

# Valutazione del rischio tossicologico per l'età evolutiva di interferenti endocrini presenti nei prodotti ittici

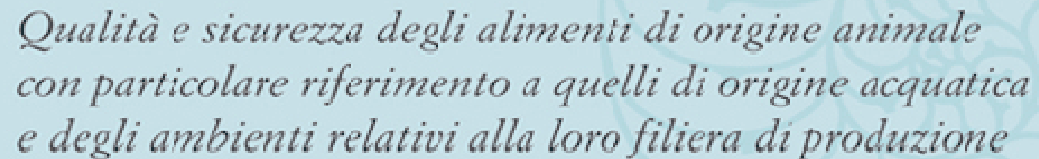
*Francesca Maranghi*

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ'

Dip. Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare

Reparto Tossicologia Alimentare e Veterinaria

[francesca.maranghi@iss.it](mailto:francesca.maranghi@iss.it)



## Biomarcatori in modelli *in vivo*

LA **VALUTAZIONE** DEL RISCHIO  
TOSSICOLOGICO  
E' UN PROCESSO A 4 FASI

- **Identificazione degli effetti avversi**
- **Caratterizzazione degli effetti avversi**
- **Valutazione dell'esposizione**
- **Caratterizzazione del rischio**



## Contributo dell'ISS in PESCI Biomarcatori in modelli *in vivo*

### Obiettivo del lavoro:

**caratterizzazione di marcatori precoci di effetto di contaminanti organici persistenti (POPs) - tutti potenziali Interferenti Endocrini (IE)**

- TCDD
- BDE47
- HBCD
- PCB153

**in un modello murino *in vivo* → femmina di topo prepubere selezionata come modello per il sottogruppo di consumatori potenzialmente più vulnerabile**

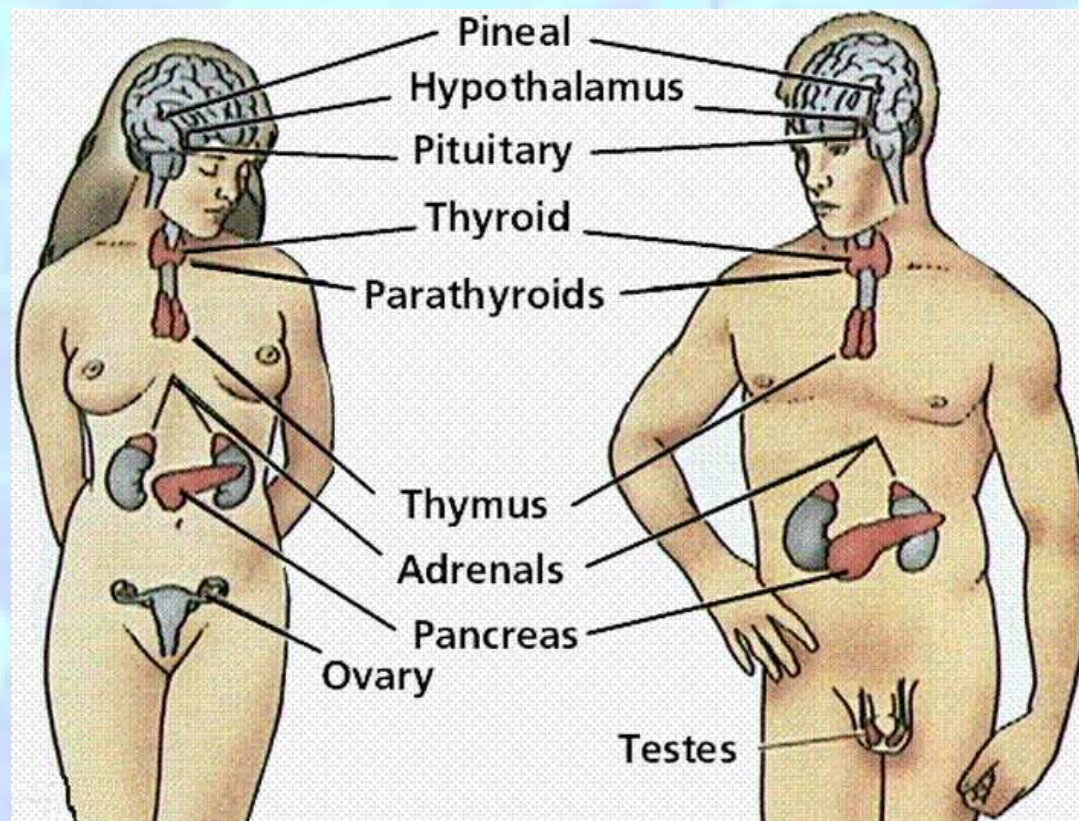
**fornire basi scientifiche alla valutazione e gestione del rischio (effetti/esposizione) IE capaci di bioaccumulo nelle filiere ittiche.**

