

Attività del Centro di Riferimento della Medicina di Genere dell'ISS nella valutazione degli effetti tossicologici degli interferenti endocrini

Sabrina Tait, Elena Ortona

Centro di riferimento per la medicina di genere, Istituto Superiore di Sanità

La tossicologia sesso/genere-specifica individua le differenze nella risposta alle sostanze chimiche sulla base del sesso e del genere. A questo scopo, in ognuna delle quattro fasi della valutazione del rischio, occorre analizzare le differenze di sesso/genere, con particolare riguardo alla metabolizzazione dei composti chimici, agli organi target, agli effetti, all'esposizione e alla relazione dose-risposta. È però importante definire in modo chiaro i termini "sesso" e "genere" in quanto essi influenzano differentemente gli aspetti sopra citati. In particolare, il sesso determina le caratteristiche biologiche di un individuo legate all'assetto cromosomico e alla produzione di ormoni sessuali, che a loro volta determinano le caratteristiche dimorfiche di molti organi, le gonadi *in primis*. Il sesso quindi determina la diversa capacità di metabolizzare le sostanze chimiche, il loro trasporto ed escrezione (tossicocinetica e tossicodinamica), influenzando quindi sulla suscettibilità all'esposizione, nonché sui

possibili effetti avversi. Il genere, invece, si riferisce a caratteristiche sociali, culturali, economiche e allo stile di vita, che derivano da scelte individuali e che influenzano principalmente lo scenario di esposizione.

Storicamente la tossicologia si è occupata solo marginalmente di includere la valutazione del sesso/genere, sia per ciò che concerne gli studi animali, in cui vengono impiegati prevalentemente maschi per evitare di tenere in considerazione il ciclo estrale delle femmine, sia negli studi umani dove spesso, nonostante si arruolino individui di entrambi i generi, l'analisi dei dati non viene stratificata per sesso/genere. Ciò determina un serio *gap conoscitivo*, non solo a livello scientifico, ma anche a livello regolatorio perché, in mancanza di informazioni precise sui diversi effetti e sui livelli di esposizione in uomini e donne, non è possibile effettuare una valutazione del rischio sesso/genere specifica.

Fra le sostanze a cui la popolazione ge-

nerale è esposta giornalmente, gli Interferenti Endocrini (IE) hanno una particolare rilevanza nell'ambito della tossicologia di genere data la loro capacità di alterare il sistema endocrino. All'interno di questa vasta classe di composti, vi sono sostanze con varie strutture chimiche e con diversi impieghi, ad esempio come plasticizzanti (contenuti nelle plastiche anche a contatto con gli alimenti), ritardanti di fiamma (presenti in tessuti, mobili, apparecchiature elettroniche e audiovisive per ridurre l'infiammabilità), preservanti (ad esempio nei cosmetici) o pesticidi. Il loro meccanismo d'azione in genere implica un'interazione, agonista o antagonista, con i recettori nucleari degli ormoni steroidei all'interno delle cellule bersaglio, principalmente quelli per gli estrogeni (ER α , ER β , ERR γ , GPER) e gli androgeni (AR), con conseguente alterazione dei segnali e dell'attivazione di geni da essi dipendenti. Gli IE, però, possono anche competere con alcuni ormoni per il legame alle proteine seriche, alterando quindi il trasporto degli ormoni nel circolo sanguigno, oppure possono alterare l'attività di alcuni enzimi necessari alla sintesi degli ormoni stessi.

Il Gruppo di Tossicologia del Centro di Riferimento di Medicina di Genere si occupa da anni di investigare effetti, modi d'azione ed esposizione a IE in ottica di genere, attraverso studi sulle cellule *in vitro*, sui modelli animali *in vivo* e sugli esseri umani. Di seguito vengono illustrati alcuni approcci e risultati ottenuti.

Esposizione

L'esposizione a sostanze chimiche presenti nell'ambiente o negli alimenti è strettamente dipendente dai luoghi frequentati, dalle abitudini alimentari, dallo stile di vita, dalla condizione socio-economica, dall'area geografica di residenza, dall'uso di cosmetici o di altri prodotti di consumo. Queste diverse componenti possono derivare da scelte volontarie o essere condizionate

da fattori esterni sociali e rappresentano, pertanto, orientamenti genere-specifici.

