



Governo italiano
Presidenza del Consiglio dei Ministri

*Comitato Nazionale per la Biosicurezza, le
Biotecnologie e le Scienze della Vita*

*Gruppo di studio per la prevenzione dei rischi
alimentari ed ambientali da interferenti endocrini
ed altri contaminanti emergenti*

**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**

Roma,

Componenti del Gruppo di lavoro

Prof. Luciano CAGLIOTI, Professore Ordinario di Chimica Organica, Università di Roma “La Sapienza” - Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR), con l’incarico di coordinatore;

Dott. Gianvincenzo BARBA, Ricercatore di III livello II^a fascia presso l’Istituto di Scienza dell’Alimentazione del Consiglio Nazionale delle Ricerche;

Prof. Francesco Maria CANCELLOTTI, Direttore Scientifico Istituto Zooprofilattico Sperimentale Lazio e Toscana;

Dott.ssa Anna Maria COLACCI, Responsabile Cancerogenesi ambientale ARPA Emilia Romagna;

Dott. Ivano GIACOMELLI, Segretario Nazionale Associazione Codici;

Prof. Giuseppe LATINI, Direttore Unità Operativa di Neonatologia dell’Ospedale Perrino di Brindisi;

Dott.ssa Catherine LECLERCQ, Ricercatore di ruolo presso l’Unità di Nutrizione Umana dell’Istituto Nazionale di Ricerca per gli Alimenti e la Nutrizione (INRAN), Responsabile del “Gruppo di ricerca sull’esposizione al rischio alimentare”;

Prof.ssa Alberta MANDICH, Ricercatore confermato presso il Dipartimento di Biologia dell’Università di Genova;

Prof. Alberto MANTOVANI, Dirigente di ricerca del Dipartimento Sicurezza Alimentare e Salute Pubblica Veterinaria dell’Istituto Superiore di Sanità;

Prof. Luigi MANZO, Professore Ordinario di Tossicologia, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Pavia, IRCCS, Fondazione Maugeri;

Dott. Fabrizio OLEARI, Direttore Generale Ministero della Salute, Segretariato Nazionale della Valutazione del Rischio della Catena Alimentare;

Prof.ssa Antonella OLIVIERI, Primo Ricercatore presso il Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze dell’Istituto Superiore di Sanità, Roma

Dott. Elena ORBAN, Direttore dell’Unità di Tecnologie Alimentari e dell’Area di Studio Prodotti Ittici, Istituto Nazionale di Ricerca per gli Alimenti e la Nutrizione (INRAN);

Dott. Stefano PAOLUCCI, Direttore Unità Operativa “F” Fondazione S. Lucia, IRCCS;

Dott. Carlo ZAGHI, Dirigente Divisione VII, Valutazione del Rischio Ambientale di Prodotti Chimici, Direzione Generale per la Salvaguardia Ambientale, Ministero dell’Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare.

Struttura di supporto

Per la Presidenza del Consiglio: Dott.ssa Agnese CAMILLI; Dott.ssa Valentina CAPO; Dott.ssa Paola CASTELLO; Dott.ssa Annalisa DEL MONDO; Dott.ssa Claudia ORLANDINI; Dott.ssa Loredana PERSAMPIERI; Dott.ssa Simona RAGUSA; Dott.ssa Marina SALVATORE; Sign.ra Giuseppina SCHIAVONE.

Per l'Istituto Superiore di Sanità: Dott. Gabriele MORACCI; Dott.ssa Chiara FRAZZOLI.

INDICE

EXECUTIVE SUMMARY

1. INTRODUZIONE

1.1 Ambiente e salute

1.2 Il problema degli Interferenti endocrini: prevenzione e promozione della salute

2. PRIORITÀ PER UNA STRATEGIA SUGLI INTERFERENTI ENDOCRINI

2.1 Metodi per la sorveglianza della contaminazione e della esposizione

2.1.a *Biosensori*

2.1.b *E-screen, ed altri metodi basati sulla interazione con recettori*

2.1.c *Bioindicatori ambientali*

2.1.d *Biomarcatori*

2.1.e *Prospettive della tossicogenomica per il monitoraggio ambientale*

2.2. Valutazione del rischio per l'ambiente e la salute umana

2.2.a *Meccanismi molecolari di interazione con sistemi viventi*

2.2.b *Tossicologia ed ecotossicologia: metodi innovativi*

2.2.b.1 *Tossicologia in silico: QSAR.*

2.2.b.2 *Sviluppo di test in vitro .*

2.2.c *Lo sviluppo dell'approccio meccanicistico alla valutazione del rischio tossicologico*

2.2.d *Valutazione del rischio di miscele: modelli sperimentali e strategie*

2.2.e *Epidemiologia*

2.2.f *Sviluppo di biomarcatori di esposizione/effetto/suscettibilità*

2.2.g *Banche biologiche e banche dati*

2.2.h *Gruppi a speciale esposizione: IE e medicina del Lavoro*

2.3 Prevenzione, gestione, riduzione del rischio

2.3.a *Biorisanamento: acque e suoli*

2.3.b *Innovazione tecnico-scientifica ed aggiornamento delle normative europee e nazionali*

2.3.b.1 *REACH: misure di gestione del rischio.*

2.3.b.2 *Piani di sorveglianza*

2.3.b.3 *Sicurezza del lavoro*

2.3.b.4 *Sviluppo del principio di sostituzione*

2.3.c. *Stili alimentari e di vita a sostegno della prevenzione*

2.3.c.1 *Interazione degli IE con gli alimenti.*

2.3.c.2 *IE ed alimentazione in sottogruppi della popolazione generale.*

2.3.c.3 *Rischi e benefici del consumo di specifici alimenti nella popolazione italiana*

2.3.c.4 *La dieta nella prevenzione dell'esposizione e degli effetti di IE.*

2.3.d *Comunicazione del rischio, formazione ed educazione sanitaria*

3. Aspetti bioetici: il “profilo bioetico” e giuridico dell’esposizione a sostanze classificate come “interferenti endocrini”.

3.1 *Aspetti generali*

3.2 *Domande bioetiche e biogiuridiche*

3.3 *Principi e valori*

3.4 *Alcuni aspetti di rilevanza bioetica della tossicologia degli IE*

3.5 *Conclusioni*

4. Conclusioni: caratteristiche e ricadute della piattaforma progettuale “ambiente e salute”.

EXECUTIVE SUMMARY

Nel 2007, l'allora Comitato Nazionale per la Biosicurezza e le Biotecnologie ha pubblicato il primo documento ufficiale italiano sulla “*Sorveglianza dell'esposizione a interferenti endocrini*”, che ha fatto il punto sullo stato dell'arte e le lacune conoscitive per la valutazione del rischio per l'ambiente e la salute umana di questo ampio ed eterogeneo gruppo di contaminanti emergenti.

Gli IE comprendono contaminanti persistenti (ad es., diossine), pesticidi, sostanze industriali (es., ftalati, bisfenolo A) e sostanze naturali (es., “fitoestrogeni”) e sono caratterizzati dalla molteplicità di effetti, dalla diffusa esposizione (anche con problemi di bioaccumulo in molti casi) e dalla potenzialità di rappresentare uno specifico rischio per la riproduzione e per lo sviluppo pre- e postnatale.

Sulla base delle raccomandazioni del documento CNBBSV(2007), l'attuale Comitato Nazionale Biosicurezza, Biotecnologie e Scienze della Vita ha organizzato un nuovo gruppo di lavoro con l'obiettivo di individuare priorità ed obiettivi per una piattaforma progettuale “ambiente e salute” centrata *sulla valutazione e gestione* dei rischi da interferenti endocrini (IE), ma applicabile come modello anche ad altri contaminanti emergenti. Nel fare questo il gruppo di lavoro ha tenuto conto

- dei principali sviluppi in ambito europeo, quali il nuovo regolamento sulle sostanze chimiche REACH (*Registration, Evaluation, Authorization and restriction of Chemicals*) ed il sistema di valutazione del rischio per la sicurezza alimentare progressivamente elaborato dall'Authority Europea per la sicurezza Alimentare (*European Food Safety Authority, EFSA*)
- della specificità italiana, comportante un territorio relativamente ristretto con un considerevole carico di popolazione e di rifiuti potenzialmente tossici, ma anche da una grande ricchezza di ecosistemi e di filiere agroalimentari
- dell'accumulo di evidenze, fornite da studi sperimentali ed epidemiologici, sulla correlazione fra esposizione a IE, alterazioni degli ecosistemi e patologie umane, soprattutto riproduttive e dell'età evolutiva
- della specificità dei rischi indotti da IE: effetti a lunga latenza e/o sulla generazione successiva, molteplicità di scenari di esposizione.

Il Gruppo di lavoro ha, pertanto, articolato la piattaforma in tre grandi settori, individuando per ciascuno criticità e prospettive per il futuro.

1) Metodi per la sorveglianza della contaminazione e della esposizione

In questo settore esistono numerosi metodi (biosensori, biomarker) capaci di evidenziare concentrazioni attive di IE in matrici ambientali, alimentari o biologiche. Tuttavia, una prima criticità è la limitazione di

gran parte dei metodi disponibili alla rilevazione di uno specifico segnale (ad es., attività estrogenica o diossina-simile), che può rendere difficile valutare situazioni complesse, ma reali, come le miscele di inquinanti, o di inquinanti e componenti naturali, anche con ruoli protettivi (ad es., antiossidanti, chelanti). Un'ulteriore seria criticità è la scarsità di dati sulla *trasferibilità* di modelli di laboratorio alle situazioni sul campo, ad esempio, per il controllo e l'allerta di situazioni ambientali, filiere alimentari, o per valutare l'effettivo impatto di interventi. Un altro strumento importante sono i bioindicatori, utilizzabili per valutare l'impatto su popolazioni-campione negli ecosistemi (ad es., vitellogenina in pesci teleostei, imposex in molluschi gasteropodi); mancano ancora, tuttavia, criteri condivisi nella scelta dei bioindicatori e nella loro valutazione quali-quantitativa, con il rischio di acquisire informazioni non comparabili o non complete.

Le *prospettive future* comprendono, pertanto

- 1) lo sviluppo e validazione scientifica di sistemi integrati (ad es., biosensori) in grado di dare segnali multipli, non ristretti ad un singolo meccanismo o gruppo di inquinanti;
- 2) studi di trasferibilità dei sistemi sperimentali alle situazioni sul campo per valutarne ed ottimizzarne le applicazioni in termini, ad es., di robustezza, facilità di uso, possibilità di integrazione in rete, risparmio energetico;
- 3) nel campo dei *bioindicatori* la selezione condivisa di un insieme di specie sentinella che costituiscano un sistema di riferimento integrato in senso spaziale e temporale della qualità degli habitat, consentendo quindi di: 3.a) valutare i rischi a lungo termine associati al bioaccumulo, e 3.b) fornire dati confrontabili tra le diverse aree studiate;
- 4) nel campo dei *biomarcatori ambientali*, la messa a punto e standardizzazione di un pool ristretto di biomarcatori in grado di fornire un sistema di lettura degli effetti legati alla presenza di IE o gruppi di IE accomunati da determinati meccanismi di azione (estrogenici, tireostatici, ecc.)

2) Valutazione del rischio per l'ambiente e la salute umana

In questo ambito vi è sicuramente una ampia disponibilità di dati, test e strumenti che, tuttavia, per essere efficaci debbono essere integrati in una strategia. Un primo aspetto critico è l'insufficiente conoscenza dell'associazione fra effetto avverso a lungo termine e/o transgenerazionale e meccanismi di azione degli IE, in primo luogo le interazioni con recettori nucleari e la modulazione epigenetica: la relazione effetto-meccanismo è particolarmente importante per caratterizzare biomarcatori per gli studi di popolazione e per valutarne la predittività. La identificazione di IE è uno degli aspetti fondamentali del sistema REACH: a tale scopo è criticamente in ritardo lo sviluppo di modelli *in silico* struttura-attività (QSAR) e di batterie di test *in vitro*. In generale, due criticità per la integrazione ricerca-valutazione del rischio sono la capitalizzazione delle conoscenze e degli strumenti forniti dalle "omiche" e dalla biologia dei sistemi, nonché la messa a punto di strategie per la valutazione delle miscele. Dal punto di vista, invece, degli *studi epidemiologici*, va

considerata la crescente disponibilità di banche biologiche, banche dati e registri di patologia potenzialmente utilizzabili per lo studio degli IE; tuttavia, ad oggi manca a livello centrale, regionale e locale, *una integrazione fra istituzioni operanti nel settore dell'ambiente e della salute* per un miglior utilizzo degli strumenti esistenti e l'identificazione di priorità ed obiettivi. In particolare, lo sviluppo e l'impiego di banche biologiche specifiche è rallentato dalla insufficiente conoscenza di tale strumento e, soprattutto, dalla mancanza di un'iniziativa nazionale. Infine, occorre dare maggiore attenzione al problema specifico dell'esposizione occupazionale, considerando i cambiamenti delle condizioni lavorative negli ultimi decenni e le differenti vulnerabilità legate al genere ed all'età.

Le *prospettive future* comprendono, pertanto

- 1) lo studio dei meccanismi, indirizzato ad obiettivi di potenziale rilievo per la sanità pubblica, in primo luogo la identificazione di biomarker precoci, e di potenziali effetti additivi di miscele;
- 2) modelli sperimentali, *in vitro/in vivo* per valutare le differenti vulnerabilità legate al sesso ed alla fase del ciclo vitale e caratterizzare in maniera più completa gli effetti degli IE (ad es. interazione con l'omeostasi di tiroide, glucorticoidi, adipochine; effetti su sindrome metabolica, sistema scheletrico, prostata, ecc.);
- 3) strategie integrate, *in silico e/o in vitro*, per la identificazione sensibile, efficiente e precoce di IE nell'ambito di REACH ed altri programmi europei
- 4) capitalizzare strumenti e conoscenze forniti dai nuovi approcci biomolecolari, migliorandone la robustezza e la predittività nei confronti di potenziali effetti avversi;
- 5) potenziare gli studi per la valutazione del rischio di miscele, dando priorità a quelle di riscontro più comune in scenari di esposizione realistici o in ragione degli impieghi previsti (ad es., sulla base di dati raccolti nel quadro degli adempimenti REACH);
- 6) studi epidemiologici sugli IE indirizzati su solide ipotesi (correlazioni esposizioni-patologie) ed utilizzando *biomarcatori* basati su evidenze tossicologiche; in questo ambito, sono fondamentali gli studi sull'età evolutiva, quali gli studi di coorte madre-bambino, per i quali occorre sviluppare biomarcatori di minima invasività, usando matrici quali capelli, saliva, strisci boccali;
- 7) un impiego maggiore e più efficace di banche biologiche, banche dati e registri di patologia, dando la priorità all'ottimizzazione ed integrazione di strumenti già disponibili;
- 8) potenziare la sorveglianza sanitaria di IE in contesti lavorativi prioritari (ad es., agricoltura, rifiuti) integrando indagini di igiene industriale orientate alla valutazione della salubrità ambientale con indagini di monitoraggio biologico, inserite all'interno di protocolli di sorveglianza sanitaria e dando specifico rilievo alle *differenze di genere*, che possono essere determinanti nel caso degli IE.

3) Prevenzione, gestione, riduzione del rischio

Comitato Nazionale per la Biosicurezza, le Biotecnologie e le Scienze della Vita

*Gruppo di studio per la prevenzione dei rischi
alimentari ed ambientali da interferenti endocrini
ed altri contaminanti emergenti*

Questi aspetti sono stati considerati complessivamente critici, per la necessità di rafforzare il legame fra incremento della conoscenza (ricerca/innovazione) ed intervento, sia normativo sia sul territorio. Specifiche criticità vengono identificate nello sviluppo di metodi per il biorisanamento di ambienti inquinati, nell'aggiornamento e miglioramento delle regolamentazioni (sicurezza alimentare, risposta ai rischi emergenti, sicurezza sul lavoro), nei criteri per applicare il principio di sostituzione -richiesto da REACH-, nello sviluppo del trinomio informazione-comunicazione-formazione.

Sulla base di queste complesse criticità, le *prospettive future* devono andare da nuove metodologie, all'innovazione della regolamentazione alla comunicazione del rischio, ed in particolare:

- 1) strategie per ottimizzare l'uso di sistemi di biorisanamento, per potenziarne l'azione (degradazione simultanea di più contaminanti) e per valutarne l'impatto;
- 2) integrare diverse filiere di dati nella sorveglianza alimentare ed ambientale, per utilizzarle nella risposta a rischi emergenti,
- 3) nuove strategie per la sicurezza sul lavoro, basate sull'integrazione fra monitoraggio mirato, comunicazione del rischio ed innovazione dei processi;
- 4) sviluppo di una "griglia" decisionale per la valutazione comparata dei rischi e benefici per la salute di materiali diversi per attuare il *principio di sostituzione* sulla base di una "precauzione informata";
- 5) *sicurezza alimentare*: identificata come uno dei punti più importanti, perché l'alimentazione è una componente dell'ambiente di vita comune a tutta la popolazione e di particolare importanza - ambientale, sociale, economica e culturale, oltre che sanitaria- nel contesto italiano e specificamente:
 - 5.a) strategie per la valutazione e comunicazione del rischio mirate ai gruppi vulnerabili, come bambini/adolescenti, e alle fasce di consumatori formatesi nel corso dei recenti mutamenti negli stili alimentari;
 - 5.b) aggiornamento dei programmi di controllo considerando, ad esempio, i possibili effetti di additivi di gruppi di pesticidi, la definizione di limiti massimi tollerabili in specifici prodotti "critici" (latte/latticini, prodotti ittici, mangimi ecc.) di contaminanti sinora non normati ma oggetto di valutazioni dell'EFSA (ad es. PCB non diossina-simili, composti perfluorati, organostannici);
 - 5.c) promuovere la prevenzione della contaminazione degli alimenti attraverso l'innovazione tecnologica (ad es., prodotti fitosanitari, mangimi) e le Buone Pratiche in agricoltura e zootecnia;
 - 5.d) valutazione del rapporto rischio-beneficio e dei potenziali effetti legati al consumo di sostanze naturali, soprattutto attraverso integratori e "novel foods";
 - 5.e) valutazione integrata del possibile ruolo protettivo di nutrienti e sostanze bioattive (ad es., antiossidanti, iodio) nei confronti di contaminanti alimentari, come strumento di gestione e riduzione del rischio attraverso la diffusione di stili alimentari consapevoli, quali il consumo di sale iodato;

- 6) *documentazione*: creare uno strumento per la raccolta aggiornata e tempestiva ed integrazione delle conoscenze e competenze esistenti, estendendo e potenziando il modello del *Censimento Nazionale della ricerca sugli IE*, sviluppato da INBB e ISS (2008)
- 7) *formazione*: organizzazione di un programma a lungo termine di formazione, per promuovere l'apporto di energie e idee nuove nelle tematiche “ambiente-salute”;
- 8) uno studio nazionale pilota sulla *comunicazione del rischio* scientificamente corretta, trasparente, comprensibile, e quindi atta a sostenere lo *empowerment* dell'utente; lo studio dovrà sviluppare applicati a situazioni concrete ed in collaborazione con le parti sociali interessate, in primo luogo il mondo dell'associazionismo;
- 9) Dal punto di vista *bioetico* va sottolineato il ruolo e l'interesse “sociale” della ricerca che si sta conducendo sugli IE, in particolare sui “marcatori specifici di rischio” e sulla attendibilità del trasferimento di prove positive sull'animale alle condizioni di rischio umano. Questa ricerca varrà certamente al miglioramento della conoscenza dei delicati rapporti fra organismi viventi, ambiente ed attività industriali, ma potrà apportare -anche e soprattutto- contributi di maggiori certezze a chi deve disciplinare produzione, distribuzione e consumo di una importante categoria di sostanze peraltro utili allo sviluppo materiale, nonché ottemperare a criteri etici di verità e giustizia nell'accertamento del “nesso di causalità” fra comportamenti e danni.

In conclusione, il Gruppo di lavoro rileva come l'Italia rimanga indietro, sul piano sia delle risorse sia delle iniziative, rispetto a molti altri paesi -europei e non- sul problema IE nel suo complesso. Per contro, vi è una forte sensibilità nei confronti di specifici argomenti inerenti agli interferenti endocrini, quali pesticidi, diossine e, ultimamente, REACH. Pertanto uno degli scopi della piattaforma proposta sarà quello di *integrare tali argomenti in un'unica cornice* che comprenda ricerca ed iniziative di prevenzione..

L'impatto della piattaforma progettuale sul “sistema Italia” (e sul “sistema Europa”) riguarderà principalmente, ma non esclusivamente

- 1) la *regolamentazione delle sostanze chimiche*, sia riguardo al programma REACH sia riguardo alla tutela dei lavoratori;
- 2) la *protezione dei consumatori* attraverso una più aggiornata regolamentazione delle filiere alimentari e dei prodotti di consumo, nonché, una migliore comunicazione del rischio;
- 3) 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 suscettibili o esposte;
- 4) la tutela della salute delle *nuove generazioni* -futuro del corpo sociale, ma anche componente più suscettibile- estendendo quindi all'ambito salute il concetto di sviluppo sostenibile.

Il Gruppo di Lavoro sottolinea, infine, come la piattaforma progettuale dovrà tenere conto del rapporto *costo-beneficio* delle azioni proposte (ad esempio, ridurre i costi complessivi dei controlli -spesso ridondanti od inutili- ed aumentandone l'efficacia in termini di protezione del consumatore) e della possibilità di rimodulare obiettivi in base alla valutazione di rischi nuovi, o che si presentano con aspetti nuovi. In sintesi, la piattaforma si pone come un modello di *prevenzione traslazionale*, instaurando un circolo virtuoso fra ricerca, innovazione, valutazione ed intervento.

INTRODUZIONE

Nel 2007, l'allora Comitato Nazionale per la Biosicurezza e le Biotecnologie ha pubblicato il primo documento ufficiale italiano sulla “*Sorveglianza dell'esposizione a interferenti endocrini*” (CNBBSV, 2006) che ha fatto il punto sullo stato dell'arte e le lacune conoscitive per la valutazione del rischio per l'ambiente e la salute umana di questo ampio ed eterogeneo gruppo di contaminanti emergenti.

Gli IE comprendono contaminanti persistenti (ad es., diossine), pesticidi, sostanze industriali (es., ftalati, bisfenolo A) e sostanze naturali (es., “fitoestrogeni”) e sono caratterizzati dalla molteplicità di effetti, dalla diffusa esposizione (anche con problemi di bioaccumulo in molti casi) e dalla potenzialità di rappresentare uno specifico rischio per la riproduzione e per lo sviluppo pre- e postnatale.

Sulla base delle raccomandazioni di (CNBBSV 2007), l'attuale Comitato Nazionale Biosicurezza, Biotecnologie e Scienze della Vita ha organizzato un nuovo gruppo di lavoro con l'obiettivo di individuare priorità ed obiettivi per una piattaforma progettuale “ambiente e salute” centrata *sulla valutazione e gestione* dei rischi da interferenti endocrini (IE), ma applicabile come modello anche ad altri contaminanti emergenti. Nel fare questo il gruppo di lavoro ha tenuto conto

- dei principali sviluppi in ambito europeo, quali il nuovo regolamento sulle sostanze chimiche REACH (*Registration, Evaluation, Authorization and restriction of Chemicals*) ed il sistema di valutazione del rischio per la sicurezza alimentare progressivamente elaborato dall'Authority Europea per la sicurezza Alimentare (*European Food Safety Authority*, EFSA)
- della specificità italiana, comportante un territorio relativamente ristretto con un considerevole carico di popolazione e di rifiuti potenzialmente tossici, ma anche da una grande ricchezza di ecosistemi e di filiere agroalimentari
- dell'accumulo di evidenze, fornite da studi sperimentali ed epidemiologici, sulla correlazione fra esposizione a IE, alterazioni degli ecosistemi e patologie umane, soprattutto riproduttive (ad es., infertilità) e dell'età evolutiva (ad es., deficit neurocomportamentali), ma anche alterazioni immunitarie, predisposizione alla sindrome metabolica ed a taluni tipi di tumori
- della specificità dei rischi indotti da IE: effetti a lunga latenza e/o sulla generazione successiva, molteplicità di scenari di esposizione.