**[collaborazione con NIFES (Bergen-Norvegia) e King's College (Londra)]**

# Endocrine disrupters

Interferenti Endocrini

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



# COSA SONO?

Un Interferente Endocrino (IE) è 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.

*(European Workshop on the Impact of Endocrine Disrupters on Human Health and Wildlife, Weybridge 2-4/12/1996)*

*Azione sulla sintesi, distribuzione, metabolismo, escrezione e funzione degli ormoni*

L'omeostasi degli *steroidi sessuali* e della *tiroide* sono i principali bersagli degli effetti degli IE;

La *salute riproduttiva* e l'*infanzia* sono le fasi biologiche più suscettibili

*Metabolismo*...(<http://www.iss.it/inte/aspe/cont.php?id=221&lang=1&tip o=5> )



# GRUPPO ETEROGENEO...

## Contaminanti Organici Persistenti (POP)

- **Policlorobifenili (PCB):**

effetti complessi sulla omeostasi degli steroidi e della tiroide

- **Diossine e PCB “diossina-simili”:** agonisti del recettore arilico

- **DDT e derivati:** agonisti estrogeni e/o antagonisti androgeni

## Sostanze industriali & “prodotti di consumo”

Nonil-fenoli e ottil-fenoli (sottoprodotti di detergenti) - *agonisti estrogeni* - si accumulano in organismi bentonici

Bisfenolo A (adesivi, plastiche..) - *agonista estrogeno, Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs)*

Ftalati (PVC, deodoranti, colle: es., dietilesil-) *antiandrogeni (sintesi degli steroidi), PPARa*

**PFOA-OA**: immunotossici e tossici per lo sviluppo, interferenza con PPARs

Organostannici (conservanti) - *Inibitori dell'aromatasi (?)* - si accumulano in organismi bentonici

**Polibromodifenileteri (ritardanti di fiamma)** - *tireostatici, agonisti ERa, (soprattutto)*

## Pesticidi, biocidi, antiparassitari

Insetticidi clorurati (es. Lindano)

*Omeostasi degli steroidi (estrogeni e/o antiandrogeni)*

Triazoli, Imidazoli (fungicidi)

*Inibitori della sintesi degli steroidi*

Vinclozolin, Procimidone (fungicidi), Linuron (erbicida) *Antiandrogeni*

Triazine (erbicidi) *asse neuroendocrino-ipofisario*

Etilene tiourea (maneb, mancozeb..), benzimidazoli

*Tireostatici*



## Ed inoltre

Elementi in traccia e metalli quali Cd, Hg, As, Pb, Mn, Zn: (*meccanismi ancora non chiari, As diabetogeno, Cd asse HP, Mn effetti neuroendocrini, etc.*) (J Toxicol Environ Health B Crit Rev. 2009 Mar;12(3):206-23)

Sostanze usate in cosmesi (Paraben..): agonisti estrogeni

ovviamente gli

anabolizzanti zootecnici (*vietati nella UE*)

e le micotossine (zearalenone, agonista ERa)

## Nuovi meccanismi, nuovi bersagli

**PPARs**: coinvolti nel metabolismo lipidico e glucidico, presenti in molti tessuti quali fegato e tessuto adiposo ma non solo (ftalati, BPA, TBT, TPT, PFCs)

**PXR, CAR, LXR, RXR** innescano effetti pleiotropici sulla funzione epatica, metabolismo lipidi, glucidi, risposta infiammatoria (DDT, ftalati, PBDE, PCBs, pesticidi, BPA...) (Mol Pharm. 2008 Jan-Feb;5(1):35-41, Arch Biochem Biophys. 2005 Jan 15;433(2):387-96, Vitam Horm. 2007;75:1-32).

