



Interferenti Endocrini nella filiera agro-alimentare

Stefano LORENZETTI

stefano.lorenzetti@iss.it

**ISS - Istituto Superiore di Sanità
Department of Food Safety and Veterinary Public Health**



INDICE

➤ **INTERFERENTI ENDOCRINI**

- **Definizioni**
- **Cosa sono**
- **Dove si trovano**
- **Perché ci interessano**
- **I meccanismi di azione**

➤ **LA REALTÀ ITALIANA ED EUROPEA DEL RISCHIO CHIMICO**

- **Il piano nazionale residui (PNR2013-PNR2014)**
- **I residui dei pesticidi nel 2013 (rapporto EFSA2015)**
- **Esposizione multiple e limiti della tossicologia**
- **Interferenti Endocrini e valutazione del rischio nei Regolamenti europei**
- **Identificazione di effetti avversi mediante approcci *in vitro***



INDICE

➤ **INTERFERENTI ENDOCRINI**

- **Definizioni**
- **Cosa sono**
- **Dove si trovano**
- **Perché ci interessano**
- **I meccanismi di azione**

➤ **LA REALTÀ ITALIANA ED EUROPEA DEL RISCHIO CHIMICO**

- **Il piano nazionale residui (PNR2013-PNR2014)**
- **I residui dei pesticidi nel 2013 (rapporto EFSA2015)**
- **Esposizione multiple e limiti della tossicologia**
- **Interferenti Endocrini e valutazione del rischio nei Regolamenti europei**
- **Identificazione di effetti avversi mediante approcci *in vitro***



INTERFERENTI ENDOCRINI : cosa sono (1)

LE DEFINIZIONI

✓ Endocrine Active Substance / EAS

una sostanza avente la capacità intrinseca di interagire o interferire con uno o più componenti del sistema endocrino **causando un effetto biologico**, ma non deve necessariamente causare effetti negativi.

“a substance having the inherent ability to interact or interfere with one or more components of the endocrine system resulting in a biological effect, but need not necessarily cause adverse effects.” **EFSA Journal 2013;11(3):3132**

✓ Interferente Endocrino / IE – Endocrine Disruptors / EDs

una sostanza esogena, o una miscela, che altera la funzionalità del sistema endocrino, **causando effetti avversi** sulla salute di un organismo, oppure della sua progenie o di una (sotto)popolazione.

“An endocrine disrupter is an exogenous substance or mixture that alters function(s) of the endocrine system and consequently causes adverse health effects in an intact organism, or its progeny, or (sub)populations.” **WHO/IPCS 2002**

➤ In altre parole, **“gli IE sono Endocrine Active Substances/EASs che causano effetti avversi mediante meccanismi endocrini”**

“Endocrine Disruptors (EDs) (i.e., EASs causing adverse effects mediated by endocrine mechanisms)”
Rovida, De Angelis, Lorenzetti. ALTEX 30, 2/13



INTERFERENTI ENDOCRINI : cosa sono (2)

LE STRUTTURE CHIMICHE - Interferenti Endocrini di origine naturale

FITO-ESTROGENI - MICOTOSSINE.

- ✓ Sostanze chimiche prodotte da **piante** o **funghi** che, strutturalmente e/o funzionalmente, assomigliano agli estrogeni di mammifero.
- ✓ Il loro ruolo naturale è di proteggere le piante dallo stress e di agire come parte del meccanismo di difesa delle piante.
- Le classi principali sono quelle dei **flavonoidi**, **lignani** e cumestani
- Più di 4000 sostanze chimiche di origine naturale vengono considerate fito-estrogeniche !?

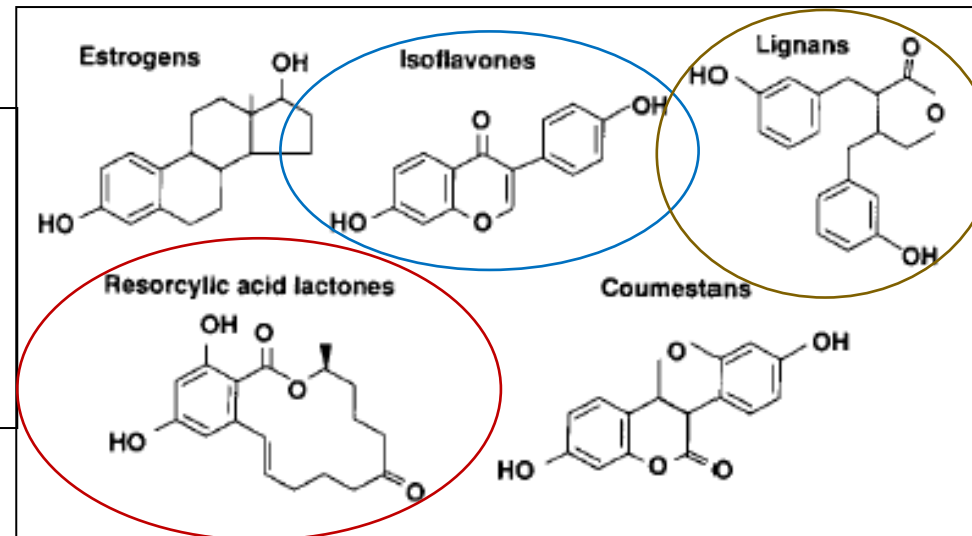
FLAVONOIDI

Isoflavoni: Genisteina, Daidzeina

Flavonoli: Quercetina

Flavanoli: Luteolina e Apigenina

Flavanones: Naringenina



✓ *Binding to the estrogen receptor (ER)*

✓ *Induction of specific estrogen responsive gene products*

✓ *Stimulation of ER-positive breast cancer cell growth*

“ ...any plant substance or metabolite that induces biological responses in vertebrates and can mimic or modulate the actions of endogenous oestrogens usually by binding to estrogen receptors.”

(COT Report 2003 on Phytoestrogens and Health - UK Food Standard Agency)



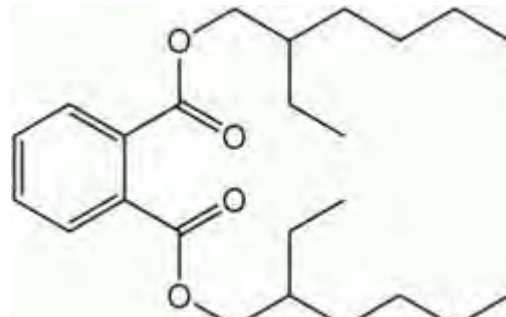
INTERFERENTI ENDOCRINI : cosa sono (3)

LE STRUTTURE CHIMICHE - Interferenti Endocrini di sintesi chimica

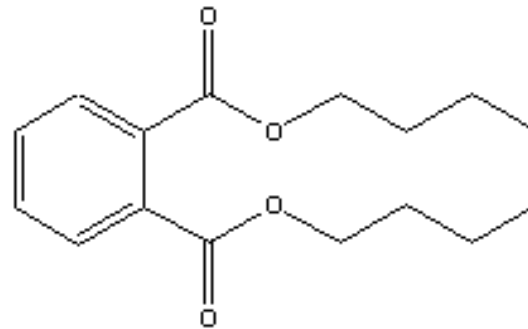
XENO-ESTROGENI. Sostanze di origine sintetica prodotte dall'industria agro-alimentare e chimica, la cui introduzione nell'ambiente sarebbe responsabile di notevoli alterazioni dei meccanismi riproduttivi delle specie viventi (nell'uomo, TDS/testicular dysgenesis syndrome).

Esempi:	plasticizzanti:	bisfenol A / BPA; ftalati (DBP, DEHP)	ERs, AR; PPARs
	insetticidi, fungicidi:	linuron, lindano, vinclozolina	AR, ERs
	diossine:	TCDD	AhR

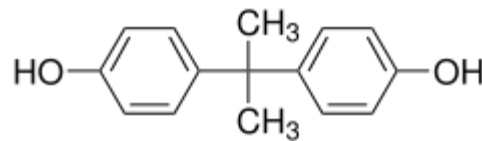
✓ La loro azione in realtà è spesso mediata da uno o più recettori nucleari (NRs), non necessariamente o non solo dai recettori per gli estrogeni !



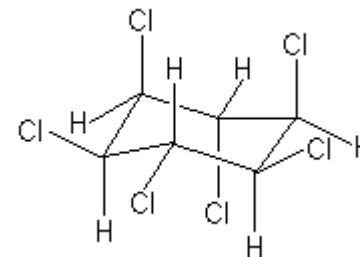
bis(2-ethylhexyl) ftalato
DEHP



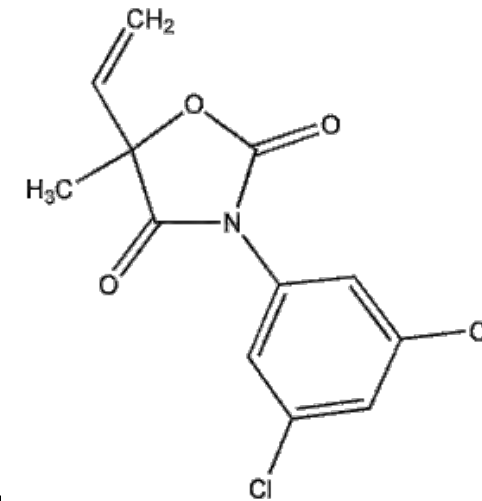
di-*n*-butyl ftalato
DBP



bisfenolo A / BPA



lindano: γ -esaclorocicloesano / γ -HCH



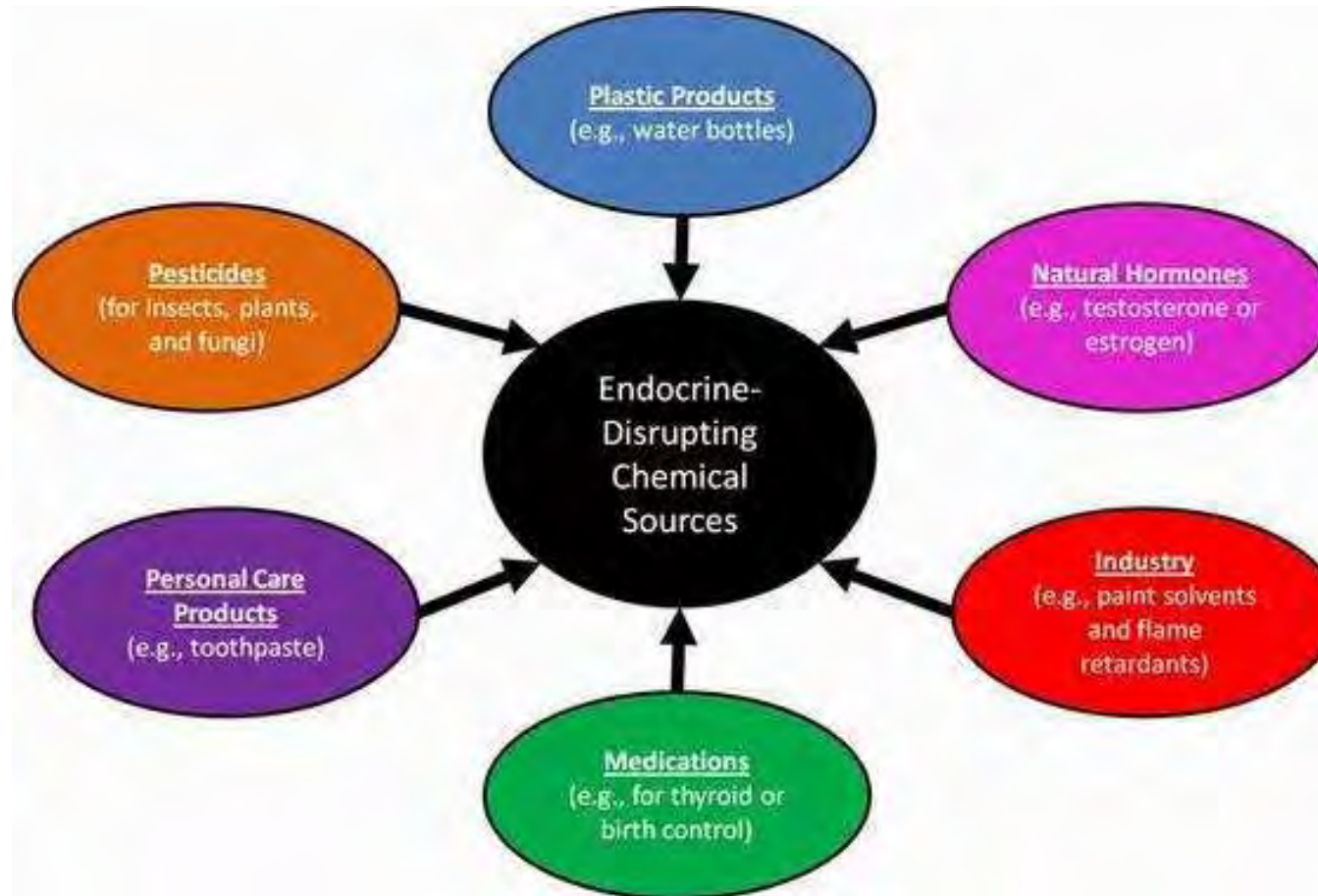
vinclozolina



INTERFERENTI ENDOCRINI : dove si trovano (1)

Gli Interferenti Endocrini di sintesi

si trovano in prodotti di largo consumo e vengono assunti principalmente attraverso l'alimentazione (popolazione generale), ed in misura minore mediante la via inalatoria o dermica (soprattutto, i professionalmente esposti)





INTERFERENTI ENDOCRINI : dove si trovano (2)

Gli Interferenti Endocrini di origine naturale

vengono assunti attraverso l'alimentazione, con il consumo di frutta e verdura :

- mele, frutta e ortaggi in genere
- agrumi tè, caffè, cioccolato, tè verde
- frutti rossi e vino rosso
- olive e olio extra vergine di oliva
- cereali
- soia



quercetina



flavononi



catechine



antociani/stilbeni



secoiridoidi
(tirosolo e derivati)



lignani



isoflavoni



≤ 20 gr olive oil *pro die*
(≥ 5 mg hydroxytyrosol and derivatives)
"Consumption of olive oil polyphenols
contributes to the protection of blood
lipids from oxidative damage."