Il Gruppo di lavoro ha, pertanto, articolato la piattaforma in tre grandi settori, rispettivamente:

Metodi per la sorveglianza della contaminazione e della esposizione

Valutazione del rischio per l'ambiente e la salute umana

Prevenzione, gestione, riduzione del rischio

individuando per ciascuno criticità e prospettive per il futuro, con l'obiettivo di caratterizzare e rafforzare il legame fra incremento delle conoscenze e prevenzione.

2. PRIORITÀ PER UNA STRATEGIA SUGLI INTERFERENTI ENDOCRINI

2.1 Metodi per la sorveglianza della contaminazione e della esposizione

2.1.a Biosensori

Un biosensore è un dispositivo analitico costituito da un componente biologico immobilizzato accoppiato ad un componente fisico, detto trasduttore. Il primo media una specifica risposta ad un analita che è tradotta dal secondo in un segnale facilmente rivelabile. I componenti biologici includono: antigeni, anticorpi, enzimi, acidi nucleici, recettori, cellule ed organelli cellulari. I trasduttori, invece, possono essere: fibre ottiche, cristalli piezoelettrici ed elettrodi di vario tipo.

La specificità dei processi molecolari che coinvolgono i componenti biologici rendono i biosensori strumenti di misura altamente selettivi, applicabili in situ, operanti on-line e senza necessità di pretrattamento del campione da analizzare. Un buon biosensore deve essere: economico, semplice da usare, sufficientemente rapido, dotato di alta sensibilità, accurato e facile da realizzare. Tutti questi requisiti rendono il biosensore adatto per analisi continue ed automatiche, non distruttive ed economiche.

Le possibili applicazioni di tale tecnologia sono molteplici ed in continuo sviluppo. Attualmente i biosensori sono impiegati nel monitoraggio delle acque reflue, nell'industria ed in analisi biomediche. In campo ambientale sono stati sviluppati sensori per tutti i tipi di inquinanti; tuttavia, lo sviluppo è ancora molto minore per gli IE, forse perché la conoscenza dei rischi ha preso corpo solo di recente. Un esempio di uso nei confronti di specifici inquinanti sono i biosensori piezoelettrici realizzati per la determinazione di alcuni composti organofosfati; il metodo potrebbe essere sviluppato per la determinazione di IE immobilizzando gli opportuni recettori.

I biosensori elettrochimici sono senza dubbio i più diffusi ed i più efficienti tra i biosensori poiché risolvono molte delle limitazioni degli altri sistemi. Inoltre sono rapidi, semplici da utilizzare, economici e facilmente miniaturizzabili.

Una segnalazione a parte meritano i biosensori a DNA, una classe relativamente nuova, caratterizzati dalla capacità di rilevare le modificazioni subite da filamenti doppi di DNA a causa della interazione con altre molecole. Questi biosensori possono essere usati come indicatori generali della presenza nell'ambiente di composti in grado di interagire con il DNA; ad esempio, biosensori a DNA sono stati costruiti per la determinazione degli idrocarburi policiclici aromatici. E' possibile prevedere uno sviluppo di questo tipo di biosensori per la determinazione di IE agonisti o antagonisti di recettori nucleari, come gli "xenoestrogeni" bisfenolo A, nonilfenolo ed ottilfenolo.

Tutti i tipi di biosensori sopra elencati possono essere utilizzati per la valutazione del rischio ecologico/alimentare permettendo la determinazione di concentrazioni attive di inquinanti in siti contaminati, come ad esempio campioni di acque, sia potabili che di scarico, di suoli, di matrici alimentari, ecc.

I biosensori possono rappresentare un terreno fecondo di interazione fra ricerca sui meccanismi di azione, sviluppo tecnologico e sorveglianza/gestione del rischio. Pertanto, vi è una impellente necessità di incrementare questo settore di ricerca e, soprattutto vi è la necessità di un avanzamento dei paradigmi.

Criticità. Una prima criticità è la limitazione dei singoli biosensori alla rilevazione di uno specifico segnale, ancorché importante: i biosensori non sono nati per studiare i meccanismi delle singole molecole, ma per valutare *situazioni complesse*, tipiche delle filiere alimentari o dell'ambiente, con miscele di inquinanti ed anche di fattori protettivi (ad es., antiossidanti, chelanti)

Un altro aspetto è la attuale limitatezza valutazione della *trasferibilità* di modelli di laboratorio alle situazioni sul campo, ad esempio, per il controllo e l'allerta di situazioni ambientali, filiere alimentari, o per valutare l'effettivo impatto di interventi.

Per il futuro. Sviluppo di batterie di biosensori in grado di dare *segnali integrati* di interesse per la rilevazione di IE e loro miscele a concentrazioni attive in specifiche matrici; un esempio in questo ambito è il sistema *BEST* brevettato dall'Istituto Superiore di Sanità nel 2008 (<http://www.sprintlazio.it/downloads/company-project-profile-pharma-2009/iss-dvphfs/view>).

– Studi di trasferibilità di biosensori alle situazioni sul campo per valutarne le applicazioni ed ottimizzarne le caratteristiche in termini, ad esempio, di robustezza delle prestazioni, facilità di uso e di lettura, possibilità di integrazione in rete di biosensori in punti diversi, risparmio energetico.

2.1.b E-screen, ed altri metodi basati sulla interazione con recettori

Numerosi IE (sostanze industriali come il BPA e gli ftalati, antiparassitari come i dicarbossimidi, sostanze naturali come gli isoflavoni, ecc.) interagiscono con recettori nucleari. Mentre negli anni passati si riteneva di poter identificare in maniera semplice i diversi meccanismi, ora è sempre più chiaro come le diverse sostanze possano svolgere azione agonista in alcuni tessuti e antagonista in altri; infatti, nei diversi tessuti sono presenti coattivatori e corepressori che modulano l'azione dei ligandi con azione tessuto-specifica. Un esempio è il bisfenolo A, il quale – già considerato tipico “xenoestrogeno”- ora viene invece identificato come SERM (Selective Estrogen Receptor Modulator). L'effetto primario del bisfenolo nei diversi tessuti è tuttavia sempre basato sull'interazione con i recettori per gli estrogeni: si tratta del *meccanismo degli IE meglio studiato* e che viene preso qui come modello.

Per un primo livello di valutazione della presunta attività xeno-estrogenica di composti puri o miscele complesse derivate da alimenti e da matrici ambientali è internazionalmente accettato l'uso di test a breve termine *in vitro*. Sono stati sviluppati vari modelli che si basano su meccanismi d'azione ben conosciuti e utilizzano differenti parametri; ciascuno di questi può presentare vantaggi e limiti nel definire un composto “estrogenico”:

1) *Competitive estrogen receptor binding assays*. Il test valuta la competizione di legame tra uno xenobiotico e l'ormone naturale 17- β estradiolo con il recettore estrogeno α . Questi saggi sono stati estensivamente impiegati anche se non possono distinguere tra azioni agoniste e antagoniste, e questo è da ritenersi un limite importante oltre al fatto che il metodo è piuttosto laborioso; inoltre la sola evidenziazione di legame al recettore non è sufficiente per determinare l'estrogenicità di una sostanza, poiché la potenza è dipendente, oltre che dall'affinità di legame, dalla capacità del ligando di mantenere il legame con il recettore così da iniziare una serie di eventi a cascata che culminano con una risposta misurabile. Perciò il solo legame di una sostanza al recettore nucleare è meramente un indicatore.

2) *E-screen: cell proliferation assay*. Questi test, raggruppati sotto la denominazione di "E-screen" usano linee cellulari (essenzialmente MCF-7, ma anche T47-D) derivate da tumori mammari umani estrogeno-dipendenti. Lo "E-screen" valuta l'induzione di proliferazione cellulare da parte dello xenobiotico o della miscela: si tratta quindi di un indicatore indiretto, ma che misura una attività biologica di rilievo.

Le linee cellulari di adenocarcinoma mammario umano MCF-7 sono forse il modello *in vitro* più diffusamente usato per valutare l'azione estrogenica di farmaci e xenobiotici. La maggior parte delle linee contengono recettori α , alcune principalmente α e pochi β . Possono evidenziare attività di tipo agonista e cioè induzione di proliferazione cellulare estrogeno dipendente, ma anche antagonista e la risposta è dose dipendente. Questo test a breve termine è orientato ad evidenziare effetti estrogeno-dipendenti in cellule di provenienza umana. Sebbene la semplicità di questo test l'abbia reso interessante, molti fattori possono interferire con il risultato. Fra questi, la differenza dei vari cloni di linee cellulari, le condizioni di coltivazione, le diverse modalità di valutazione della crescita cellulare, il lotto dei sieri utilizzati per le colture. Inoltre, nel siero fetale bovino utilizzato per la coltivazione delle cellule, sono stati identificati composti mitogeni capaci di incrementare la proliferazione cellulare. Tutto ciò complica la standardizzazione del test per assicurarne la riproducibilità. Inoltre la applicabilità del test a matrici complesse (ad esempio alimenti, campioni di tessuto) e/o a miscele presenti nell'ambiente e negli alimenti deve essere ulteriormente elaborata. Un potenziale vantaggio da valutare può essere costituito dal fatto che la linea MCF-7 esprime anche recettori nucleari per gli androgeni, progesterone, glucocorticoidi in aggiunta ai recettori estrogenici: pertanto la possibilità di caratterizzare le attività di IE e loro miscele potrebbe essere più ampia di quanto attualmente riconosciuto.

3) *Reporter Gene Assays/Recombinant Receptor*. Negli ultimi 10 anni molte industrie farmaceutiche hanno usato i Reporter Gene assays con recettori ricombinanti per identificare ligandi specifici per i recettori (estrogenici, androgenici, tiroidei) per le potenziali applicazioni terapeutiche di nuovi principi attivi: il fondamento dei test si basa sul complesso costituito da un promotore endogeno associato ad un elemento di risposta agli estrogeni (ERE) o ad altri ormoni ligandi di recettori nucleari, seguita da un gene reporter

codificante un enzima, ad esempio luciferasi. Tali test sono stati anche applicati allo studio degli IE: in dipendenza della loro elevata specificità e sensibilità possono essere utilizzati per valutare la potenza relativa di composti con attività presuntivamente agonista/antagonista che si esprime con meccanismo d'azione mediato da recettore. Questa strategia ha portato alla realizzazione di test *in vitro* che ad oggi risultano essere i più promettenti in quanto sensibili, selettivi, e facilmente adottabili. Un altro esempio è il modello *Yeast Estrogen Screen* che utilizza il lievito *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificato contenente il recettore umano α (hER α) o β (hER β) per gli estrogeni ed un ERE legato ad un gene reporter che codifica per un enzima, β -galattosidasi o luciferasi: l'attivazione del recettore conseguente al legame tra recettore e ligando è misurabile attraverso l'attività enzimatica (Pinto et al., 2008). L'attività estrogenica del campione in studio può essere espressa come Efficienza Relativa di Induzione (RIE), calcolata come il rapporto tra la massima attività β -galattosidasi indotta da ogni singolo campione e quella indotta dal 17 β -E2 10nM x 100 oppure come Estradiol Equivalent (EEQs ng/l). La *sensibilità* del saggio è rappresentata dalla minima concentrazione di estradiolo che ha la capacità di dare una risposta significativamente diversa dal bianco sperimentale (solvente). Un altro approccio è quello di calcolare la *Fold Induction* cioè il rapporto tra la luminescenza indotta dal campione e la luminescenza data dal bianco (solvente).

Il modello a lievito ricombinante presenta numerosi vantaggi rispetto ad altri test *in vitro*: ad esempio la mancanza di recettori endogeni fino ad oggi conosciuti, i mezzi colturali impiegati sono privi di steroidi e il microrganismo ha una disposizione genetica che facilita l'inserzione di geni reporter di mammifero. Ha dimostrato elevata sensibilità e specificità in tutte le sue applicazioni, possibilità di determinare bassi e alti livelli di espressione con curve dose -risposta, rapidità di esecuzione e bassi costi di realizzazione. Tuttavia sono state evidenziate alcune criticità legate alla natura stessa del lievito. Ad esempio la permeabilità della parete cellulare potrebbe essere ridotta per alcune molecole, le capacità metaboliche possono essere notevolmente diverse dalle cellule di mammifero; inoltre possono esservi differenze fra i vari costrutti di *S. cerevisiae*, ad esempio nel livello di recettori espressi ed è riconosciuta una certa variabilità di crescita cellulare del lievito anche in condizioni sperimentali standardizzate e strettamente controllate. E' evidente che questi test non possono identificare le complesse interazioni e meccanismi di risposta che gli ormoni inducono in organismi pluricellulari.

4) *Linee cellulari di mammifero ricombinanti*. Linee cellulari di provenienza umana possono essere transfettate con geni reporter derivati da altre specie animali, tra cui la luciferasi nel caso del test CALUX sviluppato per composti che interagiscono coi recettori estrogeni, androgeno ed arilico (ER-, AR-, AhR-CALUX; Van der Linden et al., 2008). Varie linee cellulari sono state geneticamente costruite nel tempo e le più citate in letteratura sono:

- le linee cellulari MCF-7 e T47D entrambe derivate da adenocarcinoma mammario umano;
- la linea cellulare BG1Luc4E2 derivata da carcinoma ovarico umano che esprime i recettori endogeni α e β .

Questo tipo di test ha vantaggi e limiti desumibili da quanto precedentemente esposto; rispetto ai saggi basati su cellule di lievito ha l'evidente vantaggio di utilizzare cellule umane.

I test basati su cellule di lieviti possono essere utili per un primo livello di screening, poiché sono sensibili e specifici, facili e poco dispendiosi se paragonati ai test che usano cellule di mammifero, i quali richiedono laboriose e costose attività di laboratorio. Le cellule umane possono essere più penetrabili da parte di xenobiotici, ma i lieviti sono più resistenti ai contaminanti ambientali rispetto alle cellule di mammifero e questo è un vantaggio quando devono essere valutate complesse miscele di matrici ambientali. Pertanto si può concludere che i test basati su cellule di lievito sono migliori per il monitoraggio ambientale, anche per ragioni pratiche, per contro i test basati sull'interazione recettoriale di cellule umane sono sicuramente preferibili per lo screening di sostanze chimiche, ad esempio nell'ambito di programmi quali REACH. Ambedue i tipi di test devono venire ampliati in modo da identificare anche altri tipi di interazioni fra IE e recettori nucleari oltre a quelle con i recettori estrogeni, androgeno.

Criticità. Migliorare la robustezza e riproducibilità dei test, ed allargare il campo di applicazione: matrici, miscele e meccanismi di azione.

Per il futuro. E' necessario muoversi in due direzioni:

- sul piano della validazione scientifica occorre affrontare le rimanenti criticità per lo sviluppo dei test.
- promuovere il trasferimento e l'applicabilità su larga scala ai fini dell'utilizzo in attività di sorveglianza ambientale, alimentare ed epidemiologica.

2.1.c **Bioindicatori ambientali**

I bioindicatori sono particolarmente importanti nel monitoraggio ambientale in quanto, integrati con determinazioni chimico-analitiche e strumentali, contribuiscono ad individuare e quantificare l'effetto di un inquinante in organismi sentinella della qualità di specifici comparti ambientali (corpi idrici, sedimenti, suolo).

Pesci, molluschi e crostacei sono gli organismi sentinella più utilizzati sia nel monitoraggio chimico della contaminazione dei corpi idrici sia per lo studio degli effetti biologici indotti, ma anche i macroinvertebrati bentonici sono considerati ottimi bioindicatori per la loro abbondanza, l'ampia distribuzione, la facilità di campionamento e la limitata capacità di spostamento. E' fondamentale ricordare che un bioindicatore deve essere rappresentativo per ruolo ecologico, di facile reperibilità e mantenimento, informativo per l'area di campionamento e il più possibile conosciuto sotto il profilo genetico e funzionale per consentire la messa a punto e la validazione di indici utilizzabili nelle analisi ambientali.

Criticità. Mancano criteri condivisi nella scelta dei bioindicatori da parte dei diversi gruppi di ricerca, con il rischio di acquisire informazioni non comparabili o non complete.

Per il futuro. Una scelta condivisa di un pool di specie sentinella che, per le intrinseche caratteristiche fisiologiche costituiscano un sistema di riferimento integrato in senso spazio-temporale della qualità del loro habitat consentendo di:

valutare il rischio ambientale associato al bioaccumulo di contaminanti,
determinare lo stato di “benessere” delle popolazioni di riferimento,
soprattutto, fornire dati confrontabili tra le diverse aree studiate.

2.1.d **Biomarcatori**

I biomarcatori (variazione indotta da un composto su processi biochimici, cellulari, strutturali o funzionali, valutabile in un sistema biologico) consentono di analizzare nel tempo ed in modo quantitativo l'effetto dell'inquinante sugli organismi esposti, di effettuare indagini comparative in habitat differenti fornendo, a seconda del tipo prescelto, preziose indicazioni sul livello di esposizione, sulla associazione fra l'esposizione ed una risposta biologica od un futuro effetto e sulla suscettibilità a breve e a lungo termine. Da un punto di vista sia etico sia di efficienza è molto importante proseguire l'utilizzo, la caratterizzazione e la validazione di biomarcatori non distruttivi quali la misurazione di specifiche attività enzimatiche o il dosaggio di molecole rilevabili in sangue, feci, biopsie e muco-cutanei; questo rende possibile la raccolta di informazioni ripetute nel tempo, senza sacrificare gli organismi bioindicatori.

Per la determinazione degli effetti da IE ad azione estrogeno-mimetica nei maschi delle specie ovipare, il biomarcatore più conosciuto ed in corso di definitiva convalida è la vitellogenina (VTG), affiancato in casi più rari dalle proteine della zona radiata (Zrp). L'insorgenza di questi biomarcatori può essere monitorata a diversi livelli, attraverso l'espressione di mRNA negli epatociti primari, di concentrazione della proteina nel plasma, o, più modernamente a livello di muco cutaneo con sistemi non invasivi (dipstick o biosensori). Più recentemente, ma con evidenze di rilievo, sta diventando chiara l'imponente presenza nelle acque anche di sostanze ad attività androgenizzante ed anti-androgenizzante. A questo riguardo, l'identificazione di una glicoproteina, lo “spiggin”, prodotta dai maschi di *Gasterosteus aculeatus* durante la stagione riproduttiva, in risposta agli androgeni endogeni, ha fornito finalmente un biomarcatore di antiandrogenicità *in vivo* rilevabile direttamente, come biomarcatore biomolecolare (dosaggio della molecola mediante ELISA) nel rene delle femmine esposte ad androgeni o a molecole androgeno-mimetiche, e indirettamente come biomarcatore morfologico (morfologia delle cellule epiteliali renali). A questo riguardo, occorre ricordare come siano fortemente rivalutati i cosiddetti biomarcatori morfologici, in grado di fornire preziosissime informazioni sugli effetti cronici di IE anche in piccole concentrazioni. L'approccio morfologico, alla base di numerosi test di laboratorio (es. *Xenopus Metamorphosis Assay*) è diffusamente utilizzato negli studi

ambientali come nel caso dell'imposex dei Molluschi Gasteropodi o della intersessualità delle gonadi dei pesci e degli anfibi (per una rassegna degli effetti di IE in organismi ambientali, v. CNBBSV, 2006).

Lo *Xenopus Metamorphosis Assay* (importante per gli IE tirostatici) e la misurazione della vitellogenina nel plasma di teleostei mediante ELISA (importante per gli IE che disturbano l'omeostasi estrogeni/androgeni) sono due esempi di test di ecotossicità che utilizzano biomarcatori in organismi bioindicatori: il test su *Xenopus* è stato adottato come linea guida OECD 231 nel settembre 2009 (<http://www.oecd.org>), mentre per il saggio sulla vitellogenina è in preparazione la norma ISO (ISO/WD 23893-3, <http://www.iso.org/>).

Criticità. Al momento è difficile applicare i biomarcatori di esposizione per evidenziare in modo univoco situazioni anomale in rapporto a valori di riferimento;

- difficoltà nel trasferimento delle informazioni ottenute sui modelli di laboratorio ai bioindicatori (specie naturali) di ogni area oggetto di studio;
- la specie-specificità degli anticorpi usati nella valutazione di biomarcatori quali la VTG limita la possibilità di applicare ogni test quantitativo alla sola specie per la quale è stato preparato;
- difficoltà nella “traduzione” di osservazioni qualitative soggettive in parametri numerici che possano valutare quantitativamente le modificazioni morfologiche (ad esempio identificazione di classi a gravità crescente come per l'imposex nei gasteropodi) e che possano essere utilizzati per il trattamento statistico dei dati.

Per il futuro. Preparazione di un anticorpo ad alta interspecificità per i test semi-quantitativi della VTG utilizzabile per monitoraggi su un ampio numero di specie ittiche;

- la ricerca di un omologo allo “spiggin” in altre specie da poter utilizzare in futuri studi di monitoraggio della presenza di IE ad attività androgeno-mimetica, complementare alla VTG;
- il potenziamento degli studi sugli effetti di IE ad azione tiroideo-mimetica;
- non ultimo per importanza, la messa a punto e la standardizzazione di un pool ristretto di biomarcatori in grado di fornire un sistema di lettura degli effetti legati alla presenza di IE o gruppi di IE accomunati da determinati meccanismi di azione .

2.1.e Prospettive della tossicogenomica per il monitoraggio ambientale

I pesci (teleostei) sono assai sensibili all'inquinamento in generale ed in particolare alla presenza di IE nell'ambiente: effetti sulla differenziazione dei tessuti riproduttivi, sul comportamento sessuale e le difese immunitarie sono stati riportati in studi sperimentali e sul campo, con esposizioni molto inferiori a quelle associate ad effetti tossici “classici” quali mortalità e ritardo di crescita (per una trattazione v. CNBBSV, 2006).

Lo studio del sistema endocrino e l'analisi delle sue alterazioni sono dunque uno dei sistemi più sensibili per misurare l'inquinamento dei corpi idrici. E' inoltre da tenere in considerazione la possibilità di effetti

sinergici ed additivi che l'esposizione combinata a diverse IE può comportare; al contrario dei metodi analitici chimici, lo studio dell'organismo target "il pesce" può mettere in evidenza un effetto "cocktail" derivante dalla sommatoria di piccole quantità di molecole diverse.

Le perturbazioni dell'espressione genica possono rappresentare marker precoci di effetti ambientali, se opportunamente validate dal punto di vista della riproducibilità e del valore predittivo. La tecnologia dei microarray permette di esaminare rapidamente l'espressione differenziale di più geni nel genoma un organismo, di un tessuto o di un tipo cellulare, sottoponendo a screening centinaia o migliaia di geni contemporaneamente. Nel campo della ricerca sugli IE l'analisi dell'espressione genica può fornire un approccio sensibile per accertare la presenza di IE con effetti estrogeni (Ruggeri et al., 2008).

Criticità: insufficienza delle attuali piattaforme microarray per evidenziare effetti associati ad IE nelle principali specie di pesci teleostei identificate come bioindicatori negli ecosistemi di acqua dolce e marini.

Per il futuro: sviluppare adeguate piattaforme per le principali specie, con particolare attenzione alla robustezza e riproducibilità dei protocolli ed al valore predittivo (effetto avverso o risposta adattativa) dei risultati.

2.2. Valutazione del rischio per l'ambiente e la salute umana

2.2.a Meccanismi molecolari di interazione con sistemi viventi

La conoscenza dei meccanismi di azione è di critica importanza per la valutazione del rischio tossicologico (Hartung, 2009). La caratterizzazione dei meccanismi, ad esempio, è fondamentale per collegare effetti osservati in sistemi sperimentali con potenziali ricadute sulla salute umana, caratterizzare biomarker e valutare la possibilità di effetti additivi fra sostanze presenti in miscele: a tale proposito, diossine e composti diossina-simili rappresenta un modello per l'uso dei meccanismi nella sorveglianza dell'esposizione.

Numerosi sono i meccanismi degli IE, che possono colpire la sintesi, il trasporto e/o il catabolismo degli ormoni. In questa sede due tipi di meccanismi sono stati identificati come critici sia per la valutazione del rischio, sia per l'incremento di conoscenze: i *meccanismi recettore-mediati* e la *regolazione epigenetica*.

1) *Meccanismi recettore-mediati* Una comune caratteristica di molti IE è quella di indurre effetti di 'disregolazione': piccoli cambiamenti molecolari sufficienti, però, ad impedire la corretta risposta delle cellule bersaglio ai normali segnali di ormoni, citochine e fattori di crescita.

