

## Interferenti endocrini dalla ricerca alla sanità pubblica

### *Endocrine disruptors: from research to public health practice*

Alberto Mantovani, Francesca Baldi

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

#### Riassunto

**Gli Interferenti Endocrini (IE) sono un vasto ed eterogeneo gruppo di sostanze, naturali e di sintesi, accomunate dalla capacità di alterare la funzionalità del sistema endocrino causando effetti avversi sulla salute di un organismo, oppure della sua progenie o di una (sotto)popolazione particolarmente vulnerabile. La salute riproduttiva, lo sviluppo prenatale ed infantile sono le fasi più suscettibili. Gli effetti specifici degli IE sono strettamente associati ai rispettivi meccanismi, ad esempio agonismo o antagonismo di recettori nucleari. Gli IE possono essere divisi in quattro grandi gruppi: contaminanti persistenti in grado di bioaccumulare in organismi animali e vegetali; pesticidi, biocidi e sostanze utilizzate in zootecnia; sostanze industriali largamente diffuse in prodotti di consumo come il bisfenolo A e gli ftalati, meno potenti dei contaminanti persistenti e pesticidi ma che danno luogo ad una esposizione diffusa e non sono ancora oggetto di piani di controllo consolidati; sostanze naturali come la micotossina zearalenone o componenti bioattive presenti nella dieta come i fitoestrogeni. Per molte patologie multifat-**

#### Summary

**An Endocrine Disrupter (ED) is an exogenous substance or a mixture, that alters function(s) of the endocrine system, causing adverse health effects in an intact organism, or its progeny, or particularly vulnerable (sub)populations. Reproductive health, prenatal and infant development are the most susceptible stages. EDs specific effects are closely associated with the respective mode of action, which can be very different e.g., nuclear receptor agonism or antagonism. EDs can be divided into four main groups: persistent pollutants that can bioaccumulate in animals and plants; pesticides, biocides and compounds used in animal husbandry; industrial chemicals widely used in consumer products such as bisphenol A and phthalates, less potent than persistent pollutants and pesticides, but with a more widespread exposure and still not adequately regulated; substances naturally occurring in diet such as the mycotoxin zearalenone or bioactive food components such as phytoestrogens. For many multifactorial endocrine-related diseases EDs should be considered as preventable risk factors; main**

Received/Pervenuto 2.7.2012 - Accepted/Accettato 10.10.2012

Address/Indirizzo: Alberto Mantovani, Reparto di Tossicologia Alimentare e Veterinaria, Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Istituto Superiore di Sanità, Roma, Italia - E-mail: alberto.mantovani@iss.it

Il lavoro è stato effettuato nell'ambito dei seguenti progetti: PREVIENI (<http://www.iss.it/prvn>) finanziato e promosso dal Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare ; "Interferenti Endocrini", progetto speciale dell'Istituto Superiore di Sanità (<http://www.iss.it/inte>)

toriali a base endocrina gli IE vanno visti come fattori di rischio prevenibili, tra gli esempi principali i disturbi della fertilità e la predisposizione alla sindrome metabolica e ad alcuni tipi di tumore. La ricerca indipendente è indispensabile per integrare ed aggiornare la valutazione del rischio attraverso la comprensione dei meccanismi, lo sviluppo di possibili biomarcatori per gli studi di popolazione nonché la identificazione di priorità ed obiettivi necessari per la gestione e comunicazione del rischio. *Eur. J. Oncol.*, 17 (4), 161-173, 2012

**Parole chiave:** sindrome metabolica, fertilità, sicurezza alimentare, infanzia, sviluppo

### **Interferenti endocrini: aspetti generali**

Gli interferenti endocrini (IE) sono un vasto ed eterogeneo gruppo di sostanze, naturali e di sintesi, accomunate dalla capacità di alterare la funzionalità del sistema endocrino causando effetti avversi sulla salute di un organismo, oppure della sua progenie o di una (sotto)popolazione particolarmente vulnerabile (1-4).

Le evidenze scientifiche mostrano che gli effetti degli IE sono fortemente modulati dalla fase del ciclo vitale: la salute riproduttiva, lo sviluppo prenatale ed infantile sono le fasi più suscettibili. Un aspetto caratteristico è la capacità di alterare lo sviluppo di tessuti e sistemi modulati da specifici meccanismi endocrini, senza necessariamente indurre tossicità diretta (ad es., un effetto teratogeno), ma riducendone a lungo termine, ed in maniera potenzialmente persistente, la funzionalità. Dati consolidati provenienti da numerosi studi di tossicologia sperimentale e da un numero crescente di studi epidemiologici, documentano alterazioni dello sviluppo riproduttivo e neuro-comportamentale; di crescente interesse sono gli studi sullo sviluppo immunitario, metabolico, sulla crescita e composizione corporea, nonché sulla maggiore predisposizione alle patologie tumorali. Importanti sono anche le associazioni con patologie di interesse pediatrico (pubertà precoce), riproduttivo (infertilità, abortività, endometriosi), e con il diabete di tipo 2 (2, 5-8).

examples are fertility disorders as well as predisposition to metabolic syndrome and some types of cancer. Independent research is essential to integrate and update risk assessment based on the mode of action understanding, the development of possible biomarkers for population studies as well as priorities and targets for risk management and communication. *Eur. J. Oncol.*, 17 (4), 161-173, 2012

**Key words:** metabolic syndrome, fertility, food safety, childhood, development

Naturalmente, gli effetti degli specifici IE sono strettamente associati ai rispettivi meccanismi di azione, che possono essere molto diversi. I vari IE sono in grado di:

- *mimare* (anche solo parzialmente) gli ormoni quali ad esempio gli estrogeni, gli androgeni e gli ormoni tiroidei, producendo una sovrastimolazione. Classico esempio è la micotossina zearalenone, un potente agonista estrogenico (9);

- *legarsi* ad un recettore nucleare o interferire con la cascata di eventi subito a valle dell'interazione ormone-recettore. In questo caso l'IE si comporta da antagonista, impedendo al segnale "normale" di verificarsi correttamente. Tipico esempio sono i fungicidi dicarbosimidi (vinclozolina, procimidone) antagonisti del recettore androgeno (10);

- *interferire* o *bloccare* il modo in cui gli ormoni naturali sono costituiti o controllati; tipici esempi sono altri gruppi di pesticidi, come i triazoli, inibitori dell'aromatasi e quindi della sintesi di estradiolo 17-beta (11) e l'etilene tiourea, metabolita dei fungicidi etilene bisditiocarbammati, che inibisce la sintesi degli ormoni tiroidei (12). In questo ambito un gruppo particolare di meccanismi sono quelli associati alla regolazione ipotalamico-ipofisaria della rete endocrina (13). Con un pragmatico approccio agli aspetti di valutazione del rischio, gli IE possono, essere divisi in quattro grandi gruppi (2):

1. Contaminanti persistenti quali policlorobifenili (PCB), diossine, insetticidi organo clorurati (es., DDT) ma anche alcuni elementi in traccia (cadmio, arsenico). Si tratta di contaminanti in grado di bioaccumulare in organismi animali e vegetali; pertanto, composti vietati da decenni nei paesi industrializzati come DDT e PCB rappresentano un “lascito” ancora attuale.

2. Pesticidi, biocidi e sostanze utilizzate in zootecnia quali dicarbossimidi, triazoli, etilene bisditiocarbamati, organo stannici: si tratta in generale di sostanze molto attive e con sostanziale potenziale di esposizione alimentare ed ambientale. Tuttavia, il problema “pesticidi” è ben presente alle autorità regolatorie ed all’opinione, e certamente non solo per i problemi di interferenza endocrina. Pertanto, sui pesticidi esistono consolidati piani di sorveglianza dei residui negli alimenti e programmi per la sostituzione di principi attivi particolarmente preoccupanti.