INTERFERENTI ENDOCRINI : dove si trovano (3)

La Piramide Alimentare nella Dieta Mediterranea

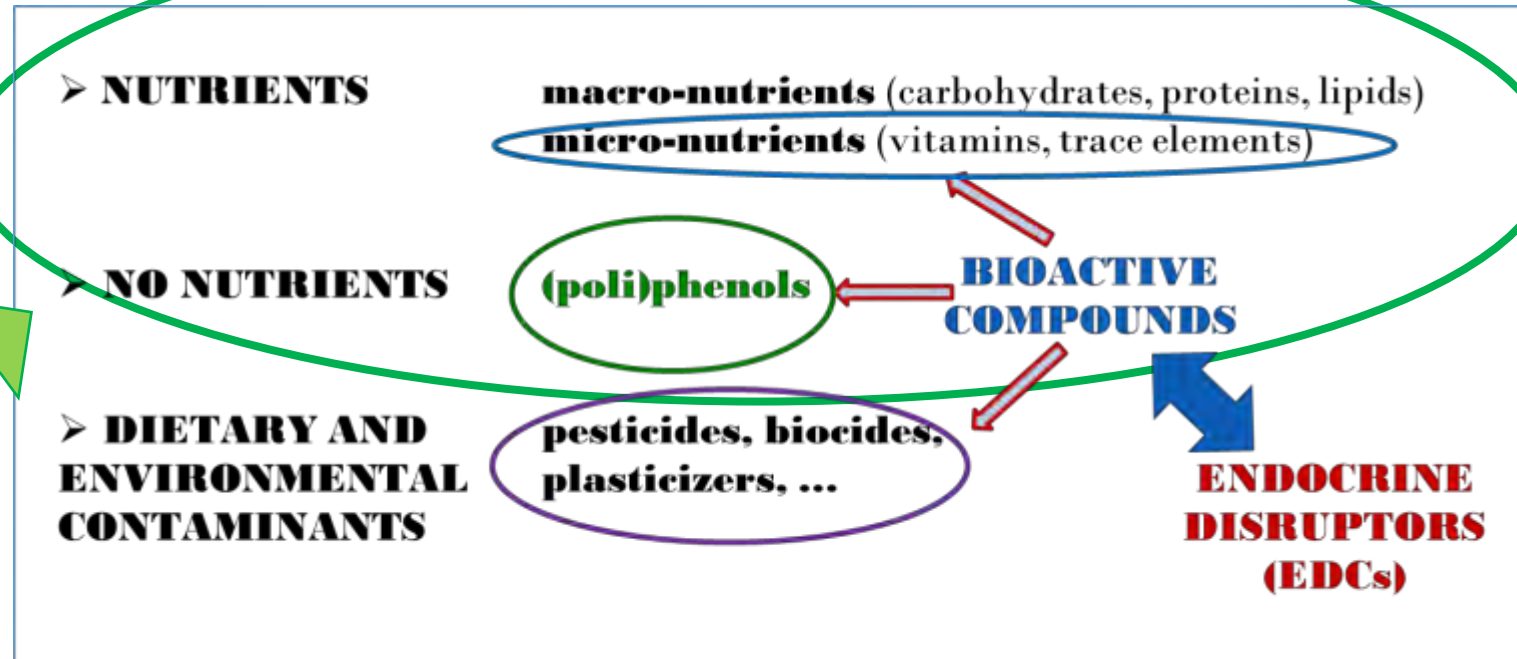
Bevande:

Acqua - 6 bicchieri al giorno

Vino - 1 bicchiere scarso a pasto



Modificato da:
 © 2000 Oldways Preservation & Exchange Trust



- **L'ALIMENTO** rappresenta:
- ✓ una miscela complessa
- ✓ una fonte di nutrienti e (non) nutrienti ...
- ✓ ... ma anche una fonte di contaminanti ambientali e della filiera agro-alimentare



INTERFERENTI ENDOCRINI : origine dell'interesse (1)

EFFETTI AVVERSI ECO-TOSSICOLOGICI...

➤ **Prima evidenza:
infertilità da trifoglio rosso
negli ovini australiani (1940 circa)
per eccesso di isoflavoni
(genistenina, daidzeina, formononetina, biocianina A)**



➤ **Femminizzazione degli alligatori**

➤ **Intersex nei pesci**

➤ **Sviluppo anfibi adulti**

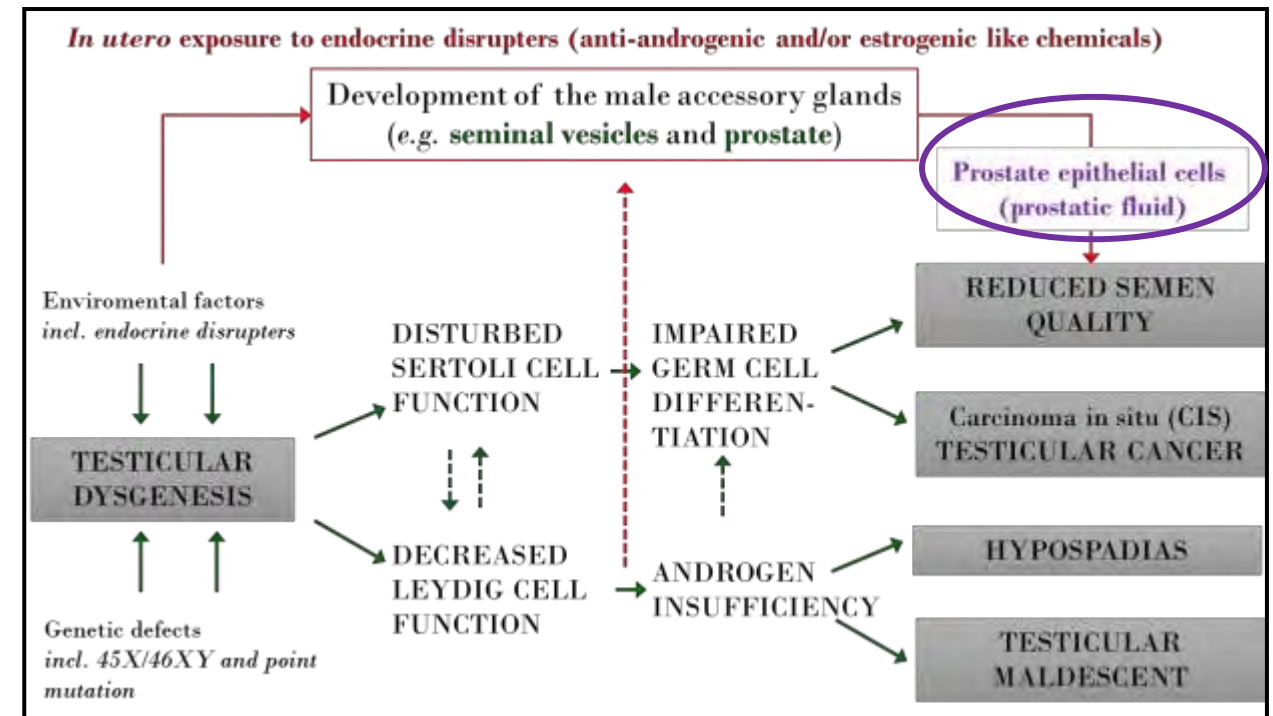
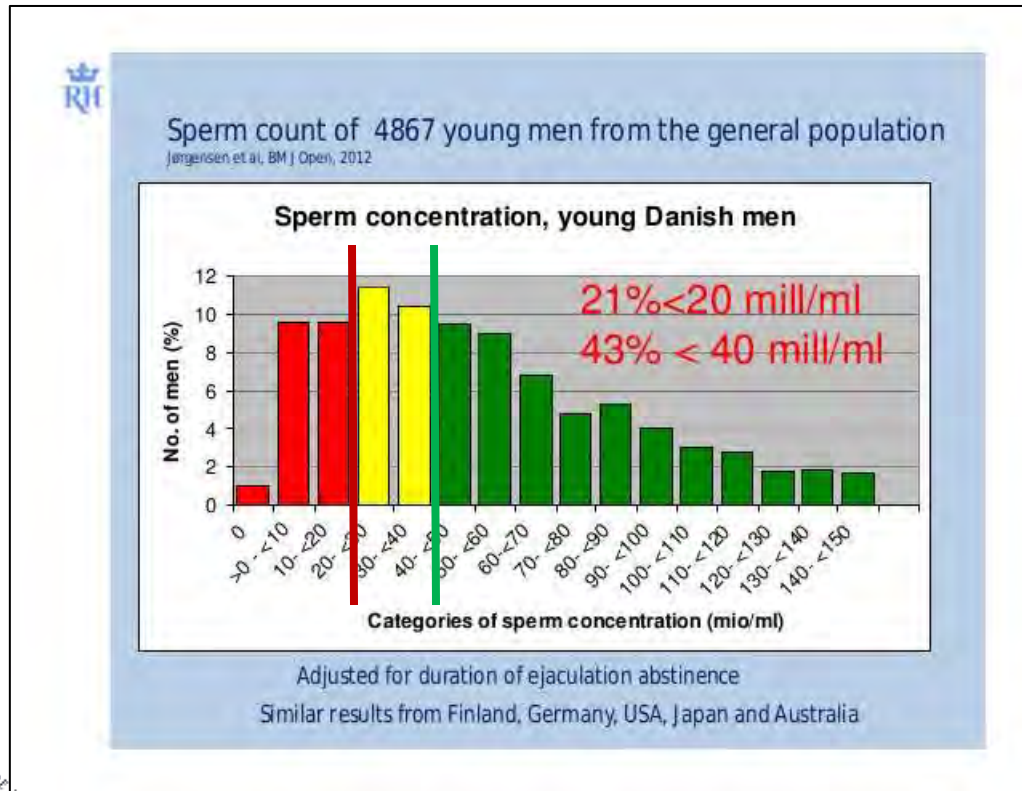


INTERFERENTI ENDOCRINI : origine dell'interesse (2)

EFFETTI AVVERSI ... SULL'UOMO

Infertilità maschile: numero degli spermatozoi e sindrome della disgenesi testicolare (TDS)

contaminanti organici persistenti (POPs)
 pesticidi, erbicidi, fungicidi ad attività anti-androgenica
 plastificanti (ftalati, bisfenoli)
 etc.





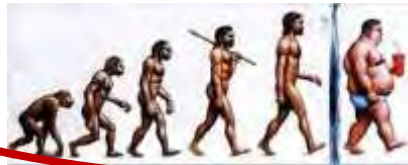
INTERFERENTI ENDOCRINI : origine dell'interesse (3)

EFFETTI AVVERSI ... SULL'UOMO

Effetti obesogeni

organostannici/organotine
 plastificanti (ftalati, bisfenoli)

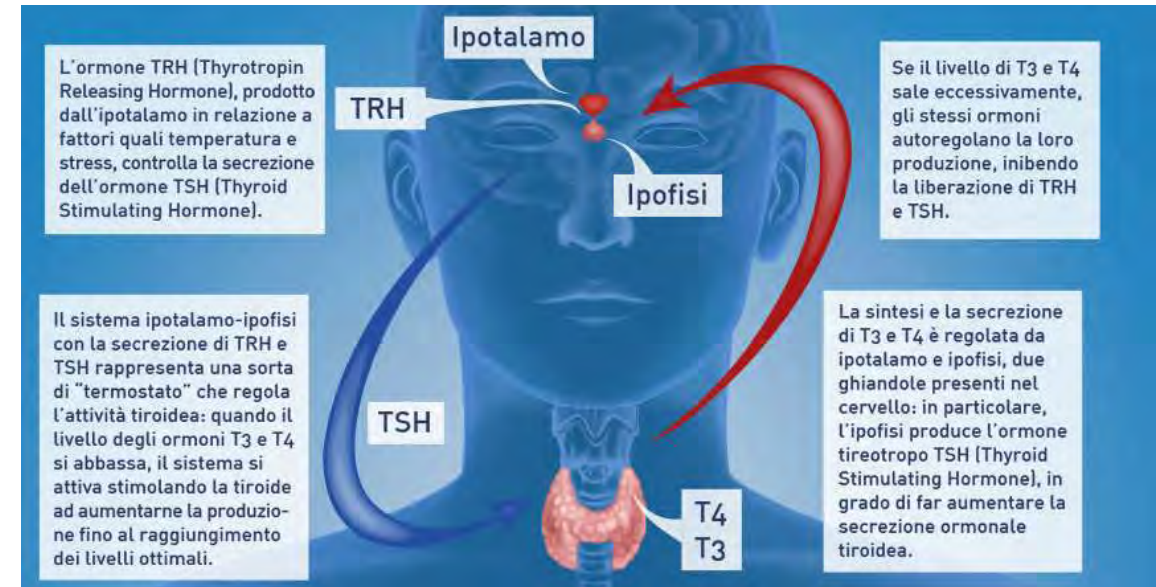
OBESOGEN FACTORS



Accumulo lipidico

Effetti goitrogenici

genisteina
 glucosinolati/isotiocianati



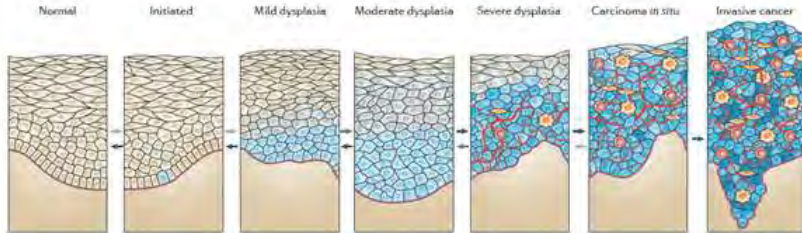
Uptake dello iodio – attività della TPO



INTERFERENTI ENDOCRINI : origine dell'interesse (4)

EFFETTI BENEFICI PER L'UOMO

ENDOCRINE-DEP. TUMOURS

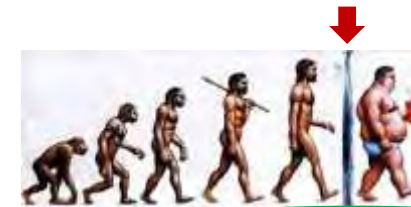


Vasta letteratura in studi epidemiologici ed in sistemi sperimentali modello (*in vitro* e *in vivo*):

- Fattori anti-proliferativi, anti-tumorali, pro-apoptotici
- Fattori anti-infiammatori
- Effetti positivi su biomarcatori di malattie cardio-vascolari e sulla sindrome metabolica in genere
- Effetti positivi su biomarcatori di malattie ossee ed epatiche...