L'affinità dei diversi IE per i recettori nucleari è stata finora valutata soprattutto per gli ER e AR; per contro, numerosi studi indicano l'importanza dell'interazione con altri recettori (PPARs, PXR, LXR, ecc.) per sostanze identificate come IE in vivo (ad es. ftalati, PBDE, v. Cooper et al., 2008, Fery et al., 2009). Oltre al legame ligando(IE)-recettore, occorrono maggiori studi per valutare se l'affinità ligando fisiologico(ormone)-recettore rimane inalterata anche in presenza di IE. Un altro aspetto è la alterazione dei

livelli di recettore, mediante, ad es., la modulazione della velocità di turn-over delle due isoforme recettoriali. Infine, occorre valutare gli effetti dell'interazione recettoriale, cioè la capacità di modificare i segnali a valle, a livello di attivazione di chinasi coinvolte nelle vie di traduzione: in effetti, la catena di eventi fra agonismo/antagonismo recettoriale e modificazione morfofunzionale di cellule/tessuti rappresenta ancora in gran parte una “scatola nera”.

Criticità. E'insufficiente la caratterizzazione delle interazioni fra IE ed recettori nucleari nonché della associazione interazione-effetto avverso. Occorre considerare maggiormente problemi come il cross-talk fra i recettori nucleari e l'interazione fra IE ed agonisti fisiologici sullo stesso recettore.

Per il futuro. Lo studio delle interazioni IE-recettori nucleari deve indirizzarsi ad obiettivi di potenziale rilievo per la sanità pubblica: caratterizzazione della dose-risposta per gli effetti critici per la valutazione del rischio, identificazione di biomarker precoci, potenziali effetti additivi di miscele. In questo ambito occorre sviluppare modelli sperimentali che forniscano informazioni atte a valutare le differenti vulnerabilità legate al sesso ed alla fase del ciclo vitale.

2) Meccanismi di modulazione epigenetica: associazione con effetti a lungo termine e/o transgenerazionale

L'epigenetica è un complesso di meccanismi il cui studio sta assumendo rilievo prioritario per la comprensione delle interazioni genoma-ambiente. I meccanismi epigenetici consentono di ottenere una espressione differenziale dei geni grazie a cambiamenti dello stato di aggregazione della cromatina, indotti da modifiche delle proteine (istoni) che ne stabilizzano la struttura (Marlowe et al., 2009). Sono modifiche epigenetiche, ad esempio, quelle che determinano il compattamento cromatinico e, quindi, il silenziamento di uno dei due cromosomi X nelle donne con formazione del cosiddetto “corpo di Barr”, così come quelle alla base dell’*“imprinting genomico”*, fenomeno che si manifesta nella non equivalenza nell’espressione degli alleli in certi loci, in relazione alla derivazione materna o paterna degli stessi. Molte patologie di rilievo socio-sanitario -tumori, disordini neurologici, malattie autoimmuni, malformazioni- presentano meccanismi epigenetici aberranti. L'attivazione erronea, o la mancata attivazione fisiologica, di recettori nucleari è un meccanismo di alterazione epigenetica importante. Comprendere le basi di questi fenomeni e le vie di traduzione del segnale che li determinano è quindi fondamentale per comprendere i meccanismi d’azione degli IE ed il loro legame con effetti a lungo termine e/o transgenerazionali (Tait, 2007). Un esempio noto di possibile effetto epigenetico transgenerazionale di IE è stato l'aumento di nati di sesso femminile dopo l'incidente di Seveso (Mocarelli et al., 2000); tuttavia, lo spettro dei possibili effetti dovuti ad alterata regolazione epigenetica è molto lontano dall'essere caratterizzato..

Le alterazioni epigenetiche indotte da fattori ambientali possono portare a modificazioni del ciclo cellulare, del differenziamento e dell’apoptosi nei tessuti bersaglio. In particolare, alcune alterazioni molecolari

associate a meccanismi epigenetici potrebbero essere indagate per comprendere la regolazione dell'espressione genica indotta da IE, portando quindi allo sviluppo di biomarker precoci:

- marker istonici di espressione genica (H3K9Ac, H3k4me, Hek27me, ecc), sia come alterazione dei livelli generali, sia come modulazione dell'attivazione di specifici promotori responsivi ad IE (analisi globale dei dati mediante la tecnica *Chromatin IP -ChIP-Seq-* associata a PCR quantitativa) (Yaragatti et al., 2008): un esempio è il promotore di PS2 come responsivo agli estrogeni (Papoutsis et al., 2009);
- modificazioni post-trasduzionali su proteine 'target' (ad es., Era, AR), valutandone lo stato di fosforilazione e di acetilazione; un modello sperimentale può essere rappresentato da linee cellulari ingegnerizzate in cui è stata espressa la proteina modificata post-trasduzionalmente nello specifico residuo.
- marcatori di effetti cellulari di meccanismi epigenetici, quali apoptosi (attivazioni delle caspasi iniziatrici, variazione del potenziale mitocondriale, ecc.) e differenziamento (valutazione di proteine di membrana mediante citofluorimetria)

Criticità. Una migliore conoscenza degli effetti epigenetici di specifici IE è importante per la comprensione degli effetti biologici a lungo termine e/o transgenerazionali, compresa la interazione con modulatori epigenetici fisiologici (ad es., ormoni steroidi) o nutrizionali (ad es., retinoidi, folati).

Per il futuro. Lo studio degli effetti epigenetici dovrà diventare parte integrante della ricerca sugli effetti degli IE, sviluppando opportuni test e biomarker.

La valutazione del rischio degli IE dovrà tenere conto specificamente degli effetti sulle generazioni future, nel quadro del nuovo concetto di "sviluppo sostenibile", che considera anche gli effetti sulla salute nella dimensione temporale transgenerazionale (Frazzoli et al., 2009)

2.2.b **Tossicologia ed ecotossicologia: metodi innovativi**

2.2.b.1 *Tossicologia in silico: QSAR.* I modelli QSAR (*Quantitative Structure-Activity Relationships*) permettono di predire, su base strutturale, attività biologiche e/o proprietà chimico-fisiche per composti chimici per i quali non sono disponibili i corrispondenti dati sperimentali.

I modelli QSAR si basano sull'informazione esistente (dati sperimentali noti), utilizzando descrittori numerici della struttura molecolare e sviluppando modelli statistico-matematici (di regressione o classificazione); in tal modo si possono predire dati per proprietà chimico-fisiche o attività biologiche: tossicità acuta o cronica: cancerogenesi, mutagenesi, interferenza endocrina, ecc. Gli QSAR si applicano sia a composti esistenti, per i quali non sono noti i dati sperimentali, sia per progettare la sintesi di composti più utili e sicuri. Tale modellistica predittiva, già da tempo ampiamente utilizzati dall'industria farmaceutica nel campo del *Drug Design*, per individuare, su base strutturale, i composti di maggior interesse da sintetizzare, riducendo quindi i costi ed i tempi della sperimentazione, viene ora ritenuta di particolare importanza nell'ambito della nuova normativa europea REACH (Zachary e Greenway, 2009). Le applicazioni di tale

modellamento si sono finora focalizzate principalmente a problematiche di interesse ambientale, studiando le proprietà di persistenza, bioaccumulo e tossicità (PBT) di inquinanti ambientale, come pure diverse proprietà chimico-fisiche. Tra le attività biologiche un interesse particolare si è concentrato più recentemente sugli IE (Serafimova et al., 2007). Lo sviluppo di modelli per sostanze potenziali PBT od IE è particolarmente importante perché, in ambito REACH, per tali composti è prevista la più rigida procedura di Autorizzazione e la richiesta di trovare alternative più sicure, che possono essere individuate *a priori* e progettate solo con l'aiuto della modellistica QSAR (*Chemical Design*).

La modellistica QSAR richiede le conoscenze di “buon modellamento” con rigidi controlli per la validazione (Gramatica, 2007; Tropsha et al., 2003), e può essere applicata ad ampie tipologie di sostanze (Hewitt et al., 2007; Roncaglioni et al., 2008)

Criticità. I modelli QSAR si basano sui dati sperimentali esistenti, ma questi sono disponibili in maniera esaustiva solo per un limitato numero di composti chimici e di meccanismi di tossicità

Per il futuro. Lo sviluppo dei modelli QSAR deve andare di pari passo con la crescita delle conoscenze sugli IE e sui loro meccanismi. Soprattutto, lo sviluppo dei QSAR è importante per applicare efficacemente il principio di sostituzione propugnato da REACH (v. 2.3.b.4).

2.2.b.2. *Sviluppo di test in vitro* . Lo sviluppo di test *in vitro* è indispensabile sia per motivi etici nei confronti degli animali non-umani sia per la tutela del cittadino e dell'ambiente: è infatti impensabile saggiare le migliaia di sostanze chimiche oggetto del programma REACH attraverso complessi, lunghi e costosi test in vivo. A questo si deve aggiungere che REACH che non comprende, alcuni ambiti -in quanto già coperti da normative europee specifiche, anch'esse in evoluzione-, che hanno grande importanza per la tutela del cittadino e specificamente per la prevenzione dei rischi da esposizione a IE: pesticidi, additivi ed integratori alimentari, cosmetici, mangimistica, farmaci zootecnici (per alcuni esempi del rilievo di questi ambiti nel problema IE v. CNBBSV, 2006). Mentre a livello OECD vi è una intensa attività di validazione di test *in vitro* sugli IE, con la sostanziale partecipazione di centri di ricerca ed industrie europee, in Europa la mancanza di specifiche procedure di autorizzazione per gli IE nell'ambito del REACH (v. 2.3.b.1) fa sì che non vi sia un approccio strategico per una batteria di screening. Per contro, la US *Environmental Protection Agency* ha iniziato già dal 2004 un programma di validazione di alcuni test per IE. Il programma si basa sulle conclusioni raggiunte da una apposita commissione e pubblicate nel 2002 nel documento *Validation Status of In Vitro Test Methods for Detecting Endocrine Disruptors* (http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/endo_docs/expertpanfinalrpt/panelrpt1102.pdf).

In tale documento vengono definiti alcuni standard minimi procedurali e una lista di 78 composti che potrebbero essere utilizzati per standardizzare e convalidare i test di legame e di attivazione trascrizionale di ER α e AR. Si tratta quindi di un programma del tutto insufficiente per la piena caratterizzazione degli effetti

di IE, ma che rappresenta comunque un passo avanti rispetto alla situazione europea. In Europa vi è stato certamente un sostegno imponente allo sviluppo dei test *in vitro* (anche sugli IE) nell'ambito degli ultimi programmi quadro (Commissione Europea, 2009): ma è mancato sinora l'aspetto “*traslazionale*” cioè la capacità di tradurre i progressi della ricerca in un rinnovamento delle strategie di saggio delle sostanze chimiche. E' chiaro che nessun test *in vitro* potrà essere, preso singolarmente, un valido modello per effetti a lungo termine sui sistemi di “segnalazione” dell'organismo come quelli indotti dagli IE: è pertanto necessario a) integrare i test disponibili sugli IE in batterie di test (obiettivo del progetto europeo ReProtect, www.reprotect.eu). Inoltre, alcuni parametri (es. effetti neuroendocrini) rimangono scoperti, per cui è anche importante mettere a punto nuovi test.

A livello europeo i *criteri per la eleggibilità di un test alla sua validazione internazionale* sono: definizione del test; variabilità intra-laboratorio; trasferibilità; variabilità interlaboratorio; capacità predittiva; ambiti di applicabilità; standard di performance. il processo di validazione di un test comporta un periodo molto lungo (circa 10 anni) prima che possa essere accettato come metodo a livello regolamentativo; proposte per snellire e rendere più efficiente questo processo sono state recentemente avanzate dalla *European Partnership for Alternative Approaches to Animal Testing* (Hoffmann et al., 2008)). Al momento sono in corso di validazione diversi test *in vitro*, accomunati dalla caratteristica di utilizzare cellule di derivazione tumorale umana (mammella, osteosarcoma, prostata, ovaio) e di evidenziare la capacità di un composto di esprimere attività agonista e/o antagonista nei confronti di recettori nucleari estrogeni e/o androgeno, nonché per identificare effetti sull'aromatasi. Ai fini della caratterizzazione delle potenzialità dei test è importante sapere se il test valuta direttamente marcatori associati ai recettori nucleari, es., induzione di proliferazione cellulare, o se le cellule sono transfettate (ingegnerizzate) ed esprimono attività enzimatica indotta dalla trascrizione di un gene reporter di altra specie animale.

Lo E-screen test, già citato (2.1.b), per quanto limitato solo agli effetti estrogenici può essere considerato un buon modello per lo sviluppo di test *standardizzati e trasferibili* per lo screening di ampi numeri di molecole (*high-throughput screening*): questo tipo di test permette anche di creare una base di dati considerevole per lo sviluppo di QSAR (2.2.b.1). Per una panoramica dei test *in vitro* utilizzati in tossicità riproduttiva, e quindi di particolare rilievo per gli IE -tenendo conto che il quadro è in evoluzione- v. Bremer et al (3005).

Lo sviluppo di test *in vitro* è quindi importante per motivi

- di protezione del pubblico, permettendo la caratterizzazione in tempi più brevi di sostanze a rischio
- pratici, permettendo la reale applicazione di normative, in primo luogo REACH
- etici: anche se è difficile ipotizzare la sostituzione dei test *in vivo* per effetti complessi e a lungo termine, quali quelli indotti dagli IE, i sistemi *in vitro* possono integrare gli studi *in vivo*, riducendo

la durata degli studi ed il numero di animali impiegati nonché chiarendo i meccanismi alla base degli effetti (v. ad es., Maranghi et al., 2007);

- scientifici: infatti, in molti casi la reale validazione, la sensibilità, specificità e applicabilità al rischio per la salute umana dei test tossicologici su animali sono meno che ottimali, ed i test *in vitro* potrebbero contribuire ad una tossicologia con più solide basi scientifiche (Hartung, 2009).

Al momento attuale, tuttavia, l'uso dei test *in vitro* per la valutazione del rischio degli IE e di altri contaminanti che inducono effetti a lungo termine presenta serie criticità, che devono venire affrontate in tempi utili

Criticità. Occorrono ulteriori modelli per la valutazione di effetti di IE diversi dalla alterazione della omeostasi di estrogeni/androgeni.

I test *in vitro* sono in massima parte effettuati su colture bidimensionali di un singolo tipo cellulare: la capacità di fornire un modello per effetti cronici a livello tissutale (ad es., promozione tumorale) può essere limitata. Lo sviluppo in tossicologia dei sistemi tridimensionali *in vitro* è tuttora molto limitato.

Lo sviluppo di test, già disponibili e nuovi, prosegue con vigore ma si è in ritardo nello sviluppo di batterie integrate, un aspetto indispensabile per il rinnovamento delle strategie di saggio.

Per il futuro. Occorrono nuovi test per ottenere uno spettro più completo di meccanismi d'azione degli IE (ad es. interazione con l'omeostasi di tiroide, glucorticoidi, insulina, ipofisi, adipochine) e bersagli (ad es., sistema scheletrico e prostata, importanti bersagli per i quali non vi sono ancora test in corso di validazione) Occorre sostenere lo sviluppo, anche in tossicologia, delle colture tridimensionali di organo e/o tessuto come modelli innovativi e maggiormente accurati riguardo alle interazioni fra xeno biotici e bersagli biologici (Mazzoleni et al., 2009)

E' indispensabile dare maggiore priorità all'integrazione dei test in batterie. Tali strategie dovranno necessariamente incorporare sempre di più le conoscenze sui meccanismi di azione fornite dai nuovi approcci biomolecolari (v. anche 2.2.a e 2.2.c).

2.2.c Lo sviluppo dell'approccio meccanicistico alla valutazione del rischio tossicologico

Un valido contributo alla valutazione del rischio tossicologico da IE potrà venire in futuro dal perfezionamento di due efficaci strumenti di indagine: (a) lo studio sistematico dei meccanismi molecolari che governano l'interazione degli IE con i sistemi viventi e (b) l'applicazione di biomarcatori molecolari.

Questi metodi saranno molto utili per trasferire all'uomo le informazioni acquisite su modelli sperimentali, per confrontare singoli composti o miscele di IE in termini di natura e potenza dell'azione e per valutare in forma integrata le risposte ottenute in scenari differenti.

Negli ultimi anni, si è registrato un notevole l'avanzamento delle conoscenze sui meccanismi molecolari che determinano l'interazione degli IE con gli organismi viventi (2.2.a). Un comune meccanismo riconosciuto è

la capacità degli IE di indurre fini alterazioni di processi biochimici e molecolari cui si deve il mantenimento di equilibri omeostatici in cellule, tessuti e sistemi fisiologici integrati; tali alterazioni compaiono ben prima di segni obiettivi di tossicità. Persistendo nel tempo (a seguito di esposizioni ripetute e/o continue e/o di bioaccumulo) e in presenza di fattori individuali di vulnerabilità, esse si accentuano fino a dar vita a fenomeni di disregolazione a carico, in primis, dei sistemi riproduttivo, nervoso ed immunitario.

Le conoscenze sulla biologia dei sistemi e le nuove metodologie offerte dai recenti approcci della “omica” offrono preziosi strumenti per l’analisi degli effetti di IE.

In un prossimo futuro, l’azione degli IE potrà essere studiata esaminando, in contemporanea, un numero relativamente limitato di processi cellulari e molecolari (“*toxicity pathways*”) mediante test basati su parametri biomolecolari integrati da metodi d’analisi bioinformatica (Hartung, 2009). Una volta inquadrati in strategie generali di ricerca ed in un disegno coerente con i requisiti regolatori, gli studi meccanicistici aumenteranno di molto il valore predittivo degli studi tossicologici e la precisione dei metodi di valutazione del rischio chimico.

I vantaggi attesi comprendono

- la possibilità di acquisire un gran numero di dati empirici attraverso serie limitate di test biologici
- la possibilità di caratterizzare gli effetti anche a bassi livelli di esposizione
- l’utilizzo di cellule umane e l’impiego ridotto di animali di laboratorio
- la confrontabilità dei dati sperimentali.

L’impiego delle nuove tecniche di indagine molecolare servirà a classificare le sostanze in rapporto alle proprietà IE (come richiesto da REACH), a caratterizzarne la potenza a livelli di esposizione attesi nell’ambiente e a confrontare sostanze aventi meccanismo d’azione identico (es. attive sullo stesso recettore) o dissimile, ma con bersaglio biologico analogo (es. IE che interagiscono con i recettori o con la sintesi di steroidi). Sarà anche possibile diminuire il livello di incertezza delle stime del rischio attraverso strategie non più centrate meramente sull’extrapolazione matematica di dati tossicologici (dalle alte alle basse dosi, dall’animale all’uomo, ecc.), nonché affinare le procedure di indagine epidemiologica mediante biomarker ricavati dagli studi sui meccanismi.

Criticità. La integrazione degli studi meccanicistici ed in particolare delle strategie basate sulle “omiche” nella valutazione del rischio deve affrontare problemi quali la confrontabilità dei dati fra diversi laboratori e protocolli sperimentali, la predittività biologica delle alterazioni molecolari, la associazione fra meccanismi e condizione dell’organismo (sesso, età, fase del ciclo vitale)

Per il futuro. Occorre aumentare la base di dati su IE ed altri contaminanti emergenti ottenuti da studi che utilizzano le “omiche”, anche con l'obiettivo di aumentare la robustezza dei protocolli e la riproducibilità dei risultati

La predittività biologica delle alterazioni biomolecolari va rafforzata mediante strategie di ricerca miranti a a) integrare le “omiche” con marcatori morfologici e/o funzionali di effetto (“*phenotypic anchoring*”) (Daston, 2008) e/o b) valutare l'associazione fra alterazioni biomolecolari indotte da uno specifico IE e condizione dell'organismo. In tale ambito, lo sviluppo di modelli innovativi in vivo può dare informazioni importanti sulle interazioni fra IE e tessuti nell'organismo integro: in Italia, un progresso importante è stato fornito dai modelli che permettono di seguire l'andamento delle interazioni molecole-tessuti nel tempo utilizzando tecniche di analisi dell'immagine (Montani et al., 2008).

2.2.d *Valutazione del rischio di miscele: modelli sperimentali e strategie*

Le miscele rappresentano, nella grande maggioranza dei casi, la situazione *reale* di esposizione delle popolazioni e degli ecosistemi. La moderna cultura tossicologica distingue le *esposizioni combinate* (compresenza di IE in un singolo alimento/matrice: es., residui multipli di pesticidi negli alimenti vegetali, compresenza di IE liposolubili e persistenti in alimenti come pesce e latticini) dalle *esposizioni aggregate* (nello stesso individuo, esposto a IE differenti attraverso diversi alimenti/vie di esposizione).

L'approccio meccanicistico alla valutazione del rischio (2.2.c.1) è di particolare rilievo per la valutazione delle miscele (EFSA, 2009). Con i nuovi metodi si potranno ottenere dati sperimentali sugli effetti totali di miscele complesse anche quando i singoli IE siano contenuti nella matrice ciascuno in concentrazioni che non risultano attive nei classici test tossicologici. Si potrà integrare nello stesso modello di esposizione lo studio di xenobiotici e di sostanze naturali (es. fitoestrogeni e xenoestrogeni, l'esposizione a diossine e i composti naturali presenti nella frutta che interagiscono con AhR) (Baldi e Mantovani, 2008), determinare il significato delle interazioni (effetti additivi o protettivi) e condurre valutazioni di rischio cumulative (NRC, 2008). Quest'ultimo aspetto ha importanza tutte le volte in cui, assieme agli IE, sia documentata la presenza di noxae coincidenti o di fattori che accentuano la vulnerabilità individuale agli IE (fattori genetici e costituzionali, gravidanza, condizioni di stress, particolari stili di vita, uso di psicofarmaci, ecc.). E' oggi noto che molti di questi fattori sono in grado di influenzare gli stessi meccanismi di regolazione omeostatica conosciuti come bersaglio d'azione degli IE.

Un esempio di valutazione del rischio cumulativo è il recente studio sugli ftalati condotto dal US *National Research Council* (NRC, 2008). Il criterio dosimetrico utilizzato per le diossine, basato sui TEF e la potenza dell'interazione con AhR non sia idoneo per altre categorie di IE per le quali i meccanismi sono tuttora non chiaramente definiti, possono essere multipli (ad es., la genisteina, fitoestrogeno della soia agonista estrogenico ma anche tireostatico; Hampl et al., 2008), nonché differire fra composti chimicamente simili e

che si ritrovano nelle stesse matrici (ad es., i PCB, che includono composti sia ad azione diossina-simile sia che non interagiscono con AhR). Va anche ricordato che certi IE presentano, con il variare della dose, effetti diversi. Ad esempio, studi *in vitro* indicano che alcuni fitoestrogeni agiscono come inibitori dell'aromatasi a basse concentrazioni (< 1 uM) mentre hanno azione estrogenica a concentrazioni > 1 uM, presentando una tipica curva dose-risposta ad U (Almstrup et al., 2002). Pertanto, anche la eventuale dose-additività potrebbe essere in funzione della concentrazione dei singoli composti nella miscela.

Criticità. La valutazione del rischio di miscele è uno dei campi meno esplorati ma più importanti per la valutazione del rischio tossicologico. Un esempio, nel campo della sicurezza alimentare, è la compresenza in determinate matrici (ad es., latte/latticini, prodotti ittici) di tracce di diversi contaminanti in grado di bioaccumulare, ciascuno a concentrazioni al di sotto di quelle massime tollerate.

Per il futuro. Occorre potenziare gli studi per la valutazione del rischio di miscele identificando come priorità dovrebbe essere le miscele contenenti IE con almeno una delle seguenti caratteristiche: rappresentativi di classi di composti più ampie, più attivi (secondo le informazioni tossicologiche ed epidemiologiche esistenti), di riscontro più comune in scenari di esposizione realistici (secondo i dati di monitoraggio ambientale, alimentare o biologico) o in ragione degli impieghi previsti (dati su sostanze e prodotti censiti nel quadro degli adempimenti REACH).