3. Sostanze industriali diffuse in prodotti di consumo: esempi di attualità sono alcuni additivi delle plastiche come il bisfenolo A (BPA), gli ftalati, gli alchilfenoli, sottoprodotti dei detergenti polietossilati. In genere, si tratta di sostanze meno potenti dei contaminanti persistenti e pesticidi, ma che danno luogo ad una esposizione diffusa e non sono ancora oggetto di piani di controllo di alimenti e ambiente, nonostante alcuni gruppi siano in grado di bioaccumulare nelle catene trofiche (ad es., i ritardanti di fiamma bromurati, i composti iperfluorati). Questi IE sono generalmente composti ad alto volume di produzione e molti sono considerati prioritari nel programma di revisione delle sostanze utilizzate in Europa REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemical substances) (14).

4. Sostanze naturali. Alcune, come la micotossina zearalenone (15), sono del tutto indesiderabili. Altre, invece sono componenti bioattive presenti nella dieta, quali, ad esempio, i cosiddetti fitoestrogeni (ad es., genisteina della soia) ed addirittura nutrienti essenziali come lo iodio. Per considerare queste sostanze dagli effetti complessi e spesso benefici per la salute, la *Authority* Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA) utilizza il termine di “sostanze con attività endocrina” (9): effetti avversi si possono verificare per assunzioni eccessive (ad es., di “integra-

tori”) e/o in gruppi particolarmente vulnerabili. A titolo di esempio, l’Europa ha ridotto l’uso di additivi a base di iodio nei mangimi allo scopo di minimizzare il rischio di un’assunzione eccessiva attraverso latte e uova (16). Pertanto, per questo gruppo di IE è soprattutto opportuno valutare anche il rischio-beneficio.

In sintesi, la molteplicità di bersagli, il rischio di effetti a lungo termine, e non immediatamente visibili, sullo sviluppo pre- e post-natale e la esposizione diffusa sono motivo di crescente preoccupazione nei confronti degli IE.

Nelle sezioni successive ci occuperemo di alcuni argomenti di maggior rilievo, aspetti emergenti che *quantificano* e *qualificano* la esposizione a IE, gli effetti a loro collegati, la valutazione e comunicazione del rischio a loro connessa.

### **Interferenti endocrini ed infertilità maschile: nuove evidenze**

Il sistema riproduttivo è il bersaglio principale della maggior parte degli IE, in particolare di quelli che alterano il bilancio estrogeni-androgeni. L’associazione fra esposizione prenatale a IE e *sindrome da disgenesia testicolare* resta una delle prime e principali ipotesi riguardo agli effetti di IE sulla salute. Secondo tale ipotesi gli IE sono fattori di rischio precoci per l’incremento di disturbi della riproduzione maschile (oligospermia, cancro al testicolo) osservati in tanti paesi industrializzati: l’esposizione *in utero* a fattori che inducono iperestrogenizzazione e ipoandrogenizzazione altererebbe lo sviluppo funzionale del testicolo. Non è certo facile indagare un’associazione fra un’esposizione *in utero* ed effetti che si manifestano dopo l’adolescenza e richiede, ad es., l’utilizzo di banche biologiche: questa associazione è stata studiata essenzialmente per gli elevati livelli di esposizione a IE persistenti (ad es., PCB, diossine, pesticidi organoclorurati), sostenendo positive correlazioni solo fra alcuni insetticidi organo clorurati ed il rischio di seminoma (17). Tuttavia, concentrarsi su specifici composti, senza opportuni approcci per valutare l’effetto miscela può essere molto riduttivo: questo è tanto più vero in quanto l’esposizione agli IE clorurati persistenti avviene in massima parte attraverso

so matrici comuni (soprattutto alimenti di origine animale con elevato contenuto lipidico: latticini, carne suina, pesci grassi) e gli stessi composti sono presenti nel tessuto adiposo come miscela. Uno studio spagnolo, utilizzando una biobanca materno-infantile, ha osservato una correlazione significativa con il rischio di ipospadia sia per specifici organi clorurati sia per l'effetto miscela: l'incremento di ipospadia in una popolazione viene considerato un segnale precoce del rischio, su scala molto più ampia, di sindrome da disgenesia testicolare (18). La conoscenza dei meccanismi di azione è importante per valutare il rischio delle miscele di IE persistenti. I PCB sono complessivamente i più importanti fra i contaminanti clorurati persistenti: si tratta di ben 209 congeneri, la cui persistenza ambientale e tossicità sono modulati da variazioni, apparentemente modeste, nella struttura chimica. Un recente studio su un modello *in vitro* di cellule fetali di corpo cavernoso umano ha mostrato che i principali PCB possono essere divisi in tre gruppi sulla base dei meccanismi, e che ciascun gruppo altera l'espressione di specifici geni, importanti per lo sviluppo riproduttivo (19). Interessanti studi di tossicologia sperimentale richiamano l'attenzione sull'esposizione precoce a IE non persistenti e tuttora utilizzati; ad esempio, nei ratti esposti *in utero* a dibutil ftalato (DBP, un plasticizzante che interferisce con l'omeostasi androgena) si osservano alterazioni dello sviluppo delle cellule germinali pienamente riportabili alla sindrome umana (20).

Una delle componenti di maggior rilievo della sindrome da disgenesia testicolare è l'aumentata predisposizione a tumore del testicolo: gli IE non rientrano fra le classiche sostanze cancerogene con azione genotossica, tuttavia la capacità di alcuni composti di interagire con i recettori nucleari ha posto l'attenzione sui potenziali effetti epigenetici di composti quali BPA ed alcuni ftalati (21). Pertanto l'effetto degli IE andrebbe considerato come un effetto di promozione tumorale associato ad un alterato *programming* di tessuti bersaglio nella fase dell'istogenesi. In particolare, per quanto concerne l'aumentato rischio di seminoma, la vera cellula bersaglio è la cellula del Sertoli, responsabile della regolazione dello sviluppo dell'epitelio seminifero; la cellula del Sertoli fetale è differenziata funzional-

mente a partire dalla 13<sup>a</sup> settimana di gravidanza, il numero delle cellule aumenta stabilmente per tutta la gravidanza e nella prima infanzia e vede un ultimo picco, nonché la finale differenziazione funzionale, attorno alla pubertà (22).

Un altro filone di ricerca indaga l'esposizione corrente a IE in relazione all'infertilità nel maschio adulto. Numerosi studi hanno indagato soprattutto l'associazione con elevati livelli di esposizione a IE persistenti. Il principale studio Europeo (INUENDO) su quattro coorti (tre europee e una di Inuit groenlandesi, consumatori estremi ed abituali di alimenti grassi di origine animale) ha utilizzato anche un biomarcatore per valutare l'interazione complessiva su recettori bersaglio: si sono osservate correlazioni significative essenzialmente solo con la ridotta integrità del DNA spermatico (23-25). Si tratta di un marcatore importante, ma certamente INUENDO non ha confermato l'ipotesi di una forte associazione fra IE clorurati persistenti ed infertilità, almeno per quanto riguarda l'esposizione nell'adulto. E' tuttavia interessante l'associazione con il danno alla qualità ed integrità del DNA spermatico: un analogo effetto è stato osservato in topi esposti *in utero* a lindano, un altro insetticida clorurato diffusamente utilizzato sino agli anni '80 (26); è interessante rilevare che il lindano è uno dei pochi IE di sintesi che interagiscono solo con il recettore estrogeno (ER) beta, non con ER alfa considerato il bersaglio principale degli IE estrogenici (27).