Bioactive agent	Cancer	Stage of agent development	Equivalent synthetic drugs
Soy isoflavones	Breast	Clinical trials	SERMs: tamoxifene, raloxifene
Lycopene (tomatoes)	Prostate and lung	Phase II RCT (prostate); cohort studies (lung)	5α-reductase inhibitors: finasteride and dutasteride
Resveratrol (grapes and red wine)	Oesophageal, intestinal, colon and others	Preclinical and animal studies	Aromatase inhibitors: anastrozole and exemestane
Omega-3-fatty acids (fish oil)	Prostate, breast and colon	Animal models (prostate, breast and colon); Phase II studies (all cancer)	Metformin
Pomegranate	Breast, lung and prostate	Preclinical and animal studies (breast and lung); Phase II study (prostate)	Aspirin (off-label)
Curcumin	Carcinogenesis, prostate and colorectal	Preclinical and animal studies; limited human trial data	---

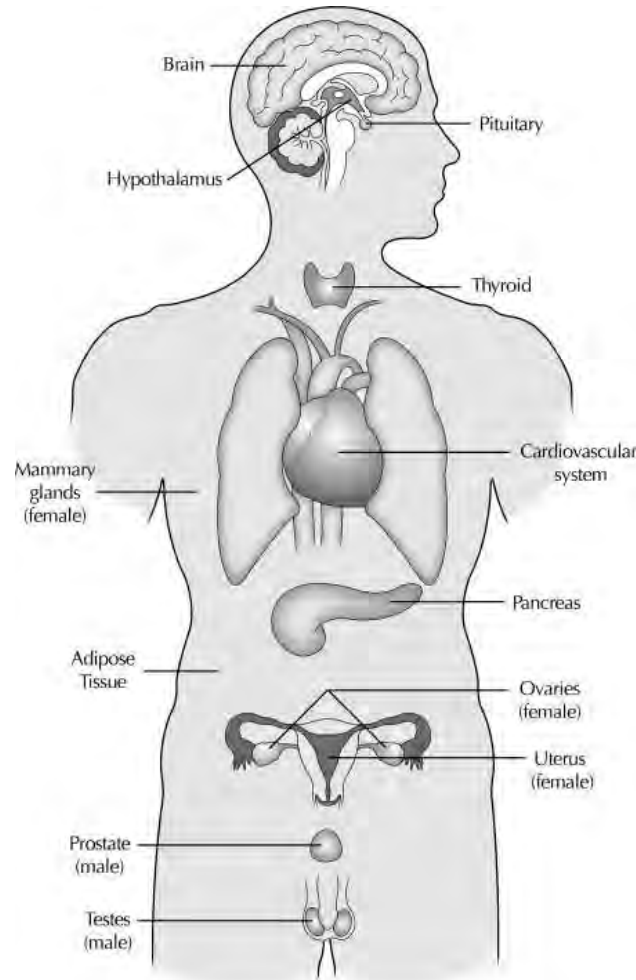
OBESOGEN FACTORS





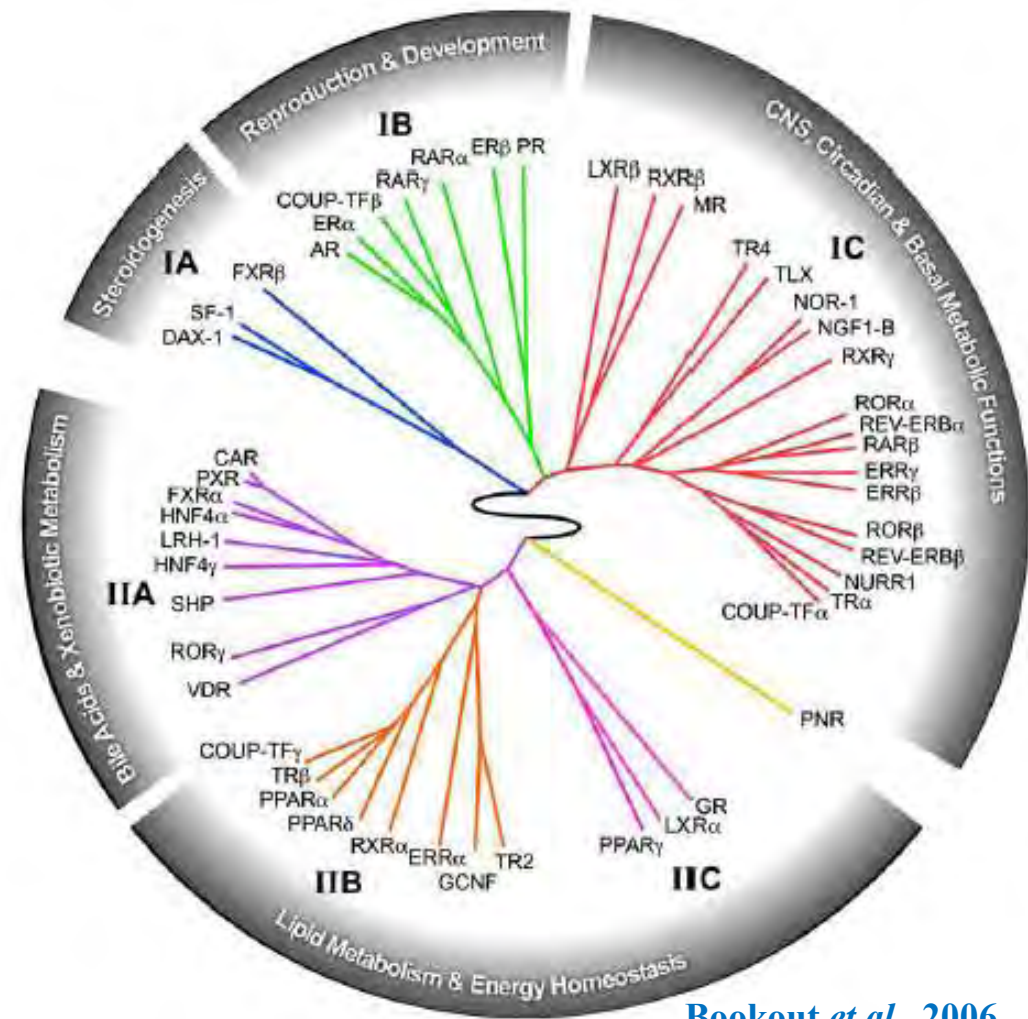
INTERFERENTI ENDOCRINI: i meccanismi di azione (1)

Bersagli dell'azione endocrina e dell'interferenza endocrina



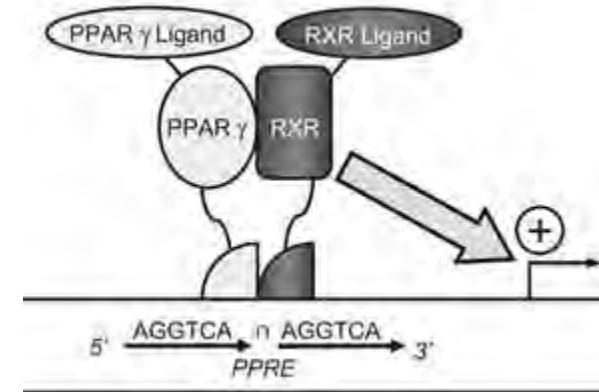
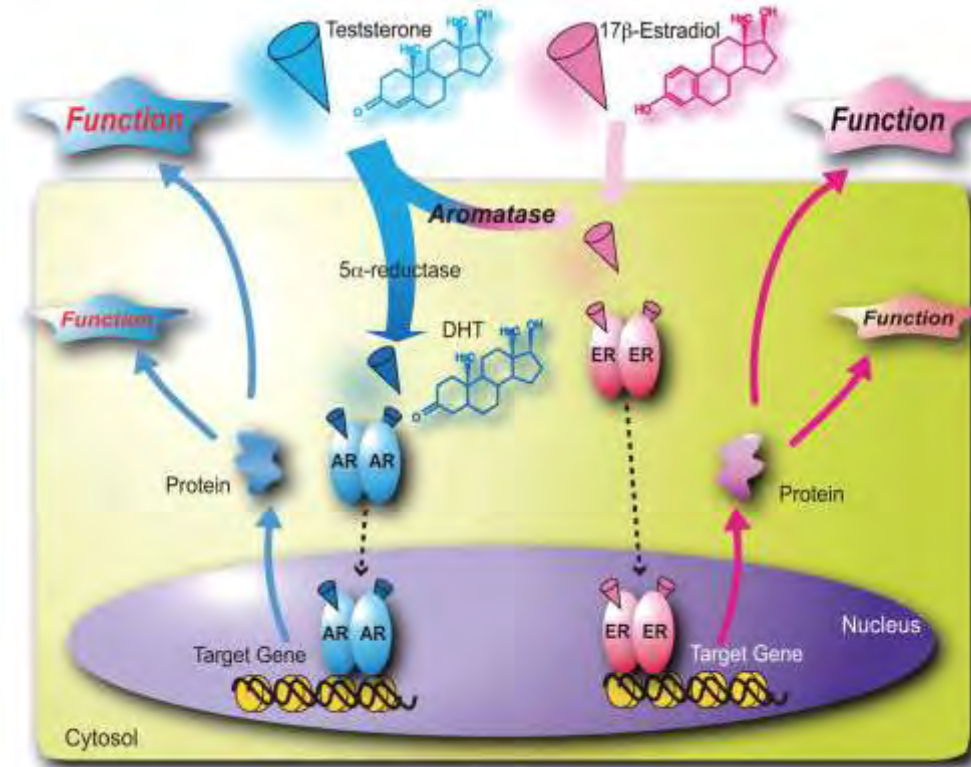
ormoni
 ⇔
 Interferenti Endocrini

Dendrogramma circolare della superfamiglia dei recettori nucleari e loro funzioni correlate

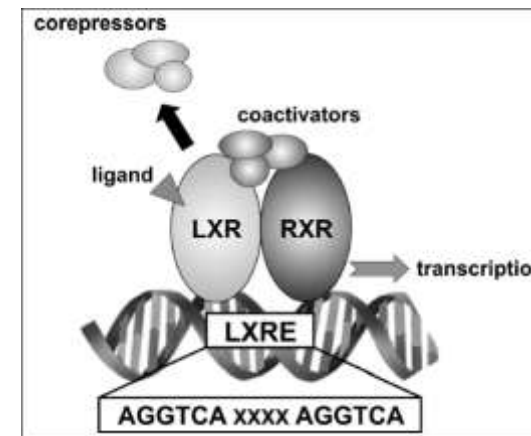


Bookout et al., 2006

INTERFERENTI ENDOCRINI: i meccanismi di azione (2)



Sugawara et al., *Endocr J* 2010.



Baranowski, *JPP* 2008.



INDICE

- INTERFERENTI ENDOCRINI
 - Definizioni
 - Cosa sono
 - Dove si trovano
 - Perché ci interessano
 - I meccanismi di azione

- **LA REALTÀ ITALIANA ED EUROPEA DEL RISCHIO CHIMICO**
 - **Il piano nazionale residui (PNR2013-PNR2014)**
 - **I residui dei pesticidi nel 2013 (rapporto EFSA2015)**
 - **Esposizione multiple e limiti della tossicologia**
 - **Interferenti Endocrini e valutazione del rischio nei Regolamenti europei**
 - **Identificazione di effetti avversi mediante approcci *in vitro***



INTERFERENTI ENDOCRINI : la realtà italiana - 1



Il **Piano Nazionale Residui** (di seguito denominato PNR) si struttura tenendo conto delle prescrizioni del **D.L. n. 158 del 16 marzo 2006**, recante attuazione di:

- **direttiva 96/22/CE e s.m.** concernente il **divieto d'utilizzazione di talune sostanze ad azione ormonica, tireostatica e delle sostanze β -agoniste nelle produzioni animali**;
- **direttiva 96/23/CE e s.m.** concernente le misure di controllo su talune sostanze e sui loro residui negli animali vivi e nei loro prodotti;
- **decisione 97/747/CE** che fissa i livelli e le frequenze di prelievo di campioni per il controllo di talune sostanze e dei loro residui in alcuni prodotti di origine animale;
- **decisione 98/179/CE** recante modalità d'applicazione per il prelievo ufficiale di campioni al fine della sorveglianza di talune sostanze e sui loro residui negli animali vivi e nei prodotti di origine animale.