# Perche' ci preoccupano?

- I dati (soprattutto sperimentali) indicano il rischio di effetti ritardati sullo sviluppo (esposizione prenatale o perinatale con effetti osservabili alla pubertà o nell'età adulta)
- Insufficienza degli approcci tossicologici (o epidemiologici) disponibili per una valutazione adeguata.
- Effetti endocrini si manifestano a dosi più basse rispetto ad altri effetti (cancerogenicità, teratogenicità, etc.)
- Difficoltà a definire "livelli senza effetto osservabile" su cui basare **la valutazione/gestione** del rischio

Primo documento ufficiale italiano sugli "interferenti endocrini" (Comitato Nazionale Biosicurezza e Biotecnologie – Presidenza del Consiglio-  
"SORVEGLIANZA DELL'ESPOSIZIONE A INTERFERENTI ENDOCRINI"  
(scaricabile da <http://www.iss.it/inte> - sezione "Progetti ISS")



## Contributo dell'ISS in PESCI - Biomarcatori in modelli *in vivo*

### Obiettivo del lavoro:

caratterizzazione di marcatori precoci di effetto di POPs -  
tutti potenziali Interferenti Endocrini (IE)

- TCDD
- BDE47
- HBCD
- PCB153

**in un modello murino *in vivo* → femmina di topo prepubere  
selezionata come modello per il sottogruppo di  
consumatori potenzialmente più vulnerabile**

fornire basi scientifiche alla valutazione e gestione del  
rischio (effetti/esposizione) IE capaci di bioaccumulo  
nelle filiere ittiche.

[collaborazione con NIFES (Bergen-Norvegia) e King's  
College (Londra)]

# Età e sviluppo

Durante il ciclo vitale, progressivi cambiamenti di natura sia anatomica che biochimica e fisiologica si susseguono a partire dal concepimento fino alla morte

I “**bambini**” possono essere considerati come un gruppo con SPECIFICHE e PROPRIE caratteristiche.

## **CHILDREN**

**Neonati** < 1 mese

**Infanti** 1-23 mesi

**Bambini** 2-12 anni

**Adolescenti** 13-18 anni (il termine “**pubertà**” si riferisce specificamente alla maturazione sessuale)

# Fisiologia

- Maggiore assorbimento a **livello gastrointestinale**
- Maggiore **assorbimento dermico** dovuto a maggiore permeabilità cutanea
- Maggiore quantità di sostanze (xenobiotici) assorbite per **inalazione**
- **Body composition**: minore contenuto lipidico – maggiore contenuto di acqua
- Funzionalità enzimatica ancora immatura (fase I e II)
- Funzionalità **renale** ancora non completamente matura
- Limitata capacità di legame e trasporto delle **proteine** seriche

## **Sistema Immunitario**

completamente sviluppato alla nascita **MA** la produzione di linfociti T e B attivati continua dopo la nascita, anche per l'interazione con gli antigeni

## **Il Sistema Endocrino influenza tutti gli organi/sistemi corporei**

Steroidi sessuali (**crescita, insieme di processi che portano alla pubertà, maturazione prepuberale dei sistemi riproduttivi**)

Tiroide (**cervello, crescita**)

Ormone della crescita (**tessuti muscolare ed osseo**)

# Adolescenza

The period from the appearance of secondary sex characteristics to the attainment of adult height (11-19 years)

- **Modificazioni fisiologiche**, ad es. crescita corporea, peso degli organi, metabolismo epatico (colesterolo ed ormoni steroidi), funzionalità polmonare, nutrizione, etc.
- Completa maturazione dei sistemi **immunitario**, **scheletrico e riproduttivo**, **SNC** e **comportamento**.