Nell'ambito del progetto Life PERSUADED ("Biomonitoraggio di ftalati e BPA nei bambini italiani e associazione con patologie infantili: il progetto europeo LIFE PERSUADED"; LIFE13 ENV/IT/000482), abbiamo misurato i livelli di esposizione ai plasticizzanti Bisfenolo A (BPA) e di-etil-esil-ftalato (DEHP) in 900 coppie madri-bambino, arruolando equamente individui residenti nelle tre macroaree geografiche (Nord, Centro e Sud), in aree a diversa densità abitativa (urbana e rurale); i bambini, inoltre, erano equamente suddivisi in tre fasce di età (4-6, 7-10, 11-14 anni) e fra i due sessi. I risultati hanno mostrato che i bambini maschi avevano livelli urinari più alti di DEHP, in particolare nella fascia 11-14 anni e presentavano una maggiore efficienza metabolica nella trasformazione da MEHP (primo metabolita del DEHP) a MEHHP (secondo metabolita), rispetto alle bambine, indipendentemente dall'area di residenza [1]. Nessuna differenza, invece, è stata osservata nei livelli di esposizione a BPA fra bambini e bambine [2]. Lo studio, quindi, ha permesso di determinare i livelli di esposizione di una popolazione suscettibile come quella infantile, considerando contemporaneamente per la prima volta e con un campionamento esteso il sesso, l'età e l'area di residenza. Inoltre, sono state evidenziate differenze metaboliche sesso-specifiche mai descritte in precedenza.

Effetti sesso/genere-specifici

Gli IE possono determinare effetti avversi, anche a basse dosi, sui sistemi riproduttivo, neurologico, metabolico, immunitario, ecc. Di particolare importanza è la finestra di esposizione a tali sostanze, in quanto alcune fasi della vita sono più suscettibili di altre, come ad esempio durante la vita intrauterina, la pubertà, la menopausa o nelle fasi dell'invecchiamento.

Nei nostri studi *in vivo* è sempre prevista l'inclusione di animali di entrambi i sessi per valutare effetti dimorfici sugli organi bersaglio delle sostanze in esame. Inoltre, molti dei nostri studi prevedono somministrazione delle sostanze chimiche in esame nella fase pre- e/o perinatale, fino all'allattamento, in cui molti degli organi sono ancora in sviluppo. Ad esempio, uno studio ha previsto la somministrazione durante la gravidanza del pesticida organofosforico clorpirifos, ampiamente utilizzato in agricoltura per anni ed il cui uso è stato ora limitato, a livelli di dose inferiori a quelle considerate tossiche, inibenti l'azione dell'acetilcolinesterasi [3]. Gli animali maschi, osservati in età adulta, presentavano alterazioni della risposta sociale molto più marcate delle femmine. Inoltre, a tale fenotipo era associata un'aumentata espressione genica del recettore β degli estrogeni nell'ipotalamo ed una ridotta espressione genica del peptide ossitocina nell'amigdala [3], implicando quindi un'interazione endocrina del clorpirifos con ripercussioni sul comportamento. Ipotalamo e amigdala sono particolarmente coinvolti nel comportamento sociale ed emotivo e livelli alterati di ossitocina sono associati a diverse manifestazioni patologiche. Gli effetti a lungo termine da noi osservati, sono stati supportati da altre evidenze nella letteratura, sia attraverso studi con animali da laboratorio che sulla popolazione, dimostrando come il sesso maschile sia più suscettibile all'esposizione al clorpirifos e come questo possa rappresentare un fattore di rischio per malattie neurodegenerative come la sindrome dello spettro autistico che, come noto, ha una prevalenza maschile [4].