INTERFERENTI ENDOCRINI : la realtà italiana - 2

Figura 1 - Allegato I del d. lgs. del 16 marzo 2006, n. 158

CATEGORIA	A - SOSTANZE AD EFFETTO ANABOLIZZANTE E SOSTANZE NON AUTORIZZATE
Gruppo	A1 - Stilbeni, loro derivati e loro sali ed esteri
	A2 - Agenti antitiroidei
	A3 - Steroidi
	A4 - Lattoni dell'acido resorcilico (compreso lo zeranolo)
	A5 - β -agonisti
	A6 - Sostanze incluse nell'All. IV del regolamento (CEE) n. 2377/90 del Consiglio, del 26 giugno 1990 [ora abrogato dal regolamento (CE) n. 470/2009 e regolamento (UE) n. 37/2010]
CATEGORIA	B - MEDICINALI VETERINARI E AGENTI CONTAMINANTI
Gruppo	B1 - Sostanze antibatteriche, compresi sulfamidici e chinolonici
Gruppo	B2 - Altri prodotti medicinali veterinari
Sottogruppo	B2a - antelmintici
	B2b - coccidiostatici, compresi i nitroimidazoli
	B2c - carbammati e piretroidi
	B2d - tranquillanti
	B2e - antinfiammatori non steroidei (AINS)
	B2f - altre sostanze esercitanti un'attività farmacologia
Gruppo	B3 - Altre sostanze e agenti contaminanti per l'ambiente
Sottogruppo	B3a - composti organoclorurati, compresi i PCB
	B3b - composti organofosforati
	B3c - elementi chimici
	B3d - micotossine
	B3e - coloranti
	B3f - altri



PNR 2013 - PIANO MIRATO

- ✓ **38.250** campioni (+11.281 vs minimo delle norme comunitarie),
- ✓ **13.850** per la ricerca di residui di sostanze appartenenti alla **categoria A** (pari al **36,2%** del totale delle analisi) e
- ✓ **24.400** per la ricerca di residui di sostanze appartenenti alla **categoria B** (pari al **63,8%**).
- **EXTRAPIANO**
9.820 campioni (Marche = 67)
- **SOSPETTI**
1.724 campioni



PNR 2014 - PIANO MIRATO

- ✓ **40.806** campioni (+11.281 vs minimo delle norme comunitarie),
- ✓ **16.276** per la ricerca di residui di sostanze appartenenti alla **categoria A** (pari al **39,9%** del totale delle analisi) e
- ✓ **24.530** per la ricerca di residui di sostanze appartenenti alla **categoria B** (pari al **60,1%**).
- **EXTRAPIANO**
7.529 campioni (Marche = 7)
- **SOSPETTI**
2.376 campioni



INTERFERENTI ENDOCRINI : la realtà italiana - 3



Figura 6 - Numero di campioni analizzati dal 2005 al 2014

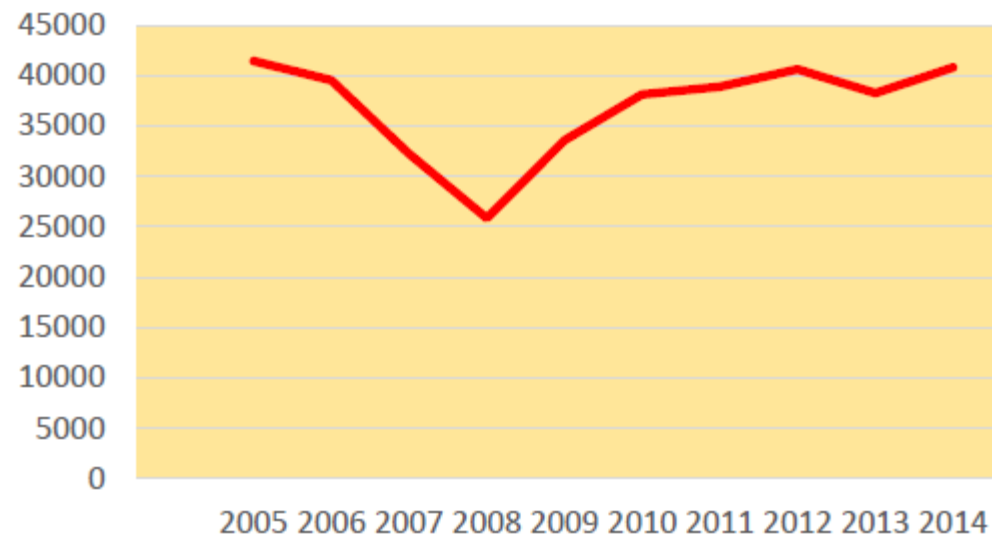
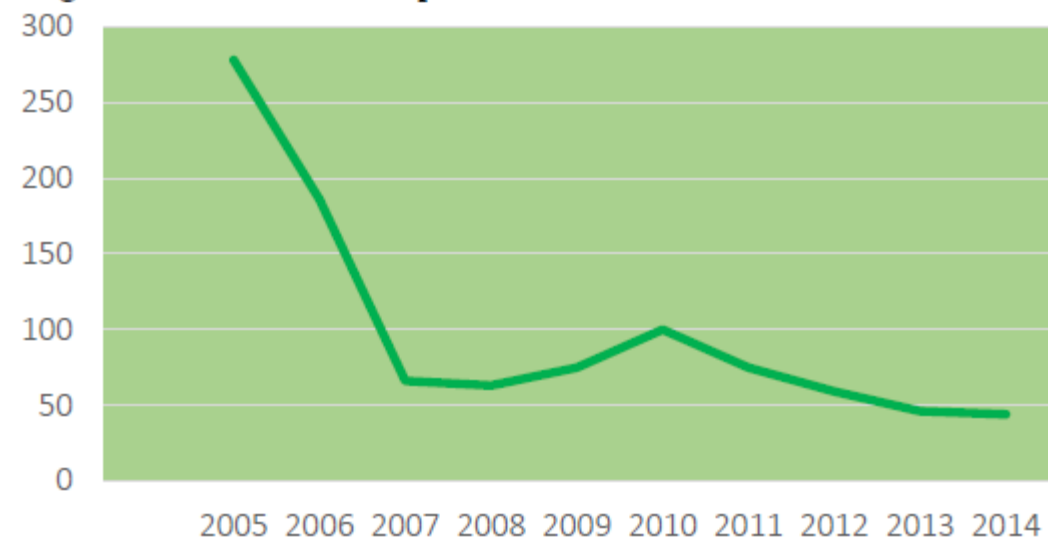


Figura 7 - Numero di campioni non conformi rilevati dal 2005 al 2014

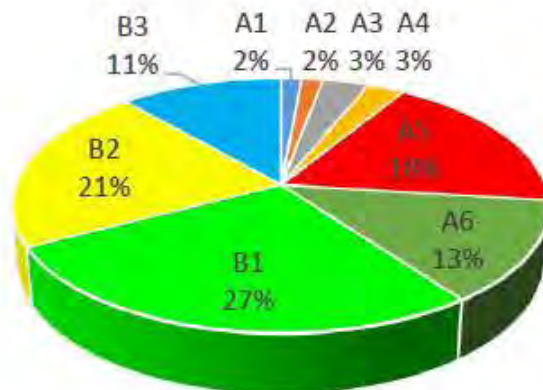




INTERFERENTI ENDOCRINI : la realtà italiana - 4



Figura 2 - Distribuzione percentuale dei campioni analizzati, in attuazione del PNR 2014, suddivisa per gruppi di sostanze ricercate



Legenda

- A1 Stilbeni
- A2 Agenti antitiroidei
- A3 Steroidi
- A4 Lattoni dell'acido resorcilico
- A5 Beta-agonisti
- A6 Sostanze incluse nell'allegato IV dell'ex reg. (CEE) n. 2377/90
- B1 Sostanze antibatteriche, compresi sulfamidici e chinolonici
- B2 Altri prodotti medicinali veterinari
- B3 Altre sostanze e agenti contaminanti per l'ambiente

- B2a - antelmintici
- B2b - coccidiostatici, compresi i nitroimidazoli
- B2c - carbammati e piretroidi
- B2d - tranquillanti
- B2e - antinfiammatori non steroidei (AINS)
- B2f - altre sostanze esercitanti un'attività farmacologia

- B3a - composti organoclorurati, compresi i PCB
- B3b - composti organofosforati
- B3c - elementi chimici
- B3d - micotossine
- B3e - coloranti
- B3f - altri

Il 27 % dei campioni è stato analizzati per il gruppo B1 (sostanze antibatteriche, comprese sulfamidici e chinolonici). A seguire, troviamo il gruppo B2 (altri prodotti medicinali veterinari) con il 21 %, il gruppo A5 (β -agonisti) con il 18%, il gruppo A6 (sostanze incluse nell'allegato IV del Reg. CEE 2377/90) ed il gruppo B3 (altre sostanze e agenti contaminanti per l'ambiente) rispettivamente con il 13 % e 11 %.

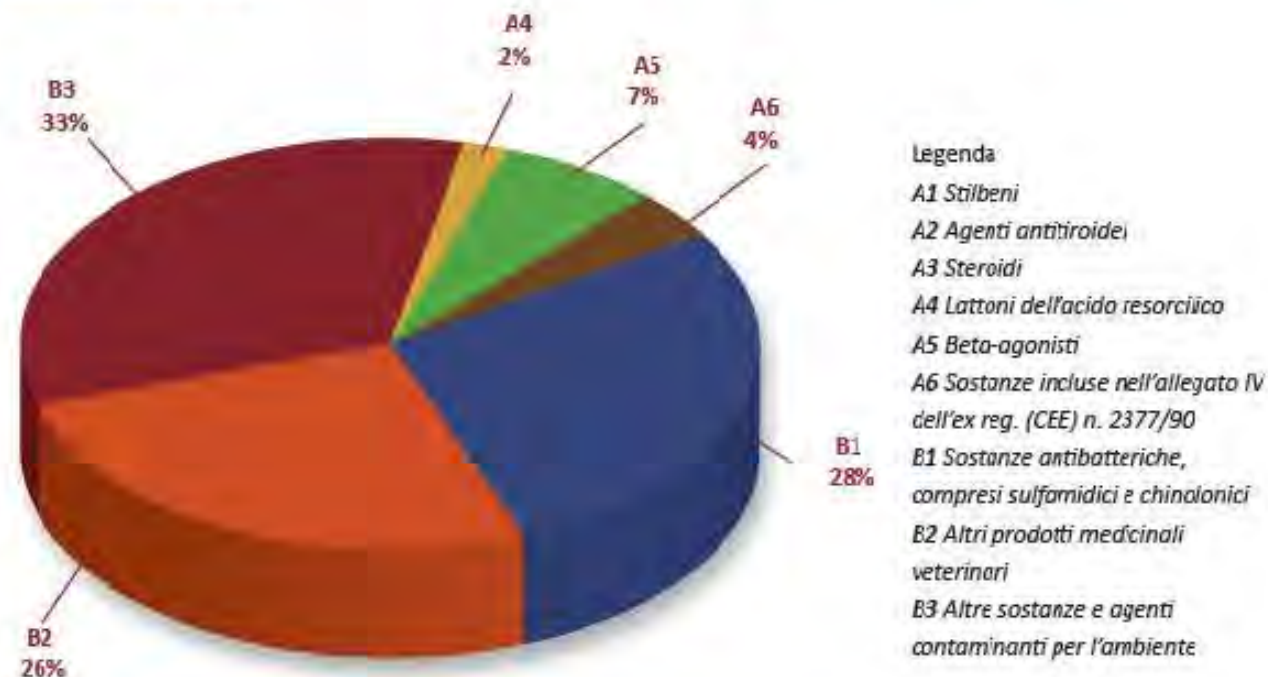
**INTERFERENTI ENDOCRINI : la realtà italiana - 5****PIANO MIRATO - NON CONFORMITA' 2013 = 46****Tabella 8 - Numero dei campioni analizzati, campioni non conformi e risultati non conformi in tutti i settori produttivi e per ciascuna categoria di sostanze – PNR 2013**

RISULTATI DI ATTIVITÀ PNR 2012					
Categoria/ Gruppo sostanze	Campioni analizzati		N. campioni non conformi		N. risultati non conformi
	n. (a)	%	n. (b)	% sul totale	n. (c)
A	13.850	36,2	6	0,02	6
A1	627	1,6	0	0	0
A2	658	1,7	0	0	0
A3	1.388	3,6	0	0	0
A4	1.032	2,7	1	0	1
A5	5.377	14,1	3	0,01	3
A6	4768	12,5	2	0,01	2
B	24.400	63,8	40	0,10	40
B1	12.168	31,8	13	0,034	13
B2	7.721	20,2	12	0,031	12
B2a	1.776	4,6	0	0	0
B2b	1.601	4,2	0	0	0
B2c	442	1,2	0	0	0
B2d	776	2,0	0	0	0
B2e	168	0,4	0	0	0
B2f	2.958	7,7	12	0,03	12
B3	4.511	11,8	15	0,04	15
B3a	2.266	5,9	2	0,01	2
B3b	195	0,5	0	0	0
B3c	1.204	3,1	4	0,01	4
B3d	645	1,7	9	0,02	9
B3e	201	0,5	0	0	0
TOTALE	38.250	100	46	0,12	46

(a) numero di campioni analizzati per uno o più sostanze;

(b) numero campioni non conformi per una o più sostanze all'interno del gruppo;

(c) numero di risultati non conformi.

Figura 4 – Distribuzione percentuale dei campioni non conformi in ciascun gruppo di sostanze – PNR 2013

Il gruppo B3 (altre sostanze e agenti contaminanti) rappresenta la principale causa di non conformità (33%). A seguire, il gruppo B1 (sostanze antibatteriche, comprese sulfamidici e chinolonici) con il 28%, il gruppo B2 (altri prodotti medicinali veterinari) con il 26%.