# Il bambino non è un “piccolo adulto”

## VULNERABILITA' - SUSCETTIBILITA'

### Immaturità principali sistemi corporei

*inoltre*

- Mangiano, bevono, respirano in misura maggiore rispetto agli adulti (considerando il peso corporeo)
- Consumano cibi specifici (alimenti per l'infanzia)
- Seguono diete differenti (consumano alcuni alimenti di preferenza)
- Hanno abitudini e comportamenti (maggiore e più protratto nel tempo contatto con il suolo, abitudine a portare tutto alla bocca, maggiore permanenza in ambienti chiusi, gattonare) che li rendono più vulnerabili ed esposti agli xenobiotici

## VIE DI ESPOSIZIONE

- **Alimenti**

**Gli effetti possono manifestarsi dopo lunga latenza – alla pubertà e/o in età adulta**

# Il bambino non è un piccolo adulto....

- Il settore farmaceutico riconosce il problema *bambini differenti da adulti* attraverso il juvenile toxicity test per lo sviluppo di **farmaci** pediatrici
- **ma non** è lo stesso per il settore RA - food safety, pesticidi, industrial products ....

## Modelli animali per l'identificazione del rischio nel bambino

L'organo/funzione bersaglio nel modello animale prescelto DEVONO trovarsi nello **stesso periodo di sviluppo** rispetto a quella ravvisata come "a rischio" per l'uomo

Nei modelli animali sovente lo sviluppo di un organo/sistema è temporalmente "**compresso**" rispetto alla specie umana (ad esempio il sistema riproduttivo)

# Modelli animali per l'identificazione del rischio nel bambino

## Periodi critici per lo sviluppo

Chiaramente definiti nell'uomo

Periodi paragonabili nelle specie animali utilizzate come modello non facilmente identificabili e spesso dipendenti dal singolo organo e/o sistema

Gli eventi chiave dello sviluppo non avvengono alla stessa "età cronologica" nelle varie specie viventi.



## **Contributo dell'ISS in PESCI - Biomarcatori in modelli *in vivo***

### **Obiettivo del lavoro:**

**caratterizzazione di marcatori precoci di effetto di POPs -  
tutti potenziali Interferenti Endocrini (IE)**

- TCDD
- BDE47
- HBCD
- PCB153

**in un modello murino *in vivo* → femmina di topo prepubere  
selezionata come modello per il sottogruppo di  
consumatori potenzialmente più vulnerabile**

**fornire basi scientifiche alla valutazione e gestione del  
rischio (effetti/esposizione) IE capaci di bioaccumulo  
nelle filiere ittiche.**

**[collaborazione con NIFES (Bergen-Norvegia) e King's  
College (Londra)]**

# Perchè *il* pesce

## BENEFICIO

**Alimento chiave dell'alimentazione poiché fornisce: acidi grassi polinsaturi (omega 3), proteine di alta qualità (15-23%), vitamine (A, D), elementi in traccia (iodio, selenio)**

**Importanti ad esempio per il corretto sviluppo neurocomportamentale, neuroendocrino e metabolico del bambino**

## RISCHIO

**Potenzialmente contaminato da: metalli (*MetHg*), elementi in tracce (As), composti alogenati persistenti (PCBs, diossine, PBDEs, PFOS/OA)**

**...che possono annullarne il beneficio**

**Consumo di pesce, sia allevato sia pescato: possibili rischi e benefici nutrizionali (2005, Panel CONTAM)**

**[www.efsa.europa.eu/en/science/contam/contam\\_opinions/1007.html](http://www.efsa.europa.eu/en/science/contam/contam_opinions/1007.html)**

# Valutazione EFSA, Metil mercurio

## Opinion of the Scientific Panel on contaminants in the food chain [CONTAM] related to mercury and methylmercury in food

([http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa\\_locale-1178620753812\\_1178620763245.htm](http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa_locale-1178620753812_1178620763245.htm))

Mercury (Hg) is an environmental contaminant that is present in fish and seafood products largely as methylmercury (MetHg).

MetHg is highly toxic particularly to the nervous system, and the developing brain is thought to be the most sensitive target organ for MetHg toxicity.

