beta

porta a

3) alterata funzione delle cellule del Sertoli (ad es., alterata membrana cellulare, *Bernardino et al., 2018, Cells*)

porta a

4a) ridotta differenziazione deill'epitelio seminifero

e porta a

4b) presenza persistente di cluster di gonociti indifferenziati

che portano a

5a) ridotta fertilità

5b) carcinomi in situ con aumentato rischio di sviluppo di seminomi

ADVERSE OUTCOME PATHWAYS

Le AOP interagiscono (sviluppo di "ontologies")

La ridotta attività delle cellule del Leydig

e la alterata funzione delle cellule del Sertoli =

reciproco feed-back positivo (circolo "virtuoso")

La insufficiente androgenizzazione intratesticolare

contribuisce/aggrava

La ridotta differenziazione dell'epitelio seminifero

Pertanto le due AOP (o cluster di AOP) portano ad esiti associati nella

Sindrome da Disgenesia testicolare

(*Hua et al, 2018, Lymperi & Giwercman, 2018, Skakkebaek et al., 2015*))

E esattamente lo stesso discorso si può fare per *IL CONVITATO DI PIETRA nel panorama IE*

LA SINDROME METABOLICA

il grande assente dal dibattito sugli IE è sinora Il principale *singolo gruppo di patologie su base endocrino-metabolica*

Il diabete e l'obesità nel quadro della "sindrome metabolica"
Quali sostanze? Come identificarle?

Heindel JJ, Blumberg B, Cave M, Machtinger R, Mantovani A, Mendez MA, Nadal A, Palanza P, Panzica G, Sargis R, Vandenberg LN, Saal FV. Metabolism Disrupting Chemicals and Metabolic Disorders. Reproductive Toxicology 2017
Open Access

PUNTI CRITICI

- L'esposizione prenatale a diversi IE può essere obesogena perché modifica il bilancio energetico (bisfenolo A) e/o aumenta il tessuto adiposo (nicotina) e/o modifica la successiva risposta dell'organismo a diete ricche di grassi/ipoattività (IPA)

- la esposizione, soprattutto prenatale a IE (bisfenolo A, atrazina, IPA), può indurre *altre caratteristiche* della obesità tipica della SM = insulino-resistenza, infiammazione, che vengono anch'esse aggravate dalla dieta successiva

- la steatosi non alcolica è una manifestazione dello stesso complesso patogenetico e numerosi IE, tra quelli studiati possono esservi coinvolti (oltre al DEHP, bisfenolo A, biocidi organostannici, contaminanti persistenti)

Bersagli e meccanismi

(studio dei meccanismi = test di screening e biomarker)

- ipotalamo: risposta ai segnali della adipogenesi (leptina, insulina) e della fame/sazietà (grelina) all'ipotalamo

- bersagli critici "classicamente" IE:

asse ipotalamo-ipofisi-surreni e

asse ipotalamo-ipofisi-tiroide

A livello di regolazione tessutale

- tessuto adiposo= differenziazione (bersaglio = cellule mesenchimali staminali) e iperplasia degli adipociti: importante bersaglio molecolare il PPAR gamma

- effetto diretto sul metabolismo del glucosio attraverso le cellule beta pancreatiche – il bersaglio possono essere le cellule stesse (la cui funzione è sensibile a danno ossidativo e mitocondriale) o la secrezione di insulina (ad es. nel caso dell'*arsenico*)

- per la steatosi non-alcolico il bersaglio critico più importante è il Liver X Receptor (LXR) che regola sia l'assorbimento dei grassi sia la loro ossidazione da parte dell'epatocita.

IE E SINDROME METABOLICA

Crescono gli studi che trovano ASSOCIAZIONI nell'ESSERE UMANO

L'Arsenico inorganico (alta esposizione nell'acqua in BanglaDesh: dati umani forti sull'aumento di diabete mellito) per il suo impatto sull'insulina e è un *nuovo IE*

Altri?

Servono *marcatori e test per identificare gli effetti metabolici di IE e capirne l'importanza rispetto ad altri parametri*

(Forse basta misurare adipochine? Tassinari et al., 2021 sul modello ratto prepuberale esposto a DEHP e/o bisfenolo A)

WORK IN PROGRESS

IE E ASPETTI «CALDI»

ONE HEALTH

MICROPLASTICHE

CAMBIAMENTO CLIMATICO

IE E ONE HEALTH

Dall'Ambiente agli Animali a Noi

Il caso dei PBDE

Ritardanti di fiamma **(plastiche, tessili, apparecchiature elettroniche, soprattutto): non sono legati stabilmente alle matrici, possono essere rilasciati**

Usati dal 1970, i problemi di contaminazione già dal 1980: un accordo internazionale di limitazione nel 2004

Tutti ben lipofili,

8 congeneri più importanti per l'esposizione alimentare

BDE-28, -47, -99, -100, -153, -154, -183, -209.

Interferiscono con il metabolismo degli ormoni steroidi *e soprattutto tiroidei*

***Esposizione*: alimenti di O.A. (carne, pesce, latte, uova) e grassi (animali e vegetali)**

IE E ONE HEALTH

PBDE e l'alimento ittico (*EFSA 2011*)
il pesce è l'alimento di O.A. con maggiore presenza di PBDE,

- il contenuto di grasso del tessuto influenza direttamente la concentrazione di BDE:
le specie più contaminate hanno carni con >8% lipidi (salmone, sardina, acciuga, maccarello, anguilla..)