Analogamente a quanto menzionato per la sindrome da disgenesia testicolare, studi più recenti puntano l'attenzione verso IE meno persistenti, ma tuttora largamente utilizzati nelle filiere produttive di alimenti e prodotti di consumo. Si tratterebbe, quindi, non di un problema di bioaccumulo, ma di un'esposizione costante, ripetuta e prolungata (28). Riportiamo alcuni dati recenti di studi di monitoraggio biologico. Alti livelli urinari di BPA, additivo delle plastiche in policarbonato e considerato un IE ad azione simil-estrogenica, sono associati a significativi effetti avversi sulla qualità del seme maschile. L'effetto principalmente osservato, in uno studio effettuato su pazienti in cura per infertilità, era sulla concentrazione dello sperma (29). Ad ogni modo, nella popolazione generale non è stata riscontrata una netta correlazione fra livelli di BPA ed effetti avversi sul DNA spermatico (30). Nello

stesso gruppo di pazienti di infertili (29) sono stati indagati anche gli effetti dell'esposizione a parabeni: si tratta di conservanti utilizzati nei cosmetici, farmaci, alimenti e bevande, e per alcuni dei quali è sospettata un'azione estrogenica. Benché i livelli urinari di parabeni mostrino un'esposizione diffusa, non è stata riscontrata alcuna associazione con la qualità dello sperma. Per contro, il butil paraben è risultato positivamente associato a danni al DNA spermatico, con un ulteriore possibile effetto additivo con i livelli di BPA (31). Alcuni ftalati (ad es., il dietil esil ftalato, DEHP, ed il DBP, già citato) hanno effetti complessi sull'equilibrio degli steroidi, mediati dall'interazione con diversi recettori nucleari (recettori della proliferazione perossisomale-PPAR, recettore costitutivo dell'androstano-CAR ed il recettore del pregnano X-PXR) (32-34). L'uso degli ftalati nelle plastiche in cloruro di polivinile (PVC), in corso di limitazione nei paesi industrializzati, può rimanere importante in paesi in corso di industrializzazione, con minori vincoli rispetto - ad es. - all'Unione Europea. Uno studio su soggetti della popolazione generale in India ha rilevato una significativa correlazione fra ridotta motilità dello sperma e livelli, nello sperma stesso, di DEHP e DBP; l'effetto è stato confermato anche da studi *in vitro* (35). Tuttavia il problema dell'esposizione a ftalati è tuttora attuale anche in Europa: un recente studio italiano ha osservato livelli urinari maggiori di ftalati in coppie infertili rispetto a coppie fertili con analoghe caratteristiche (36). Ricordiamo che gli studi indicati riguardano esposizioni in atto in maschi adulti. Per contro, la gran parte delle evidenze sperimentali indica che l'esposizione dell'organismo in via di sviluppo (vita intrauterina o prima infanzia) può avere effetti più marcati e persistenti. Pertanto, gli effetti osservati dagli studi citati non sono stati osservati nella popolazione ritenuta più vulnerabile.

Complessivamente, le evidenze scientifiche disponibili indicano la necessità di studi di monitoraggio biologico sugli IE che considerino le sostanze tuttora diffusamente utilizzate (37). Una valutazione degli effetti sulla fertilità dovrà dare attenzione anche a biomarcatori potenzialmente indicativi di effetti a lungo termine (ad es., il danno al DNA spermatico), nonché ad eventuali effetti additivi fra IE con meccanismi simili.

## IE e sindrome metabolica

La sindrome metabolica (obesità, ipertensione, diabete di tipo 2) è una delle grandi cause di morbidità e mortalità nei paesi industrializzati, con un'incidenza crescente nei Paesi in via di Sviluppo che hanno superato i problemi di penuria alimentare (38): la sindrome metabolica, e gli associati squilibri dell'omeostasi immuno-endocrina, sono anche correlati ad un aumentato rischio di specifici tumori (39; 40). Al di là del ruolo cruciale dell'alimentazione e della ricerca di possibili fattori individuali di predisposizione genetica, è estremamente importante identificare specifici fattori di rischio ambientali prevenibili. Pertanto, la possibilità che l'esposizione a IE possa modulare il metabolismo e la composizione corporea desta sempre più interesse. Un dato di particolare interesse sulla interazione fra IE e stili alimentari è lo studio di Lim (41) che ha mostrato come un prolungato dimagrimento (ad es., in persone in sovrappeso che si sottopongono a diete o trattamenti) mette in circolo gli IE depositati nel tessuto adiposo (PCB e insetticidi clorurati: trans-nonaclor, p'p'DDE -metabolita del DDT- e beta-esaclorocicloesano -HCH).

I possibili meccanismi con cui gli IE possono aumentare il rischio di obesità sono le interazioni con l'omeostasi tiroidea e steroidea nonché con i recettori nucleari PPAR, importanti per la regolazione del metabolismo energetico e della differenziazione degli adipociti (34). Nello studio presentato da Mendez (42) è stata seguita una coorte di oltre 600 donne spagnole a partire dall'inizio della gravidanza. Gli elevati livelli sierici materni di DDE erano correlati con una più rapida crescita neonatale e con un elevato *body mass index* (BMI) al 14° mese di età (termine dello studio); altri contaminanti persistenti (esaclorobenzene, PCB, beta-HCH) non hanno mostrato correlazioni significative. Un dato interessante è che l'effetto del DDE era osservabile nei figli di donne di peso normale, ma non di donne in sovrappeso.

Anche uno studio statunitense (43), scaturito dai dati della coorte NHANES (National Health and Nutrition Examination Survey), ha trovato alcune correlazioni positive fra parametri associati all'obesità e contaminanti clorurati persistenti, in particolare fra livelli di p'p'DDT e ossicloridano e circonferenza addominale. Uno studio belga (44) suggerisce che gli IE

possano avere effetti diversi: il beta-HCH (considerato un IE estrogenico) ha una correlazione positiva con il BMI, mentre i PCB (soprattutto i congeneri persistenti come il 180) mostrano una correlazione negativa. Questi studi sono stati effettuati su soggetti adulti; tuttavia, la fase neonatale è importante per determinare il carico corporeo di contaminanti persistenti nella vita adulta, pertanto, i dati potrebbero riflettere indirettamente anche un effetto sullo sviluppo.

Purtroppo questi studi epidemiologici su IE e BMI riguardano in massima parte i tradizionali composti clorurati persistenti; per contro, diversi studi sperimentali identificano effetti sullo sviluppo metabolico di altri IE tuttora ampiamente utilizzati e diffusi negli alimenti e nell'ambiente. L'esposizione di topi durante la gravidanza e l'allattamento a BPA induce un maggiore peso corporeo allo svezzamento, ma non nella vita adulta: l'effetto non si accompagna ad una maggiore suscettibilità ad una dieta ricca di grassi (45). Di particolare interesse sono i limitati dati disponibili sugli ftalati, in quanto modulatori dei PPAR (46). Uno studio pilota condotto negli USA ha rilevato una correlazione positiva fra esposizione a ftalati e BMI negli uomini adulti e nelle ragazze adolescenti (34): pur con tutte le limitazioni degli studi osservazionali trasversali, si tratta certamente di un dato meritevole di ulteriore indagine. Il fegato è fondamentale per il metabolismo di ormoni, sostanze bioattive e xenobiotici, ed è ricco di recettori nucleari; tuttavia gli effetti di IE sullo sviluppo funzionale epatico, hanno ricevuto una ridotta attenzione. L'esposizione *in utero* di topi CD-1 al plasticizzante DEHP influenza in maniera persistente il metabolismo epatico di glucidi e lipidi, in particolare con una marcata riduzione dell'accumulo epatico di glicogeno (46). Pertanto è auspicabile che nuovi studi epidemiologici considerino anche l'esposizione agli IE indicati come potenziali obesogeni dai recenti dati tossicologici.