The estimated intakes of Hg in Europe varied by country, depending on the amount and the type of fish consumed (large predatory fish having a higher concentration of MetHg)

**Provisional Tolerable Weekly Intake (PTWI) of 1.6 µg/kg body weight**

A probabilistic analysis of the French data indicated that children are more likely to exceed the PTWI than adults



# Valutazione EFSA

Consumo di pesce, sia allevato sia pescato: possibili rischi e benefici nutrizionali (2005, Panel CONTAM)

[www.efsa.europa.eu/en/science/contam/contam\\_opinions/1007.html](http://www.efsa.europa.eu/en/science/contam/contam_opinions/1007.html)  
(Omega 3 e..PCB, MethHg)

.....*there is evidence that fish consumption, especially of fatty fish (one to two servings a week) **benefits the cardiovascular system** and is suitable for secondary prevention in manifest coronary heart disease. There may also be benefits in **foetal development**, but an optimal intake has not been established. Frequent consumers of Baltic herring and wild Baltic salmon **are more likely to exceed the PTWI for PCDD/F and DL-PCBs** than other consumers of fatty fish.*

*For **methylmercury** it is possible for a woman to decrease the amounts in her body by decreasing intake in the months preceding and during pregnancy .....*

The most important of these are methylmercury and the dioxin-like compounds, for which **high level consumers of certain fish may exceed the provisional tolerable weekly intake (PTWI)** even without taking into account other sources of dietary exposure. **Such exceedance is undesirable and may represent a risk to human health** if repeated frequently.

# Interazione fra contaminanti e principi attivi

Target effetti PBDE → tiroide

Pesce ricco di iodio → necessario per il corretto funzionamento della tiroide

Induttori di stress ossidativo in diversi sistemi cellulari in vitro e SNC di roditore

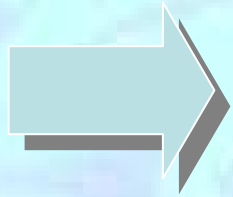
Possibile meccanismo alla base della neurotossicità dei PBDE

Pesce → omega 3

Retinoids play an important role in controlling such vital processes as morphogenesis, development, reproduction or apoptosis

Some environmental pollutants that affect embryogenesis, immunity or epithelial functions were also shown to interfere with retinoid metabolism and signaling in animals. This suggests that at least some of their toxic effects may be related to interaction with the retinoid metabolism, transport or signal transduction

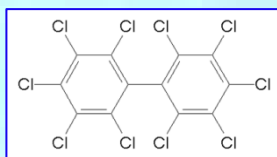
*Novak J et al 2008 Environ Int. Aug;34(6):898-913*



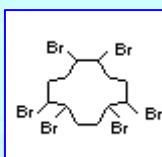
**Contributo dell'ISS in PESCI - Biomarcatori  
in modelli *in vivo***

***Protocollo sperimentale***  
***Risultati***  
***Conclusioni***

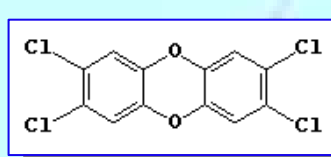
PCB-153



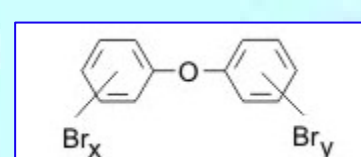
HBCD



2,3,7,8-TCDD



PBDE-47



Contaminanti modello a **2 livelli di dose**  
**compatibili con esposizione umana**



*Aquamax-salmone liofilizzato + mangime tradizionale (caseina)*

control

spiked

spiked

spiked

spiked



**femmine** di topo Balb/c trattate per **28 giorni a partire dallo svezzamento (prepuberi)** – sacrificio a PND 52

Organi bersaglio: tiroide, fegato, cervello, surreni, utero, milza, timo

Siero per biochimica tossicologica (steroidi sessuali, ormoni tiroidei)

# Livelli di dose

I livelli di dose sono stati selezionati in modo da essere compatibili con **scenari di assunzione elevati, ma realistici.**

Dosi basse (low) = i livelli alti di contaminazione ritrovati nei filetti di salmone (database NIFES)

Dosi alte (high) = la più bassa dose in grado di indurre effetti tossici nel topo (dati di letteratura)

- TCDD h 100 ng/kg p.c. day
- TCDD l 6 pg/kg p.c. day
- HBCD h 200 mg/kg p.c. day
- HBCD l 200 µg/kg p.c. day
- PCB 153 h 274 µg/kg p.c. day
- PCB 153 l 9 µg/kg p.c. day
- PBDE 47 h 375 µg/kg p.c. day
- PBDE 47 l 4 µg/kg p.c. day