INTERFERENTI ENDOCRINI : la realtà italiana - 6

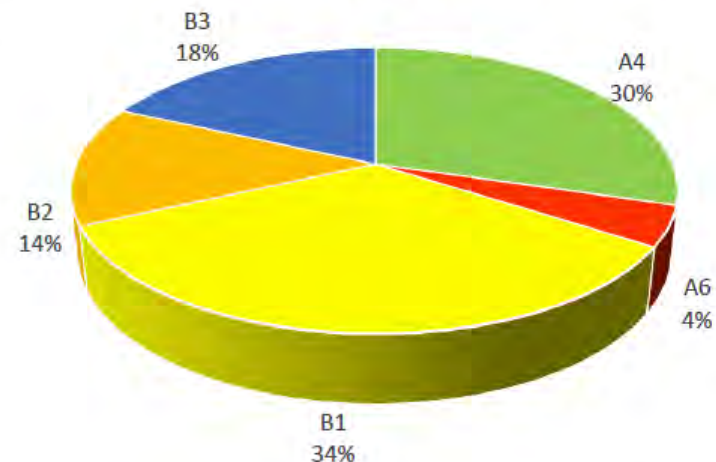
PIANO MIRATO - NON CONFORMITA' 2014 = 56



Tabella 4 – Numero dei campioni analizzati, dei campioni non conformi e dei risultati non conformi, in tutti i settori produttivi e per ciascuna categoria di sostanze – PNR 2014

RISULTATI DELL'ATTIVITA' - PNR 2014					
Categoria/ Gruppo sostanze	Campioni analizzati ⁴		Campioni non conformi ⁵		Numero di esiti analitici non conformi <i>n</i>
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	% sul totale degli analizzati	
A	16.276	39,9	15	0,04	22
A1	587	1,4	0	0	0
A2	616	1,5	0	0	0
A3	1.325	3,2	0	0	0
A4	1.052	2,6	13	0	20
A5	7.422	18,2	0	0,00	0
A6	5274	12,9	2	0,01	2
B	24.530	60,1	29	0,07	34
B1	11.185	27,4	15	0,037	18
B2	8.679	21,3	6	0,015	6
B2a	1.918	4,7	0	0	0
B2b	1.681	4,1	2	0	2
B2c	454	1,1	1	0	1
B2d	751	1,8	0	0	0
B2e	776	1,9	0	0	0
B2f	3.099	7,6	3	0,01	3
B3	4.666	11,4	8	0,02	10
B3a	2.408	5,9	0	0,00	2
B3b	247	0,6	0	0	0
B3c	1.193	2,9	5	0,01	5
B3d	643	1,6	2	0,01	2
B3e	175	0,4	1	0	1
TOTALE	40.806	100	44	0,11	56

Figura 3 - Distribuzione percentuale dei campioni non conformi relativamente ai gruppi di sostanze PNR 2014



Il gruppo B1 (*sostanze antibatteriche, comprese sulfamidici e chinolonici*) rappresenta la principale causa di non conformità (34%), per un totale di 15 campioni non conformi. A seguire, il gruppo A4 (*lattoni dell'acido resorcilico, compreso lo zeranolo*) con il 30 %, il gruppo B3 (*altre sostanze e agenti contaminanti per l'ambiente*) con il 18 % e il gruppo B2 (*altri prodotti medicinali veterinari*) con il 14 %.



INTERFERENTI ENDOCRINI : la realtà italiana - 7

PIANO MIRATO - NON CONFORMITA' settori produttivi 2013-2014



Figura 5 – Distribuzione percentuale dei campioni non conformi nei singoli settori produttivi - PNR 2013

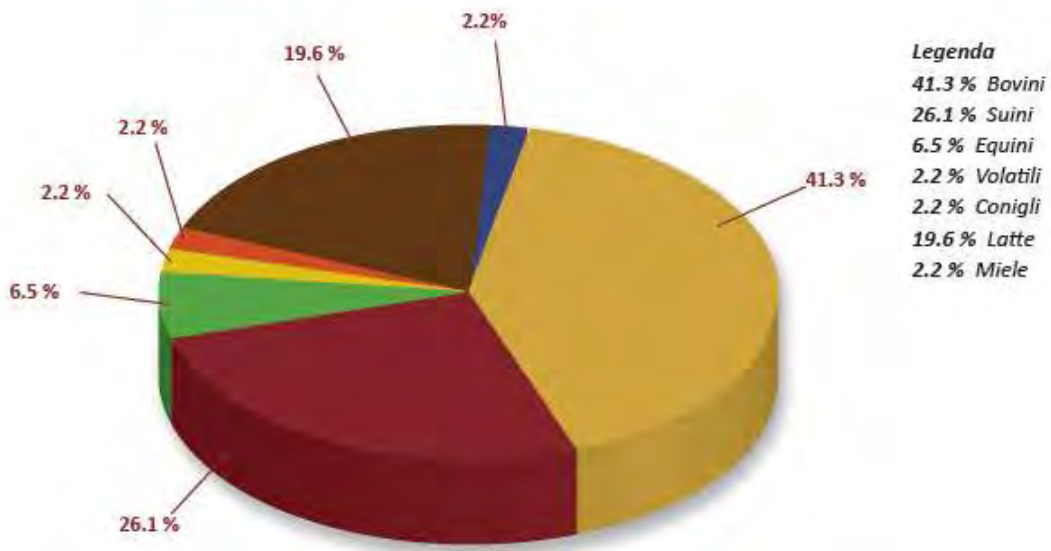
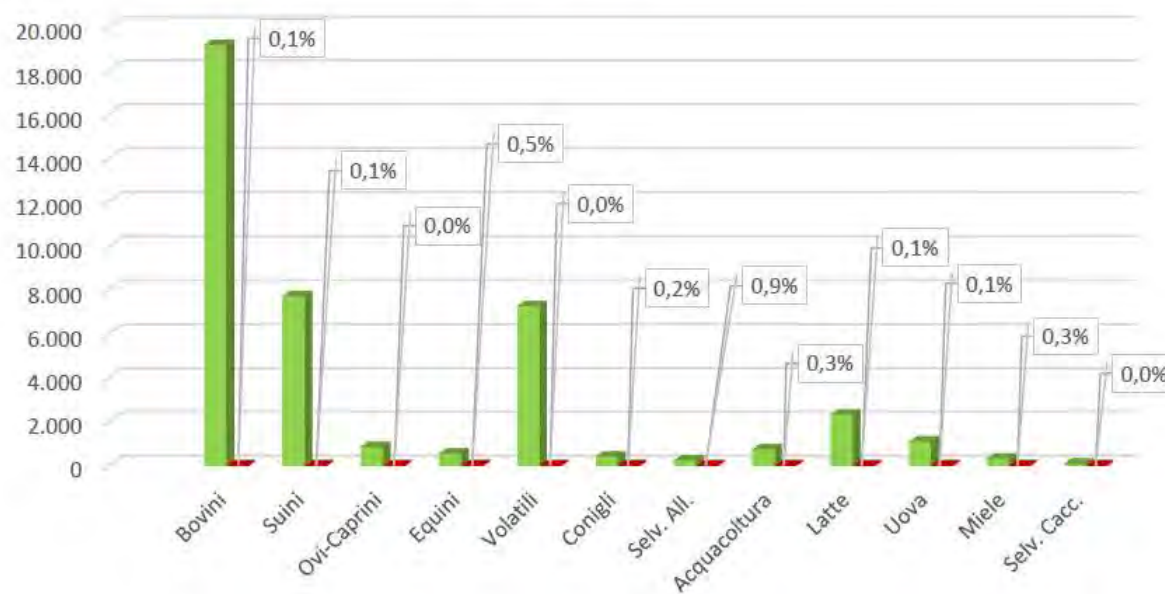


Figura 5 - Percentuale dei campioni non conformi rispetto al numero dei campioni analizzati nei singoli settori produttivi - PNR 2014

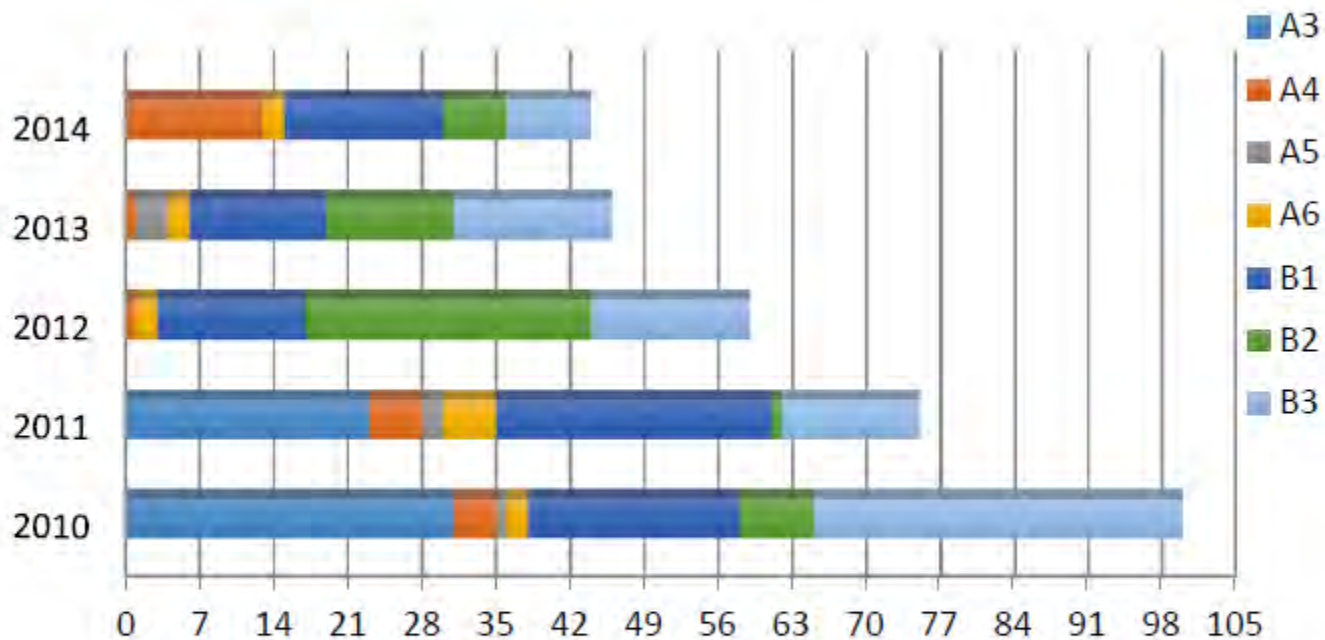




INTERFERENTI ENDOCRINI : la realtà italiana - 8

PIANO MIRATO - NON CONFORMITA' settori produttivi 2013-2014 e confronto 2010-2014

Figura 8 - Confronto delle non conformità PNR 2010-2014



E' evidente negli anni la diminuzione di non conformità relative al gruppo A3, causata dallo spostamento nel 2012 dei cortisonici, su esplicita richiesta della Commissione europea, dal gruppo A3 al gruppo B2f, con il conseguente spostamento di tali non conformità nel gruppo B2, che negli anni registra comunque una flessione.

zzati nei singoli settori

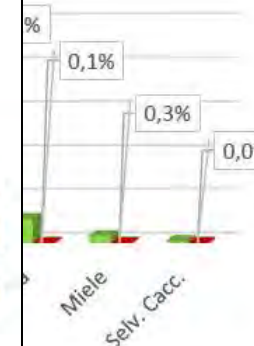
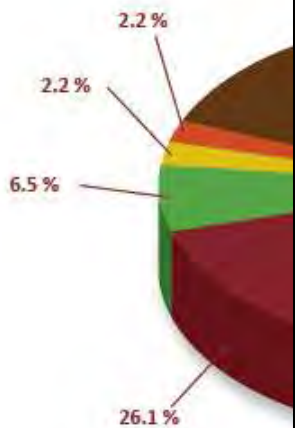


Figura 5 - Distribuzione delle non conformità nei settori produttivi - PNR 2013





INTERFERENTI ENDOCRINI : la realtà italiana - 9

CONCLUSIONI PNR 2014

CONCLUSIONI PNR 2013

- Il **gruppo B3** (*altre sostanze e agenti contaminanti*) rappresenta la principale causa di non conformità (33%).
- A seguire, il **gruppo B1** (*sostanze antibatteriche, comprese sulfamidici e chinolonici*) con il 28%, il gruppo **B2** (*altri prodotti medicinali veterinari*) con il 26%.
- **Una prevalenza così elevata di campioni irregolari per il gruppo B3 è da attribuirsi all'emergenza climatica verificatasi nell'estate del 2012 che ha comportato un aumento della presenza di aflatossina B1 nelle produzioni di mais e, come conseguenza, di aflatossina M1 nel latte.**
- A seguito dello spostamento dei *cortisonici dal gruppo A3 al gruppo B2f* e della definizione di un valore di 5,0 ppb come limite per il *prednisolone* al di sopra del quale emettere il giudizio di non conformità, i campioni irregolari per la categoria A sono drasticamente diminuiti.
- Inoltre, rispetto all'anno 2012, si evidenzia un'importante riduzione delle non conformità per B2f ed in particolare non è stata mai riscontrata la presenza di *prednisone* che negli anni precedenti è stata riscontrata molto spesso associata al *desametasone* ed al *prednisolone*.

- Permane la criticità relativa alla mancata attuazione del PNR, rispetto al numero programmato, nel settore *Acquacoltura*, nel settore della *Selvaggina cacciata* (anche rispetto al minimo richiesto dalla norma europea) e nel *Miele*, già oggetto in passato (2011) di mancato raggiungimento dell'obiettivo. Inoltre, nel settore *Uova* non è stato rispettato il requisito secondo cui "*almeno il 30% dei campioni deve essere prelevato da centri di imballaggio che presentano la più significativa percentuale di uova destinate al consumo umano*". Infatti, soltanto 218 campioni sono stati prelevati presso i centri di imballaggio, pari a circa il 19.7 %, dato in salita comunque rispetto a quello del 2013 (14.5%).
- Il **gruppo B1** (*sostanze antibatteriche, comprese sulfamidici e chinolonici*) rappresenta la principale causa di non conformità (34%), per un totale di 15 campioni non conformi. A seguire, il gruppo A4 (*lattoni dell'acido resorcilico, compreso lo zeranolo*) con il 30 %, il gruppo B3 (*altre sostanze e agenti contaminanti per l'ambiente*) con il 18 % e il gruppo B2 (*altri prodotti medicinali veterinari*) con il 14 %.
- **Tale andamento differisce da quello rilevato nel 2013, in cui la principale causa di non conformità (33 %) era rappresentata dal gruppo B3 (*altre sostanze e agenti contaminanti per l'ambiente*) a causa dell'emergenza climatica verificatasi nell'estate del 2012, che ha comportato un aumento della presenza di aflatossina B1 nella produzione del mais e, come conseguenza, di aflatossina M1 nel latte.**
- Risaltano inoltre i 13 campioni non conformi a causa della presenza delle molecole del **gruppo A4** (*lattoni dell'acido resorcilico, compreso lo zeranolo*), I risultati delle indagini di follow-up hanno confermato tuttavia l'assenza di trattamento illecito ed hanno individuato, come causa, la contaminazione dei mangimi con i metaboliti della **micotossina zearalenone**,



INTERFERENTI ENDOCRINI : la realtà europea - 1



12 marzo 2015

European Food Safety Authority Pesticides

Oltre il 97% degli alimenti contiene residui di pesticidi nei limiti di legge



EFSA Journal 2015;13(3):4038

Più del 97% dei campioni di alimenti valutati dall'Autorità europea per la sicurezza alimentare (EFSA) contiene livelli di residui di pesticidi che rientrano nei limiti di legge, con poco meno del 55% dei campioni privo di tracce rilevabili di tali sostanze chimiche. I risultati fanno parte della relazione annuale dell'EFSA per il 2013 sui residui di pesticidi negli alimenti, comprendente i risultati per quasi 81 000 campioni di alimenti provenienti da 27 Stati membri dell'UE, Islanda e Norvegia.