2.2.e **Epidemiologia**

Il documento “*Sorveglianza dell'esposizione a interferenti endocrini*” (CNBBSV, 2006) ha evidenziato come gli studi epidemiologici siano -segnatamente in Italia- uno degli aspetti critici per lo sviluppo della ricerca sugli IE; questa valutazione è stata confermata dal censimento della ricerca italiana sugli IE, lanciato congiuntamente dall'Istituto Superiore di Sanità e dall'Istituto Nazionale Biostrutture e Biosistemi ed i cui risultati preliminari sono stati presentati al workshop nazionale sugli IE organizzato nell'ottobre 2008 (Calamandrei et al., 2009). Sviluppando le raccomandazioni di (CNBBSV, 2006) va data particolare attenzione a: patologie riproduttive (compresi tumori dei tessuti bersaglio, Martin et al., 2007) e tiroidee, agli effetti a lungo termine dell'esposizione prenatale, soprattutto riguardo allo sviluppo neurocomportamentale ed alla sindrome metabolica (Newbold et al., 2007), nonché a gruppi con specifiche modalità di esposizione (bambini, lavoratori).

Soprattutto, in situazioni potenzialmente a rischio, è indispensabile integrare la epidemiologia classica, con la valutazione del contesto ambientale e con l'uso di biomarcatori, che possono essere considerati come la vera interfaccia fra tossicologia ed epidemiologia: un esempio positivo a tale proposito è il lavoro avviato, con il coordinamento del CNR, nell'area di Gela (Musmeci et al., 2009).

2.2.f **Sviluppo di biomarcatori di esposizione/effetto/suscettibilità**

Lo sviluppo di biomarcatori è fondamentale per la messa a punto di strategie di *prevenzione traslazionale*: (“*from bench to risk assessment*”); esso prevede la capitalizzazione delle nuove conoscenze sulla “omica” e la biologia dei sistemi per mettere a punto tecnologie e strumenti utilizzabili per lo sorveglianza sanitaria ed in grado fornire segnali *precoci* della necessità di interventi di prevenzione. L’uso di biomarcatori avrà in futuro un ruolo sempre importante in campo epidemiologico e negli studi condotti volti a definire i valori limite di soglia ed i rapporti esposizione/effetto nell’uomo (Scheepers, 2008): una rassegna critica dell’uso dei dati di tossicologia sperimentale per caratterizzare possibili biomarker di pesticidi con effetti endocrini è fornita da Mantovani et al. (2008). PREVIENI è un primo esempio di progetto nazionale incentrato sull’uso di biomarker di esposizione ed effetto per la valutazione dell’impatto di IE sulla fertilità; il progetto è finanziato dal Ministero per l’Ambiente, la tutela del territorio e del mare e coordinato dall’Istituto Superiore di Sanità (<http://www.iss.it/prvn>).

1) *Biomarcatori di esposizione*. I progressi nell’area chimico-analitica permetteranno di utilizzare marker specifici di esposizione (singole categorie o singoli IE) e quindi di definire meglio il ruolo esercitato da ciascuna classe di sostanze in scenari di esposizione definiti (Huang et al, 2007; Wolff et al. 2007). Importante sarà anche lo sviluppo dell’uso di *biomarker di esposizione totale* (ad es., il carico totale di attività xenoestrogena, Fernandez et al., 2008), per lo screening di campioni in largo numero in modo da concentrare le analisi chimiche specifiche sui campioni “fuori range”.

2) *Biomarcatori di effetto*. Dosaggi ormonali ed enzimatici e parametri seminologici sono possibili biomarker di effetto per il monitoraggio biologico degli IE, con le dovute cautele (validazione analitica, robustezza, fattori confondenti, ecc.); tra i parametri seminologici va segnalata la valutazione della integrità della cromatina spermatica (Spanò et al., 2005). E’ importante caratterizzare marcatori molecolari derivati da studi sperimentali che utilizzano le strategie di “omica” (Mantovani et al., 2008). Preliminare applicazione, sia in modelli animali che nell’uomo, è stata fatta recentemente di alcuni marker che, utilizzando matrici biologiche accessibili (piastrine, linfociti), misurano parametri neurochimici collegati all’azione neurotossica di IE (Coccini et al, 2009). Altre interessanti applicazioni si prospettano con l’affinamento delle tecniche di imaging molecolare, per il momento messe a punto solo in modelli animali (Di Lorenzo et al, 2008).

3) *Biomarcatori di suscettibilità*. Al momento non vi è una strategia per identificare biomarker di suscettibilità per gli IE. Occorre capitalizzare e sviluppare le informazioni sparse che identificano, quali potenziali biomarker di suscettibilità, a) polimorfismi genetici, sia di enzimi del metabolismo (ad es., dei folati: Paracchini et al., 2006) sia recettoriali (Giwercman et al., 2007; Rigon et al., 2009), e soprattutto b) marker dello status nutrizionale, ad esempio, i livelli di vitamine ed elementi in traccia antiossidanti (Baldi e Mantovani, 2008).

Criticità. Lo sviluppo dell'uso di biomarcatori deve affrontare criticità quali la predittività in termini di rischi per la salute, e la definizione di valori di riferimento in associazione con genere, età, stato fisiologico e stili di vita

Per il futuro: La validazione di possibili biomarcatori deve considerare sia l'aspetto analitico (riproducibilità, ripetibilità, incertezza, trasferibilità) sia l'aspetto biologico (predittività di un certo tipo o livello di rischio) E' indispensabile rafforzare gli studi epidemiologici sugli IE, utilizzando biomarcatori basati su solide evidenze tossicologiche, e concentrandosi su specifiche patologie (2.2.e) e/o situazioni espositive.

Per gli studi sull'infanzia, quali gli studi di coorte madre-bambino (2.2.g) occorre sviluppare biomarcatori di minima invasività, usando matrici quali capelli, saliva, strisci boccali.

2.2.g **Banche biologiche e banche dati**

1) **Banche biologiche umane.** Lo sviluppo di banche biologiche ed un migliore utilizzo di banche dati attualmente esistenti è di interesse prioritario per un approccio integrato allo studio degli effetti sulla salute dell'esposizione a sostanze chimiche. L'interazione tra geni, ambiente e stili di vita è la base multifattoriale di gran parte delle patologie: le banche biologiche, intese come strumento per raccogliere ed analizzare i dati derivanti da queste tre fonti, rappresentano "risorse critiche" per l'avanzamento scientifico in campo sanitario, con notevoli potenzialità per ciò che riguarda lo studio degli IE.

Per *banca biologica* si intende una collezione di campioni biologici (generalmente sangue, cellule, DNA, tessuti) relativi a

- soggetti sani (banche di popolazione, coorti di nascita)
- soggetti affetti da una specifica patologia o
- soggetti esposti a definiti fattori di rischio (ambientali o genetici).

La comunità scientifica internazionale sempre più fermamente sta esprimendo la necessità di allestire banche biologiche per la ricerca, sebbene la realizzazione di questi strumenti risulti complessa nella progettazione e nella gestione, compresi anche delicati aspetti etici (reclutamento, consenso informato, comunicazione dei risultati). Generalmente le banche biologiche sono avviate a partire da un preciso progetto di ricerca, continuando poi a fornire dati ad altri progetti. Nel campo "ambientale", in Europa il singolo esempio più importante è il progetto *NewGeneris* (<http://www.newgeneris.org>) che prevede lo sviluppo di nuove banche e l'utilizzo di banche già esistenti per lo studio dell'esposizione madre-bambino a cancerogeni alimentari. Un altro approccio che si sta tentando in Europa, nel contesto della strategia europea "Ambiente e Salute", è l'istituzione di queste raccolte complesse quali strumenti concepiti per grandi studi di popolazione al fine di rispondere ai quesiti che il progresso conoscitivo e le evidenze accumulate producono progressivamente: verso questo obiettivo direzione si è mosso il primo incontro della *European Conference on Human*

Biomonitoring (Parigi, 4-5/11/2008; <http://www.invs.sante.fr/publications/2008/biosurveillance>), cui è purtroppo mancato il contributo italiano.

L'opportunità di conservare materiale biologico oltre gli scopi di un singolo progetto genera da un lato problemi di tipo etico, che implicano evidentemente l'esigenza di un consenso informato "ampliato" che vada ben oltre il semplice "consenso al prelievo" e che illustri chiaramente l'intento di conservazione del materiale biologico per un suo possibile uso futuro; d'altro canto essa costituisce una grande potenzialità per la ricerca, grazie anche alle possibilità offerte dalle strategie della "omica". Il materiale biologico raccolto in una biobanca può essere utilizzato nelle sue reali potenzialità ove corredato da informazioni, la cui raccolta, gestione e valutazione siano di solida qualità; ad esempio quelle derivanti da un registro di patologia associato. In queste condizioni una biobanca può dare un apporto molto serio sui rapporti di casualità tra esposizioni e insorgenza di specifiche patologie. A titolo esemplificativo, si può citare il Registro Nazionale degli Ipotiroidei Congeniti (coordinato dall'Istituto Superiore di Sanità) al quale, da qualche anno, è stata associata una banca biologica (DNA e sangue) dei pazienti affetti da ipotiroidismo congenito (<http://www.iss.it/rnic/>). La possibilità di effettuare determinazioni di marcatori di esposizione, di suscettibilità e di effetto fornita dalla disponibilità del materiale biologico raccolto dalla biobanca, congiuntamente alla disponibilità di informazioni dettagliate sui pazienti (cliniche, anamnestiche, demografiche, ecc..) costituisce una potenzialità per la comprensione del ruolo giocato dai fattori di rischio genetici e ambientali nell'eziopatogenesi della più frequente endocrinopatia dell'infanzia (Medda et al., 2005).

2) *Banche biologiche sperimentali*. Seguendo il modello di quanto si sta già realizzando in altri Paesi ed in altri settori (Becker e Wise, 2006; Kelly-Spratt et al., 2009), è opportuno sviluppare una rete di collaborazioni, nazionali ed internazionali, finalizzata alla realizzazione di banche che raccolgano campioni biologici di animali da esperimento esposti a IE (*animal model biobanks*). Questa specifica tipologia di biobanche risulterebbe particolarmente utile per facilitare la collaborazione fra gruppi con tecnologie, obiettivi ed approcci sperimentali diversi e potrebbe risultare in una riduzione del numero di animali sperimentali ed in una ottimizzazione del loro utilizzo, anche evitando la duplicazione di numerosi studi.

3) *Banche dati*. Le banche dati dovrebbero rappresentare -insieme alle banche biologiche che sono sicuramente più impegnative e più ricche di potenzialità- un patrimonio cui una comunità scientifica ricorre quotidianamente e del cui mantenimento e sviluppo conosce bene l'importanza. Tuttavia, la comunità scientifica nazionale, in cui ancora le tematiche innovative della prevenzione non trovano lo spazio che meritano, tende a sottovalutare il ruolo delle banche dati. Per contro, una maggior conoscenza ed un miglior utilizzo delle banche dati attualmente disponibili, prima ancora di svilupparne di nuove, consentirebbe di disporre di un ulteriore strumento per l'attuazione di una strategia di studio e di intervento relativamente al

problema degli IE. Di importanza primaria, anche se non possono essere considerati specifiche banche dati, sono le raccolte di valutazioni di agenzie internazionali come l'EFSA (<http://www.efsa.europa.eu/>), la US CDC *Agency for toxic Substances and Disease Registry* (ATSDR, <http://www.atsdr.cdc.gov/>) e lo *International Programme on Chemical Safety* (IPCS) della WHO (<http://www.who.int/ipcs/en/>). Accanto a queste, esistono -e vanno utilizzate e rafforzate- banche dati specifiche nazionali. Ad esempio, la banca dati EDID (*Endocrine Disrupting chemical-Diet Interactions Database*, <http://www.iss.it/inte/edid/index.php?lang=1&tipo=18&anno=2009>) dell'Istituto Superiore di Sanità rappresenta una base di dati sugli studi presenti nella letteratura internazionale, riguardanti sia sistemi sperimentali sia popolazioni animali o umane, relativamente agli effetti delle esposizioni derivanti dalle interazioni tra componenti alimentari e IE. Si tratta della prima ed unica banca dedicata a questo aspetto, di notevole importanza per la sicurezza alimentare e per la protezione di popolazioni esposte. Un'altra importante fonte di dati è rappresentata dalle *banche dati ambientali*, sia di carattere nazionale (ISPRA-Istituto Superiore per la protezione e la ricerca ambientale; <http://www.apat.gov.it/>) che regionale attraverso le Agenzie Regionali per la Protezione dell'Ambiente. Sebbene ancora limitatamente disponibili in rete, queste consentono di definire la mappatura del rischio legato alle attività agricole o industriali di una determinata area geografica e, potenzialmente, dell'intero territorio nazionale. Tali informazioni, se associate ad un'adeguata attività di sorveglianza epidemiologica, possono contribuire a verificare ipotesi intese ad interpretare eccessi di malattia in aree in cui sono o sono stati presenti insediamenti produttivi, industriali o agricoli (Bianchi et al., 2006). Infine, come già precedentemente accennato, i *registri di patologia* rappresentano un patrimonio informativo insostituibile, soprattutto se riferiti ad una popolazione (*population-based*) e non ad un campione di soggetti affetti da una determinata patologia. Inoltre, se caratterizzati da un lungo periodo di attività, i registri di patologia consentono di analizzare le eventuali variazioni spazio-temporali dell'incidenza della patologia di cui effettuano la sorveglianza, evidenziando possibili aree ad alta incidenza ed offrendo, in tal modo, l'opportunità di verificare la possibile associazione con eventuali esposizioni ambientali. In Italia, nel campo ambiente e salute, è importante la rete dei registri delle malformazioni congenite, organizzata su base regionale con il coordinamento del Centro Nazionale Malattie Rare dell'ISS (<http://www.iss.it/cnmr>) e collegata ad altre reti di sorveglianza europee. In Italia, i dati del registro siciliano delle malformazioni congenite sono serviti come base per valutare l'esposizione a pesticidi e l'alimentazione come fattori di rischio per ipospadia e criptorchidismo, due malformazioni associate agli IE (Carbone et al., 2006; Giordano et al., 2008); un modello di uso integrato di una base di dati ambientali (mappatura dell'uso di pesticidi) e di registri di popolazione è stato utilizzato in Veneto per monitorare eventuali effetti sulla salute riproduttiva di pesticidi (Clementi et al., 2007, Clementi et al., 2008).

Naturalmente, l'integrazione fra un registro ed una banca biologica avrà un forte valore aggiunto (Olivieri, 2009).

Pertanto banche biologiche, banche dati e registri vanno visti come componenti di un *continuum di flussi informativi tra loro connessi*, in grado di sostenere e potenziare le attività di ricerca, con cui sono in continua interazione.

Criticità. A fronte di una crescente disponibilità di banche biologiche, banche dati e registri di patologia utilizzabili per lo studio degli IE, ad oggi ancora manca a livello centrale, regionale e locale, *una integrazione fra istituzioni operanti nel settore dell'ambiente e della salute*, che possa promuovere la conoscenza ed un miglior utilizzo degli strumenti esistenti e l'identificazione di priorità ed obiettivi per lo sviluppo di possibili nuove iniziative.

In particolare, lo sviluppo e l'impiego di banche biologiche specifiche attualmente è rallentato dalla scarsa conoscenza di tale strumento da parte dei ricercatori impegnati nel settore "ambiente e salute", della limitata disponibilità di biobanche attive sul territorio nazionale, e soprattutto dalla mancanza di un'iniziativa nazionale che consenta di promuovere l'accesso alle biobanche attualmente disponibili e lo sviluppo di nuove collezioni di campioni biologici più mirate allo studio degli IE.

Per il futuro. E' necessario un sempre maggior impiego di banche biologiche, banche dati e registri quali strumenti nell'ambito di un approccio integrato (studi sperimentali/studi epidemiologici) per lo studio degli IE.

Tuttavia, affinché tale impiego sia efficace è indispensabile una iniziativa nazionale al fine di

- a) ottimizzare l'utilizzo degli strumenti esistenti, promuovendone la qualità e l'integrazione in rete,
- b) valutare le priorità per lo sviluppo di nuovi strumenti

Nel quadro di una ricerca orientata alla prevenzione degli effetti a lungo termine e transgenerazionali degli IE, una particolare attenzione dovrà essere data agli strumenti dedicati alla sorveglianza e protezione dell'*età evolutiva*, quali ad es., le coorti madre-bambino, di cui il progetto NewGeneris (<http://www.newgeneris.org>) è un primo modello europeo.

2.2.h Gruppi a speciale esposizione: IE e medicina del Lavoro

I contesti lavorativi potenzialmente coinvolti nella esposizione a IE sono numerosi e spaziano dall'agricoltura (per l'utilizzo di pesticidi) agli impianti di termodistruzione dei rifiuti, soprattutto nel caso di rifiuti speciali e contenenti alte percentuali di plastiche (40% della produzione attuale di diossine), dall'industria di coloranti e vernici all'industria della gomma e della plastica, dall'industria elettrica ed elettronica alla petrolchimica e metallurgica.

Questione centrale è la "*misura*" o l'accurata descrizione, dell'esposizione -che risulta una variabile complessa- piuttosto che l'accertamento dei alterazioni cliniche; questo poiché gli scenari espositivi sono

fortemente differenziati in base ai comparti, cicli produttivi, lavorazioni e mansioni coinvolte. Caratteristica comune del contesto lavorativo è ormai il realizzarsi di esposizioni a basse dosi spesso per sostanze chimiche multiple; è inoltre importante aggiungere che il problema dei possibili effetti di IE a “basse dosi” rivesta una importanza cruciale per la valutazione del rischio in medicina del lavoro, anche per identificare eventuali nuovi valori limite di esposizione professionale.

L’approccio metodologico dei disegni epidemiologici su esposizioni lavorative ad IE, è attualmente un argomento molto discusso. Gli strumenti a disposizione, soprattutto per la raccolta delle informazioni inerenti l’anamnesi lavorativa, attuale e pregressa, nonché le abitudini alimentari e di vita sono spesso messi in discussione, soprattutto riguardo l’utilizzo di questionari. Questo approccio richiederebbe una standardizzazione ed una validazione su ampia scala per poter essere considerato realmente affidabile; inoltre è essenziale che la somministrazione di questionari venga affidata a personale opportunamente formato.

I più efficaci studi epidemiologici integrano i dati dei monitoraggi biologici con le indagini mediante questionari, dando attenzione alla incertezza del metodo analitico usato ed alla plausibilità biologica delle eventuali associazioni significative, nonché, soprattutto, alla potenza dello studio, in modo da minimizzare il rischio di falsi risultati “negativi”.

L’interpretazione dei dati ottenuti, ed un loro utilizzo ai fini della prevenzione, è un punto focale ma non di semplice trasposizione, come anche la definizione di “limiti” in matrici ambientali o biologiche.

La *fertilità* è uno dei principali bersagli della maggioranza degli IE nell'adulto; tuttavia spesso gli studi presentano limitazioni metodologiche notevoli (Caserta et al., 2008). Ad esempio, l'interpretazione dei markers biologici per la fertilità maschile (conta spermatica, morfologia, motilità) non è univoca, anche per l'influsso di variabili quali tempo di astinenza, età, stagione, età; non sono ancora definiti markers applicabili su larga scala per la fertilità femminile; occorre indagare meglio l'impatto degli stili di vita (ad es., fumo di sigaretta, alimentazione) non solo come “fattori confondenti” secondo la comune *vulgata* epidemiologica, ma anche e soprattutto quali cofattori modulanti il rischio. La predominanza di studi di fertilità maschile riflette la disponibilità dei metodi analitici e certamente *non* il fatto che il sistema riproduttivo maschile risulti più suscettibile rispetto a quello femminile. Dagli anni '80 è stato proposto, ed adottato da numerosi gruppi di ricerca, il “*time to pregnancy*” (attesa nel concepimento) come indicatore della fertilità di coppia: tale parametro, oltre a richiedere la conoscenza di un tempo di partenza, è molto sensibile e riflette un effettivo problema riproduttivo, ma è anche soggetto a numerosi fattori esterni all'esposizione che si intende studiare ed è aspecifico, non caratterizzando l'origine del problema (Caserta et al., 2008). Più limitate sono le evidenze sugli effetti sulla salute riproduttiva femminile in ambito lavorativo: i problemi metodologici riguardano la complessità presente nella registrazione degli effetti di interesse (patologie uterine, disturbi

nell'ovulazione, abortività precoce, ecc.), la variabilità delle metodologie analitiche applicate comunemente, la difficoltà nella scelta delle matrici biologiche da analizzare (Figà-Talamanca, 2006).

Complessivamente l'identificazione del rischio espositivo in ambiente di lavoro passa attraverso:

- la messa a punto di biomarker affidabili e predittivi per specifici IE e specifici effetti
- L'identificazione dei comparti lavorativi maggiormente coinvolti nella manipolazione, produzione, lavorazione e stoccaggio di IE.
- Lo studio di processi ed impianti produttivi.

Criticità: Il mutare dei contesti lavorativi e la necessità di considerare le differenti vulnerabilità legate al genere ed all'età richiedono un ammodernamento delle strategie di valutazione del rischio.

Per il futuro. Occorre potenziare la sorveglianza sanitaria di IE in contesti lavorativi prioritari (ad es., agricoltura, rifiuti) integrando indagini di igiene industriale orientate alla valutazione della salubrità ambientale con indagini di monitoraggio biologico, inserite all'interno di protocolli di sorveglianza sanitaria, che consentano una tempestiva sorveglianza di eventuali alterazioni pre-cliniche del sistema endocrino e che quindi permettano interventi incisivi per la protezione della salute dei lavoratori e delle lavoratrici.

Come sottolineato inoltre anche dalla normativa vigente in termini di salute e sicurezza in ambienti di lavoro (D.Lgs 81/08) dovranno essere condotti studi specifici orientati a considerazioni sulla *differenza di genere*, che può essere determinante nel caso degli IE.

2.3. Prevenzione, gestione, riduzione del rischio

Nell'ambito di una proposta di piattaforma progettuale, è indispensabile considerare i bisogni e le priorità di innovazione anche per quelle attività di prevenzione, gestione e riduzione del rischio che talora - erroneamente - si ritiene debbano basarsi unicamente sul "consolidato" e sulla sorveglianza dell'applicazione della normative vigenti.

Una strategia di innovazione deve porsi due obiettivi di fondo:

- a) sistemi che mettano in grado di fornire *risposte precoci* ai possibili problemi
- b) *indicare strategie* (ad es. innovazione dei processi o di prodotti, biorimediazione) per aumentare il livello di sicurezza degli alimenti e dell'ambiente di vita.

2.3.a Biorisanamento: acque e suoli

Per biorisanamento si intende l'insieme di metodologie in grado di disinquinare le acque o i terreni contaminati da sostanze tossiche mediante l'utilizzo di microrganismi, funghi e batteri o di parte di essi (enzimi). Nel primo caso il principio di funzionamento è semplice: alcuni batteri si nutrono di sostanze inquinanti bonificando indirettamente l'ambiente. La tecnica, detta anche biorimediazione, elimina

l'inquinamento in modo naturale con un basso impatto ambientale. Il residuo del biorisanamento è infatti composto da anidride carbonica, acqua e biomasse facilmente riassorbibili dall'ambiente.

In alcuni casi però può accadere che il processo di degradazione non sia completo. In questo caso si ottengono prodotti intermedi che, potrebbero anche essere più tossici del contaminante originario. Ad esempio la biodegradazione non completa del tri- o tetra-cloroetilene può dar luogo al cloruro di vinile che è altamente cancerogeno. Inoltre può succedere che i microrganismi presenti in natura non sono sempre in grado di degradare i composti di origine antropica: in questi casi si deve necessariamente ricorrere a microrganismi estranei provenienti da altre zone o prodotti in laboratorio con tecniche di ingegneria genetica. La ricerca è indirizzata anche ad ingegnerizzare i batteri in modo tale da degradare contemporaneamente un numero maggiore di inquinanti, allargando così la loro capacità generale di disinquinare. I microrganismi, infatti, potrebbero svolgere efficacemente il loro lavoro per determinate sostanze inquinanti ma non per tutte quelle presenti nella zona.

Le tecniche di biorisanamento possono essere utilizzate per ridurre o rimuovere rifiuti pericolosi che hanno già contaminato l'ambiente oppure possono essere impiegate per il trattamento di inquinanti soprattutto prima che questi lascino i luoghi di produzione e vengano immessi nell'ambiente. Negli impianti di trattamento dei liquami, i microrganismi rimuovono gli inquinanti più comuni dalle acque reflue prima che queste vengano convogliate ai corpi idrici: i costi del trattamento possono essere ammortizzati mediante la trasformazione dei contaminanti in prodotti utili. Un esempio, non riguardante il problema IE, è il gruppo di batteri marini identificati dall'Istituto per l'Ambiente Marino Costiero di Messina che hanno un ruolo importante nella degradazione del petrolio (batteri idrocarburoclastici; <http://www.molecularlab.it/news/view.asp?n=147>).