Il diabete di tipo 2 è la principale singola patologia endocrina nei Paesi industrializzati, nonché componente della sindrome metabolica. Tuttavia, le evidenze di un'associazione fra IE e patogenesi del diabete sono ancora limitate: gli studi di tossicologia sperimentale possono fornire un notevole contributo, sia sostenendo la plausibilità biologica di ipotesi epidemiologiche, sia identificando nuovi IE potenzialmente coinvolti.

Notevole interesse ha destato la possibile associazione, osservata ad esempio in Bangla-Desh, fra elevata esposizione ad arsenico (iAs) inorganico e diabete di tipo 2 (47). Studi sperimentali hanno mostrato che lo iAs è in grado di inibire la produzione e secrezione dell'insulina e la tolleranza al glucosio, nonché di modulare l'attività del recettore nucleare per i glucocorticoidi, mostrando un'azione stimolatoria a basse dosi ed inibitoria a dosi elevate; inoltre, può alterare la reciproca interazione (*cross-talk*) fra i recettori nucleari (48, 49). Le evidenze di un'associazione diretta fra esposizione ad iAs e diabete presentano numerose incertezze (50); tuttavia, un recente studio sperimentale su basse dosi di iAs nel ratto mostra – anche nel caso dell'omeostasi del glucosio – l'importanza degli effetti a lungo termine sullo sviluppo (51). Un altro metallo di potenziale interesse è il cromo trivalente (CrIII); al contrario del Cr esavalente, riconosciuto come contaminante cancerogeno, il CrIII è considerato un composto bioattivo, con effetti sul metabolismo del glucosio, sui livelli di insulina e sull'omeostasi delle adipochine, la cui valutazione rischio-beneficio è ancora incerta (52). Anche il BPA, induce iperinsulinemia ed interferisce con l'attività delle cellule pancreatiche beta nel topo, sebbene ulteriori dati siano necessari per studiare la possibile associazione (53). Alcuni dati mostrano come alcuni insetticidi organofosfati, come il diazinon o il clorpirifos, siano in grado di causare iperinsulinemia ed elevata risposta a stimoli gluconeogenetici *in vivo* (54). Inoltre la tossicità di questi composti è aumentata nei roditori con diabete indotto farmacologicamente (55). Gli organofosforici sono composti neurotossici, inibitori dell'acetilcolinesterasi cerebrale, e non sono generalmente considerati IE. Tuttavia, nel topo l'esposizione prenatale a dosi “non tossiche” di clorpirifos altera nell'adulto i livelli di neuropeptidi (ossitocina, vasopressina) e ormoni tiroidei, due effetti potenzialmente correlati alla crescita e composizione corporea (56, 57). Questi studi mostrano anche come alcuni composti possano agire come IE quando l'esposizione avviene in fasi vulnerabili del ciclo vitale. I dati tossicologici, ancorché insufficienti per una valutazione del rischio, indicano come l'esposizione a IE dovrebbe essere meglio esplorata anche in studi epidemiologici come fattore di rischio per il diabete.

## Dalla ricerca all'intervento in sanità pubblica: la "prevenzione traslazionale"

Nelle sezioni precedenti abbiamo cercato di delineare alcuni aspetti della ricerca sugli IE che ci sembrano buoni esempi delle esigenze di tradurre l'indagine su effetti e meccanismi in strumenti per la valutazione e gestione del rischio, secondo un approccio di "prevenzione traslazionale". Passeremo ora in rassegna alcuni aspetti in cui l'interazione fra innovazione ed analisi del rischio risulta particolarmente evidente.

### L'identificazione di interferenti endocrini: test e bersagli

Per valutare e gestire il rischio da IE è indispensabile identificare quelle molecole che possono avere effetti endocrini "specifici", cioè non secondari ad altri effetti. Pertanto, è di importanza critica valutare la capacità degli attuali test tossicologici *in vitro* ed *in vivo* di identificare gli IE, nonché le priorità per l'eventualità dello sviluppo di nuovi saggi. È raccomandato lo sviluppo di batterie di test *in vitro* non solo e non tanto per motivi etici, quanto per una più efficiente protezione del pubblico, permettendo la caratterizzazione in tempi più brevi di sostanze a rischio, nonché dei loro meccanismi di azione (58).

La tossicità riproduttiva è tuttora riconosciuta come la branca precipuamente attinente agli IE; con i suoi numerosi bersagli e meccanismi di azione, è un'area complessa, ricca di sfide scientifiche nonché prioritaria per l'attuazione del Regolamento Europeo REACH. Aspetti cruciali sono lo sviluppo di nuove strategie sperimentali che sfruttino le conoscenze prodotte dalla biologia molecolare e cellulare e l'uso delle conoscenze sui meccanismi di tossicità. Un passo in avanti è stato compiuto dal progetto europeo ReProTect (concluso nel 2009), che ha sviluppato un insieme di saggi *in vitro* per studiare le diverse fasi del ciclo riproduttivo, dai gameti maschili e femminili alla placenta, che potranno essere successivamente integrati in una batteria di test (59). Gli attuali test, tuttavia, non coprono tutti i bersagli e i meccanismi: vi sono infatti aree importanti di patologie umane correlate ad alterazioni endocrine che non sono adeguatamente considerate in tossicologia. Ad esempio, la funzionalità

della prostata è essenziale per la fertilità maschile; sinora, però, la identificazione di effetti sulla prostata è stata piuttosto trascurata nello sviluppo di test di tossicità sugli IE, nonostante la fisiopatologia della ghiandola sia essenzialmente regolata dal recettore androgeno. Sempre nell'ambito di ReProTect, l'Istituto Superiore di Sanità ha messo a punto un test *in vitro* che utilizza la linea cellulare umana di epitelio della prostata LNCaP per l'identificazione di molecole che agiscono sulla funzionalità prostatica; il test trasferisce alla tossicologia un consolidato biomarcatore clinico, la secrezione di PSA (Antigene Prostatico Specifico). Nell'uomo la secrezione di PSA è direttamente regolata dal recettore androgeno, ed è alterata in caso di iperplasia benigna ed adenocarcinoma. Il test è attualmente in grado di discriminare: a) sostanze senza effetto specifico che alterano la secrezione della PSA solo a concentrazioni citotossiche, b) sostanze androgeno-simili che aumentano marcatamente la secrezione (lo steroide anabolizzante metil-testosterone, l'erbicida glufosinato ammonio), c) antiandrogeni (es., i pesticidi linuron e vinclozolin) che sono anch'essi capaci di incrementare debolmente la secrezione di PSA, ma con una potenza molto minore rispetto agli androgeni e fra loro comparabile, ed infine d) il BPA (legante i recettori degli estrogeni), che diminuisce la secrezione in assenza di citotossicità (60). Nel caso di questo nuovo test, si è quindi trasferito un marcatore clinico "a monte", cioè ai test tossicologici preclinici.

L'apporto dei test *in vitro* è di fondamentale importanza per lo sviluppo di un nuovo concetto di tossicologia basato sulla comprensione dei meccanismi e non più solo sulla descrizione degli effetti. Tuttavia, al momento, gli studi *in vivo* continuano ad essere necessari sia per la caratterizzazione degli effetti sul sistema endocrino a livello dell'organismo, sia per valutare la capacità dell'organismo stesso di metabolizzare le sostanze e/o di compensarne gli effetti. Pur con tutti i limiti dei modelli animali, che presentano differenze fisiologiche significative rispetto all'essere umano, gli studi *in vivo* presentano il vantaggio considerevole di eliminare i possibili co-fattori e fattori confondenti presenti negli studi epidemiologici. Un approccio di grande interesse è l'integrazione fra test *in vivo* e modelli *in vitro* per studiare l'associazione effetti/meccanismi (27, 46).