I 29 Paesi relatori eseguono due programmi di monitoraggio ai fini della relazione: un programma nazionale, progettato da ciascun paese, e un programma coordinato a livello UE, nell'ambito del quale tutte le autorità preposte al controllo alimentare monitorano lo stesso "paniere" di prodotti alimentari. Un totale combinato di 80 967 campioni di un'ampia varietà di prodotti alimentari, lavorati e non, sono stati analizzati per rilevare l'eventuale presenza di **685 pesticidi**. I risultati principali sono riportati di seguito:

- il 97,4% dei campioni analizzati rientrava nei limiti di legge;
- il 54,6% era privo di residui rilevabili; **il 45,4% contiene residui rilevabili**
- l'1,5% superava nettamente i limiti di legge, tenendo conto dell'incertezza di misurazione, dando così l'avvio a sanzioni legali o amministrative nei confronti degli operatori del settore alimentare responsabili;
- **Residui di più di un pesticida (residui multipli) sono stati rilevati nel 27,3% dei campioni.**



INTERFERENTI ENDOCRINI : la realtà europea - 2



12 marzo 2015

Pesticides

Oltre il 97% degli alimenti contiene residui di pesticidi nei limiti di legge



EFSA Journal 2015;13(3):4038

CONCLUSIONI EFSA 2015



<https://www.efsa.europa.eu/it/efsajournal/pub/4038>



PRIMo Tool 2013 EU
Report Pesticide Residues

La maggior parte dei campioni (68,2%) era stata prelevata da alimenti di origine europea, mentre il 27,7% proveniva da alimenti importati da paesi terzi. La percentuale di campioni da paesi terzi che superava i limiti di legge era più elevata (5,7%) rispetto ai Paesi dell'UE/SEE (1,4%). Tuttavia, i tassi di superamento per gli alimenti importati sono diminuiti di quasi due punti percentuali (dal 7,5%) dal 2012.

Per il programma coordinato a livello UE, gli Stati relatori hanno sottoposto a test 11582 campioni di 12 prodotti alimentari: mele, cavolo cappuccio, porro, lattuga, pesche, segale o avena, fragole, pomodori, latte vaccino, carne di maiale e vino. I risultati hanno evidenziato che il 99,1% dei campioni analizzati conteneva livelli di residui entro i limiti ammissibili e che quasi il 53% dei campioni non conteneva residui misurabili.

Rispetto ai risultati del 2010, quando erano stati analizzati gli stessi prodotti alimentari, eccetto il vino, la percentuale di campioni che superano i limiti di legge è diminuita per tutti i prodotti esaminati.

L'EFSA ha utilizzato i dati del programma di coordinamento dell'UE per valutare l'eventualità che l'attuale esposizione alimentare ai residui di pesticidi rappresenti un rischio per la salute umana a lungo termine (cronico) o a breve termine (acuto). Secondo le conclusioni dell'Autorità, è improbabile che la presenza di residui di pesticidi negli alimenti abbia un effetto a lungo termine sulla salute dei consumatori. Per quanto concerne l'esposizione a breve termine, il rischio per i cittadini europei esposti a livelli nocivi di residui attraverso la dieta è stato giudicato basso.

- [The 2013 European Union report on pesticide residues in food](#)



INTERFERENTI ENDOCRINI : la realtà europea - 3



Oltre il 97% degli alimenti contiene residui di pesticidi nei limiti di legge



EFSA Journal 2015;13(3):4038

Residues of more than one pesticide (multiple residues) were found in 27.3 % of the samples (22 126 samples).

Among the 2 788 individual determinations that exceeded the legal limit, 878 determinations were reported for pesticides not approved in the EU. In most cases these MRL exceedances for non-approved pesticides were related to imported products (659 cases) while for products produced in the EU and EEA countries non-approved pesticides were less frequent (186 results).

Questioni aperte in tossicologia:

- ✓ individuare relazioni causa-effetto richiede lo studio delle singole sostanze chimiche
- ✓ scenari di esposizione reale
- ✓ effetti additivi e/o sinergici e drivers degli effetti delle miscele di sostanze chimiche



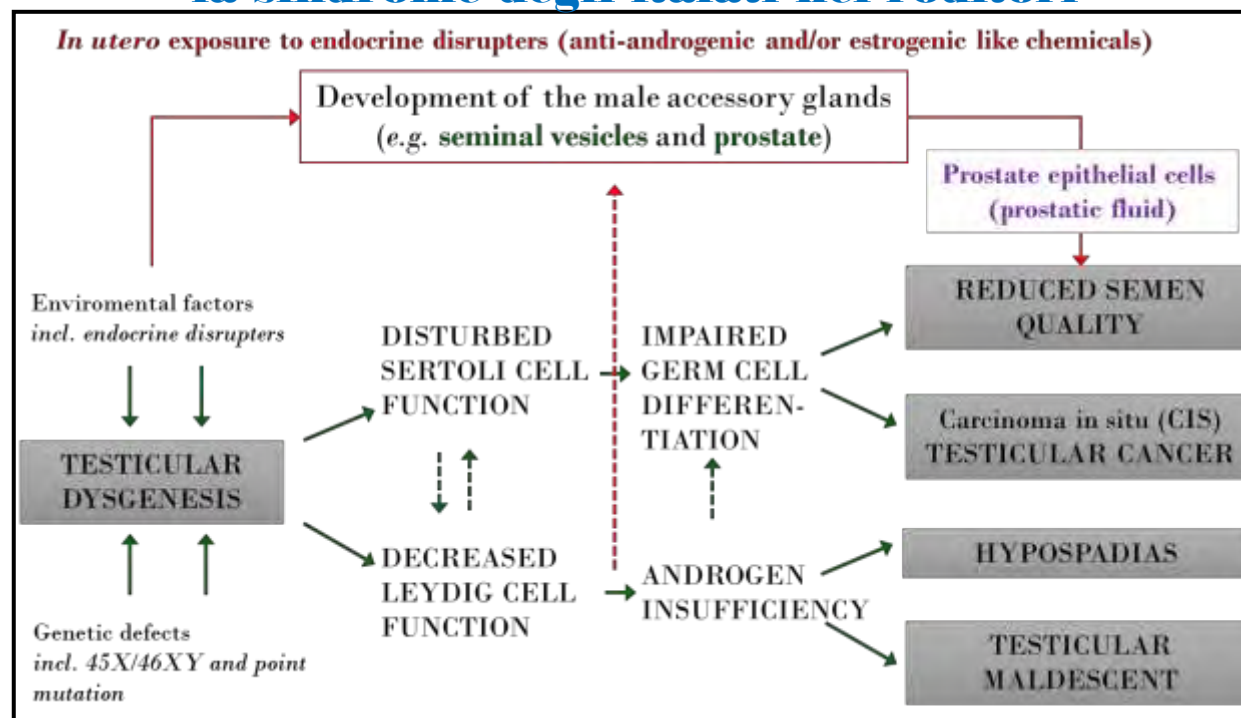
INTERFERENTI ENDOCRINI :

additività degli effetti al di sotto della No Adverse Effect Observed Level (NOAEL)

La sindrome della disgenesi testicolare (TDS) umana è riproducibile sperimentalmente: la sindrome degli italati nei roditori



Cosa succede in caso di esposizione multipla *in utero* di roditori a sostanze chimiche con nota attività anti-androgenica e a dosi inferiori alla NOAEL ?

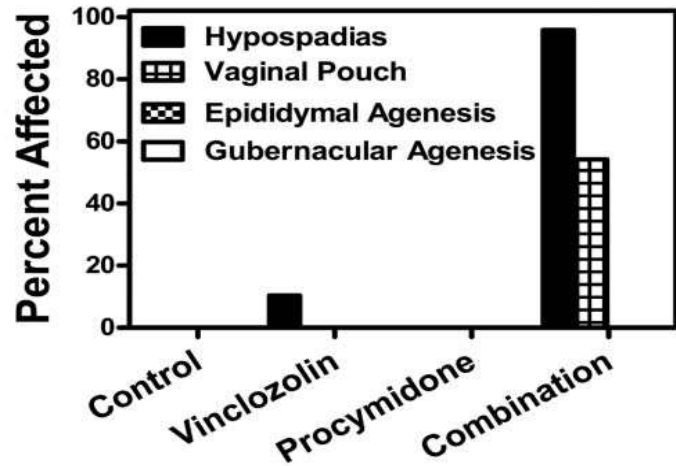




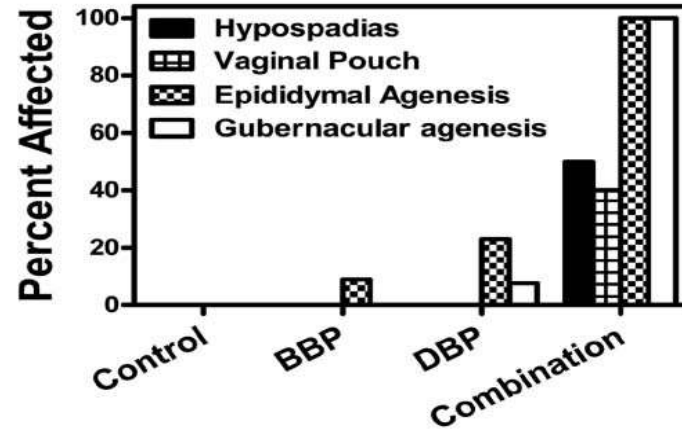
INTERFERENTI ENDOCRINI - sindrome degli ftalati (1)

esposizione multipla ad anti-androgeni

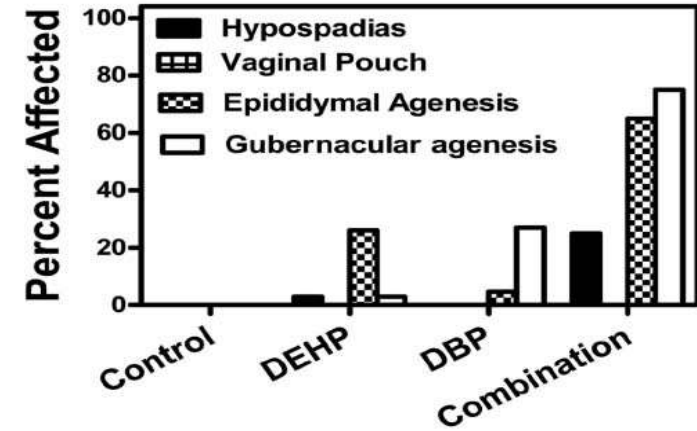
Two Androgen Receptor Antagonists



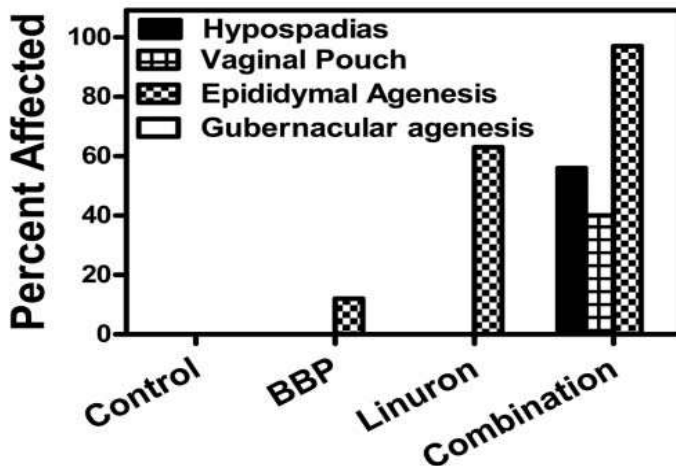
Two Phthalates
DBP plus BBP



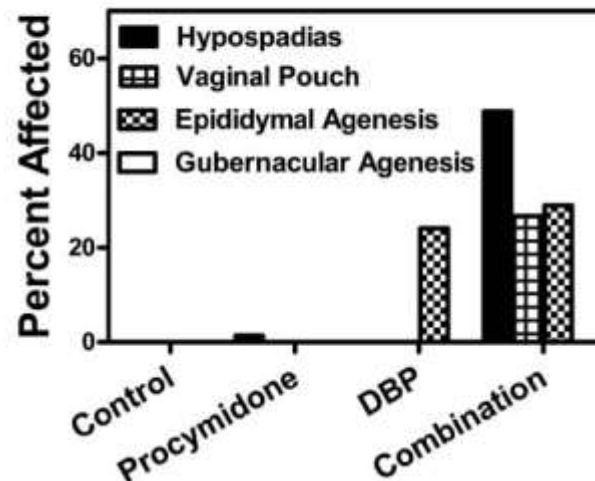
Two Phthalates
DBP plus DEHP



A Pesticide plus a Phthalate
Linuron plus BBP



A Phthalate plus an
Androgen Receptor Antagonists



esposizione multipla *in utero* di roditori
a sostanze chimiche con nota attività anti-androgenica
e a dosi inferiori alla NOAEL

Rider et al. Toxicol.Pathol. 2009



Esposizioni binarie a pesticidi e/o ftalati
e/o un singolo pesticida e un singolo ftalato
(tutti anti-androgeni)
producono effetti avversi additivi
a dosi corrispondenti alla NOAEL
per ciascuna sostanza chimica

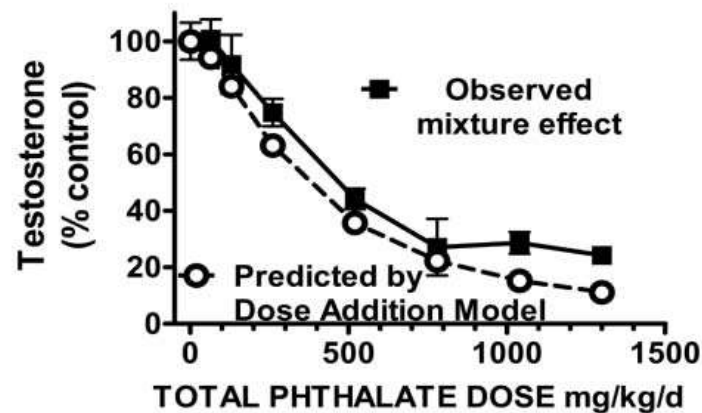


INTERFERENTI ENDOCRINI – sindrome degli ftalati (2) esposizione multipla ad anti-androgeni

esposizione multipla *in utero* di roditori
a sostanze chimiche con nota attività anti-androgenica
e a dosi inferiori alla NOAEL
Rider et al. Toxicol.Pathol. 2009



Mixture (5 phthalates) effects
on Fetal Testosterone Production



In this example of “mixture toxicology” with different antiandrogens a cumulative, dose additive effects were shown by all binary combinations on androgen-dependent tissues.