Il biorisanamento può essere impiegato anche come tecnica di prevenzione: un esempio è il trattamento preventivo dei corpi idrici, in modo da ottenere acqua potabile di qualità accettabile, la cui disponibilità a costi ragionevoli è un prerequisito per il moderno sviluppo sociale.

Accanto alle forme classiche di biorimediazione, soprattutto nel caso dell'ambiente acquatico, sono state sviluppate di recente biotecnologie avanzate in grado di rimuovere/biodegradare selettivamente un singolo tipo di inquinante (o più inquinanti della stessa famiglia) lasciando inalterati gli elementi indispensabili per la vita dell'ecosistema o producendo acqua potabile priva solo degli inquinanti indesiderati. Un esempio è l'utilizzo dell'enzima laccasi in grado di biorisanare, con diverso potere di biodegradazione a secondo delle molecole target da abbattere, composti fenolici: dallo stesso fenolo, al catecolo, ai prodotti clorofenolici, ai congeneri del bisfenolo, in particolare bisfenolo A, uno dei più noti IE (Diano et al., 2007; Mita et al., 2007). Per ridurre l'impiego di enzimi, e quindi il costo della biorimediazione, si fa ricorso all'uso di enzimi immobilizzati su beads o membrane mediante tecniche varie, dall'intrappolamento in matrici polimeriche -

naturali o artificiali- al legame covalente. L'uso di enzimi immobilizzati conferisce loro la capacità di riuso nel tempo, maggiore resistenza a situazioni estreme di pH e temperatura, maggior stabilità. Le apparecchiature in cui operano questi sistemi enzimatici derivati si chiamano *bioreattori* per distinguerle da altre apparecchiature utilizzate in altri processi di disinquinamento a membrana (nanofiltrazione, ultrafiltrazione e osmosi inversa) definite reattori. I bioreattori sembrano più indicati per rimuovere IE in quanto permettono la degradazione di singole molecole target lasciando inalterato l'ecosistema, mentre ultrafiltrazione ed osmosi inversa, pur producendo disinquinamento, alterano gli ecosistemi in quanto producono "acqua pura" e comunque pongono l'ulteriore problema del successivo smaltimento degli inquinanti concentrati nel retentato. Recentemente è stato proposto l'utilizzo di bioreattori non isotermi (Ricupito et al., 2009), in cui la membrana catalitica – selettiva ed idrofobica – è sottoposta ad un gradiente di temperatura. In queste condizioni sperimentali l'attività enzimatica aumenta mediamente di circa il 100 %, con un solo grado centigrado di differenza di temperatura ai capi della membrana. Aumentare l'attività catalitica, ovviamente, significa accelerare il processo di biorimediazione e ridurre i costi del processo. In conclusione, con singoli enzimi (o microrganismi anche immobilizzati) è possibile risanare qualunque sistema acquoso inquinato anche da IE, sempre che si trovi l'opportuna coppia "materiale biologico enzimaticamente attivo/inquinante da abbattere".

Criticità. Non si può pensare di disinquinare grandi estensioni di suolo o grandi volumi acquatici, in quanto occorrerebbero bioreattori di dimensioni tali che la loro potenzialità di lavorare in situ porrebbe gravi problemi sia economici che tecnici.

Migliorare le strategie per la valutazione dell'impatto del biorisanamento

Per il futuro. Ottimizzare l'utilizzo di bioreattori su portate di non grandi dimensioni prima della loro immissioni in grandi volumi (ad es., mari, laghi), in modo da ridurre la capacità di innescare consistenti processi di biomagnificazione e bioaccumulo.

Integrare i bioreattori con strumenti di monitoraggio (ad es., biosensori e bioindicatori) per la valutazione dell'impatto del biorisanamento

Innovazione tecnologica: ricerche per coimmobilizzare enzimi differenti, quali, ad es., polifenolo ossidasi e lipasi, in grado di degradare simultaneamente prodotti fenolici e ftalati.

2.3.b **Innovazione tecnico-scientifica ed aggiornamento delle normative europee e nazionali**

2.3.b.1 *REACH: misure di gestione del rischio.* Il regolamento (CE) n.1907/2006 del 18/12/06 (denominato "regolamento REACH" dall'acronimo di **R**egistration, **E**valuation, **A**uthorisation of **C**hemicals) prevede la registrazione e l'acquisizione di informazioni specifiche sulle caratteristiche tossicologiche ed ecotossicologiche di tutte le sostanze prodotte o importate nell'Unione Europea in quantità superiori ad 1 tonnellata/anno. L'Agenzia Europea per le sostanze chimiche (ECHA, <http://echa.europa.eu/>)

gestirà e controllerà l'applicazione di REACH. L'attuazione di questa complessa normativa permetterà l'adozione delle misure di gestione del rischio necessarie a garantire la protezione della salute umana e dell'ambiente nelle diverse situazioni di produzione ed uso. Le priorità del REACH vengono definite sulla base delle quantità prodotte o importate; a prescindere dalle quantità, entro il 1/12/2010 dovranno essere registrate tutte le sostanze classificate come cancerogene, mutagene e tossiche per la riproduzione, (C, M, R) in categoria 1 e 2 (chiara evidenza di effetti). Il regolamento REACH considera gli IE come sostanze di “*equivalent concern*” rispetto alle sostanze C, M, R. Queste sostanze potranno essere prodotte e utilizzate solo previa specifica autorizzazione per determinati usi della Commissione Europea.

Se, da una parte, il regolamento REACH stabilisce che gli IE devono essere considerati sostanze “estremamente preoccupanti” dall'altra parte gli studi richiesti alle imprese sulle proprietà tossicologiche delle sostanze non prevedono test specifici per identificare i potenziali IE, né, tanto meno, una *strategia efficiente* che integri le informazioni fornite da test diversi. L'unica eccezione è lo studio di tossicità riproduttiva su due generazioni (linea guida OECD 416) considerato il test standard più rilevante per l'individuazione di effetti sul sistema endocrino. Tuttavia si tratta di un test lungo, oneroso, che valuta un grande numero di parametri e che impiega un grande numero di animali (sino a 3.000): è semplicemente impossibile saggiare tutte le sostanze (migliaia) per cui mancano dati sugli effetti nel test a due generazioni, per motivi pratici ed anche per motivi etici. Il test a due generazioni può essere solo lo studio finale da applicare ad un numero molto limitato di sostanze a vasta diffusione per derivare un NOEL a lungo termine. Analogamente, il regolamento (CE) N. 440/2008 del 30/5(08, nel quale sono descritti i metodi di prova delle sostanze soggette agli obblighi previsti dal REACH, non contempla alcun test specifico (né tanto meno un test *in vitro*) per gli IE. L'assenza di test specifici per l'identificazione degli IE tra gli studi previsti dal regolamento REACH è parzialmente giustificata dalla mancanza di criteri condivisi a livello internazionale, benché da oltre 10 anni la OECD abbia avviato una attività specifica a questo riguardo, con la costituzione del gruppo di lavoro *Endocrine Disrupter Testing and Assessment* allo scopo di sviluppare un approccio armonizzato per lo screening e la convalida di test. (http://www.oecd.org/document/62/0,2340,en_2649_34377_2348606_1_1_1_1,00.html) Tuttavia, il lavoro a livello OECD si basa sulla valutazione e validazione di singoli test, rimanendo a monte del problema delle strategie di saggio. Per contro da più parti, ed es nell'ambito del progetto europeo ReProTect (Lazzari et al., 2008) si tende allo sviluppo di *batterie* di test che

- a) integrino più livelli di complessità dei sistemi di saggio (dall'*in vitro* all'*in vivo*);
- b) considerino prioritariamente i *meccanismi*, dal momento che gli IE sono sostanze definite primariamente sulla base di “meccanismi” che causano una “preoccupazione equivalente” alle sostanze C/M/R
- c) capitalizzino i modelli ed approcci innovativi messi a punto dalla ricerca nazionale ed europea.

Lo sviluppo di batterie così strutturate potrebbe avere un grande impatto per una realistica, efficiente ed accurata caratterizzazione degli IE nell'ambito di REACH.

2.3.b.2 *Piani di sorveglianza.* L'ambito dei piani di sorveglianza di alimenti, acque, ecc. è molto complesso per la compresenza di normative europee, nazionali e regionali. Ai fini dell'integrazione di questa tematica nella piattaforma progettuale “ambiente/salute” vengono identificate due priorità.

1) Costruire un *modello per integrare le differenti filiere di dati* ai fini della valutazione del rischio.

Nell'ambito dello sviluppo di una piattaforma “Ambiente e salute”, l'*alimento ittico* viene proposto come modello per integrare le varie basi di dati producendo così un valore aggiunto per la valutazione del rischio.

Per quanto riguarda gli alimenti ittici occorre raccogliere ed integrare per i diversi tipi principali di prodotti i dati sui contaminanti, pesticidi ed altri trattamenti zootecnici, nonché sostanze (elementi in traccia) presenti nei mangimi; per una completa valutazione dell'impatto sulla salute dei consumatori è inoltre indispensabile integrare i dati di esposizione a sostanze tossiche, con quelli sulla effettiva assunzione di fattori protettivi quali, per ciò che riguarda il pesce, iodio, selenio e omega3.

2) Costruire un modello per tradurre gli incrementi conoscitivi in risposta ai “rischi emergenti”, comprendenti -secondo la definizione dell'EFSA (2006) – sia fattori di rischio non precedentemente identificati, sia fattori di rischio noti, il cui impatto può essere diverso per mutate condizioni ambientali.

2.3.b.3 *Sicurezza del lavoro.* La gestione del rischio proveniente da IE in ambiente di lavoro è strettamente legata alla normativa riguardante la protezione dei lavoratori dal rischio di agenti chimici (titolo IX D.Lgs 81/08). Ovviamente tale normativa, pur non essendone formalmente parte, viene ad integrarsi da un punto di vista operativo e gestionale con l'applicazione del nuovo regolamento REACH. In altri termini: gli obblighi di autorizzazione che il REACH impone per gli IE, come per altri composti “altamente preoccupanti”, richiederanno un impegno notevole da parte delle aziende che a vario titolo producono, manipolano o utilizzano tali prodotti. Il forte impulso che REACH impone per la sostituzione di questi agenti chimici potrà rappresentare un elemento di prevenzione incisivo in ambiente lavorativo; inoltre, il programma della ECHA di rilasciare un numero di autorizzazioni annue non superiore a poche decine condizionerà l'assetto industriale e produttivo che coinvolge sostanze identificate come IE (es., bisfenolo A, ftalati, ritardanti di fiamma bromurati)..

La prevenzione del rischio è l'elemento cruciale di tutta la gestione, partendo, come detto dalla sostituzione di ciò che è più pericoloso con ciò che lo è meno, e passando quindi attraverso:

- la formazione ed informazione dei lavoratori riguardo gli specifici rischi per la salute e quindi una comunicazione del rischio puntuale e completa.
- una sorveglianza sanitaria mirata, attraverso la definizione di protocolli sanitari mirati a specifici comparti e mansioni

- lo studio e predisposizione di processi produttivi che richiedano l'utilizzo del minor numero di sostanze e nelle minori quantità possibili con il minor numero di lavoratori potenzialmente coinvolti
- la definizione, produzione e scelta dei dispositivi di protezione, collettiva ed individuale, specifici per le potenzialità di rischio delle sostanze considerate

2.3.b.4 *Sviluppo del principio di sostituzione.* La presenza sul mercato di prodotti che possano mettere a repentaglio la nostra salute non è più accettabile. Soprattutto perché in molti casi esistono delle soluzioni alternative di bassa tossicità e, nel caso dei biomateriali, assolutamente biocompatibili. Un modello della possibilità di rimpiazzare sostanze identificate come IE, e specificamente gli ftalati, viene dai risultati di un 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") finanziato nel 2000 dalla EU (Contract N. QLK5-CT-1999-01355) e portato a compimento nel 2004. Qualsiasi soluzione alternativa (e quindi anche questa) non potrà che avere nel momento in cui viene immessa sul mercato un prezzo superiore al prodotto utilizzato da anni; è anche chiaro che nel computo dei costi e dei benefici vanno compresi i costi sanitari per la famiglia e per lo Stato -dovuti agli effetti a lungo termine e per le generazioni future- derivanti dall'uso di "vecchi" composti identificati come IE.

Criticità. Nell'ambito dello sviluppo di una piattaforma "ambiente/salute" è importante la traslazione dei risultati della ricerca all'aggiornamento e miglioramento delle regolamentazioni. Vengono identificati quattro ambiti critici:

- a) la univoca ed accurata identificazione di IE per l'applicazione di REACH
- b) la integrazione dei dati e la risposta ai rischi emergenti per i programmi di sorveglianza dell'ambiente e degli alimenti
- c) i nuovi problemi della sicurezza sul lavoro
- d) la necessità di applicare il principio di sostituzione

Per il futuro. a) Sviluppo di strategie di saggio accurate ed efficienti per l'identificazione di IE

- b) strategie per integrare diverse filiere di dati nella sorveglianza alimentare ed ambientale e per utilizzarle nella risposta a rischi emergenti
- c) sviluppo di nuove strategie per la sicurezza sul lavoro, basate sull'integrazione fra monitoraggio mirato, comunicazione del rischio ed innovazione dei processi
- d) sviluppo (integrato con strategie promosse anche nell'ambito di REACH) di una "griglia" decisionale per la valutazione comparata dei rischi e benefici per la salute di materiali diversi per attuare il principio di sostituzione sulla base di una "precauzione informata"

2.3.c. *Stili alimentari e di vita a sostegno della prevenzione*

2.3.c.1 *Interazione degli IE con gli alimenti.* L'alimentazione rappresenta un importante veicolo attraverso il quale gli IE possono entrare in contatto con l'organismo umano. Le tipologie di IE veicolati dall'alimentazione sono numerose ed eterogenee. L'esposizione umana ed animale riguarda infatti sia l'esposizione a xenobiotici quali contaminanti persistenti (come le diossine e i PCB), pesticidi e sostanze utilizzate nelle industrie alimentari, ad es. nel packaging (come il bisfenolo A e gli ftalati), sia a sostanze bioattive naturalmente presenti negli alimenti, ovvero elementi semplici quali lo iodio, e molecole più complesse quali i fitoestrogeni, sostanze presenti nelle piante in grado di interagire con i recettori degli estrogeni e di esercitare altre azioni endocrine (genisteina, isoflavoni, lignani, ecc.). Da quanto detto si comprende come l'attenzione sia rivolta non tanto al rischio del singolo alimento ma al potenziale effetto "cocktail" dovuto al consumo di determinati contaminanti presenti nella dieta per periodi di tempo più o meno lunghi e pertanto, in grado di accumularsi nell'organismo fornendo un carico globale il cui possibile impatto sulla salute presenta molteplici incognite.

Per molti IE, soprattutto se in grado di bioaccumulare, l'alimentazione è la principale via di esposizione. E' stato stimato che l'esposizione alimentare a PCB e diossine rappresenta il 90% dell'esposizione totale (La Rocca e Mantovani, 2006). Tuttavia è opportuno precisare che, ai fini di una stima efficace dell'esposizione alimentare, occorre valutare gli apporti individuali piuttosto che il livello di contaminazione degli alimenti: l'esposizione dipende infatti dalle caratteristiche della dieta individuale (che ha un'elevata variabilità) tenendo conto però, anche della variabilità della possibile contaminazione ambientale (area di provenienza dell'alimento) e dai processi di preparazione, conservazione e trasformazione dell'alimento stesso.

Nonostante evidenti incertezze nella stima del rischio attraverso gli alimenti -per molti IE non è ben noto il livello di esposizione- i dati disponibili indicano un rischio non trascurabile, in particolare nelle fasce di popolazione più sensibili. Un esempio è la valutazione dell'EFSA dei perfluoro-ottani, contaminanti persistenti con effetti non completamente noti, ma che portano a includerli fra gli IE (EFSA, 2008).

Il ruolo dell'alimentazione e degli alimenti quali fonti di esposizione agli IE varia nelle diverse fasi della vita. Se durante l'infanzia, infatti, la fonte principale è rappresentata dal latte e dai suoi derivati, nelle successive fasi della vita le fonti principali sono le carni e il pesce. Va ricordato inoltre che i bambini sono particolarmente esposti al rischio di esposizione perché, in proporzione al peso, assumono una maggiore quantità di alimenti rispetto agli adulti. Nei bambini, inoltre, l'esposizione ai contaminanti avviene in una fase della vita quale la crescita, in cui la suscettibilità agli effetti degli IE è aumentata sia in termini di sviluppo sessuale che cognitivo e immunitario (Maranghi et al., 2005).

Diversi alimenti vulnerabili al bioaccumulo di contaminanti presentano però anche potenziali benefici: il latte e i suoi derivati sono la fonte principale di calcio e vitamina D, le carni sono fondamentali per garantire un adeguato apporto proteico e di ferro, il pesce contiene acidi grassi polinsaturi, selenio e iodio, il cui effetto

benefico sulla salute è documentato (Mozaffarian et al., 2006). Per questi alimenti è importante valutare in maniera equilibrata i benefici, in termini di riduzione dell'apporto ai fini della riduzione dell'esposizione a IE ed altri contaminanti, con il rischio della riduzione dell'apporto di nutrienti fondamentali. Programmi di sorveglianza ambientale mirati, uso di processi agroalimentari più "puliti" (ad es., la qualità dei mangimi è critica per alimenti quali pesci, latte e latticini) ed una corretta informazione dei cittadini sono fondamentali per ridurre i rischi e massimizzare i benefici (EFSA, 2005; Istituto Superiore di Sanità, 2009). In generale, gli aspetti della capacità di scelta responsabile ed informata da parte del cittadino e dell'innovazione tecnologica sono cruciali per una *moderna sicurezza alimentare*: ad esempio, occorre estendere i sistemi per la tutela igienica degli alimenti (*HACCP-Hazard Analysis Critical Control Point*) alla prevenzione dei rischi tossicologici a lungo termine in filiera (Frazzoli et al., 2009).

2.3.c.2 *IE ed alimentazione in sottogruppi della popolazione generale*. E'essenziale che la piattaforma progettuale "ambiente/salute" consideri alcuni gruppi con specifica o differente vulnerabilità.

1) *Neonati e lattanti*. L'esposizione agli IE in questa fase è profondamente differente rispetto alla popolazione adulta in quanto essa può avvenire sia durante la vita fetale sia dopo la nascita (Figà-Talamanca e Mantovani, 2004; Maranghi et al., 2005). Inoltre, nel neonato, l'esposizione *interna* a contaminanti è significativamente influenzata dallo stato di immaturità della detossificazione epatica e della barriera ematoencefalica. La diretta assunzione alimentare di IE è legata a due fattori principali: la contaminazione del latte materno e la presenza di molecole nel latte in formula nei bambini allattati artificialmente. Per quanto riguarda l'allattamento al seno, il problema principale è il bioaccumulo di sostanze lipofile (PCB, ritardanti di fiamma bromurati, diossine) ed il loro passaggio dall'organismo materno alla frazione grassa del latte, in genere come miscela di più contaminanti. L'esposizione in allattamento può essere considerevole; il 10% del carico corporeo di sostanze diossina-simili a 25 anni di età è attribuibile all'allattamento durante i primi sei mesi di vita (Figà-Talamanca e Mantovani, 2004). Tuttavia, nella valutazione dei rischi potenziali da esposizione a IE dovuti all'allattamento materno, è necessario considerare che questo presenta indubbi vantaggi per lo sviluppo del bambino, anche in senso comportamentale e neurocognitivo, tali da non consigliarne la riduzione per limitare l'esposizione agli IE, salvo che in situazioni eccezionali di elevata contaminazione (Figà-Talamanca e Mantovani, 2004). A titolo esemplificativo val la pena di ricordare l'importante contributo del latte materno all'assunzione di iodio del neonato, fondamentale per garantire un'ottimale funzione tiroidea, e quindi per il completamento dello sviluppo funzionale del sistema nervoso (v. Osservatorio Nazionale per il Monitoraggio della Iodoprofilassi-OSNAMI, <http://www.iss.it/osnami>).

Per quanto riguarda il latte artificiale, particolare interesse è stato rivolto ai latte-formula a base di soia per i quali è stata riportata una possibile azione tireostatica, probabilmente dovuta alla capacità della genisteina, isoflavone contenuto nella soia, di interferire con la sintesi degli ormoni tiroidei (Milerova et al., 2006).

L'esposizione dei lattanti alimentati a base di formule con latte di soia può essere 4-5 volte superiore a quella di un adulta; pertanto va mantenuta e sviluppata la posizione cautelativa italiana che prevede nelle formule le sole proteine di soia isolate, ed in particolare la posizione italiana che raccomanda comunque di limitare l'impiego di tali formule a situazioni particolari (intolleranza a proteine vaccine, al lattosio o galattosemia) (CNBBSV, 2006)

2) *Bambini ed adolescenti*. Gli studi disponibili sull'esposizione ambientale/alimentare agli IE documentano che, in generale, i livelli di esposizione sono in aumento fino al primo anno di età e poi si riducono progressivamente nel corso dell'infanzia e dell'adolescenza, per divenire stabili, a valori più bassi, intorno al ventesimo anno di età. È plausibile che questa maggiore esposizione ai contaminanti sia prevalentemente attribuibile ad una esposizione di tipo alimentare in quanto, in relazione al proprio peso corporeo, un bambino o un adolescente consumano una quantità quotidiana di alimenti considerevolmente maggiore rispetto a un adulto (Figà-Talamanca e Mantovani, 2004; Maranghi et al., 2005)

3) *Donne in età fertile*. Esiste accordo generale sulla necessità di ridurre l'esposizione agli IE nelle donne in età fertile come misura in grado di incidere significativamente sul livello di esposizione della generazione futura, nell'ottica della "sicurezza alimentare sostenibile" (Frazzoli et al., 2009). Gli esempi sono estremamente numerosi: qui, per lo sviluppo della piattaforma "ambiente/salute" basta fare due esempi: a) la contemporanea presenza in determinati tipi di pesce (es., tonno, merluzzo, salmone) di contaminanti pericolosi per lo sviluppo embriofetale (metilmercurio, PCB) e di nutrienti che per tale sono essenziali (iodio, omega-3) ha portato in alcuni paesi (ad es., il Canada: http://dSPACE.iss.it/dSPACE/bitstream/2198/349/1/fish_mercury.pdf) allo sviluppo di specifiche misure di gestione e comunicazione del rischio, atte anche ad orientare le scelte alimentari della donna; b) la attenzione va rivolta anche all'abuso di sostanze "naturali" con attività endocrina (fitoestrogeni, elementi in traccia come lo iodio, il selenio) dovuto, ad esempio, a malintese preoccupazioni salutistiche

4) *Gruppi di popolazione con specifici stili alimentari*. Le popolazioni orientali si caratterizzano per l'elevato consumo di legumi e, principalmente di soia, ad elevato contenuto in fitoestrogeni. L'esposizione precoce e prolungata ai fitoestrogeni durante le prime fasi del ciclo vitale, potrebbe giocare un ruolo importante sull'omeostasi ormonale. A fronte di un possibile effetto protettivo nei confronti di alcune patologie, producono effetti estrogenici differenziati, quali il prolungamento del ciclo mestruale e un ruolo potenzialmente contrastante nei confronti del rischio di tumore al seno. Inoltre l'elevato consumo di soia e dei suoi derivati può avere un effetto avverso sulla funzionalità tiroidea in assenza di un adeguato apporto di iodio (CNBBSV, 2006; Milerova et al., 2006). Oltre che per comunità di origine straniera, nella misura in cui mantengono le loro abitudini alimentari, tali considerazioni valgono anche per i vegetariani, un gruppo in continua crescita in Italia e con un consumo di soia solitamente elevato. Per contro, i vegetariani hanno

diversa, e verosimilmente minore, esposizione a IE lipofili che bioaccumulano: si tratta, pertanto, di un gruppo di popolazione consistente e che merita un'attenzione specifica.

L'esposizione alimentare agli IE potrebbe essere maggiore nei consumatori abituali di pasti presso i fast food: è disponibile un solo studio al riguardo, condotto nel 1997 negli USA (Schechter e Li, 1997), che ha evidenziato un'assunzione di PCB diossina-simili e DDE pari 16.7-52.7% del TEQ giornaliero *unicamente* attraverso gli alimenti disponibili nei fast food. Questo dato, se confermato, indicherebbe che per un bambino –in relazione al peso corporeo- il consumo di diossine attraverso il consumo di pasti presso i fast food sarebbe di *tre volte superiore* rispetto all'adulto.