## ***Biomarcatori e biomonitoraggio***

Lo sviluppo di biomarcatori è fondamentale per la messa a punto di strategie di prevenzione traslazionale; esso prevede la capitalizzazione delle nuove conoscenze sulla “omica” e la biologia dei sistemi per mettere a punto tecnologie e strumenti utilizzabili per la sorveglianza sanitaria ed in grado di fornire segnali precoci della necessità di interventi di prevenzione. L’uso di biomarcatori avrà in futuro un ruolo sempre più importante in campo epidemiologico e negli studi condotti volti a definire i valori limite di soglia ed i rapporti esposizione/effetto nell’uomo (61): una rassegna critica dell’uso dei dati di tossicologia sperimentale per caratterizzare possibili biomarcatori di pesticidi con effetti endocrini è fornita da Mantovani *et al.* (62). Il cadmio, di cui è stata riconosciuta l’attività estrogenica in anni recenti, può essere un esempio di applicazione di evidenze sperimentali, nuove e consolidate, all’identificazione di possibili biomarcatori di effetto: gli studi sui meccanismi di tossicità *in vitro* e *in vivo* evidenziano due potenziali gruppi di biomarcatori di effetto negli indici di stress ossidativi e nei marker associati a ERalfa (63). Il progetto PREVIENI, conclusosi nel dicembre 2011, è un primo esempio di progetto nazionale incentrato sull’uso di biomarcatori di esposizione ed effetto per la valutazione dell’impatto di IE sulla fertilità; lo studio è stato promosso e finanziato dal Ministero per l’Ambiente, la tutela del territorio e del mare e coordinato dall’Istituto Superiore di Sanità (64).

Il progetto ha avuto come obiettivo la valutazione della esposizione agli IE “emergenti”, quali PFOS/PFOA, BPA, DEHP, diffusi nell’ambiente ma oggetto di studi sparsi e non coordinati e tuttora non oggetto di programmi di sorveglianza.

I primi risultati di PREVIENI riguardano l’esposizione a composti perfluorati (PFOS, PFOA). Si tratta di IE tuttora diffusi in prodotti di largo consumo, persistenti e capaci di bioaccumulo, anche se non lipofili. Il consumo di pesce è il principale veicolo di esposizione. I perfluorati sono in grado di alterare le funzioni della tiroide e il metabolismo di steroidi, correlati con problemi di fertilità (65) ma con effetti/meccanismi ancora non del tutto chiari (66).

In uno studio nell’ambito di PREVIENI, PFOS e PFOA sono stati determinati in 53 coppie affette da

infertilità, reclutati in un’area metropolitana, escludendo la infertilità da cause note non associabili a fattori endocrini. I soggetti infertili avevano maggiori livelli di PFOS, ma non di PFOA, rispetto ad un campione di coppie fertili: la distribuzione dei livelli sierici di PFOS era tipicamente irregolare, con “picchi” superiori di oltre 20 volte il limite analitico (0,5 ng/g) nel 40% dei soggetti ed altri soggetti con livelli non misurabili. Oltre a più alti livelli di PFOS, i soggetti infertili avevano livelli di espressione più alti di diversi recettori nucleari (androgeno, estrogeni, pregnano-X) nelle cellule mononucleate del sangue periferico. L’analisi dei dati prosegue indagando la possibile correlazione di PFOS con specifici disordini riproduttivi (67).

## ***Interferenti endocrini e nutrienti; il data base EDID dell’Istituto Superiore di Sanità***

La dieta è sia un’importante fonte di esposizione a contaminanti come gli IE, sia un determinante critico della suscettibilità dell’organismo a xenobiotici, attraverso l’apporto (corretto, squilibrato o carente) di nutrienti e sostanze bioattive “naturali”. Tuttavia, le conoscenze sulle interazioni fra xenobiotici e sostanze “naturali” presenti negli alimenti sono limitate, nonostante il rilievo che questo argomento può avere nell’ambito più generale della sicurezza alimentare e della prevenzione. Il database EDID (*Endocrine disrupting chemicals - Diet Interactions Database*) è accessibile dalla home page dell’area tematica ISS dedicata agli IE. EDID intende fornire un contributo per stimolare la ricerca in questo settore: una banca dati sugli studi presenti nella letteratura internazionale e riguardanti sia sistemi sperimentali sia popolazioni animali o l’essere umano, di facile consultazione ed aggiornata periodicamente. Soprattutto, le informazioni scientifiche contenute in EDID possono contribuire alla valutazione integrata dei prodotti alimentari, considerando sia i rischi sia i benefici della modulazione endocrina (68). Il database mostra che l’importanza della valutazione degli alimenti *in toto* non risiede solo nell’identificare possibili fonti di esposizione: l’apporto di alcuni nutrienti può essere importante per modulare la suscettibilità agli IE. Di seguito alcuni esempi di interazioni fra IE e nutrienti. Diversi IE, quali PCB, diossine e cadmio, inducono - con meccanismi diversi - un

aumento dello stress ossidativo, che può essere ridotto da vitamine (A, E, C), elementi in traccia (Selenio) e/o sostanze bioattive antiossidanti (69, 70). I fitoestrogeni, in quanto “sostanze naturali” sono stati talora ritenuti antagonisti - quindi fattori protettivi - nei confronti degli IE di origine antropica: in realtà, gli studi sperimentali mostrano una situazione non lineare, con interazioni complesse che potrebbero dar luogo anche ad effetti avversi additivi (71). Infine, l’aspetto forse più interessante è che alcuni IE possono interferire, direttamente o indirettamente, con vie metaboliche di specifici nutrienti, agendo pertanto come fattori anti-nutrizionali: esempi sono le interferenze di IE tireostatici (ad es., percloroetilene o pesticidi come gli etilene bisditiocarbammati) e lo iodio (72), oppure di ritardanti di fiamma bromurati (polibromo difenil eteri -PBDE) con il metabolismo della vitamina A (73). La caratterizzazione del rischio-beneficio associato ad alimenti ricchi di contaminanti e/o nutrienti (74), è importante per sviluppare possibili strategie di prevenzione/riduzione del rischio soprattutto in popolazioni con elevata esposizione.

### ***Gestione e riduzione del rischio***

Si tratta di aspetti complessivamente critici, per la necessità di rafforzare il legame fra incremento della conoscenza (ricerca/innovazione) ed intervento, sia normativo sia sul territorio (75). Le criticità vanno dallo sviluppo di metodi per il bio-risanamento di ambienti inquinati, all’aggiornamento e miglioramento delle regolamentazioni (sicurezza alimentare, risposta ai rischi emergenti, sicurezza sul lavoro), ai criteri per applicare il principio di sostituzione richiesto da REACH. Quest’ultimo aspetto è importante dal punto di vista scientifico ed etico: la presenza sul mercato di prodotti che possono mettere a repentaglio la salute non è più accettabile ove esistano delle soluzioni alternative. Un esempio viene dal DEHP, che è tuttora il plasticizzante più ampiamente utilizzato nei dispositivi sanitari in polivinilcloruro (PVC). Tuttavia, il DEHP non è chimicamente stabile all’interno del PVC e l’uso prolungato, migra dai dispositivi medici. I neonati prematuri sono particolarmente a rischio, a causa delle loro dimensioni, delle condizioni fisiche e per esposizione contemporanea a molteplici dispositivi medici (76). Un mo-

dello sulla possibilità di rimpiazzare sostanze identificate come IE, e specificamente gli ftalati, viene dai risultati del progetto di ricerca BRITE (Biocompatible Flexible Polymer Alloys Based on Polyesters from Renewable Resources for Mass-Consumer Applications Involving Contact with human fluids and tissues, 2000-4). Nonostante il successo del progetto, che ha prodotto un nuovo plasticizzante assolutamente biocompatibile e privo di tossicità, vi è ancora una mancanza di decisioni normative verso la presenza di ftalati in dispositivi medici (77).