# Due fasi sperimentali

- Fase I: somministrazione delle 4 sostanze modello (2 livelli di dose) nella dieta standard per roditori
  - Fase II: somministrazione di due livelli di dose (low and high) di BDE47, utilizzate due diverse diete per roditori da laboratorio
    - 1) a base di caseina
    - 2) a base di pesce
- per verificare la diversa influenza di tali componenti sugli effetti del contaminante



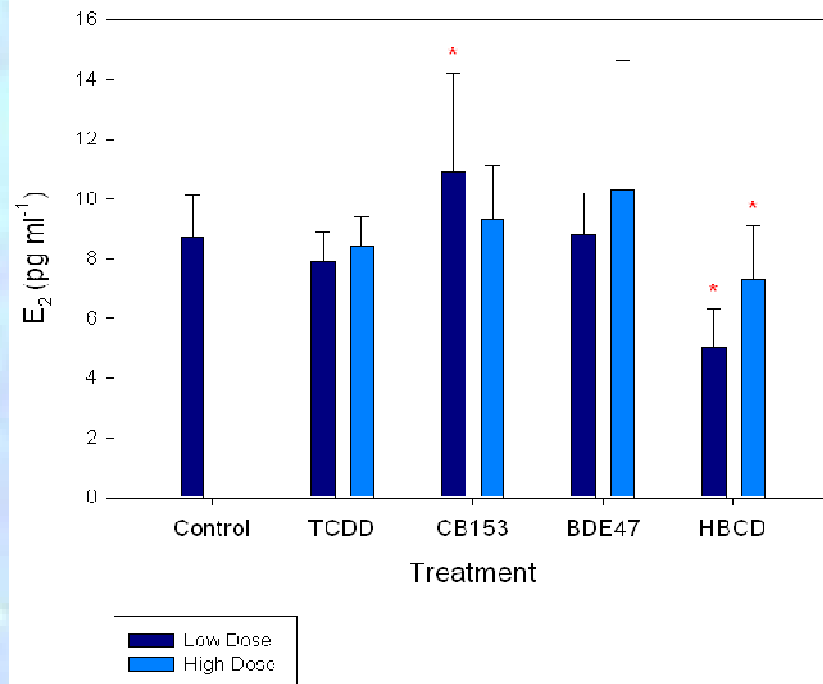
# HISTOPATHOLOGY

Organs	Observations	CON.	PCB		PBDE		TCDD		HBCD	
			Low dose (9 µg/kg)	High dose (274.8 µg/kg)	Low dose (4 µg/kg)	High dose (375 µg/kg)	Low dose (6 pg/kg)	High dose (100 ng/kg)	Low dose (200 µg/kg)	High dose (200 mg/kg)
Thyroid	Desquamation into follicular lumen	0/7 (0%)	2/7 (29%)	3/7 (43%)	1/7 (14%)	5/7## (71%)	0/7 (0%)	3/7 (43%)	3/7 (43%)	1/7 (14%)
	Foaming colloid	1/7 (14%)	4/7 (57%)	3/7 (43%)	3/7 (43%)	3/7 (43%)	3/7 (43%)	2/7 (29%)	2/7 (29%)	3/7 (43%)
Uterus	Irregular multistratification of the luminal epithelium	1/8 (12%)	3/9 (33%)	5/8 (62%)	4/10 (40%)	4/7 (57%)	4/6 (67%)	5/7 # (71%)	2/7 (29%)	1/6 (17%)
	Reduction in endometrial glands density	0/8 (0%)	2/9 (22%)	1/8 (12%)	4/10 (40%)	3/7 (43%)	2/6 (33%)	3/7 (43%)	4/7 # (57%)	2/6 (33%)
Liver	Marked vacuolization in hepatocytes	0/10 (0%)	1/8 (12%)	3/10 (30%)	1/7 (14%)	4/9 # (44%)	2/8 (25%)	0/10 (0%)	5/8 ## (62%)	1/9 (11%)
	Lymphocytic infiltration	0/10 (0%)	4/8 # (50%)	6/10 # (50%)	4/7 # (57%)	4/9 # (44%)	4/8 # (50%)	2/10 (20%)	6/8 ## (75%)	4/9 # (44%)
	Hyperaemic vessels	0/10 (0%)	0/8 (0%)	7/10 ## (70%)	0/7 (0%)	0/9 (0%)	1/8 (12%)	5/10 # (50%)	6/8 ## (75%)	5/9 # (56%)
	Picnotic nucleus	0/10 (0%)	2/8 (25%)	0/10 (0%)	0/7 (0%)	5/9 # (56%)	2/8 (25%)	8/9 ### (89%)	2/8 (25%)	0/9 (0%)
Thymus	Hassal's bodies	2/10 (20%)	4/10 (40%)	2/10 (20%)	2/8 (25%)	7/9 # (78%)	2/10 (20%)	6/9 (67%)	5/10 (50%)	2/8 (25%)
	Cortical invasivity	2/10 (20%)	4/10 (40%)	2/10 (20%)	6/8 (75%)	2/9 (22%)	2/10 (20%)	3/9 (33%)	2/10 (20%)	8/9 ## (89%)
	Minerals	2/10 (20%)	0/10 (0%)	3/10 (30%)	0/8 (0%)	4/9 (44%)	6/10 (60%)	4/9 (44%)	5/10 (50%)	4/9 (44%)
	Stress	0/10 (0%)	7/10 ## (70%)	2/10 (20%)	2/8 (25%)	5/9 # (56%)	0/10 (0%)	6/9 ## (67%)	5/10 # (50%)	1/9 (11%)
Spleen	Lymphocyte hyperplasia	4/10 (40%)	2/10 (20%)	10/10 ## (100%)	1/10 (10%)	9/10 # (90%)	6/10 (60%)	10/10 ## (100%)	5/10 (50%)	6/10 (60%)
	Infiltration in red pulp and periarteriolar zones (PALS)	0/10 (0%)	2/10 (20%)	8/10 ### (80%)	1/10 (10%)	5/10 # (50%)	0/10 (0%)	4/10 (40%)	0/10 (0%)	0/10 (0%)