Effetti sesso- e organo-specifici sono stati osservati anche nello studio animale svolto nell'ambito del progetto Life PERSUADED, in cui ratti *juvenile* (modello che risulta paragonabile alla pubertà) di entrambi i sessi sono stati trattati con DEHP o BPA a livelli di dose riscontrati nella popolazione infan-

tile italiana sopra descritta. L'esposizione a BPA ha determinato nelle femmine effetti più evidenti a livello epatico con iperplasia dei dotti biliari e focolai di cellule infiammatorie [5]. Nei maschi si sono osservati effetti più severi a livello riproduttivo in seguito ad esposizione con DEHP, con un evidente ritardo dello sviluppo puberale compatibile con il meccanismo anti-androgenico di questo contaminante [6]. Sia BPA che DEHP hanno inoltre indotto alterazioni metaboliche sesso-specifiche: entrambi hanno aumentato i livelli serici di adiponectina solo nei maschi, riducendo i livelli di leptina in entrambi i sessi [5,6]. Nonostante la similitudine degli effetti provocata dai singoli composti, la loro somministrazione in miscela ha rilevato l'esistenza di un meccanismo antagonista nei maschi e di uno sinergico nelle femmine [7], supportando due diversi modi d'azione. È importante sottolineare che BPA e DEHP sono considerati "distruttori metabolici", o obesogeni, cioè sostanze che attivano processi cellulari e metabolici in grado di indurre obesità. Gli ormoni adiponectina e leptina, che fisiologicamente hanno livelli più elevati nelle donne, hanno un ruolo centrale nella regolazione del senso di sazietà, del bilancio energetico e del metabolismo di zuccheri e grassi. Il loro segnale mette in comunicazione il tessuto adiposo con l'ipotalamo, regione del cervello sessualmente dimorfica e da cui dipendono le attività endocrine dell'organismo. Dato l'aumento esponenziale di patologie croniche quali l'obesità, il diabete di tipo 2 e la sindrome metabolica, soprattutto nella popolazione giovanile, i nostri risultati forniscono evidenze di effetti sesso-specifici di due plasticizzanti largamente impiegati e considerati fattori di rischio per tali patologie, in una fase suscettibile e soggetta a cambiamenti ormonali quale la pubertà, con possibili ripercussioni anche a lungo termine. Un'ulteriore conferma dell'azione sesso-specifica di queste sostanze è stata

ottenuta nello studio caso-controllo di Life PERSUADED in cui sono stati analizzati i livelli di esposizione a BPA e DEHP in bambini sani e obesi: solo nelle bambine si è osservata un'associazione significativa fra esposizione ed aumentato rischio di essere obeso [8].

Un aspetto emergente e particolarmente critico nello studio degli effetti degli IE riguarda gli individui che intraprendono un percorso di conversione sessuale e si sottopongono a trattamenti ormonali prolungati. Tale condizione determina una maggiore suscettibilità all'esposizione che non è mai stata investigata. Il nostro gruppo sta mettendo a punto un modello murino di transizione demascolinizzante/femminilizzante e defemminilizzante/mascolinizzante, anche identificando opportuni biomarcatori epatici, per poter studiare gli effetti dell'esposizione a IE nella popolazione transgender [9].

Studio dei meccanismi e *Adverse Outcome Pathways*

Negli ultimi anni molte delle agenzie regolatorie europee e internazionali, come ad esempio l'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA), l'Agenzia europea delle sostanze chimiche (ECHA), l'Organizzazione per la cooperazione e lo sviluppo economico (OECD) o l'Agenzia statunitense per la protezione dell'ambiente (EPA), stanno promuovendo l'uso e lo sviluppo di metodi alternativi alla sperimentazione animale, i cosiddetti *New Approach Methodologies* (NAMs), in accordo con il principio delle 3R (*Reduction, Replacement, Refinement*). Questa spinta è guidata da motivi economici, di tempo ed etici. Si consideri, infatti, che le sostanze da valutare in ottemperanza al regolamento REACH sono circa 100.000, pertanto il numero di animali (oltre un centinaio per sostanza seguendo le linee guida dell'OECD), il tempo ed i costi (stimati in oltre 4 milioni di euro applicando una sola linea guida) per valu-

tarle tutte sarebbero insostenibili [10]. Occorre quindi sviluppare metodi alternativi *in vitro* e *in silico* in grado di fornire più rapidamente dati robusti sugli effetti, i meccanismi e le curve dose-risposta determinate dall'esposizione a sostanze chimiche, IE in particolare.