Criticità:. L'aggiornamento delle strategie di valutazione e comunicazione del rischio è urgente, in particolare per

- i bambini/adolescenti: la valutazione del rischio può essere diversa fra bambino ed adulto, anche senza tenere conto che l'organismo infantile può presentare specifiche vulnerabilità all'azione di IE (crescita osteomuscolare, pubertà). Infatti, nel bambino la varietà del regime alimentare è in genere più limitata; di conseguenza, anche se la presenza di un contaminante in un particolare alimento è bassa, l'effetto cumulativo totale può essere rilevante se quell'alimento rappresenta una quota preponderante all'interno delle scelte alimentari.

- il ruolo di specifici stili alimentari: infatti i dati sulla diversa esposizione a IE nei vegetariani e per alcune modalità di consumo di alimenti (ad es., fast food) sono ancora scarsi

Per il futuro. La popolazione in età infantile/adolescenziale rappresenta una zona di attenzione particolare, per lo sviluppo di strategie specifiche di prevenzione e per interventi mirati formativo/educazionali.

Tendenze contrastanti nei consumi alimentari (aumento dei vegetariani e di attenzioni salutistiche; consumo di alimenti preparati e fast food; riduzione delle differenze regionali nel “mercato globale”) portano alla formazione di “fasce” di consumatori, che vanno considerate per una moderna valutazione del rischio (Dickson-Spillmann et al., 2009).

2.3.c.3 *Rischi e benefici del consumo di specifici alimenti nella popolazione italiana.*

L'alimentazione, come già descritto sopra, è uno dei fattori ambientali condivisi dalla popolazione generale. Una moderna considerazione degli IE nel contesto della sicurezza alimentare deve andare l'oltre l'ambito, pur necessario, della sorveglianza delle singole molecole e giungere alla valutazione dei rischi associati ad un alimento in toto, o ad una filiera, in comparazione con gli associati benefici nutrizionali.

1) *Acqua*. Oltre alla contaminazione ambientale dei corpi idrici, occorre considerare anche il contributo dell'alimento “acqua” nell'esposizione individuale a IE, con le sue particolari modalità di assunzione: consumo quotidiano continuativo, sovente dalla stessa identica fonte di accesso. Ove dati disponibili, i dati sulla presenza di tracce di singoli IE (ad es., pesticidi) in paesi europei sono in genere tranquillizzanti

(CNBBSV, 2006). Tuttavia è desiderabile avere maggiori dati sulla possibile presenza di miscele di IE attraverso l'uso, ad esempio, di sistemi per il monitoraggio di attività endocrine (2.1).

2) *Cereali*. Un recente studio (Fattore et al., 2008) ha analizzato il ruolo del consumo di cereali e derivati nell'esposizione ai PCB, diossina-simili e non diossina-simili, in un ampio campione di popolazione italiana, evidenziando una sostanziale assenza di rischio ed un contributo minimo all'assunzione totale. Diverso può essere il problema per determinati pesticidi, quali gli insetticidi organofosforici, su cui recentemente si è appuntata l'attenzione come potenziali IE in grado di indurre effetti tireostatici e neuroendocrini (De Angelis et al., 2009; Tait et al., 2009). Il contributo dei cereali all'assunzione individuale giornaliera di pesticidi va considerato non tanto per elevati livelli di contaminazione quanto per il largo consumo di questi alimenti, ad esempio in Italia. Va data particolare attenzione ai cereali importati da Paesi non appartenenti all'UE, in quanto le pratiche agricole ed i controlli potrebbero non garantire un elevato livello di sicurezza. Per la valutazione e gestione dell'esposizione associati ai cereali ed ai loro prodotti sono essenziali gli aspetti agronomici e di geomedicina: a) la contaminazione da micotossine, fra cui lo zearalenone è un potente IE estrogenico (EFSA, 2004); b) specifiche dinamiche di accumulo, ad esempio, l'arsenico, identificato come potenziale IE diabetogeno, nel riso (Peralta-Videa et al., 2009); c) l'apporto fornito dai diversi tipi di terreno per quanto riguarda elementi in traccia tossici o protettivi: ad es., in Italia vi sono notevoli differenze anche fra aree geografiche vicine per quanto riguarda l'apporto di selenio ed il contenuto nei prodotti agricoli (Spadoni et al., 2007)

3) *Frutta e verdura*. L'apporto di IE tramite frutta e verdura è principalmente rappresentato da residui di pesticidi, ma soprattutto da sostanze naturalmente presenti nell'alimento ed in grado di interferire con gli ormoni steroidei o con la funzione tiroidea attraverso diversi meccanismi.

3.a) *Pesticidi*. La contaminazione degli alimenti da parte di pesticidi e altre sostanze utilizzate nelle pratiche agricole per aumentare la redditività delle produzioni, ha culturalmente un impatto significativo: i pesticidi sono infatti i contaminanti per antonomasia ed è nozione comune che ampi strati della popolazione siano suscettibili alla loro esposizione attraverso l'alimentazione. Studi italiani hanno evidenziato la presenza anche contemporanea di numerosi metaboliti di pesticidi (tra cui potenziali IE il clorpirifos e gli etilene bisditiocarbammati) in bambini ed in soggetti adulti senza esposizione lavorativa, a conferma di un'esposizione avvenuta attraverso l'alimentazione e l'ambiente di vita (Aprea et al., 2000; Saieva et al., 2004). Tale dato è apparentemente in contrasto con i programmi di monitoraggio che confermano la bassa presenza di residui di pesticidi negli alimenti (Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali, 2008): ne consegue l'importanza di conoscere la reale esposizione attraverso tutte le vie e l'effetto cumulativo; infatti, diversi gruppi di pesticidi, come gli etilene bisditiocarbammati -IE tireostatici- hanno metaboliti in comune che sono indicatori dell'esposizione cumulativa allo stesso gruppo (Mantovani et al.,

2008). I dati relativi all'impatto sulla salute umana della esposizione combinata a residui di sostanze diverse sono scarsi, ma indicano la necessità di maggiore attenzione; un esempio è l'associazione tra esposizione cumulativa prenatale a organofosfati e problemi di sviluppo neurocognitivo nella prima infanzia (Eskenazi et al., 2007). La valutazione del rischio diventa quindi fondamentale proprio per la fascia in età infantile.

3.b) *Composti naturali*. I più studiati IE naturali presenti nelle piante sono i fitoestrogeni, associati ad un possibile effetto preventivo nei confronti di patologie soprattutto collegate alla menopausa, in primo luogo tumori al seno ed osteoporosi (CNBBSV, 2006). Il consumo di fitoestrogeni è particolarmente elevato nelle popolazioni orientali; in Europa il consumo è altamente variabile fra i diversi paesi, con i valori più alti in nord Europa, probabilmente per la maggiore diffusione del vegetarianismo (Peeters et al., 2007). I fitoestrogeni, particolarmente gli isoflavoni genisteina e daidzeina, presentano anche un effetto goitrogeno inibendo la perossidasi tiroidea, enzima fondamentale per la sintesi ormonale, soprattutto in presenza di un insufficiente apporto iodico (CNBBSV, 2006).

Storicamente, i più noti goitrogeni vegetali sono i composti cianogenici quali glucosidi, glucosinati e tiocianati, isotiocianati presenti nelle Brassicacee (*Brassica spp.*). Si tratta di un problema ben conosciuto in mangimistica, mentre la rilevanza per la salute umana, agli attuali livelli di consumo in Europa, è probabilmente modesta.

Molti flavonoidi presenti nella frutta e nelle verdure agiscono come potenti inibitori di enzimi del gruppo delle sulfotrasferasi, coinvolte nella rimozione e detossificazione di contaminanti e fondamentali nel metabolismo di ormoni steroidei, ormoni tiroidei, e composti xenobiotici di natura fenolica (Harris e Waring, 2008). Un aspetto di recente interesse sono le furocumarine, presenti nel pompelmo ed in altri agrumi, in grado di interagire con AhR attivando meccanismi diossina-simili; il rischio per il consumatore sano sembra limitato (verosimilmente per l'azione della flora batterica intestinale ed altri meccanismi di detossificazione), ma vi è la concreta possibilità di alterare gli effetti di taluni farmaci (Mantovani e Baldi, 2008b).

Per quanto riguarda gli IE di origine ambientale, un recente studio condotto in Italia (Fattore et al., 2008) ha confermato che vegetali e nella frutta portano un contributo molto ridotto (3%) all'assunzione alimentare di PCB, diossina-simili e non diossina-simili. Per contro, l'apporto di PCB fornito dal consumo di oli di origine vegetale è significativo, dell'ordine de 11-16% dell'apporto alimentare totale. Per altri IE a vasta ed attuale diffusione (bisfenolo A, ftalati, PBDE, composti fluorurati) i dati sono del tutto insufficienti (EFSA, 2008)).

4) *Latte e latticini*. Il contributo fornito dal latte all'esposizione di IE varia notevolmente in relazione all'età degli individui, con valori più elevati nell'infanzia. La contaminazione dell'animale avviene tramite il consumo di mangimi e foraggi contaminati: al loro rapido assorbimento intestinale, segue l'accumulo del contaminante a livello del fegato, del tessuto adiposo e dei grassi del latte. La valutazione longitudinale, condotta in Francia, del contenuto di PCDD, dibenzofurani e PCB nel latte e nei prodotti derivati (Durand et

al., 2008) ha evidenziato un decremento del 50% rispetto ai dati raccolti nel 1998; i livelli erano inferiori ai limiti massimi raccomandati dall'UE. In Italia, il consumo di latte contribuisce per il 38% nei bambini, e per il 24% nell'adulto, alla quota totale di diossine e composti diossina-simili assunti con gli alimenti (Fattore et al., 2008). I dati, in Italia ed in Europa, sono ancora limitati per una valutazione della contaminazione, che può essere significativa, con altri IE persistenti (EFSA, 2004; EFSA, 2008). In Italia, vi è inoltre lo specifico problema di aree in cui la superficiale od illegale gestione di rifiuti industriali ha portato ad una prolungata contaminazione dei pascoli, con grave danno per la zootecnia e significativa esposizione dei consumatori: un esempio italiano è la contaminazione da PCB dell'area "Caffaro" a Brescia (La Rocca Mantovani, 2006).

5) *Prodotti ittici, carni e uova*. Pesce, carne ed uova appartengono allo stesso gruppo di alimenti in quanto forniscono proteine di elevato valore biologico, vitamine e oligoelementi. Ad esempio, la carne è un'importante fonte di ferro, il fegato di vitamine A e B12, il pesce marino di iodio. Le tecnologie di allevamento e l'introduzione dei mangimi hanno reso costante la presenza sul mercato di carne e pesce ma ne hanno modificato, entro certi limiti, la composizione e creato spesso emergenze alimentari, legate alla contaminazione, ambientale o accidentale, con IE a livelli molto superiori a quelli definiti "tollerabili" anche in confronto ai limiti della OMS, meno cautelativi ed aggiornati di quelli europei: inoltre, la produzione intensiva e la presenza di un libero mercato europeo hanno moltiplicato la possibilità di esposizione dei consumatori: tra gli esempi più noti citiamo i diversi episodi di contaminazione con diossine di pollame e suini nel centro e nord Europa: Questo ha richiamato la necessità di una rete europea (EFSA, laboratori di riferimento) per la valutazione e gestione tempestiva degli allarmi. Anche per i prodotti ittici allevati sono scaturiti ripetuti allarmi derivati dall'inquinamento del Mare del Nord e del Baltico, dove venivano pescate grandi quantità di pesce utilizzato per i mangimi. La necessità di preservare una fonte alimentare importante, dal punto di vista economico e nutrizionale, è stata una base per lo sviluppo di strategie per la valutazione rischio-beneficio (EFSA, 2005) e lo sviluppo di iniziative di ricerca verso mangimi per acquacoltura a minore rischio di contaminazione (v. <http://www.aquamaxip.eu>).

I prodotti ittici sono particolarmente esposti alla contaminazione ambientale. I contaminanti più noti e studiati sono il metilmercurio, e fra gli IE, diossine e PCB. Importante, per la gestione e comunicazione del rischio, la notevole differenza fra specie riguardo alla contaminazione: per il metilmercurio, i pesci più a rischio sono quelli di grossa taglia, predatori ai vertici della catena alimentare come tonno, pesce spada, e squaloidi (palombo, verdesca ecc.), mentre le specie con carni grasse, soprattutto se ai vertici della catena alimentare (tonno, salmone) e/o a contatto con i fondali (anguilla) sono quelle più a rischio di contaminazione da diossine, PCB ed analoghi composti persistenti (Corsolini et al., 2007; Orban, 2008). Pertanto per bambini e donne in gravidanza, o in allattamento, è raccomandato il consumo di alcuni pesci quali tonno e pesce spada, e, idealmente, di sostituirlo con altre specie (European Commission, 2008).

Anche il cadmio e l'arsenico, oltre che potenziali IE, sono importanti per i prodotti ittici, soprattutto per gli organismi bentonici (Falco et al., 2006). Per i metalli pesanti la speciazione può essere per la valutazione del rischio: ad es., l'arsenico nel pesce è rappresentato in gran parte da arsenobetaina, di minima tossicità) ed altri composti poco noti (arsenolipidi, arsenozuccheri) (Ciardullo et al., 2008); pertanto, la misura dell'arsenico totale fornisce una valutazione inesatta del reale rischio per il consumatore. Il massimo rilievo deve venire dato nell'immediato futuro, a livello italiano ed europeo, a quei gruppi di IE segnalati come importanti per i prodotti ittici dalla comunità scientifica -in taluni casi anche dall'EFSA- e tuttavia *non considerati nei piani di monitoraggio*, anche per la mancanza di limiti tollerabili ufficiali:

- organostannici usati, oltre che in altri ambiti, nelle vernici antivegetative per le navi e che rappresentano contaminanti significativi per i molluschi ed altri organismi edibili, soprattutto bentonici (EFSA, 2004).
 - PBDE, impiegati come ritardanti di fiamma in molti settori industriali e caratterizzati da dinamiche di persistenza e bioaccumulo analoghe ai PCB (Borghesi et al., 2009);
 - perfluottanni, largamente utilizzati in prodotti di consumo (ad es., teflon): anche per questi composti i dati disponibili indicano l'importanza dell'esposizione attraverso gli alimenti ittici (EFSA, 2008);
 - nonilfenolo, prodotto dalla degradazione industriale di detergenti polietossilati ed identificato come IE estrogenico; benché il nonilfenolo non venga considerato "persistente", dati dell'Istituto Superiore di Sanità hanno mostrato una contaminazione non trascurabile dei prodotti ittici dei mari italiani (Ferrara et al., 2008)
- Analogamente ai prodotti vegetali, i componenti naturali ad azione endocrine non possono essere trascurati anche per gli alimenti di origine animale, soprattutto se originati da animali allevati intensivamente: uova, carne e rene rappresentano una possibile fonte di testosterone (17 β testosterone) mentre le uova possono essere fonte non trascurabile di 17 β estradiolo (Courant et al., 2008).

Per quanto il pesce, esso rappresenta un'importante fonte di elementi essenziali, tra cui lo iodio, e soprattutto di acidi grassi polinsaturi, in particolare gli n-3 a catena lunga (EPA, acido eicosapentaenoico e DHA, acido docosaesaenoico): questi sono presenti in maniera significativa solo nei prodotti ittici e sono essenziali per proteggere bersagli importanti dell'azione di IE ed altri contaminanti quali lo sviluppo cerebrale ed il metabolismo dei radicali liberi (EFSA, 2005). In conclusione, i componenti naturali ad azione endocrina negli alimenti di origine animale, vanno attentamente considerati, soprattutto per la protezione della fascia di consumatori vulnerabile rappresentata dai bambini e ragazzi fino alla pubertà.

Criticità:

- *pesticidi*: la regolamentazione dei pesticidi non tiene conto a sufficienza dei problemi posti dalla esposizione cumulativa e dalle nuove conoscenze sui possibili rischi transgenerazionali e per l'età evolutiva. Occorrono dati sull'esposizione umana a IE diffusamente usati in agricoltura, come procimidone, triazoli ed etilene bisditiocarbammati (CNBBSV, 2006)

- *contaminanti*: Per alcuni gruppi di sostanze (ad es., PBDE) sono necessari dati sull'esposizione alimentare in Italia

Ancora non è ben chiaro il possibile rischio associato a composti naturali negli alimenti, anche in combinazione con xenobiotici.

- *sostanze naturali*: il bilancio fra effetti protettivi ed interferenza endocrina non è chiaro, come l'associazione con il tipo di tessuto, l'età, la durata dell'esposizione e la dose.

Per il futuro

- *pesticidi*: nuove attività di ricerca sugli aspetti critici per la valutazione del rischio tossicologico, che portino ad un aggiornamento della regolazione e del controllo dei pesticidi.

Migliorare le conoscenze sull'esposizione umana a gruppi di pesticidi diffusamente utilizzati ed identificati come IE.

Miglioramento delle metodologie per la valutazione dell'esposizione a pesticidi con effetti potenzialmente additivi nell'intera dieta.

- *contaminanti*: le nuove conoscenze scientifiche sui contaminanti richiedono l'aggiornamento dei piani di monitoraggio, identificando specifici alimenti "critici".

ottenere maggiori dati sull'esposizione a contaminanti prioritari nel contesto italiano.

Sulla base anche delle indicazioni dell'EFSA aggiornare i piani controllo attraverso la definizione di limiti massimi tollerabili in alimenti e mangimi e di adeguati metodi analitici.

Promuovere la prevenzione della contaminazione degli alimenti attraverso l'innovazione tecnologica (nuovi pesticidi a minore impatto, nuovi ingredienti dei mangimi) e le Buone Pratiche in agricoltura e zootecnia..

- *sostanze naturali*. Serve un'attenta valutazione del rapporto rischio-beneficio e dei potenziali effetti legati al consumo di sostanze naturali, soprattutto attraverso integratori e "novel foods".

Vanno migliorate le conoscenze sui fitoestrogeni (ad es. quercetina, lignani, resveratrolo) maggiormente presenti nella dieta italiana.

2.3.c.4 *La dieta nella prevenzione dell'esposizione e degli effetti di IE*. L'alimentazione non rappresenta solo il principale veicolo di contaminazione da parte di IE, ma anche un possibile mezzo attraverso il quale esercitare un'azione protettiva, anche prima della nascita.

1) *Comportamenti alimentari*. Opportune variazioni dei consumi alimentari possono ridurre l'esposizione a IE liposolubili, come le diossine: fondamentale è un consumo più contenuto e limitato di grassi, in particolare di grassi saturi; ad es. il consumo abituale di latte parzialmente scremato nell'infanzia potrebbe ridurre del 10-20% la esposizione ed il conseguente carico corporeo (Yaqine et al., 2006). Emerge, quindi, il ruolo di una informazione al cittadino che favorisca la scelta informata e responsabile dei prodotti ittici.

Anche i comportamenti relativi alla preparazione degli alimenti possono facilitare la riduzione del consumo di contaminanti. Il lavaggio accurato di frutta e verdure per rimuovere sostanze eventualmente depositate sulla superficie dell'alimento ma non assorbite dalla pianta, così come la rimozione di parti grasse dalle carni, o della pelle dal pollame e dal pesce, rappresentano accorgimenti in grado di ridurre notevolmente (almeno del 30%) l'esposizione al consumo di IE liposolubili e, nel caso degli alimenti vegetali, di pesticidi (Istituto Superiore di Sanità, 2003; CNBBSV, 2006). L'assunzione di idrocarburi policiclici aromatici, cancerogeni e agonisti di ArH, viene grandemente ridotta evitando di consumare il "bruciato" di alimenti quali carni grigliate, pizza, ecc. ed usando accorgimenti nella preparazione, ad es., preventiva marinatura della carne per il barbecue (Mantovani e Baldi, 2008a). La contaminazione da parte di bisfenolo A o ftalati, legata al contatto dell'alimento con plastiche (rispettivamente policarbonato e PVC) utilizzate nel packaging, può essere ridotta privilegiando alimenti freschi e/o con packaging (ad es. vetro) composti da materiali differenti. Una riduzione dell'esposizione ambientale ed attraverso il packaging a bisfenolo A appare ulteriormente desiderabile sulla base dei recenti sospetti -originati da studi sperimentali ed epidemiologici- sull'associazione con il *programming* della sindrome metabolica (Lang et al., 2008). Laddove tale associazione sia ulteriormente confermata, la necessità sociosanitaria di un'innovativa integrazione fra riduzione del rischio tossicologico e misure nutrizionali verrebbe notevolmente rafforzata..

2) *Macro- e micronutrienti*. Un adeguato apporto di sostanze ad attività antiossidante con l'alimentazione può svolgere un ruolo protettivo nei confronti dei possibili danni da eccessiva esposizione a IE. ER α , ad esempio, dipende strettamente per il suo funzionamento dallo stato di ossidazione cellulare: molecole ad attività pro-ossidante o riducente sono pertanto in grado di influenzare il funzionamento del recettore. Vitamine con attività antiossidante, quali la vitamina C e la E, possano avere un effetto protettivo anche nei confronti del danno indotto da ftalati o PCB; per questi ultimi, l'azione protettiva si esplica verosimilmente stimolando l'attività della superossido dismutasi e la produzione/attività del glutatione (Baldi e Mantovani, 2008).

Va anche considerato il possibile ruolo protettivo svolto dalla fibra alimentare assunta con gli alimenti per la sua capacità di modulare l'azione della microflora intestinale, essenziale per la produzione di composti ad azione protettiva. Inoltre il riassorbimento degli estrogeni a livello intestinale è regolato anche dal rapporto grassi/fibra alimentare (Mazur e Adelcreutz, 2000).

Tra i micronutrienti, l'apporto di iodio costituisce un aspetto di potenziale interesse. Come ricordato in precedenza, un adeguato apporto nutrizionale di questo microelemento, componente fondamentale degli ormoni tiroidei, consente di prevenire le manifestazioni, anche gravi, dell'ipotiroidismo: queste interessano tutte le fasi della vita (gozzo, disturbi neurologici minori, natimortalità, aborti, ecc.) e vengono appunto identificati globalmente come "disordini da carenza iodica". E'importante osservare come un'assunzione

adeguata di iodio durante la gravidanza possa essere associato proprio ad una dieta ricca di pesce marino, che è anche una fonte di esposizione a IE: Dallaire et al. (2008) hanno osservato un effetto molto limitato sui parametri tiroidei di neonati altamente esposti a PCB ed esaclorobenzene, ipotizzando un effetto protettivo dello iodio. Il perclorato, usato come solvente e nei fertilizzanti, nonché sottoprodotto di clorazione delle acque, è un antagonista del trasporto dello iodio all'interno del tireocita; uno studio cileno ha mostrato che l'esposizione a lungo termine attraverso l'acqua potabile non alterava i marker tiroidei in donne iodosufficienti durante la gravidanza e l'allattamento (Télez Télez et al., 2005). Infine, dati preliminari italiani su agricoltori esposti a etilene tiourea (il metabolita tireostatico dei fungicidi etilene bisditiocarbammati), mostrano che gli effetti tireostatici associati alla sostanza sono osservabili solo in soggetti che non utilizzano abitualmente sale iodato (Antonella Olivieri, comunicazione personale). Pertanto l'azione nazionale di iodoprofilassi attraverso la diffusione del consumo di sale iodato promossa in Italia (<http://www.iss.it/osnami>), oltre a prevenire un diffuso stato di carenza subclinica potrebbe anche ridurre l'impatto sulla salute dell'esposizione a IE con effetti tireostatici.

3) *Possibili strategie*. Le strategie a lungo termine efficaci nel modificare l'esposizione agli IE attraverso gli alimenti devono necessariamente agire sulle fonti di contaminazione degli alimenti e dei mangimi animali. Nel contempo è importante, anche se non facile, intervenire per modificare opportunamente abitudini alimentari "a rischio". Il consumo di alimenti rappresenta, infatti, un processo dinamico e i consumatori tendono ad effettuare scelte specifiche all'interno dei gruppi alimentari per garantire i propri fabbisogni. Quando la selezione degli alimenti è limitata, sia per scelta che per disponibilità e accessibilità, aumenta l'impatto di un componente della dieta con elevata contaminazione. La variabilità delle scelte alimentari, e la possibilità concreta di variarle, è un importante fattore di protezione della salute.