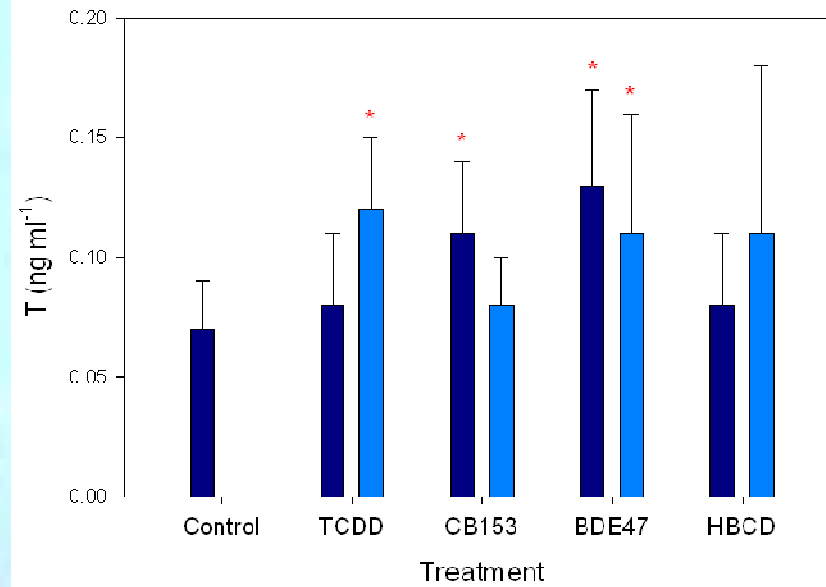
# Fase II - istopatologia

- Dieta a base di caseina → effetti a carico di tiroide, milza e fegato
- Dieta a base di pesce → effetti più limitati, a carico della tiroide (aumento colloide schiumosa) e della milza (aumento apoptosi e alterazioni polpa rossa)