In tale contesto, assume particolare rilevanza l'implementazione di modelli cellulari sesso-specifici. Finora, infatti, non si è prestata molta attenzione al *background* genetico dei modelli cellulari utilizzati, in particolare di quelli tumorali, largamente impiegati per la loro facilità di coltivazione e manipolazione. Con la maggiore diffusione delle cellule primarie e pluripotenti, però, occorre tenere maggiormente in considerazione l'origine maschile o femminile dei donatori, al fine di valutare, anche *in vitro*, effetti e modi d'azione sesso-specifici. In quest'ottica, abbiamo stabilito una collaborazione internazionale per sviluppare modelli cellulari immortalizzati di cellule fetali maschili e femminili ottenuti da interruzioni volontarie di gravidanza, per investigare effetti e meccanismi sesso-specifici degli IE durante la fase più suscettibile dello sviluppo, il primo trimestre, in cui vi è anche la determinazione del sesso del feto, l'attivazione specifica degli ormoni sessuali femminili o maschili e la caratterizzazione sesso-specifica degli organi [10]. Secondo la teoria dell'origine in utero del futuro stato di salute e di malattia di un individuo (*Developmental Origins of Health and Disease*), i fattori che durante la gravidanza influenzano il corretto sviluppo del nascituro possono avere ripercussioni sulla salute anche in fase adulta o nell'anziano [11]. Lo sviluppo di modelli cellulari fetali maschili e femminili, quindi, permetterebbe di studiare nel dettaglio quelle sostanze che rappresentano fattori di rischio rilevanti non solo per gli effetti immediati sul corretto sviluppo del feto, ma anche per alterazioni a lungo termine innescati da un'errata "programmazione" dei meccani-

smi ormonali e metabolici.

Sulla base dei risultati sesso-specifici ottenuti *in vivo* nell'ipotalamo in seguito ad esposizione a clorpirifos, abbiamo iniziato uno studio *in vitro* per indagare i meccanismi molecolari alla base di tale dimorfismo. A tal fine, stiamo impiegando una linea immortalizzata murina di ipotalamo di neuroni GnRH (GT1-7), ottenuta da animali maschi e femmine, quindi di origine cromosomica mista [12], trattandola con CPF a concentrazioni rilevanti per l'esposizione umana in due differenti scenari espositivi, e cioè in presenza di estradiolo o di testosterone a concentrazioni fisiologiche, sia in monostrato che in 3D per formare neurosfere. Risultati preliminari indicano chiaramente che il clorpirifos determina effetti molecolari e sulla funzionalità neuronale diversi in condizioni ipotalamiche femminili o maschili. Ulteriori approfondimenti, anche mediante analisi proteomica, consentiranno di definire nel dettaglio i meccanismi che sottintendono i diversi effetti osservati.

Lo stesso modello ipotalamico murino verrà impiegato anche nel progetto PNRR di partenariato esteso "Heal Italia" per investigare l'alterazione dei segnali ipotalamo-tessuto adiposo da parte di un pesticida neonicotinoide (acetamiprid) ed un polifenolo naturale (acido protocateciuco) per la valutazione del rischio/beneficio. In particolare, colture di adipociti umani di entrambi i sessi verranno trattate con le due sostanze singolarmente o in miscela, ed il mezzo condizionato verrà addizionato alle cellule ipotalamiche. Alternativamente, si metteranno a punto modelli di co-cultura. Marcatori specifici e di funzionalità d'organo verranno analizzati per indagare eventuali alterazioni sesso-specifiche del *signalling* fra tessuto adiposo e ipotalamo il cui sbilanciamento, come descritto in precedenza, rappresenta un elemento critico per l'insorgenza di malattie metaboli-

che quali l'obesità.