The results also suggest that a modification of the approach for cumulative risk assessments from one based upon “common mechanism of toxicity” to one that includes the cumulative assessment of chemicals that disrupt development of the same reproductive tissues during sexual differentiation would result in target organ- and timing-based approach rather than on a narrow mechanism of toxicity.

We propose that the primary focus should be on the biological system (e.g., androgen signaling pathway) rather than the mechanism of toxicity and that a cumulative risk assessment could potentially include all chemicals that target that system during the same critical developmental period.



INTERFERENTI ENDOCRINI: valutazione del rischio

ANALISI DEL RISCHIO (*Risk analysis*)



VALUTAZIONE DEL
RISCHIO #
(*Risk assessment*)



Identificazione del pericolo
(eventi avversi)
(*hazard identification*)

Caratterizzazione del pericolo
(eventi avversi)
meccanismi e relazione dose-risposta
(*hazard characterization*)

Valutazione dell'esposizione
(*exposure assessment*)

Caratterizzazione del rischio
(*risk characterization*)



**Identificazione
in vitro degli
eventi avversi**



**il caso specifico degli
Interferenti Endocrini (IE) o
Endocrine Disruptors (EDs)**

Gestione del rischio
(*Risk management*)

Comunicazione del rischio
(*Risk communication*)

attività specifica di un Ente Pubblico di Ricerca (p.es. ISS)

INTERFERENTI ENDOCRINI

strategie innovative *in vitro* per l'identificazione degli effetti avversi

IL CONTESTO INTERNAZIONALE - 1



INTERFERENTI ENDOCRINI

strategie innovative *in vitro* per l'identificazione degli effetti avversi

IL CONTESTO INTERNAZIONALE - 2

Regolamento REACH
1907/2006/CE



INTERFERENTI ENDOCRINI
come sostanze altamente
preoccupanti
Artt. 57f e ss., 138.7; All. II – 12.6



equivalent concern to:
CMR, , PBT, vPvB
(Art. 57 a-e)



ANNEX XIV
Substances of Very High Concern
SVHC

➤ Endocrine Active Substance / EAS

“a substance having the inherent ability to **interact or interfere with** one or more components of **the endocrine system** resulting in a biological effect, but need not necessarily cause adverse effects.” **EFSA J. 2013; 11(3):3132**

➤ Endocrine Disruptor / ED

“An endocrine disruptor is an **exogenous substance or mixture** that **alters function(s) of the endocrine system** and consequently **causes adverse health effects** in an intact organism, or its progeny, or (sub)populations.” **WHO/IPCS 2002**

➤ “EDs are EASs causing adverse effects mediated by endocrine mechanisms”

Rovida C, De Angelis I, Lorenzetti S. ALTEX 30, 2/13

..., **currently available definitions of “endocrine disruptor”** are **either** neutral in terms of specifying the toxicological relevance of the effects to be described, **or** they **introduce the idea of adversity**.

The former is in danger of being insufficiently discriminatory, **the latter** shifts the problem to defining **what adversity should mean in an endocrine context**, which could be too restrictive and not inclusive enough.

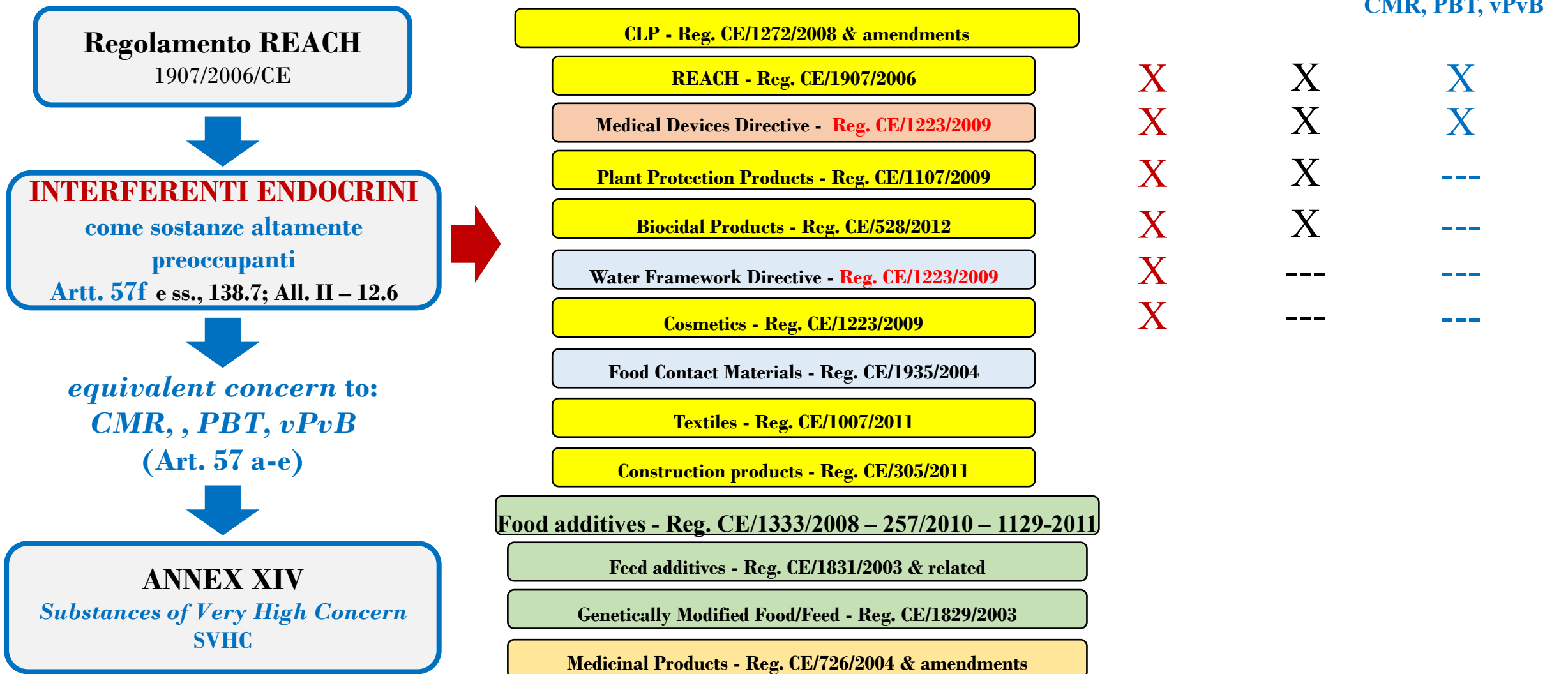
At the core of this dilemma is the fact that **“endocrine disruption” cannot presently be anchored to specific assay outcomes in a straightforward way.**

STATE OF THE ART ASSESSMENT OF ENDOCRINE DISRUPTERS,
ec.europa.eu/environment/endocrine/.../summary_state_science.pdf

INTERFERENTI ENDOCRINI

strategie innovative *in vitro* per l'identificazione degli effetti avversi

IL CONTESTO INTERNAZIONALE - 3

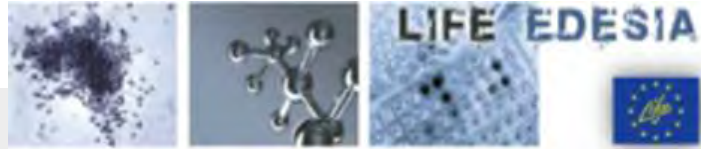


INTERFERENTI ENDOCRINI

strategie innovative *in vitro* per l'identificazione degli effetti avversi

LE NOSTRE ATTIVITÀ NEL CONTESTO NAZIONALE E INTERNAZIONALE

DEVELOPMENT OF CELL-SPECIFIC, CLINICALLY RELEVANT, HORMONE-DEP. BIOMARKERS OF EFFECTS



➤ **LIFE-EDESIA** (Progetto LIFE+2012, 2013-16)

“Endocrine Disruptors *in silico/in vitro* – Evaluation & Substitution for Industrial Applications”

Contribuire al dibattito in corso sui **CRITERI DI IDENTIFICAZIONE DEGLI INTERFERENTI ENDOCRINI**

VALIDATION OF MEASURABLE *IN VITRO* ENDPOINTS OF ENDOCRINE-DISRUPTING ADVERSE EFFECTS

PASSATO

PRESENTE

FUTURO

➤ **ReProTect** (EU IP, 2006-10)

“Development of a novel approach in hazard and risk assessment or reproductive toxicity by a combination and application of *in vitro*, tissue and sensor technologies”

➤ **PRO-SVHC** (Prog. Min. Salute, 2012-13)

“Metodi alternativi *in vitro*: tossicità riproduttiva maschile prostata-mediata di potenziali SVHC”

**RICERCA E SUPPORTO PER:
REACH COMPETENT AUTHORITY
(MIN. SALUTE & CNSC)
E DI CONSEGUENZA PER ECHA
RICERCA E SUPPORTO PER:
ALTRE AUTHORITY (EFSA)
E ISTITUZIONI (JRC-IHCP) EUROPEE
etc...**

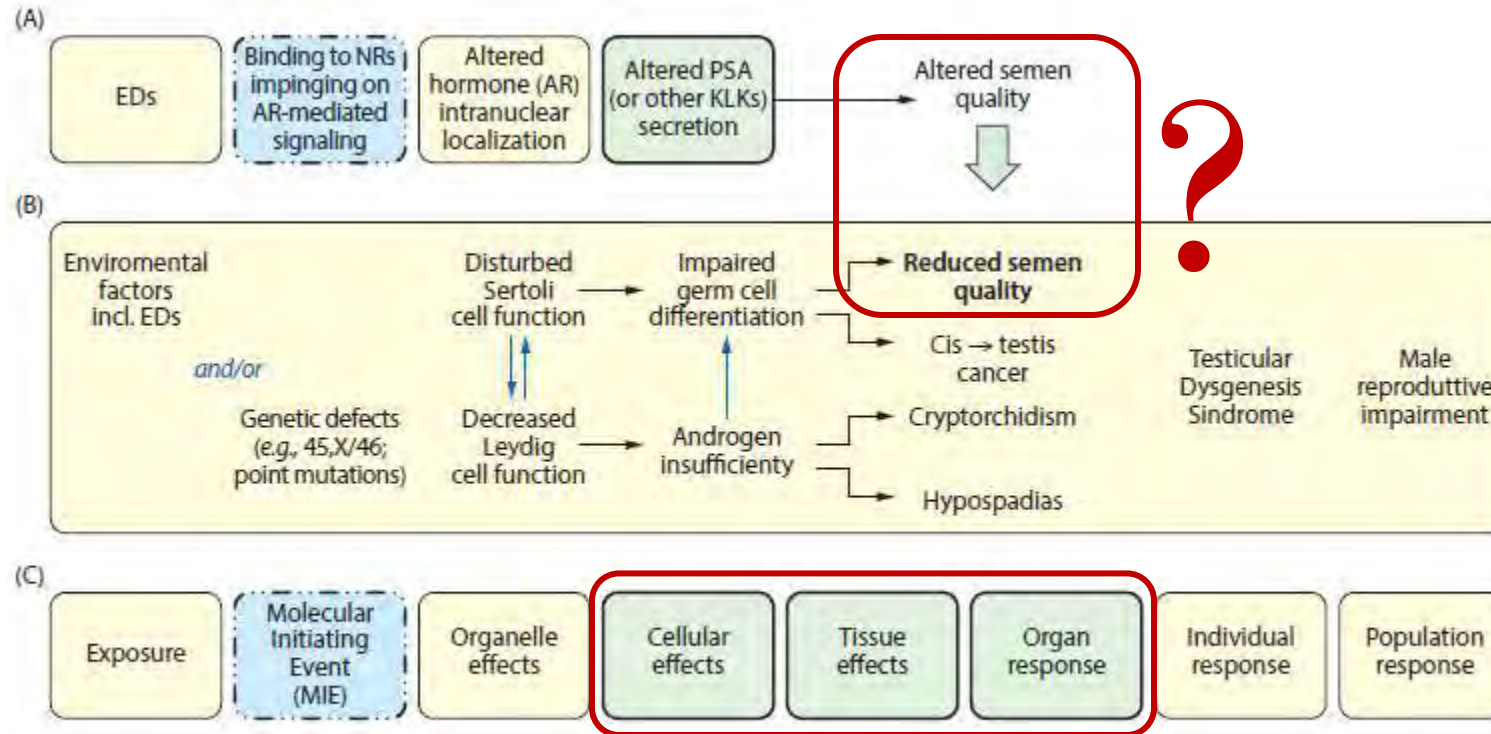
identificazione degli effetti avversi mediante la tossicologia *in vitro*

Un esempio «riproduttivo» di Adverse Outcome Pathway (AOP):

LIFE-EDESIA
www.iss.it/life

Testicular
Disgenesis
Sindrome
(TDS)

AOP
Gocht et al., 2015



AR: androgen receptor; ED: endocrine disruptor; KLK: kallikrein; NR: Nuclear receptor; PSA: prostate-specific antigen. (A) adapted from [13], (B) adapted from [15], and (C) developed from [11, 12]