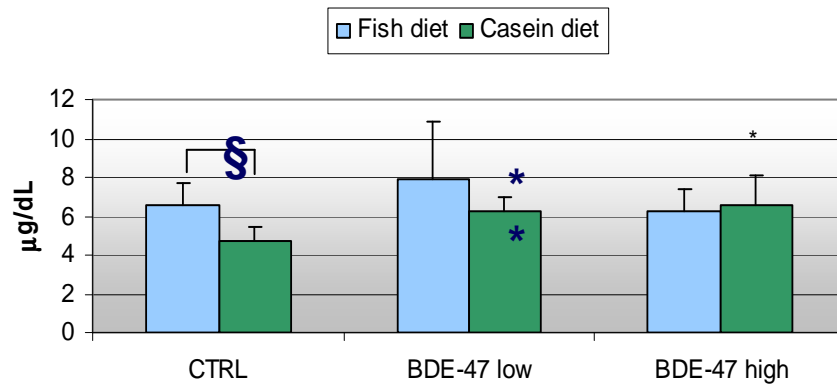
17 $\beta$ -Estradiol



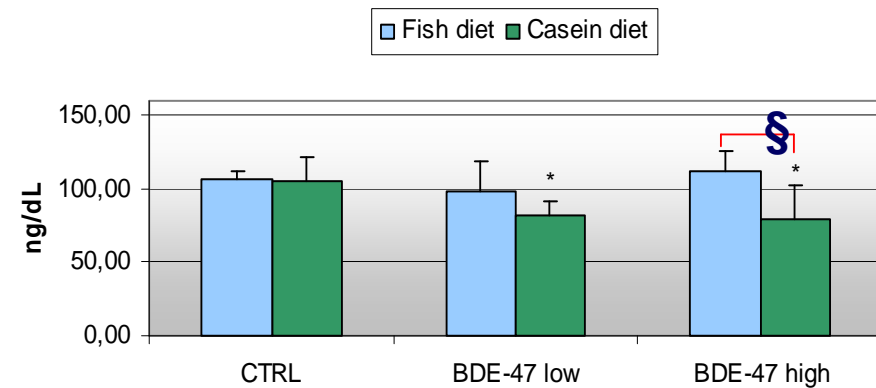
Testosterone



T4 serum levels



T3 serum levels



# Conclusioni

Effetti sottili su organi-tessuti bersaglio a livelli di dose compatibili con l'esposizione umana prevista

Gli effetti sulla tiroide (bersaglio critico dei POPs) sottolineano la differente potenza delle sostanze testate.

Effetti sui marcatori tiroidei differenti nelle differenti diete (potenziale effetto protettivo delle diete a base di pesce).

I test tossicologici su animali immaturi possono contribuire a migliorare la valutazione del rischio in sicurezza alimentare, in quanto rappresentativi di una fascia particolarmente vulnerabile di consumatori

# Conclusioni

E' importante inserire i ritardanti di fiamma bromurati (PBDE, HBCD) nei programmi di monitoraggio di mangimi ed alimenti di origine animale, come contaminanti emergenti; infatti i nostri test hanno consentito di evidenziare alterazioni a carico di tessuti come **tiroide e milza**, che risultano **chiave per lo sviluppo e a livelli di dose compatibili con scenari reali di esposizione** per il consumatore.

Alla luce dei risultati, esiste un **parziale effetto protettivo della matrice pesce**, probabilmente dovuto all'apporto di principi attivi contenuti nell'alimento; tuttavia, questi non riescono completamente a prevenire gli effetti tossici indotti da IE in fasi vulnerabili del ciclo vitale, anche a livelli di contaminazione compatibili con scenari reali.

*inoltre....*

- Per il **pesce allevato** risulta chiave il controllo sulla filiera del mangime
- Per il **pesce pescato** importante la tracciabilità del prodotto
- Importanza di fornire informazioni al consumatore sulle differenze che esistono nei diversi tipi di pesce in quanto a presenza sia di fattori nutrizionali che di potenziali contaminanti

Incremento delle conoscenze e messa a punto **strumenti più specifici** per **l'analisi del rischio**.

Ad esempio:

interazioni fra contaminanti diversi (esposizione complessiva/interazione fra elementi) fra i contaminanti ed i nutrienti presenti negli alimenti (fattori protettivi ? Base di Dati EDID: EDCs-Diet Interactions Database.

<http://www.iss.it/inte/edid/index.php?lang=1&tipo=18&anno=2006>



Un particolare ringraziamento a:

Dr. Ilaria Altieri

Dr. Gabriele Moracci

Dr. Roberta Tassinari

C. Hogstrand (KCL-UK)

A.K. Lundebye-Haldorsen (NIFES-Norway)