L'identificazione dei meccanismi d'azione delle sostanze chimiche in generale, e degli IE in particolare, permette di identificare i bersagli molecolari con cui le sostanze interagiscono (ad esempio i recettori nucleari) e gli effetti a cascata che ne derivano. Un ampliamento di tale concetto, utilizzabile a livello regolatorio per la valutazione del rischio, è rappresentato dalle *Adverse Outcome Pathways* (AOPs), introdotte nel 2012 dall'OECD e che rappresentano dei *framework* concettuali in cui tutta l'evidenza disponibile viene integrata per descrivere come da un evento molecolare iniziale (*Molecular Initiating Event*, MIE) si giunge ad un esito avverso (*Adverse Outcome*, AO), attraverso una serie di eventi chiave (*Key Events*) legati fra loro da causalità diretta o indiretta e da plausibilità biologica. Nelle AOP, il livello di complessità biologica aumenta a partire dal MIE, descritto a livello molecolare, attraverso i KEs descritti a livello molecolare, cellulare, tissutale o d'organo; infine gli AO possono manifestarsi nell'individuo o in un'intera popolazione. Appare evidente che, così come esposto finora, ognuno di questi passaggi può implicare manifestazioni sesso/genere specifiche. In ogni AOP disponibile (<https://aopwiki.org/>), infatti, dovrebbe essere opportunamente descritta la sezione relativa al "*Sex applicability domain*" per indicare tale specificità; purtroppo però, nella maggior parte dei casi, essa risulta mancante o poco approfondita. Nell'ambito della *European Partnership for the Assessment of Risks from Chemicals* (<https://www.eu-parc.eu/>) co-finanziato dall'Unione Europea, siamo coinvolti in diverse attività per l'identificazione e la caratterizzazione di alcune classi di composti ad attività endocrina nel *Work Package 5 (Hazard Assessment)*, che prevede anche l'integrazione e lo sviluppo di nuove AOP. Il primo network di AOP preso in considerazione è quello relativo all'alterazione del

sistema ormonale tiroideo; in tale ambito, abbiamo promosso l'implementazione del "Sex applicability domain".

Conclusioni

Da quanto descritto finora, emergono chiaramente, sebbene non in modo esaustivo, le fasi ed i diversi aspetti di cui tenere conto durante una valutazione tossicologica del rischio sesso/genere specifica e di come il Gruppo di Tossicologia del Centro di Riferimento di Medicina di Genere dell'ISS svolga attività inerenti tutti questi aspetti. Purtroppo questi approcci non vengono ancora sufficientemente impiegati nella ricerca sperimentale, ad esempio non includendo entrambi i sessi negli studi *in vivo*, non disaggregando per genere i dati di esposizione umana ed epidemiologici, non considerando la possibile implementazione di modelli cellulari sesso-specifici, non valutando separatamente qualunque dato, ad esempio proveniente da analisi omiche o altre tecnologie avanzate, in relazione al sesso/genere. La disponibilità di tali dati, permetterebbe di definire livelli di sicurezza sesso/genere specifici per le sostanze chimiche, aumentando così il livello di protezione della popolazione generale.

In tale ambito, le attività dell'Osservatorio sulla Medicina di Genere (<https://www.iss.it/osmg-l-osservatorio>), che ha la funzione di monitorare l'attuazione delle azioni di promozione, applicazione e sostegno alla Medicina di Genere, possono supportare l'attuazione dei principi di Tossicologia di Genere sul territorio nazionale, anche mediante diffusione di apposite Linee Guida, affinché il sesso/genere venga sempre considerato nella valutazione tossicologica delle sostanze chimiche.