Il Comitato Scientifico della Commissione Europea sui Rischi Nuovi ed Emergenti (SCENIHR) - DG SANCO ha valutato nel 2008 l’uso del DEHP come plasticizzante nei dispositivi biomedicali (78). Lo SCENIHR ha ritenuto fondate le preoccupazioni circa l’esposizione al DEHP nei neonati prematuri; il Comitato ha inoltre considerato con attenzione otto possibili plasticizzanti alternativi che risultano meno tossici del DEHP nell’animale da laboratorio, raccomandando ulteriori studi sulla migrazione dai dispositivi e sull’efficacia di utilizzo. Una spinta verso i nuovi studi raccomandati dallo SCENIHR non potrà che venire dall’attenzione del legislatore verso una possibile sostituzione del DEHP.

Le prospettive future verso una migliore gestione dei rischi associati agli IE comprendono: l’integrazione di diverse filiere di dati nella sorveglianza alimentare ed ambientale, per utilizzarle nella risposta a rischi emergenti; nuove strategie per la sicurezza sul lavoro, basate sull’integrazione fra monitoraggio mirato, comunicazione del rischio ed innovazione dei processi; strategie per la valutazione e comunicazione del rischio in sicurezza alimentare mirate ai gruppi vulnerabili, come bambini/adolescenti; l’aggiornamento dei programmi di controllo in sicurezza alimentare considerando, ad esempio, i possibili effetti additivi di gruppi di IE con meccanismi simili, la definizione di limiti massimi tollerabili negli alimenti di contaminanti sinora non normati (ad es., composti perfluorati); l’identificazione di stili di vita che riducono il rischio di esposizione per sé e per gli altri, e l’adeguata comunicazione (corretta, trasparente e comprensibile) ai cittadini (78). A tal proposito si posiziona l’iniziativa del Ministero dell’Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare e dell’Istituto Superiore di Sanità che ha presentato a Roma il 23 ottobre 2012 nel corso del Convegno

“*Conosci, Riduci, PREVIENI - L'informazione al pubblico sulle sostanze chimiche - Un Decalogo per i cittadini sugli Interferenti Endocrini*”, un opuscolo che ha come obiettivo quello di informare il cittadino in merito ai rischi derivanti dall'esposizione a taluni contaminanti chimici largamente presenti in oggetti di uso quotidiano (79). La conoscenza delle fonti di esposizione a tali sostanze e delle possibili alternative esistenti mette il cittadino in grado di adottare scelte e comportamenti consapevoli con conseguente riduzione del rischio. Nel Decalogo vengono inoltre riportate tutte le normative europee vigenti atte a regolare l'utilizzo di questi contaminanti che spesso non sono note al cittadino. A livello europeo è in corso un ampio dibattito su aspetti ancora controversi della valutazione del rischio degli IE quali la possibilità di effetti cumulativi da sostanze diverse ma con analoghi bersagli e di possibili effetti a dosi molto basse, soprattutto in finestre critiche dello sviluppo. Il raggiungimento di un consenso scientifico a livello europeo, coadiuvato da una visione concettuale, porterà alla creazione di nuove strategie normative per la tutela dell'ambiente e delle filiere alimentari.

Dal punto di vista bioetico, la ricerca sugli IE ha un ruolo e un interesse che vanno oltre quello scientifico: entrano in gioco la diversa suscettibilità legata all'età ed al genere, ma anche allo status socio-economico (qualità degli alimenti, del lavoro, dell'ambiente di vita), l'attendibilità del trasferimento di prove positive sperimentali alle condizioni di rischio umano, la necessità di disciplinare produzione, distribuzione e consumo di sostanze, talora utili allo sviluppo materiale (ad es., il DDT per la lotta contro la malaria nei Paesi in via di sviluppo), l'adesione a criteri etici di verità e giustizia nell'accertamento del “nesso di causalità” fra comportamenti e danni, l'uso del principio di precauzione ed infine l'estensione all'ambito salute del concetto di sviluppo sostenibile (80) attraverso la specifica attenzione verso la tutela della salute delle nuove generazioni.

## Conclusioni

Una valutazione obiettiva non può che concludere che l'Italia è ancora in ritardo sul problema “IE” rispetto a molti altri paesi europei e non, sia sul piano

delle risorse che sulle iniziative; questo nonostante l'impegno di alcuni gruppi scientifici ed il crescente interesse verso specifici aspetti (sicurezza alimentare, rifiuti). Gli IE, come altre grandi questioni di valutazione del rischio, emergenti o meno (dai siti a rischio ai nanomateriali) richiedono un approccio complessivo che colga le reali priorità (79).

Nel nostro breve - e necessariamente lacunoso - *excursus* sono emerse alcune aree critiche:

- la regolamentazione delle sostanze chimiche, sia riguardo al programma REACH sia riguardo alla tutela dei lavoratori;
- la protezione dei consumatori attraverso una più aggiornata regolamentazione delle filiere alimentari e dei prodotti di consumo, nonché una migliore comunicazione del rischio;
- la gestione del rischio in situazioni particolarmente vulnerabili che possono andare dalla bonifica dei siti inquinati all'intervento di sanità pubblica su fasce di popolazione specialmente vulnerabili, quali in primo luogo l'infanzia (81);
- l'ottimizzazione delle risorse, ad esempio il migliore rapporto costo-beneficio dei metodi e sistemi di sorveglianza ed il pieno utilizzo degli strumenti (ad esempio, sistemi di monitoraggio, registri di malattie, database) e delle conoscenze già disponibili.

Affrontare il problema IE può essere un'occasione per ridurre i costi sociali delle patologie su base endocrina attraverso la prevenzione e per sviluppare un modello di prevenzione traslazionale che instauri un circolo virtuoso fra ricerca, innovazione, valutazione ed intervento.

## Bibliografia

1. Area tematica dell'Istituto Superiore di Sanità Interferenti Endocrini <http://www.iss.it/inte>
2. Comitato Nazionale Biosicurezza e Biotecnologie. La Sorveglianza dell'esposizione a Interferenti Endocrini. 2006. [http://www.governo.it/biotecnologie/documenti/interferenti\\_endocrini.pdf](http://www.governo.it/biotecnologie/documenti/interferenti_endocrini.pdf)
3. Mantovani A, La Rocca C, Maranghi F. Interferenti endocrini: dalla ricerca alla valutazione del rischio. *Epidemiol Prev* 33 (1-2): 5-7.
4. Latini G, Knipp A, Mantovani A, *et al.* Endocrine Disruptors and Human Health. *Mini-Rev. Med Chem* 2010; 10 (9): 846-55. Review.
5. Mantovani A. Risk assessment of endocrine disruptors:

- the role of toxicological studies. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1076: 239-52.
6. Caserta D, Mantovani A, Marci R, *et al.* Environment and women's reproductive health. *Hum Reprod Update* 2011; 17 (3): 418-33.
  7. Caserta D, Maranghi L, Mantovani A, *et al.* Impact of endocrine disruptor chemicals in gynaecology. *Hum Reprod Update* 2008; 14 (1): 59-72.
  8. Frye CA, Bo E, Calamandrei G, *et al.* Endocrine disruptors: a review of some sources, effects, and mechanisms of actions on behaviour and neuroendocrine systems. *J Neuroendocrinol* 2012; 24 (1): 144-59.
  9. European Food Safety Authority. Scientific report of the Endocrine Active Substances Task Force. *The EFSA Journal* 2010; 8 (11): 1932.
  10. Blystone CR, Lambright CS, Cardon MC, *et al.* Cumulative and antagonistic effects of a mixture of the antiandrogens vinclozolin and iprodione in the pubertal male rat. *Toxicol Sci* 2009; 111 (1):179-88.
  11. Kjærstad MB, Taxvig C, Nellemann C, *et al.* Endocrine disrupting effects in vitro of conazole antifungals used as pesticides and pharmaceuticals. *Reprod Toxicol* 2010; 30 (4): 573-82.
  12. Thienpont B, Tingaud-Sequeira A, Prats E, *et al.* Zebrafish eleutheroembryos provide a suitable vertebrate model for screening chemicals that impair thyroid hormone synthesis. *Environ Sci Technol* 2011; 45 (17): 7525-32.
  13. Calamandrei G, Maranghi F, Venerosi A, *et al.* Efficient testing strategies for evaluation of xenobiotics with neuroendocrine activity. *Reprod Toxicol* 2006; 22 (2): 164-74.
  14. ECHA European Chemical Agency <http://echa.europa.eu/>
  15. EFSA. Scientific Opinion on the risks for public health related to the presence of zearalenone in food. *The EFSA Journal* 2011; 9 (6): 2197.
  16. EFSA. Opinion of the Scientific Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed on the request from the Commission on the use of iodine in feedingstuffs. *The EFSA Journal* 2005; 168: 1-42.
  17. Cook MB, Trabert B, McGlynn KA. Organochlorine compounds and testicular dysgenesis syndrome: human data. *Int J Androl* 2011; 34 (4 Pt 2): e68-84.
  18. Cerrillo I, Olea-Serrano MF, Ibarluzea J, *et al.* Environmental and lifestyle factors for organochlorine exposure among women living in Southern Spain. *Chemosphere* 2006; 62 (11): 1917-24.
  19. Tait S, La Rocca C, Mantovani A. Exposure of human fetal penile cells to different PCB mixtures: transcriptome analysis points to diverse modes of interference on external genitalia programming. *Reprod Toxicol* 2011; 32 (1): 1-14.
  20. Jobling MS, Hutchison GR, van den Driesche S, *et al.* Effects of di(n-butyl) phthalate exposure on foetal rat germ-cell number and differentiation: identification of age-specific windows of vulnerability. *Int J Androl* 2011; 34 (5 Pt 2): e386-96.
  21. Singh S, Li SS. Epigenetic effects of environmental chemicals bisphenol a and phthalates. *Int J Mol Sci* 2012; 13 (8): 10143-53.
  22. Sharpe RM, McKinnell C, Kivlin C, Fisher JS. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction* 2003; 125 (6): 769-84.
  23. Toft G, Rignell-Hydbom A, Tyrkiel E, *et al.* Semen quality and exposure to persistent organochlorine pollutants in an Inuit and three European cohorts. *Epidemiology* 2006; 17: 450-8.
  24. Long M, Stronati A, Bizzaro D, *et al.* Relation between serum xenobiotic-induced receptor activities and sperm DNA damage and sperm apoptotic markers in European and Inuit populations. *Reproduction* 133: 517-30.
  25. Toft G, Long M, Krüger T, *et al.* Semen quality in relation to xenohormone and dioxin-like serum activity among Inuits and three European populations. *Environ Health Perspect* 115; Suppl 1: 15-20.
  26. Traina ME, Rescia M, Urbani E, *et al.* Long-lasting effects of lindane on mouse spermatogenesis induced by in utero exposure. *Reprod Toxicol* 2003; 17 (1): 25-35.
  27. Maranghi F, Rescia M, Macri C, *et al.* Lindane may modulate the female reproductive development through the interaction with ER-beta: an in vivo-in vitro approach. *Chem Biol Interact* 2007; 169 (1): 1-14.
  28. Crinnion WJ. Toxic effects of the easily avoidable phthalates and parabens. *Altern Med Rev* 2010; 15 (3): 190-6.
  29. Meeker JD, Ehrlich S, Toth TL, *et al.* Semen quality and sperm DNA damage in relation to urinary bisphenol A among men from an infertility clinic. *Reprod Toxicol* 2010; 30 (4): 532-9.
  30. Li DK, Zhou Z, Miao M, *et al.* Urine bisphenol-A (BPA) level in relation to semen quality. *Fertil Steril* 2011; 95 (2): 625-30.
  31. Meeker JD, Yang T, Ye X, *et al.* Urinary concentrations of parabens and serum hormone levels, semen quality parameters, and sperm DNA damage. *Environ Health Perspect* 2011; 119 (2): 252-7.
  32. Guyton KZ, Chiu WA, Bateson TF, *et al.* A reexamination of the PPAR-alpha activation mode of action as a basis for assessing human cancer risks of environmental contaminants. *Environ Health Perspect* 2009; 117 (11): 1664-72.
  33. DeKeyser JG, Laurenzana EM, Peterson EC, *et al.* Selective phthalate activation of naturally occurring human constitutive androstane receptor splice variants and the pregnane X receptor. *Toxicol Sci* 2011; 120 (2): 381-91.
  34. Hatch EE, Nelson JW, Stahlhut RW, *et al.* Association of endocrine disruptors and obesity: perspectives from