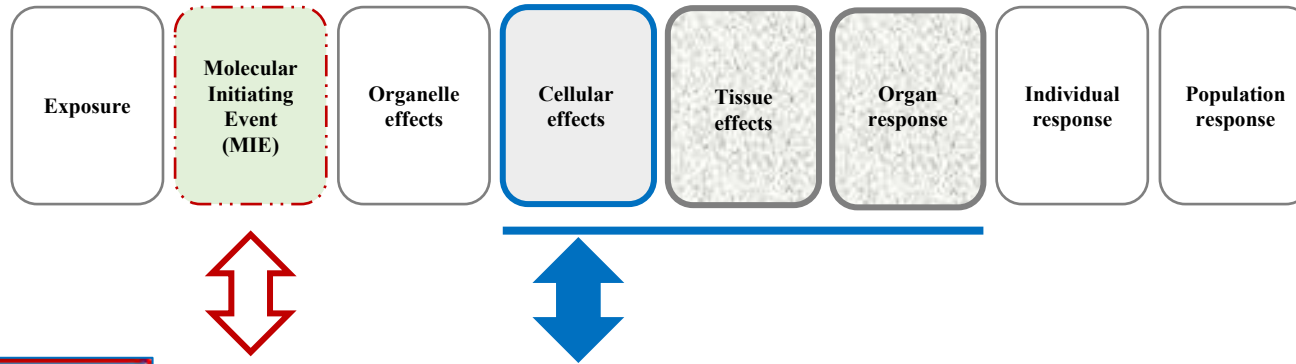


INTERFERENTI ENDOCRINI

dai meccanismi all'identificazione degli effetti avversi - 1

SCREENING INTERFERENZA ENDOCRINA: mechanism- vs effect based-approach

**Adverse
Outcome
Pathway
(AOP)**



***In vitro* Nuclear Receptor binding
& regulation of gene transcription
(gene reporter assays)**

IS SUFFICIENT TO DEFINE:

- **AN ENDOCRINE ACTIVITY ?**
- **AN ADVERSE EFFECT ?**

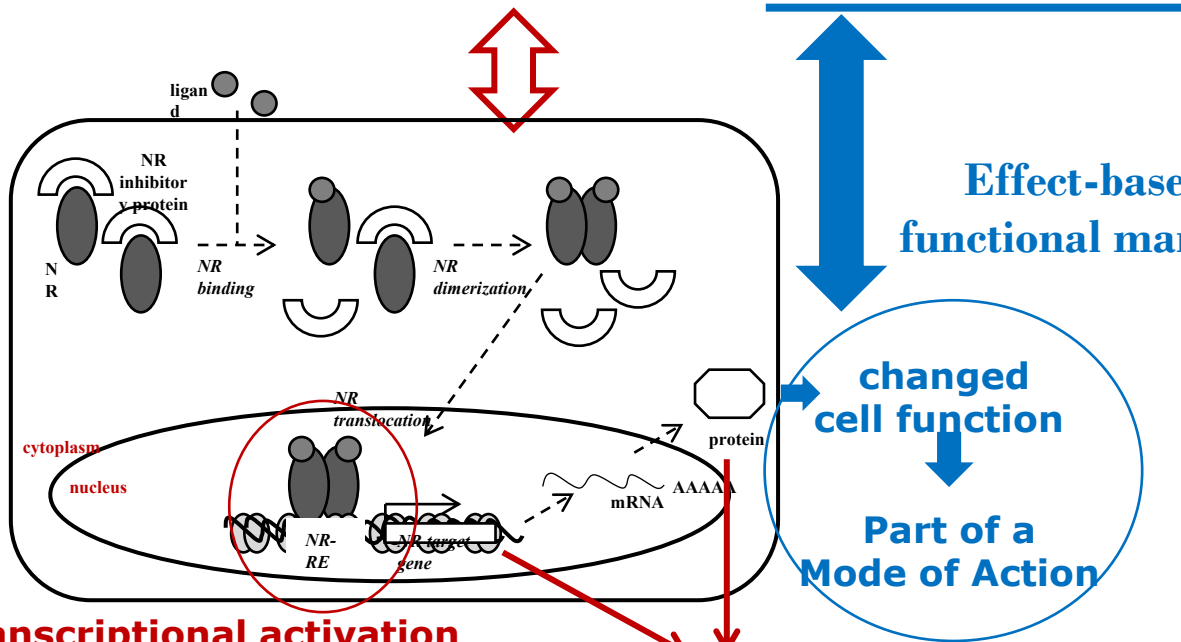
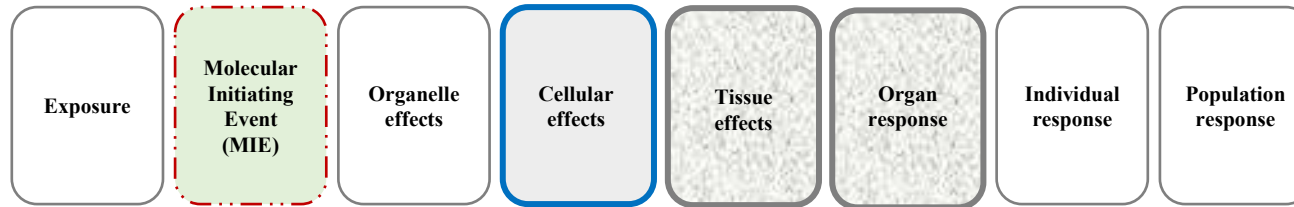


INTERFERENTI ENDOCRINI

Dai meccanismi all'identificazione degli effetti avversi - 2

SCREENING INTERFERENZA ENDOCRINA: mechanism- vs effect based-approach

Adverse Outcome Pathway (AOP)



Effect-based functional markers

changed cell function
Part of a Mode of Action

Quali biomarcatori per lo screening dell'Interferenza Endocrina:

- AN ENDOCRINE ACTIVITY ?
- AN ADVERSE EFFECT ?

cell-specific, clinically relevant, hormone-dependent biomarkers of effects



- PSA secretion – androgen disruption in prostate epithelium
- βhCG secretion – estrogen disruption in trophoblast-like cell (placenta)
- AFP secretion – metabolic disruption in liver

transcriptional activation
Part of a Mechanism of Action (incl. toxicogenomics)

molecular markers:
mRNA, miRNA, proteins, metabolites

INTERFERENTI ENDOCRINI

OECD conceptual framework – level 2: ER, AR, TR, AhR binding affinity

OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals

Note: Document prepared by the Secretariat of the Test Guidelines Programme based on the agreement reached at the 6th Meeting of the EDTA Task Force

Level 1 Sorting & prioritization based upon existing information	<ul style="list-style-type: none">• Physical & chemical properties, e.g., MW, reactivity, volatility, biodegradability• Human & environmental exposure, e.g., production volume, release, use patterns• Hazard, e.g., available toxicological data
Level 2 <i>In vitro</i> assays providing mechanistic data	<ul style="list-style-type: none">• ER, AR, TR: receptor binding affinity• High Through Put Prescreens• Transcriptional activation• Thyroid function• Aromatase & Steroidogenesis <i>in vitro</i>• Fish hepatocyte VTG assay• Aryl hydrocarbon receptor recognition/binding• QSARs: Others (as appropriate)
Level 3 <i>In vivo</i> assays providing data about single endocrine Mechanisms and effects	<ul style="list-style-type: none">• Uterotrophic Assay (estrogenic related)• Fish VTG assay (estrogenic related)• Hershberger Assay (androgenic related)• Others (e.g. thyroid)• Non-receptor mediated hormone function
Level 4 <i>In vivo</i> assays providing data about multiple endocrine mechanisms and effects	<ul style="list-style-type: none">• Enhanced OECD 407 (endpoints based on endocrine mechanisms)• Fish gonadal histopathology assay• Male and female pubertal assays• Frog metamorphosis assay• Adult intact male assay
Level 5 <i>In vivo</i> assays providing data on effects from endocrine & other mechanisms	<ul style="list-style-type: none">• 1-generation assay (TG415 enhanced)• Partial and full life cycle assays in fish, birds, amphibians & invertebrates• 2-generation assay (TG416 enhanced)• Reproductive screening (TG421 enhanced)• (development & reproduction)• Combined 28 day/reproduction screening test (TG 422 enhanced)



from OECD 2002

from NURSA website

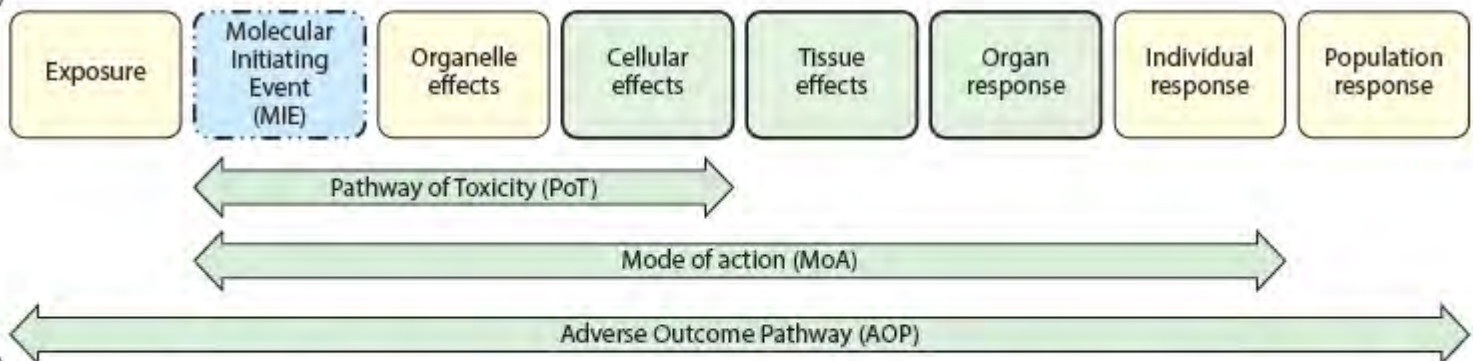
Attività endocrina degli altri recettori nucleari e in particolare dei cosiddetti «orphans» nuclear receptors



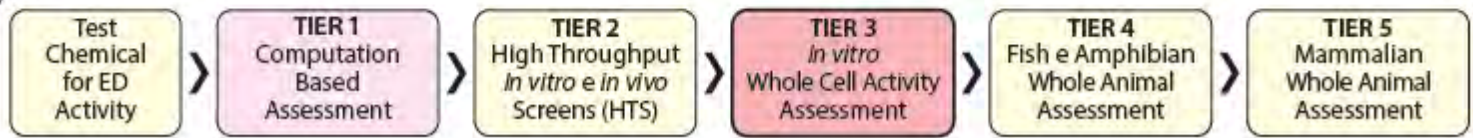
INTERFERENTI ENDOCRINI

dal meccanismo al modo di azione fino all'Adverse Outcome Pathway (AOP)

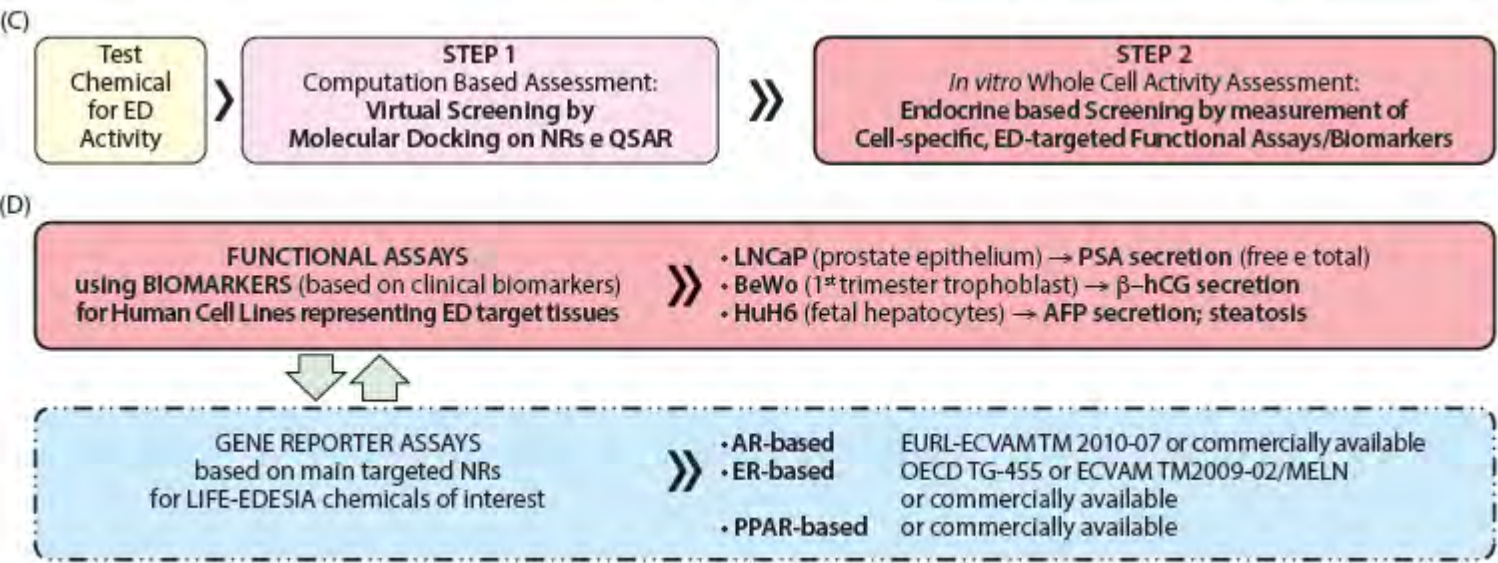
AOP
Gocht et al., 2015



TiPED
Schug et al., 2013



LIFE-EDESIA
www.iss.it/life



«COME TALK TO ME... All the things that we both might say»

Grazie

Stefano LORENZETTI

stefano.lorenzetti@iss.it



<http://www.iss.it/life>



<http://www.iss.it/life/index.php?lang=2>



life.edesia@iss.it



<https://www.facebook.com/pages/Life-Edesia/180734252116032?ref=stream>



Istituto Superiore di Sanità - Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Reparto di Tossicologia Alimentare e Veterinaria.
Viale Regina Elena, 299 - 00161 Roma



Tel.: +39-06-49902512

www.iss.it/life



LIFE EDESIA



LIFE12 ENV/IT/000633