Le strategie a lungo termine devono identificare diverse ipotesi di lavoro (alternative o anche solo transitorie) così come le barriere esistenti all'attuazione di determinate misure, questo in virtù della necessità di valutare il rapporto rischio-beneficio delle possibili misure.

Ad esempio, la esposizione a residui di pesticidi verrebbe apparentemente minimizzata da un divieto generalizzato dell'uso di pesticidi in agricoltura; ma questa porterebbe a conseguenze quali l'incremento della contaminazione da micotossine e la ridotta disponibilità di alimenti; a sua volta, la ridotta disponibilità di alimenti porterebbe ad una importazione di derrate da paesi meno restrittivi, facendo ritornare il problema dell'esposizione a residui. La valutazione, su aggiornate basi scientifiche, dei pesticidi ai fini di un uso ristretto e controllato è un'opzione che, nella sostanza, porta ad una protezione molto maggiore dei cittadini. Fondamentale per la gestione integrata del rischio è lo stimolo delle istituzioni pubbliche nei confronti del mondo produttivo per l'applicazione reale delle normative e l'innovazione tecnologica; non va dimenticato che, secondo la normativa europea denominata "Pacchetto Igiene" (Reg. CE 852/2004, 853/2004, 854/2004 e

882/04, <http://www.europass.parma.it/page.asp?IDCategoria=1117&IDSezione=7855>), il mondo produttivo è il primo responsabile della valutazione e della gestione del rischio.

Criticità: la diffusione dell'informazione sui comportamenti alimentari che riducono i rischi di effetti tossici a lungo termine è del tutto insufficiente.

La gran parte dei dati disponibili sulle interazioni fra IE e nutrienti fa riferimento principalmente a modelli sperimentali, soprattutto *in vitro*; per contro sono ancora molto scarse le indagini epidemiologiche.

Per il futuro: ricerca integrata (sperimentale/epidemiologica) sul possibile ruolo protettivo di nutrienti e sostanze bioattive, in particolare antiossidanti (vitamine, selenio, licopene..) e iodio, nonché sull'influenza del metabolismo intestinale, e della sua modulazione, sulla biodisponibilità di contaminanti alimentari.

Le strategie di prevenzione dovrebbero incentrarsi a monte, sulla produzione primaria, Stabilire limiti massimi accettabili (residui) o tollerabili (contaminanti) ha un senso nel migliorare le pratiche produttive ai fini della sicurezza del prodotto messo in vendita, mentre lo stabilirli per l'alimento commercializzato non è altrettanto efficace nel garantire la sicurezza nei confronti di un'esposizione prolungata a basse dosi e a sostanze multiple.

Utilizzare le evidenze scientifiche per programmare strategie di prevenzione e comunicazione del rischio; in primo luogo vanno promossi gli attuali interventi di prevenzione su larga scala, quali la iodoprofilassi, affinché possano a breve raggiungere livelli di efficienza e di efficacia ottimali, realizzando così (a scopo per ora precauzionale) una azione protettiva anche verso possibili effetti avversi dovuti all'esposizione a IE.

Il potenziamento delle banche dati esistenti sulle interazioni tra alimenti e IE (EDID, www.iss.it/inte/edid/cont.php?id=110&lang=2&tipo=17) o di piattaforme informatiche interattive e consultabili anche dal consumatore, quali ad esempio RIBEFood (Marti-Cid et al., 2008, <http://www.fmcs.urv.cat/ribefood/>) rappresenta un'opportunità per promuovere la formazione/informazione degli operatori del settore e dell'utenza generale.

2.3.d Comunicazione del rischio, formazione ed educazione sanitaria

Come già riportato nei capitoli precedenti, i flussi informativi, la loro integrazione ed il loro utilizzo rappresentano l'indispensabile tessuto connettivo di una piattaforma "Ambiente/salute".

Diversi messaggi fondamentali, con diverso approfondimento, possono coinvolgere operatori, responsabili delle decisioni, mezzi di comunicazione e cittadini: a) l'esposizione eccessiva ed incontrollata ad IE può causare gravi danni alla salute, con un impatto socioeconomico e sanitario soprattutto a carico della prossima generazione e quindi del futuro della società; b) è indispensabile il sostegno alla ricerca mirata a potenziare la "prevenzione traslazionale"; c) ma accanto a questo è già possibile ridurre l'impatto degli IE anche attraverso misure semplici, facilmente attuabili anche su ampie fasce di popolazione, a costi contenuti e con effetti efficaci. Esempi ne sono la diffusione della iodoprofilassi e di comportamenti alimentari atti a ridurre

il rischio di contaminazione. Infine, un'adeguata comunicazione fra tecnici e decisori è indispensabile per l'adeguamento delle normative in base a evidenze scientifiche

Criticità: vanno identificato nel deficiente aggiornamento, integrazione e valorizzazione del trinomio documentazione/formazione/informazione.

Per il futuro:

1) documentazione: creare uno strumento per la raccolta aggiornata e tempestiva ed integrazione delle conoscenze e competenze esistenti, estendendo e potenziando il modello del Censimento Nazionale della ricerca sugli IE.

2) Formazione: organizzazione di un programma a lungo termine di formazione per giovani ricercatori, ma anche per personale coinvolto nella valutazione del rischio. E' responsabilità del sistema italiano di ricerca e formazione rendere e tematiche “ambiente/salute” appetibili per una leva di giovani che possa portarvi energie e idee nuove. Può essere importante il ruolo di società professionali e scientifiche (es., ISDE-Medici per l'ambiente www.isde.it; Società Italiana Ambiente e Salute -ISEH, www.iseh.it), e soprattutto collegarsi - operativamente e come modelli- ad iniziative europee, come il network europeo sugli IE nelle catene alimentari CASCADE (www.cascadenet.org)

3) Informazione: come priorità per la piattaforma si propone uno studio nazionale pilota sulla *comunicazione del rischio*, elaborando modelli applicati a situazioni concrete ed in collaborazione con le parti sociali interessate, in primo luogo il mondo dell'associazionismo. La comunicazione del rischio, spesso negletta, è infatti componente essenziale dell'analisi del rischio: comunicare, in maniera a) scientificamente esatta, b) trasparente (cioè rendendo visibile il processo attraverso cui una informazione -ad es., che un prodotto contenente IE presenta o non presenta un rischio reale- viene sviluppata) e c) comprensibile, quindi fruibile le nuove conoscenze sui rischi ambientali ai media, alle strutture del sistema sanitario nazionale e ai responsabili delle decisioni politiche.

3. Aspetti bioetici: il “profilo bioetico” e giuridico dell’esposizione a sostanze classificate come “interferenti endocrini”.

3.1 Aspetti generali

Se per “bioetica” intendiamo – secondo la più diffusa definizione – “lo studio sistematico delle dimensioni morali comprendenti la visione morale, le decisioni, le politiche delle scienze della vita e della cura della salute, attraverso una varietà di metodologie etiche in un contesto interdisciplinare” (Reich, 1995), appare intuitivo già ad una prima riflessione attribuire “il caso” dei cosiddetti “interferenti endocrini” al capitolo dei rapporti fra la “vita” (bios) e presenza nell’ambiente di sostanze che, pur diverse nella natura chimica, vengono raggruppate sotto il profilo di uno degli aspetti dell’azione esercitata sul vivente, e cioè l’interferenza con le funzioni di una o più ghiandole endocrine, o con gli elaborati (ormoni) di una o più della costellazione delle ghiandole stesse, o con le “attività” a livello locale (cellulare) degli elaborati ormonali. Poiché gran parte delle sostanze ricomprese sotto questa denominazione esercita interferenza “negativa” con gli aspetti sopraindicati, una volta accettato questo primo punto di partenza, lo “studio sistematico delle dimensioni morali” (come vuole la definizione) porta ad inquadrare il “caso” degli IE – anche sotto il profilo etico – nel capitolo della tossicologia, con le conseguenti implicazioni giuridiche.

3.2 Domande bioetiche e biogiuridiche

Sotto le dimensioni vuoi etiche, vuoi giuridiche si pongono allora le seguenti domande:

- sulla esistenza e sulle ragioni della presenza nell’ambiente di tali sostanze (hanno origine naturale o umana? Nel secondo caso, per quale motivo vengono prodotte?);
- si può stabilire la tipologia dell’interferenza ed a quale concentrazione e durata di esposizione si documenta il danno?
- è possibile operare sul “rischio” di esposizione o sul “pericolo di danno” alla salute? ; con quali modalità? quali responsabilità specifiche (etiche o giuridiche) riguardano (secondo il ruolo svolto) gli attori della produzione, commercializzazione, distribuzione, informazione, sorveglianza nell’impiego, apprestamento delle difese ambientali e disinquinamento; identificazione e terapia degli intossicati, indennizzo del “danno ingiusto” e così di seguito?

Queste domande si pongono – di massima – in ogni capitolo della tossicologia ambientale; sarà però opportuno considerare – nel “caso” considerato – se la particolare natura dell’azione (interferenza endocrina) esercitata da tali composti presenti aspetti bioetici singolari rispetto ai pregiudizi esercitati sulla salute dai tossici ambientali in generale.

Un secondo “punto di partenza” sul quale è opportuno convenire è il riconoscimento di una stretta “alleanza” raggiunta dalla riflessione bioetica (cioè l’analisi, la penetranza e la giustificazione dell’ossequio dei valori in

gioco) e della riflessione giuridica (la disciplina dei comportamenti imposti dalla regola sociale), nel capitolo che brevemente vogliamo esaminare.

In pratica, la minuziosa normativa esistente sulla produzione, commercializzazione, distribuzione, informazione all'uso, controllo ambientale, disinquinamento, trattamento dell'intossicato, ecc. di sostanze in se pericolose, ma economicamente utili, è ispirata a sottesi – ancorché non dichiarati – principi etici, che fanno capo a “valori” sia pubblici che privati caratterizzanti nell'età postindustriale e postmoderna lo sviluppo umano. Alcuni di essi possono così venire richiamati:

a) esiste interesse alla produzione e all'impiego di sostanze (chimiche) diverse, ancorché non presenti in natura, che esercitino tuttavia effetti positivi nella economia dei beni materiali, purché il rischio di effetti negativi sia conosciuto e valutato quantitativamente, siano previste, approntate e messe in atto metodologie di prevenzione del rischio, effettuati controlli e predisposti criteri per il pronto intervento in casi di emergenza. Potremo, schematizzando, riferire i “valori” correlati ad un profilo di etica pubblica, a prevalenza “utilitarista”, che sostanzia il riferimento a principi di beneficalità/non maleficenza fra loro strettamente bilanciati, per il maggior numero degli individui appartenenti alla comunità considerata;

b) è vivo l'interesse a difendere – in ogni attività pratica e della vita materiale – anche i valori della dignità ed i diritti dell'uomo, fra i quali si iscrivono valori di libertà ed esigenze di salvaguardia della salute. Questi valori, ai quali fortemente è interessata l'etica personalista (espressa nella sostanza dalle discipline giuridiche occidentali), comportano l'armonizzazione degli interessi personali con gli interessi collettivi, armonizzazione alla quale è deputato il diritto. Secondo il profilo etico-personalista, il cittadino – consumatore, con il contratto sociale di natura democratica ha “delegato” alla rappresentanza parlamentare ed all'attività governativa e amministrativa, il ruolo (e la responsabilità) pubblica della tutela dell'ambiente e della salute, ma non ha “dismesso” i suoi interessi a conoscere, partecipare a individuare i provvedimenti necessari e poi “godere” dei benefici apportati dagli stessi (esigenze dell'etica della informazione e della partecipazione);

c) ad un “principio di giustizia”, che vale sia nella dimensione dell'etica pubblica che in quella privata, si ispira la ripartizione equa dei benefici, degli oneri e dei rischi fra tutti i consociati nella comunità di vita e di lavoro (profilo comunitarista della bioetica), con una ripartizione tuttavia (soprattutto degli oneri) in maniera proporzionale ai disomogenei parametri esistenziali che caratterizzano i diversi individui umani, ed una tutela più accentuata dei “soggetti vulnerabili”.

3.3 **Principi e valori**

Sulla base di queste premesse, il principio dominante nelle attività pratiche – che ora esaminiamo – è sia per la riflessione etica che per quella giuridica il *principio di responsabilità*.

Tale principio ricade però su tutti i consociati di una comunità (sociale e/o ambientale) in maniera differenziata secondo le professioni, i ruoli, le capacità personali ecc., ma – affinché non rimanga una pura enunciazione (ovvia) di principio, deve essere esercitato anche sulla base di principi di solidarietà e di sussidiarietà.

Apparirà subito evidente che questi principi, unitamente alla classica triade competenza, prudenza, diligenza secondo la quale viene valutato il profilo etico stesso della responsabilità di ciascun operatore nella vita pubblica, e viene giudicato il risultato dell'azione sotto l'aspetto giuridico, si applicano anche al “caso” che stiamo esaminando.

Tuttavia, la riflessione etica suggerisce anche altri valori, il cui possesso viene a costituire il comportamento virtuoso (ad es. l'empatia, la generosità, la “trasparenza dell'azione”, la “sincerità”, la “fedeltà”, ecc.), che – in misura variabile – sono stati accolti anche dalle valutazioni che vengono compiute sia dal diritto (in sede dottrinale) sia dalla giurisprudenza (in sede di giudizio civile o penale).

In definitiva, si possono concludere queste scheletriche riflessioni generali con queste proposizioni:

- a) l'evoluzione della civiltà umana ha portato ad una sempre maggiore moltiplicazione di “fattori di rischio”, in rapporto alla produzione, distribuzione e consumo di prodotti che, non esistenti in natura, svolgono tuttavia azioni ritenute benefiche sulla acquisizione di beni materiali;
- b) parallelamente, si è sviluppata una più o meno intensa azione di accertamento degli effetti provocati sull'ambiente e sulla salute dei viventi da parte delle varie sostanze prodotte (in molti casi questa azione è stata lenta o tardiva), nell'intento di prevenire i danni;
- c) quella che viviamo è stata definita la “civiltà del rischio”, che l'uomo accetta nella misura in cui possa controllare la natura e l'ampiezza del rischio stesso e prevedere le conseguenze del “danno” eventuale, predisponendone i rimedi;
- d) appare necessaria una sempre maggiore conoscenza diffusa, fra la gente, della “civiltà del rischio” ed è necessaria una sempre più approfondita e responsabile preparazione – azione del personale specificatamente preposto alla tutela dell'ambiente e della salute;
- e) il portato positivo della riflessione bioetica - trasferitosi ormai largamente nella prassi giuridica – è stato quello di aver esaltato il “comportamento prudenziale” (divenuto principio di precauzione soprattutto nelle discipline di diritto internazionale e commerciale, in particolare comunitario europeo) di fronte a rischi percepiti come reali, ma al momento, di impossibile quantificazione.

3.4 Alcuni aspetti di rilevanza bioetica della tossicologia degli IE

La domanda se composti chimici diversi, che vengono raggruppati sotto la denominazione di “interferenti endocrini” sulla base di un comune meccanismo d'azione, siano da considerarsi “tossici” alla stregua di altri

materiali o sostanze di natura biologica, chimica, ecc., la cui azione negativa nei riguardi della salute umana si manifesti dopo un periodo più o meno lungo di latenza, sembra poter avere risposta “positiva”.

Tali composti si affiancano ad altre sostanze già classificate come tossici ambientali con effetto negativo per la salute (citiamo ad es. l’asbesto, il piombo, le polveri da processi di lavorazione, il cromo, ecc. ed anche lo stesso fumo di tabacco); sostanze che – sotto l’aspetto del diritto ed ai fini dell’accertamento delle responsabilità civili (ed eventualmente penali) del loro uso giuridicamente sanzionato – rientrano nel capitolo dei “toxic tort’s”.

La peculiarità etico-giuridica degli “interferenti endocrini” (di cui forse v’è traccia nella stessa denominazione molto cauta di “interferenti”) può essere, se si vuole, rilevata nel fatto del diffuso impiego civile e industriale di alcuni di questi composti, in quanto tollerati ai fini dell’utilità economica.

Questa peculiarità – che viene anzitutto a stimolare la riflessione “etica” verso la ricerca di strategie alternative al loro uso, per ottenere risultati almeno equivalenti sotto il profilo del beneficio produttivo ed una sensibile riduzione del rischio, comporta anche particolare rigore nell’apprezzamento del profilo giuridico della responsabilità connessa alla loro produzione, distribuzione, uso.

Sarà infatti da stabilire:

- a) l’azione specifica (qualitativa e quantitativa) che ciascuno dei composti – nella sua peculiare struttura chimica – esercita sull’organismo vivente (animale ed umano) tramite l’interferenza endocrina;
- b) il tipo di danno rilevato come conseguenza della esposizione specifica (ai sensi del punto a));
- c) l’accertamento di un effettivo nesso di causalità fra l’azione della sostanza e il danno (che deve valutare anche l’estensione temporale dell’esposizione e le eventuali concause rappresentate dall’effetto di altri tossici, oltre che dalle caratteristiche di suscettibilità genetica e dai comportamenti di vita).

In questo contesto si profila – con particolare attenzione - il problema della “vulnerabilità” dei soggetti esposti, problema che appare particolarmente delicato nella età prenatale (embrione/feto) e nella età infantile – trattandosi di possibili interferenti con funzioni, come quella endocrine, che hanno forte rilevanza nella differenziazione e nello sviluppo organico.

Un aspetto infatti di grande importanza è la potenziale trasmissione del danno *alle generazioni future, ai non-ancora nati*, in quanto feti, neonati e bambini sono categorie a rischio particolarmente elevato per l’esposizione ad IE. Un organismo in via di sviluppo è, infatti, particolarmente vulnerabile: gli IE possono ostacolare il “programming” delle principali funzioni endocrine fetali durante la gravidanza e del neonato subito dopo la nascita determinando conseguenze negative per la salute che si manifesteranno non immediatamente, ma successivamente nella vita (Landrigan et al., 2005; Pombo e Castro-Feijóo, 2005; Waring e Harris, 2005).

L'esposizione in epoche molto precoci della vita ad IE, inoltre, può alterare l'espressione di alcuni geni attraverso meccanismi di vario genere (genetici ed epigenetici) con conseguente trasferimento di questi effetti alle generazioni future (Gore, 2008). Data la diffusione delle sostanze classificate come IE nelle attività della agricoltura intensiva, un altro tipo di "vulnerabilità", di carattere sociale, potrebbe individuarsi in coloro che – per la loro residenza obbligata in comunità – venissero sottoposti ad alimentazione contenente – in cibi non sottoposti ai prescritti controlli – quantità superiori ai limiti consentiti di IE.

Infine, vanno richiamate le "vulnerabilità" particolari degli addetti alla produzione ed all'uso di tali composti: non si insisterà mai abbastanza – proprio sotto il profilo etico – di richiamare costoro a quegli accorgimenti che possono impedire (o quanto meno minimizzare) il contatto pericoloso con gli IE.

3.5 Conclusioni

Sembra opportuno concludere con qualche riflessione riguardante ancora il binomio degli aspetti etici e degli aspetti giuridici, per gli interessi inerenti all'apporto della ricerca scientifica.

Per la dimostrazione della "pericolosità dell'uso" di sostanze non ancora conosciute vi possono essere elementi indiziari (ad es. alcune variazioni della normalità di parametri biologici, senza una associata manifestazione di danno – malattia -), ed elementi di maggior valore probabilistico, o addirittura "diagnostici" della pericolosità, allorché retrospettivamente può correlarsi il consumo al "danno" o può stabilirsi un nesso di concausalità con spiccata attendibilità.

Mentre l'atteggiamento giuridico ha bisogno – per ottemperare al suo compito ed ai suoi "valori" specifici – di rintracciare con sufficiente attendibilità il nesso causale, (avendo superato di recente, in alcune occasioni clamorose, il concetto di certezza), l'atteggiamento etico, nello sforzo di ottemperare al principio "neminem laedere", si muove di fronte al semplice "sospetto" di esistenza di un nesso di causalità e pone in atto – nei limiti del possibile – tutte le misure conoscitive ed analitiche già in possesso della comunità scientifica, o da sviluppare, per evitare lo slittamento dal "rischio" al "danno".

In un certo senso, *l'atteggiamento etico è più esigente del giuridico*, e chiede maggiore collaborazione al ricercatore per documentare la reale "responsabilità" dell'agente nella fattispecie.

Ciò sottolinea il ruolo e l'interesse "sociale" della ricerca che si sta conducendo sugli IE, in particolare sui "marcatori specifici di rischio" e sulla attendibilità del trasferimento di prove positive sull'animale alle condizioni di rischio umano.

Questa ricerca varrà certamente al miglioramento della conoscenza dei delicati rapporti fra organismi viventi, ambiente ed attività industriali, ma potrà apportare -anche e soprattutto- contributi di maggiori certezze a chi deve disciplinare produzione, distribuzione e consumo di una importante categoria di sostanze peraltro utili allo sviluppo materiale, nonché ottemperare a criteri etici di verità e giustizia nell'accertamento del "nesso di causalità" fra comportamenti e danni.

4. Conclusioni: caratteristiche e ricadute della piattaforma progettuale “ambiente e salute”.

Una valutazione obiettiva non può che concludere come l'Italia rimanga ancora indietro, sul piano sia delle risorse sia delle iniziative, rispetto a molti altri paesi -europei e non- sul problema IE nel suo complesso. Per contro, vi è una forte sensibilità nei confronti di *specifici argomenti* inerenti agli interferenti endocrini, quali pesticidi, diossine e, ultimamente, REACH. Pertanto uno degli scopi della piattaforma proposta sarà quello di *integrare tali argomenti in un'unica cornice*, comprendente ricerca ed iniziative di prevenzione.

Nel definire specifici obiettivi e criticità della piattaforma progettuale, occorre anche identificare gli ambiti del “sistema Italia” (e del sistema Europa) per i quali le ricadute della piattaforma sono maggiormente rilevanti. Si può concludere che l'impatto sociale della piattaforma progettuale riguarderà principalmente, ma non esclusivamente

- 1) la *regolamentazione delle sostanze chimiche*, sia riguardo al programma REACH sia riguardo alla tutela dei lavoratori;
- 2) la *protezione dei consumatori* attraverso una più aggiornata regolamentazione delle filiere alimentari e dei prodotti di consumo, nonché, una migliore comunicazione del rischio;
- 3) 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 suscettibili o esposte
- 4) la tutela della salute delle *nuove generazioni* -futuro del corpo sociale, ma anche componente più vulnerabile- estendendo quindi all'ambito salute il concetto di sviluppo sostenibile.

Inoltre, le attività di una piattaforma progettuale “ambiente-salute” dovranno necessariamente tenere conto di aspetti riguardanti

- il rapporto *costo-beneficio* delle azioni proposte. Esempi positivi in tal senso possono essere: la riduzione costi complessivi dei controlli su ambiente ed alimenti -spesso ridondanti od inutili-, aumentandone l'efficacia in termini di protezione del consumatore; il pieno utilizzo degli strumenti (ad esempio, sistemi di monitoraggio, registri di malattie, basi di dati) e delle conoscenze già disponibili.
- la *rimodulazione di obiettivi* per valutare nuovi aspetti e contesti mutati: ad esempio, la riduzione dell'importanza di contaminanti “sotto controllo” rispetto a rischi nuovi o che si presentano in forma nuova, come nanoparticelle e micotossine..

In sintesi, la piattaforma proposta si pone come un modello di *prevenzione traslazionale* che instauri un circolo virtuoso fra ricerca, innovazione, valutazione ed intervento.