Bibliografia

1. Tait S, Carli F, Busani L, Buzzigoli E, Della Latta V, Deodati A, Fabbrizi E, Gaggini M, Maranghi F, Tassinari R, Toffol G, Cianfarani S, Gastaldelli A, La Rocca C; LIFE PERSUADED Project Group. Biomonitoring of Bis (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in Italian children and adolescents: Data from LIFE PERSUADED project. *Environ Res.* 2020; 185:109428. doi: 10.1016/j.envres.2020.109428.
2. Tait S, Carli F, Busani L, Ciociaro D, Della Latta V, Deodati A, Fabbrizi E, Pala AP, Maranghi F, Tassinari R, Toffol G, Cianfarani S, Gastaldelli A, La Rocca C, Life Persuaded Project Group. Italian Children Exposure to Bisphenol A: Biomonitoring Data from the LIFE PERSUADED Project. *Int J Environ Res Public Health.* 2021;18(22):11846. doi: 10.3390/ijerph182211846.
3. Venerosi A, Tait S, Stecca L, Chiarotti F, De Felice A, Cometa MF, Volpe MT, Calamandrei G, Ricceri L. Effects of maternal chlorpyrifos diet on social investigation and brain neuroendocrine markers in the offspring - a mouse study. *Environ Health.* 2015; 14:32. doi: 10.1186/s12940-015-0019-6.
4. Lizé M, Monfort C, Rouget F, Limon G, Durand G, Tillaut H, Chevrier C. Prenatal exposure to organophosphate pesticides and autism spectrum disorders in 11-year-old children in the French PELAGIE cohort. *Environ Res.* 2022;212(Pt C):113348. doi: 10.1016/j.envres.2022.113348.
5. Tassinari R, Narciso L, Tait S, Busani L, Martinelli A, Di Virgilio A, Carli F, Deodati A, La Rocca C, Maranghi F; LIFE PERSUADED Project Group. Juvenile Toxicity Rodent Model to Study Toxicological Effects of Bisphenol A (BPA) at Dose Levels Derived From Italian Children Biomonitoring Study. *Toxicol Sci.* 2020;173(2):387-401. doi: 10.1093/toxsci/kfz226.
6. Tassinari R, Tait S, Busani L, Martinelli A, Narciso L, Valeri M, Gastaldelli A, Deodati A, La Rocca C, Maranghi F; LIFE PERSUADED Project Group. Metabolic, reproductive and thyroid effects of bis(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) orally administered to male and female juvenile rats at dose levels derived from children biomonitoring study. *Toxicology.* 2021;449: 152653. doi: 10.1016/j.tox.2020.152653.
7. Tassinari R, Tait S, Busani L, Martinelli A, Valeri M, Gastaldelli A, Deodati A, La Rocca C, Maranghi F, The Life Persuaded Project Group. Toxicological Assessment of Oral Co-Exposure to Bisphenol A (BPA) and Bis(2-ethylhexyl) Phthalate (DEHP) in Juvenile Rats at Environmentally Relevant Dose Levels: Evaluation of the Synergic, Additive or Antagonistic Effects. *Int J Environ Res Public Health.* 2021;18(9):4584. doi: 10.3390/ijerph18094584.
8. Deodati A, Bottaro G, Germani D, Carli F, Tait S, Busani L, Della Latta V, Pala AP, Maranghi F, Tas-

sinari R, Gastaldelli A, La Rocca C, Cianfarani S. Urinary Bisphenol-A (BPA) and Bis(2-ethylhex-yl)phthalate (DEHP) metabolite concentrations in children with obesity: A case-control study. *Hormone Res Pediatrics* [Under revision].

9. Tassinari R, Tammaro A, Lori G, Tait S, Martinelli A, Cancemi L, Frassanito P, Maranghi F. Risk Assessment of Transgender People: Development of Rodent Models Mimicking Gender-Affirming Hormone Therapies and Identification of Sex-Dimorphic Liver Genes as Novel Biomarkers of Sex Transition. *Cells*. 2023;12(3):474. doi: 10.3390/cells12030474.
10. Luconi M, Sogorb MA, Markert UR, Benfenati E, May T, Wolbank S, Roncaglioni A, Schmidt A, Straccia M, Tait S. Human-Based New Approach Methodologies in Developmental Toxicity Testing: A Step Ahead from the State of the Art with a Feto-Placental Organ-on-Chip Platform. *Int J Environ Res Public Health*. 2022;19(23):15828. doi: 10.3390/ijerph192315828.
11. Barker, D.J. The developmental origins of chronic disease. In *Families and Child Health*; Landale, N.S., McHale, S.M., Booth, A., Eds.; Springer: New York, NY, USA, 2013; pp. 3–11.
12. Mellon PL, Windle JJ, Goldsmith PC, Padula CA, Roberts JL, Weiner RI. Immortalization of hypothalamic GnRH neurons by genetically targeted tumorigenesis. *Neuron*. 1990;5(1):1–10.