- epidemiological studies. *Int J Androl* 2010; 33 (2): 324-32.
35. Pant N, Pant A, Shukla M, *et al.* Environmental and experimental exposure of phthalate esters: the toxicological consequence on human sperm. *Hum Exp Toxicol* 2011; 30 (6): 507-14.
  36. Tranfo G, Caporossi L, Paci E, *et al.* Urinary phthalate monoesters concentration in couples with infertility problems. *Toxicol Lett* 2012; 213 (1): 15-20.
  37. Gupta N, Goel K, Shah P, *et al.* Childhood obesity in developing countries: epidemiology, determinants, and prevention. *Endocr Rev* 2012; 33 (1): 48-70.
  38. Casals-Casas C, Desvergne B. Endocrine disruptors: from endocrine to metabolic disruption. *Annu Rev Physiol* 2011; 73: 135-62.
  39. Meeker JD. Exposure to environmental endocrine disrupting compounds and men's health. *Maturitas* 2010; 66 (3): 236-41.
  40. Lim JS, Son HK, Park SK, *et al.* Inverse associations between long-term weight change and serum concentrations of persistent organic pollutants. *Int J Obes (Lond)* 2011; 35 (5): 744-7.
  41. Mendez MA, Garcia-Esteban R, Guxens M, *et al.* Prenatal Organochlorine Compound Exposure, Rapid Weight Gain and Overweight in Infancy. *Environ Health Perspect* 2011; 119 (2): 272-8.
  42. Elobeid MA, Padilla MA, Brock DW, *et al.* Endocrine disruptors and obesity: an examination of selected persistent organic pollutants in the NHANES 1999-2002 data. *Int J Environ Res Public Health* 2010; 7 (7): 2988-3005.
  43. Dirinck E, Jorens PG, Covaci A, *et al.* Obesity and Persistent Organic Pollutants: Possible Obesogenic Effect of Organochlorine Pesticides and Polychlorinated Biphenyls. *Obesity (Silver Spring)* 2011; 19 (4): 709-14.
  44. Ryan KK, Haller AM, Sorrell JE, *et al.* Perinatal exposure to bisphenol-a and the development of metabolic syndrome in CD-1 mice. *Endocrinology* 2010; 151 (6): 2603-12.
  45. Desvergne B, Feige JN, Casals-Casas C. PPAR-mediated activity of phthalates: A link to the obesity epidemic? *Mol Cell Endocrinol* 2009; 304 (1-2): 43-8.
  46. Maranghi F, Lorenzetti S, Tassinari R, *et al.* In utero exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate affects liver morphology and metabolism in post-natal CD-1 mice. *Reprod Toxicol* 2010; 29 (4): 427-32.
  47. Navas-Acien A, Silbergeld EK, Streeter RA, *et al.* Arsenic exposure and type 2 diabetes: a systematic review of the experimental and epidemiological evidence. *Environ Health Perspect* 2006; 114 (5): 641-8.
  48. Walton FS, Harmon AW, Paul DS, *et al.* Inhibition of insulin-dependent glucose uptake by trivalent arsenicals: possible mechanism of arsenic-induced diabetes. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004; 198 (3): 424-33.
  49. Davey JC, Bodwell JE, Gosse JA, *et al.* Arsenic as an endocrine disruptor: effects of arsenic on estrogen receptor-mediated gene expression in vivo and in cell culture. *Toxicol Sci* 2007; 98 (1): 75-86.
  50. EFSA. Scientific Opinion on Arsenic in Food. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). *The EFSA Journal* 2009; 7 (10): 1351.
  51. Dávila-Esqueda ME, Morales JM, Jiménez-Capdeville ME, *et al.* Low-level subchronic arsenic exposure from prenatal developmental stages to adult life results in an impaired glucose homeostasis. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2011; 119 (10): 613-7.
  52. EFSA. Safety and efficacy of chromium methionine (Availa®Cr) as feed additive for all species Scientific Opinion of the Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed. *The EFSA Journal* 2009; 1043: 1-69.
  53. Alonso-Magdalena P, Morimoto S, Ripoll C, *et al.* The estrogenic effect of bisphenol A disrupts pancreatic beta-cell function in vivo and induces insulin resistance. *Environ Health Perspect* 2006; 114 (1): 106-12.
  54. Slotkin TA, Brown KK, Seidler FJ. Developmental exposure of rats to chlorpyrifos elicits sex-selective hyperlipidemia and hyperinsulinemia in adulthood. *Environ Health Perspect* 2005; 113 (10): 1291-4.
  55. Ueyama J, Wang D, Kondo T, *et al.* Toxicity of diazinon and its metabolites increases in diabetic rats. *Toxicol Lett* 2007; 170 (3): 229-37.
  56. Tait S, Ricceri L, Venerosi A, *et al.* Long-term effects on hypothalamic neuropeptides after developmental exposure to chlorpyrifos in mice. *Environ Health Perspect* 2009; 117 (1): 112-6.
  57. De Angelis S, Tassinari R, Maranghi F, *et al.* Developmental exposure to chlorpyrifos induces alterations in thyroid and thyroid hormone levels without other toxicity signs in CD-1 mice. *Toxicol Sci* 2009; 108 (2): 311-9.
  58. Hartung T. Toxicology for the twenty-first century. *Nature* 2009; 460 (7252): 208-12.
  59. Lorenzetti S, Altieri I, Arabi S, *et al.* Innovative non-animal testing strategies for reproductive toxicology: the contribution of Italian partners within the EU project ReProTect. *Ann Ist Super Sanità* 2011; 47 (4): 429-44.
  60. Lorenzetti S, Marcocchia D, Narciso L, *et al.* Cell viability and PSA secretion assays in LNCaP cells: a tiered in vitro approach to screen chemicals with a prostate-mediated effect on male reproduction within the ReProTect project. *Reprod Toxicol* 2010; 30 (1): 25-35.
  61. Scheepers PT. The use of biomarkers for improved retrospective exposure assessment in epidemiological studies: summary of an ECETOC workshop. *Biomarkers* 2008; 13: 734-48.
  62. Mantovani A, Maranghi F, La Rocca C, *et al.* The role of toxicology to characterize biomarkers for agrochemi-

- cals with potential endocrine activities. *Reprod Toxicol* 2008; 26 (1): 1-7.
63. La Rocca C, Mantovani A. Gli interferenti endocrini: dagli studi tossicologici alla caratterizzazione di biomarker. *Epidemiol Prev* 33(3): 59-63.
  64. Area tematica ISS Dedicata al Progetto PREVIENI (<http://www.iss.it/prvn>)
  65. Governini L, Orvieto R, Guerranti C, *et al.* The impact of environmental exposure to perfluorinated compounds on oocyte fertilization capacity. *J Assist Reprod Genet* 2011; 28 (5): 415-8.
  66. EFSA Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food chain Perfluorooctane sulfonate (PFOS), perfluorooctanoic acid (PFOA) and their salts. *The EFSA Journal* 2008; 653: 1-131.
  67. La Rocca C, Alessi E, Bergamasco B, *et al.* Exposure and effective dose biomarkers for perfluorooctane sulfonic acid (PFOS) and perfluorooctanoic acid (PFOA) in infertile subjects: Preliminary results of the PREVIENI project. *Int J Hyg Environ Health* 2012; 215 (2): 206-11.
  68. Baldi F, Mantovani A. A new database for food safety: EDID (Endocrine disrupting chemicals. Diet Interaction Database). *Ann Ist Super Sanità* 2008; 44 (1): 57-63.
  69. Zhou C, Zhang C. Protective effects of antioxidant vitamins on Aroclor 1254-induced toxicity in cultured chicken embryo hepatocytes. *Toxicol In Vitro* 2005; 19 (5): 665-73.
  70. Lubick N. Precarious balance: methylmercury, selenium, and cardiovascular health. *Environ Health Perspect* 2011; 119 (8): A354.
  71. Charles GD, Gennings C, Tornesi B, *et al.* Analysis of the interaction of phytoestrogens and synthetic chemicals: an in vitro/in vivo comparison. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007; 218 (3): 280-8.
  72. Téllez Téllez R, Michaud Chacón P, Reyes Abarca C, *et al.* Long-term environmental exposure to perchlorate through drinking water and thyroid function during pregnancy and the neonatal period. *Thyroid* 2005; 15 (9): 963-75.
  73. Ellis-Hutchings RG, Cherr GN, Hanna LA, *et al.* The effects of marginal maternal vitamin A status on pentabrominated diphenyl ether mixture-induced alterations in maternal and conceptual vitamin A and fetal development in the Sprague Dawley rat. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 2009; 86 (1): 48-57.
  74. Hoekstra J, Hart A, Owen H, *et al.* Fish, contaminants and human health: Quantifying and weighing benefits and risks. *Food Chem Toxicol* 2012 Jan 17. [Epub ahead of print]
  75. Comitato Nazionale Biosicurezza, Biotecnologie e Scienze della vita. Proposta di Piattaforma Ambiente e Salute. Priorità e obiettivi per la valutazione e gestione del rischio per la salute umana e la qualità ambientale da esposizione a Interferenti Endocrini, 2010. [http://www.governo.it/biotecnologie/documenti/Documento\\_Interferenti\\_Endocrini3.pdf](http://www.governo.it/biotecnologie/documenti/Documento_Interferenti_Endocrini3.pdf)
  76. Latini G, Ferri M, Chiellini F. Materials degradation in PVC medical devices, DEHP leaching and neonatal outcomes. *Curr Med Chem* 2010; 17: 2979-89.
  77. Latini G, Mantovani A. Sviluppo del principio di sostituzione: l'esempio degli ftalati nei dispositivi biomedici <http://www.iss.it/inte/aspe/cont.php?id=222&lang=1&tipo=5>.
  78. Scientific Committee on Emerging and Newly-Identified Health Risks- SCENIHR. Opinion on the safety of medical devices containing DEHP plasticized PVC or other plasticizers on neonates and other groups possibly at risk, 2008. [http://ec.europa.eu/health/ph\\_risk/committees/04\\_scenih/docs/scenih\\_o\\_014.pdf](http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_scenih/docs/scenih_o_014.pdf).
  79. Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare, Istituto Superiore di Sanità. Conosci, riduci, previeni gli interferenti endocrini. Un decalogo per il cittadino. Roma, 2012. <http://www.iss.it/inte/risc/cont.php?id=257&lang=1&tipo=30>.
  80. Frazzoli C, Petrini C, Mantovani A. Sustainable development and next generation's health: a long-term perspective about the consequences of today's activities for food safety. *Ann Ist Super Sanità* 2009; 45 (1): 65-75.
  81. Maranghi F, Baldi F, Mantovani A. ed. Sicurezza alimentare e salute dell'infanzia. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2005 (Rapporti ISTISAN 05/35): 4-11.