BIBLIOGRAFIA

- Almstrup K, Fernandez MF, Petersen JH, Olea N, Skakkabaek NE, Leffers H. Dual effects of phytoestrogens in U-shaped dose-response curves. 2002 Environ Health Perspect 110:743-8.
- Aprea C, Strambi M, Novelli MT, Lunghini L, Bozzi N. Biologic monitoring of exposure to organophosphorus pesticides in 195 Italian children. Environ Health Perspect. 2000 Jun;108(6):521-5.
- Baldi F, Mantovani A. A new database for food safety: EDID (Endocrine disrupting chemicals - Diet Interaction Database). 2008 Annali dell'Istituto Superiore di Sanità, 44(1): 57-63.
- Becker PR, Wise SA. The U.S. National biomonitoring specimen bank and the marine environmental specimen bank. J Environ Monit 2006,8(8):795-9.
- Bianchi F, Biggeri A, Cadum E, Comba P, Forastiere F, Martuzzi M, Terracini B. Epidemiologia ambientale e aree inquinate in Italia. Epidemiol Prev 2006, 30 (3): 146-152.
- Borghesi N, Corsolini S, Leonards P, Brandsma S, de Boer J, Focardi S. Polybrominated diphenyl ether contamination levels in fish from the Antarctic and the Mediterranean Sea. Chemosphere. 2009 Aug 17 [Epub ahead of print]
- Bremer S, Cortvrindt R, Daston G, Elettì B, Mantovani A, Maranghi F, Pelkonen O, Ruhdel I, Spielmann H. (2005) Reproductive and Developmental Toxicity. Altern Lab Anim 33 (Suppl. 1):183-209
- Calamandrei G, La Rocca C, Venerosi Pesciolini A, Mantovani A. (A cura di) Interferenti endocrini: valutazione e prevenzione dei possibili rischi per la salute umana. 2009 Rapporti ISTISAN: 09/18 vi, 95 p.
- Carbone P, Giordano F, Nori F, Mantovani A, Taruscio D, Lauria L, Figa-Talamanca I. The possible role of endocrine disrupting chemicals in the aetiology of cryptorchidism and hypospadias: a population-based case-control study in rural Sicily. 2006 Int J Androl. 30: 3-3
- Caserta D, Maranghi L, Mantovani A, Marci R, Maranghi F, Moscarini M. Impact of endocrine disruptor chemicals in gynaecology. 2008 Hum Reprod Update. 14(1):59-72.
- Ciardullo S, Aureli F, Coni E, Guandalini E, Iosi F, Raggi A, Rufo G, Cubadda F. Bioaccumulation potential of dietary arsenic, cadmium, lead, mercury, and selenium in organs and tissues of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) as a function of fish growth. J Agric Food Chem. 2008 Apr 9;56(7):2442-51.
- Clementi M, Causin R, Marzocchi C, Mantovani A, Tenconi R. A study of the impact of agricultural pesticide use on the prevalence of birth defects in northeast Italy. 2007 Reprod Toxicol. 24(1):1-8.
- Clementi M, Tiboni GM, Causin R, La Rocca C, Maranghi F, Raffagnato F, Tenconi R. (2008) Pesticides and fertility: An epidemiological study in Northeast Italy and review of the literature. Reprod Toxicol. 26(1):13-8
- CNBBSV – Comitato Nazionale Biosicurezza e Biotecnologie (2006). *La sorveglianza dell'esposizione a interferenti endocrini.*
- Commissione Europea – DG Research (2009) *Alternative testing strategies – Progress Report 2009*. http://www.euresearch.ch/fileadmin/documents/PdfDocuments/Alternative_Testing_Strategies_Progress_Report_2009.pdf
- Coccini T, Manzo L, Debes F, Steuerwald U, Weihe P, Grandjean P. No changes in lymphocyte muscarinic receptors and platelet monoamine oxidase-B examined as surrogate central

- nervous system biomarkers in a Faroese children cohort prenatally exposed to methylmercury and polychlorinated biphenyls. *Biomarkers* 2009 Mar;14(2):67-76.
- Cooper BW, Cho TM, Thompson PM, Wallace AD. Phthalate induction of CYP3A4 is dependent on glucocorticoid regulation of PXR expression. *Toxicol Sci.* 2008 Jun;103(2):268-77.
- Corsolini S, Sara G, Borghesi N, Focardi S. HCB, p,p'-DDE and PCB ontogenetic transfer and magnification in bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) from the Mediterranean Sea. *Environ Sci Technol* 2007; 41: 4227-4233
- Courant F, Antignac JP, Laille J, Monteau F, Andre F, Le Bizec B: Exposure assessment of prepubertal children to steroid endocrine disruptors. 2. Determination of steroid hormones in milk, egg, and meat samples. *J Agric Food Chem* 2008; 56: 3176-3184
- Dallaire R, Dewailly E, Ayotte P, Muckle G, Laliberte C, Bruneau S: Effects of prenatal exposure to organochlorines on thyroid hormone status in newborns from two remote coastal regions in Quebec, Canada. *Environ Res* 2008; 108: 387-392
- Daston GP. Gene expression, dose-response, and phenotypic anchoring: applications for toxicogenomics in risk assessment. *Toxicol Sci.* 2008 Oct;105(2):233-4.
- De Angelis S, Tassinari R, Maranghi F, Eusepi A, Di Virgilio A, Chiarotti F, Ricceri L, Venerosi Pesciolini A, Gilardi E, Moracci G, Calamandrei G, Olivieri A, Mantovani A. Developmental exposure to chlorpyrifos induces alterations in thyroid and thyroid hormone levels without other toxicity signs in cd1 mice. 2009 *Toxicol Sci.* 108(2):311-9.
- Diano N., Grano V., Fraconte L., Caputo P., Ricupito A., Attanasio A., Bianco M., Bencivenga U., Rossi S., Manco I., Mita L., Del Pozzo G., Mita D.G. Non-isothermal bioreactors in enzymatic remediation of waters polluted by endocrine disruptors: BPA as a model of pollutant. 2007 *Appl Catal B Env*, 69 (3-4) :252-261.
- Dickson-Spillmann M, Siegrist M, Keller C, Wormuth M. Phthalate exposure through food and consumers' risk perception of chemicals in food. *Risk Anal.* 2009 Aug;29(8):1170-81.
- Di Lorenzo D, Rando G, Ciana P, Maggi A. Molecular imaging, an innovative methodology for whole-body profiling of endocrine disrupter action. 2008 *Toxicol Sci* 106: 304-311
- Durand B, Dufour B, Fraisse D, Defour S, Duhem K, Le Barillec K: Levels of PCDDs, PCDFs and dioxin-like PCBs in raw cow's milk collected in France in 2006. *Chemosphere* 2008; 70: 689-93
- EFSA-European Food Safety Authority. Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to Zearalenone as undesirable substance in animal feed. 2004, *EFSA J*, 89, 1-35
- EFSA-European Food Safety Authority. Opinion of the Scientific Panel on contaminants in the food chain [CONTAM] to assess the health risks to consumers associated with exposure to organotins in foodstuffs. *EFSA J*, 102, 1-119
- EFSA-European Food Safety Authority. Opinion of the Scientific Panel on contaminants in the food chain [CONTAM] related to the safety assessment of wild and farmed fish, 2005, *EFSA J*, 236, 1- 118
- EFSA-European Food Safety Authority. Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA related to the early identification of emerging risks. 2006; *EFSA J.* 375, 1-14
- EFSA-European Food Safety Authority. Perfluorooctane sulfonate (PFOS), perfluorooctanoic acid (PFOA) and their salts Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food chain [1] *EFSA J* 2008; 653, 1-131.

- EFSA-European Food Safety Authority. Scientific Opinion on Risk Assessment for a Selected Group of Pesticides from the Triazole Group to Test Possible Methodologies to Assess Cumulative Effects from Exposure through Food from these Pesticides on Human Health [1] EFSA J 2009; 7 (9); 1167
- Eskenazi B, Marks AR, Bradman A, Harley K, Barr DB, Johnson C, Morga N, Jewell NP: Organophosphate pesticide exposure and neurodevelopment in young Mexican-American children. *Environ Health Perspect* 2007; 115: 792-798
- European Commission HaCD-G: D/530286 Information Note: Methyl mercury in fish and fishery products. 2008; 1-3
- Falco G, Llobet JM, Bocio A, Domingo JL. Daily intake of arsenic, cadmium, mercury, and lead by consumption of edible marine species. *J Agric Food Chem* 2006; 54: 6106-6112
- Fattore E, Fanelli R, Dellatte E, Turrini A, di Domenico A: Assessment of the dietary exposure to non-dioxin-like PCBs of the Italian general population. *Chemosphere* 2008; 73: S278-S283
- Fernandez MF, Aguilar-Garduño C, Molina-Molina JM, Arrebola JP, Olea N. The total effective xenoestrogen burden, a biomarker of exposure to xenoestrogen mixtures, is predicted by the (anti)estrogenicity of its components. 2008 *Reprod Toxicol. Sep*;26(1):8-12.
- Ferrara F, Ademollo N, Delise M, Fabietti F, Funari E. Alkylphenols and their ethoxylates in seafood from the Tyrrhenian Sea. *Chemosphere*. 2008 72(9):1279-85.
- Fery Y, Buschauer I, Salzig C, Lang P, Schrenk D. Technical pentabromodiphenyl ether and hexabromocyclododecane as activators of the pregnane-X-receptor (PXR). *Toxicology*. 2009 Oct 1;264(1-2):45-51.
- Figà-Talamanca I. Occupational risk factors and reproductive health of women. *Occup Med (Lond)*. 2006 Dec;56(8):521-31.
- Figà-Talamanca I, Mantovani A (ed.) *Ambiente e Infanzia in Italia*. Verduci (Roma), 2004
- 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 Sanita*. 2009;45(1):65-75.
- Giordano F, Carbone P, Nori F, Mantovani A, Taruscio D, Figà-Talamanca I. Maternal diet and the risk of hypospadias and cryptorchidism in the offspring. 2008 *Paed Perinat Epidemiol*. 22:249-60.
- Giwercman A, Rylander L, Rignell-Hydbom A, Jonsson BA, Pedersen HS, Ludwicki JK, Lesovoy V, Zvyedday V, Spano M, Manicardi GC, Bizzaro D, Bonefeld-Jorgensen EC, Toft G, Bonde JP, Giwercman C, Tiido T, Giwercman YL; INUENDO (2007). Androgen receptor gene CAG repeat length as a modifier of the association between persistent organohalogen pollutant exposure markers and semen characteristics. *Pharmacogen Genomics* 17: 391-401.
- Gore AC. Developmental programming and endocrine disruptor effects on reproductive neuroendocrine systems. *Front Neuroendocrinol*. 2008;29(3):358-74.
- Gramatica P. Principles of QSAR models validation: internal and external, *QSAR Comb.Sci*. 2007, 26(5), 694-701.
- HAMPL R, OSTATNIKOVA D, CELEC P, PUTZ Z, LAPCÍK O, MATUCHA P. Short-term effect of soy consumption on thyroid hormone levels and correlation with phytoestrogen level in healthy subjects. *Endocr Regul*. 2008 Jun;42(2-3):53-61.
- Harris RM, Waring RH: Sulfotransferase inhibition: potential impact of diet and environmental chemicals on steroid metabolism and drug detoxification. *Curr Drug Metab* 2008; 9: 269-75
- Hartung T. Toxicology for the twenty-first century. *Nature*. 2009 Jul 9;460(7252):208-12.

- Hewitt M, Madden JC, Rowe PH, Cronin MT. Structure-based modelling in reproductive toxicology: (Q)SARs for the placental barrier. SAR QSAR Environ Res. 2007 Jan-Mar;18(1-2):57-76.
- Hoffmann S, Edler L, Gardner I, Gribaldo L, Hartung T, Klein C, Liebsch M, Sauerland S, Schechtman L, Stamatii A, Nikolaidis E. Points of reference in the validation process: the report and recommendations of ECVAM Workshop 6 Altern Lab Anim. 2008 Jul;36(3):343-52
- Huang P-C, Kuo P-L, Guo Y-L, Lee C-C. Association between urinary phthalate monoesters and thyroid hormones in pregnant women, 2007 Human Reproduction, 22: 2715-22
- Istituto Superiore di Sanità. Ufficio Stampa: "Vademecum di prevenzione" 2003 <http://www.iss.it/binary/inte/cont/vademecum.1162289149.pdf>
- Istituto Superiore di Sanità. Atti del Corso "Modelli di valutazione rischio-beneficio in sicurezza alimentare" 23-24/62009. <http://www.iss.it/inte/prog/cont.php?id=183&lang=1&tipo=3>
- Kelly-Spratt KS, Kasarda AE, Igra M, Kemp CJ. A mouse model repository for cancer biomarker discovery. J Proteome Res 2008,7(8):3613-8.
- Landrigan P, Garg A, Droller DB. Assessing the effects of endocrine disruptors in the National Children's Study. Environ Health Perspect. 2003;111(13):1678-82.
- Lang IA, Galloway TS, Scarlett A, Henley WE, Depledge M, Wallace RB, Melzer D: Association of urinary bisphenol A concentration with medical disorders and laboratory abnormalities in adults. JAMA 2008; 300: 1303-10
- La Rocca C., Mantovani A. From environment to food:the case of PCB. Annali dell'Istituto Superiore di Sanità, 2006; 42(4):410-5.
- Lazzari G, Tessaro I, Crotti G, Galli C, Hoffmann S, Bremer S, Pellizzer C. Development of an in vitro test battery for assessing chemical effects on bovine germ cells under the ReProTect umbrella. Toxicol Appl Pharmacol. 2008 Dec 15;233(3):360-70.
- Mantovani A, Baldi F. Ridurre l'esposizione a interferenti endocrini: gli idrocarburi policiclici aromatici negli alimenti. 2008, <http://www.iss.it/inte/aspe/cont.php?id=165&lang=1&tipo=5>
- Mantovani A, Baldi F. Sostanze con attivita' endocrina negli agrumi e farmaci. 2008, <http://www.iss.it/inte/aspe/cont.php?id=167&lang=1&tipo=5>
- Mantovani A, Maranghi F, La Rocca C, Tiboni GM, Clementi M. The role of toxicology to characterize biomarkers for agrochemicals with potential endocrine activities. 2008 Reprod Toxicol. 26(1):1-7.
- Maranghi F, Baldi F, Mantovani A. Sicurezza alimentare e salute dell'infanzia (A cura di). 2005, Rapporti Istisan 05/35, 139 p.
- Maranghi F, Rescia M, Macri C, Di Consiglio E, De Angelis G, Testai E, Farini D, De Felici M, Lorenzetti S, Mantovani A. (2007) Lindane may modulate the female reproductive development through the interaction with ER-beta: an in vivo-in vitro approach. Chem Biol Interact. 169(1):1-14.
- Marlowe J, Teo SS, Chibout SD, Pognan F, Moggs J. Mapping the epigenome--impact for toxicology. EXS. 2009;99:259-88.
- Marti-Cid R, Bocio A, Llobet JM, Domingo JL: Balancing health benefits and chemical risks associated to dietary habits: RIBEFood, a new Internet resource. Toxicology 2008; 244: 242-8

- Martin OV, Lester JN, Voulvoulis N, Boobis AR. Human health and endocrine disruption: a simple multicriteria framework for the qualitative assessment of endpoint-specific risks in a context of scientific uncertainty. 2007 *Toxicol Sci*, 98: 332-47.
- Mazur W, Adlercreutz H. Overview of naturally occurring endocrine-active substances in the human diet in relation to human health. *Nutrition* 2000; 16: 654-658
- Mazzoleni G, Di Lorenzo D, Steimberg N. Modelling tissues in 3D: the next future of pharmacotoxicology and food research? *Genes Nutr*. 2009 Mar;4(1):13-22.
- Medda E, Olivieri A, Stazi MA et al. Risk factors for congenital hypothyroidism: results of a population case-control study (1997-2003). *Eur. J Endocrinol*. 2005;153(6):765-73.
- Milerova J, Cerovska J, Zamrazil V, Balek R, Lapcak O, Hampl R. Actual levels of soy phytoestrogens in children correlate with thyroid laboratory parameters. *Clin. Chem. Lab. Med*. 2006;44(2):171-4.
- Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali. *Controllo ufficiale sui residui di prodotti fitosanitari negli alimenti di origine vegetale -Anno 2007*. 2008, <http://www.ministerosalute.it/fitosanitari/paginaInternaMenuFitosanitari.jspid=1105&lingua=italiano&menu=vegetali>
- Mita DG, Attanasio A, Arduini F, Diano N, Grano V, Bencivenga U, Rossi S, Amine A, Moscone D. Enzymatic determination of BPA by means of tyrosinase immobilized on different carbon carriers. 2007 *Biosens Bioelectron*. 23(1):60-65.
- Mocarelli P, Gerthoux PM, Ferrari E, Patterson DG Jr, Kieszak SM, Brambilla P, Vincoli N, Signorini S, Tramacere P, Carreri V, Sampson EJ, Turner WE, Needham LL. Paternal concentrations of dioxin and sex ratio of offspring. *Lancet*. 2000;355(9218):1858-63.
- Montani C; Penza M; Jeremic M; Biasiotto G; La Sala G.; De Felici M; Ciana P; Maggi A; Di Lorenzo D (2008). Genistein is an efficient estrogen in the whole body throughout mouse development. *Toxicol Sci*. 103(1):57-67.
- Mozaffarian D, Rimm EB: Fish intake, contaminants, and human health: evaluating the risks and the benefits. *JAMA* 2006; 296: 1885-1899
- Musmeci L, Bianchi F, Carere M, Cori L. Ambiente e salute a Gela: stato delle conoscenze e prospettive di studi. *Epidemiol Prev* 2009; 33(3) Suppl 1: 1-160.
- Newbold RR, Padilla-Banks E, Snyder RJ, Philips TM, Jefferson WN. Developmental exposure to endocrine disruptors and the obesity epidemic. 2007 *Reprod Toxicol* 23: 290-6.
- NRC- U.S. National Research Council (2008). *Phthalates and Cumulative Risk Assessment*. The National Academy Press, Washington, DC.
- Olivieri A, the Study Group for Congenital Hypothyroidism. The Italian National register of Infants with Congenital Hypothyroidism: twenty years of surveillance and study of congenital hypothyroidism. *I.J. Ped* 2009, 35:2.
- Orban E. MM: Residue Level of organochlorine pesticides in fish from italian fishery and aquaculture. In *Progress in Pesticides Research*. Christopher M. Kanzantzakis .Nova Science Publisher, 2008.
- Papoutsis Z, Zhao C, Putnik M, Gustafsson JA, Dahlman-Wright K. Binding of estrogen receptor alpha/beta heterodimers to chromatin in MCF-7 cells. *J Mol Endocrinol*. 2009 Aug;43(2):65-72.
- Paracchini V, Garte S, Taioli E. (2006) MTHFR C677T polymorphism, GSTM1 deletion and male infertility: a possible suggestion of a gene-gene interaction? *Biomarkers*, 11:53-60.

- Peeters PH, Slimani N, van der Schouw YT, Grace PB, Navarro C, Tjonneland A, Olsen A, Clavel-Chapelon F, Touillaud M, Boutron-Ruault MC, Jenab M, Kaaks R, Linseisen J, Trichopoulou A, Trichopoulos D, Dilis V, Boeing H, Weikert C, Overvad K, Pala V, Palli D, Panico S, Tumino R, Vineis P, Bueno-de-Mesquita HB, van Gils CH, Skeie G, Jakszyn P, Hallmans G, Berglund G, Key TJ, Travis R, Riboli E, Bingham SA. Variations in plasma phytoestrogen concentrations in European adults. *J Nutr.* 2007 May;137(5):1294-300.
- Peralta-Videa JR, Lopez ML, Narayan M, Saupé G, Gardea-Torresdey J. The biochemistry of environmental heavy metal uptake by plants: implications for the food chain. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009 Aug-Sep;41(8-9):1665-77.
- Pombo M, Castro-Feijóo L. Endocrine disruptors. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2005;18 Suppl 1:1145-55.
- Pinto B, Garritano SL, Cristofani R, Ortaggi G, Giuliano A, Amodio-Cocchieri R, Cirillo T, De Giusti M, Boccia A, Reali D. Monitoring of polychlorinated biphenyl contamination and estrogenic activity in water, commercial feed and farmed seafood. *Environ Monit Assess.* 2008 Sep;144(1-3):445-53.
- Reich WT (ed), 1995, *Encyclopedia of Bioethics*, Simon & Schuster- Macmillan, New York, 1995.
- Ricupito A, Del Pozzo G, Diano N, Grano V, Portaccio M, Marino M, Bolli A, Galluzzo P, Bontempo P, Mita L, Altucci L, Mita DG. Effect of bisphenol A with or without enzyme treatment on the proliferation and viability of MCF-7 cells. *Environ Int.* 2009;35(1):21-6.
- Rigon C, Andrisani A, Forzan M, D'Antona D, Bruson A, Cosmi E, Ambrosini G, Tiboni GM, Clementi M. (2009) Association study of AMH and AMHRII polymorphisms with unexplained infertility. *Fertil Steril.* 2009 Jun 17. [Epub ahead of print]
- Roncaglioni A, Piclin N, Pintore M, Benfenati E. Binary classification models for endocrine disrupter effects mediated through the estrogen receptor. *SAR QSAR Environ Res.* 2008 Oct;19(7-8):697-733.
- Saieva C, Aprea C, Tumino R, Masala G, Salvini S, Frasca G, Giurdanella MC, Zanna I, Decarli A, Sciarra G, Palli D. Twenty-four-hour urinary excretion of ten pesticide metabolites in healthy adults in two different areas of Italy (Florence and Ragusa). *Sci Total Environ.* 2004 Oct 1;332(1-3):71-80.
- Schechter A, Li L. Dioxins, dibenzofurans, dioxin-like PCBs, and DDE in U.S. fast food, 1995. *Chemosphere* 1997; 34: 1449-1457
- Scheepers PT. The use of biomarkers for improved retrospective exposure assessment in epidemiological studies: summary of an ECETOC workshop. 2008 *Biomarkers*, 13: 734-48.
- Serafimova R, Todorov M, Nedelcheva D, Pavlov T, Akahori Y, Nakai M, Mekenyan O. QSAR and mechanistic interpretation of estrogen receptor binding. *SAR QSAR Environ Res.* 2007 May-Jun;18(3-4):389-421.
- Spadoni M, Voltaggio M, Carcea M, Coni E, Raggi A, Cubadda F. Bioaccessible selenium in Italian agricultural soils: Comparison of the biogeochemical approach with a regression model based on geochemical and pedoclimatic variables. *Sci Total Environ.* 2007 Apr 15;376(1-3):160-77.
- Spano M, Toft G, Hagmar L, Eleuteri P, Rescia M, Rignell-Hydbom A, Tyrkiel E, Zvezday V, Bonde JP; INUENDO. Exposure to PCB and p, p'-DDE in European and Inuit populations: impact on human sperm chromatin integrity. 2005 *Hum Reprod.* 20:3488-99.
- Tait S. Epigenetica ed Interferenti Endocrini. 2007 <http://www.iss.it/inte/aspect/cont.php?id=136&lang=1&tipo=5>

- Tait S, Ricceri L, Venerosi A, Maranghi F, Mantovani A, Calamandrei G. (2009) Long-Term Effects on Hypothalamic Neuropeptides after Developmental Exposure to Chlorpyrifos in Mice. *Environ Health Perspect.* 117:112-116.
- Télez Télez R, Michaud Chacón P, Reyes Abarca C, Blount BC, Van Landingham CB, Crump KS, Gibbs JP. Long-term environmental exposure to perchlorate through drinking water and thyroid function during pregnancy and the neonatal period. *Thyroid.* 2005 Sep;15(9):963-75.
- Tropsha A, Gramatica P, Gombar VK. The Importance of Being Earnest: Validation is the Absolute Essential for Successful Application and Interpretation of QSPR Models, *QSAR & Comb. Sci.*, 2003, 22, 69-77.
- Van der Linden SC, Heringa MB, Man HY, Sonneveld E, Puijker LM, Brouwer A, Van der Burg B. Detection of multiple hormonal activities in wastewater effluents and surface water, using a panel of steroid receptor CALUX bioassays. *Environ Sci Technol.* 2008 Aug 1;42(15):5814-20.
- Wolff MS, Teitelbaum SL, Windham G, Pinney SM, Britton JA, Che limo C, Godbold J, Biro F, Kushi LH, Pfeiffer CM, Calafat AM. Pilot study of urinary biomarkers of phytoestrogens, phthalates, and phenols in girls. 2007 *Environ Health Perspect.* 115:116-21.
- Yaktine AL, Harrison GG, Lawrence RS. Reducing exposure to dioxins and related compounds through foods in the next generation. *Nutr Rev* 2006; 64: 403-409
- Yaragatti M, Basilico C, Dailey L. Identification of active transcriptional regulatory modules by the functional assay of DNA from nucleosome-free regions. *Genome Res.* 2008;18(6):930-8.
- Zachary M, Greenway GM. Comparative PBT screening using (Q)SAR tools within REACH legislation. *SAR QSAR Environ Res.* 2009 Jan;20(1):145-57.