- Poca differenza fra pesce pescato e allevato (a *grandissime* linee: a parità di specie e pezzatura il pesce pescato ha più PBDE/g grasso, ma il pesce allevato ha più grasso)
Esposizione del pesce allevato: mangimi convenzionali derivati da piccoli organismi marini ("mimesi" del bioaccumulo ambientale.
M*antovani et al., Int J Nutr Food Sci. 2015*)

***Il fattore umano nella One Health*: il consumo di pesce, di determinati tipi di pesce nonché**
elevati livelli nei prodotti «salutistici» (olii di pesce, omega-3..)

MICROPLASTICHE E IE??

IL CAVALLO DI TROIA

TROJAN HORSE

LE MICROPLASTICHE COME VEICOLO DI IE
Ad es. attraverso gli organismi acquatici eduli

Le MP possono a fungere da veicolo nell'intestino e nell'organismo di sostanze tossiche
il "meccanismo del cavallo di Troia"
(EFSA 2016 e workshop effettuato nel 2021)
Nelle plastiche il 4% è rappresentato da additivi (tra cui sostanze ora drasticamente ridotte ma presenti nei vecchi prodotti e nelle MP ambientali: ftalati e bisfenoli, *interferenti endocrini*)

Le MP adsorbono dall'ambiente i contaminanti più tossici (come diossine, policlorobifenili -PCB, *interferenti endocrini*) (fino a 2,75 microgrammi/g, cioè quasi 3 parti per milione, di PCB in MP depositate sulle spiagge)

Il fenomeno del cavallo di Troia è dimostrato:

La domanda è QUANTO contribuisce alla nostra esposizione complessiva a contaminanti ad es. attraverso i prodotti ittici?

LE MICROPLASTICHE COME VEICOLO DI IE
Ci dobbiamo preoccupare?

Scenario (*non ulteriormente aggiornato*) di EFSA, 2016):
Una lauta ingestione di 225 g di cozze contenente 7 mcg di MP

Anche considerando *le più alte concentrazioni* di additivi, diossine o PCB segnalate nelle MP
la porzione di cozze avrebbe un piccolo effetto sull'esposizione complessiva: effetto massimo per il bisfenolo A, ove le MP nelle cozze aggiungerebbero *un 2% scarso* a quanto ne prendiamo dall'ambiente

Anche per i pesci, l'accumulo di PCB e diossine dalle carni delle prede naturali è molto più alto di quanto ne possono assorbire dalle MP (*Koelmans et al. Environ Sci Technol. 2016)*

***Tuttavia* con i metalli pesanti (ad es. piombo) le conclusioni possono essere diverse**
- Le MP li concentrano ordini di grandezza in più rispetto alle acque circostanti (*Squadrone, Environ Sci Pollut Res Int 2021)*

IE E CAMBIAMENTI CLIMATICI

Cambiamenti climatici e
gli associati/paralleli
cambiamenti ambientali

Impatti sulla salute

(v. *1st Scientific Symposium Health and Climate Change, ISS 2018 atti on-line*)

Impatti ben evidenti
- eventi estremi (siccità, incendi..)
- inquinamento atmosferico
- limitazioni nelle risorse essenziali (acqua, alimenti)

L'approccio OH **permette di valutare conseguenze sulla salute meno dirette e a carattere "non catastrofico",**
ma di impatto ad ampio raggio e a lungo termine

Ed in cui gli IE ci sono!

IE E CAMBIAMENTI CLIMATICI

- aumentato rilascio di sostanze tossiche da comparti ove sono "sequestrati" (ad es. Permafrost)
Con maggiore disponibilità per gli organismi viventi (Diossine, PCB, persino il DDT…)

-aumentata vulnerabilità delle colture alimentari ai funghi produttori di micotossine, tra cui lo Zearalanone ed i suoi metaboliti sono fra I più potenti IE con azione estrogenica

Senza dimenticare
- cambiamenti nei fattori abiotici (luce , temperatura) e biotici (microbioma vegetale) che modulano, ad esempio, il tipo, quantità e persistenza dei residui di pesticidi negli alimenti e nell'ambiente

(Andrea Zanzotto 1921-2011)

In questo progresso scorsoio
non so se vengo ingoiato
o se ingoio

CHIUDIAMO CON UNA BUONA NOTIZIA E UNA CATTIVA

gli IE sono una PRIORITA' per i programmi europei sulla sicurezza alimentare (PESTICIDI) e per la regolamentazione delle sostanze chimiche (REACH)

Vanno incontro a divieto o drastiche limitazioni d'uso

Ed è in programma l'armonizzazione fra i diversi ambiti in modo tale che tutte le sostanze vengano valutate con gli stessi criteri (dai mangimi ai cosmetici..)

La CATTIVA notizia è che

a) ci vorrà tempo

b) la UE è di gran lunga la parte più avanzata in un mondo globalizzato (anche se crescente interesse da Cina, Brasile, Africa)

c) le sostanze vietate possono persistere nell'ambiente (PCB, PFAS..)

DUE RIFERIMENTI

Mantovani A & Fucic A (eds) "*Challenges in Endocrine Disruptor Toxicology and Risk Assessment*" 2020, Royal Society of Chemistry, London (21 Chapters, pp. 518)

Solecki R, Bergman Å, Boobis A, Chahoud I, Degen G, Dietrich D, Greim H, Håkansson H, Hass U, Hu T, Jacobs M, Jobling S, Mantovani A, Marx-Stoelting P, Piersma A, Slama R, Stahlmann R, van den Berg M, Zoeller RT, Kortenkamp A. (2017) *Scientific principles for the identification of endocrine disrupting chemicals - a consensus statement*. Arch Toxicol 91: 1001-5.

GRAZIE PER L'ATTENZIONE!

Spero vi abbia interessato, arrivederci!