



UNIVERSITÀ DI PARMA

Dipartimento di Scienze Medico-Veterinarie

Corso di Laurea Magistrale a ciclo unico in Medicina Veterinaria

GLI INTERFERENTI ENDOCRINI: UN RISCHIO PER LA SALUTE DEL CANE E DEL GATTO

THE ENDOCRINE DISTRUPTORS: A RISK FOR THE HEALTH OF PET DOGS AND CATS

Relatore:

Chiar.ma Prof.ssa *Giuseppina Basini*

Laureanda:

Flaminia Galimberti

ANNO ACCADEMICO 2020/2021

INDICE

ABSTRACT.....	4
RIASSUNTO.....	5
INTRODUZIONE	
CAPITOLO 1: Gli Interferenti Endocrini (IE)	
1.1: Definizione	6
1.2: Cenni storici e tappe salienti nello studio degli Interferenti Endocrini.....	7
1.3: Sostanze con proprietà di Interferenti Endocrini e vie di esposizione.....	9
1.4: Caratteristiche biochimiche e tossicodinamica.....	10
1.5: Meccanismo d'azione e effetti.....	12
1.6: Studio degli Interferenti Endocrini negli animali.....	15
CAPITOLO 2: I fitoestrogeni	
2.1: Struttura e meccanismo d'azione.....	16
2.2: Fonti di esposizione.....	18
2.3: Effetti.....	21
CAPITOLO 3: Lo zearalenone	
3.1: Struttura e meccanismo d'azione.....	25
3.2: Fonti di esposizione	27
3.3: Effetti	29
CAPITOLO 4: Il bisfenolo A (BPA)	
4.1: Struttura e meccanismo d'azione	32

4.2: Fonti di esposizione.....	33
4.3: Effetti.....	36
4.4: Gli analoghi del bisfenolo A.....	40
CAPITOLO 5: Gli ftalati	
5.1: Struttura e meccanismo d'azione.....	42
5.2: Fonti di esposizione.....	44
5.3: Effetti.....	46
CAPITOLO 6: I policlorobifenili (PCB) e i polibromodifenileteri (PBDE)	
6.1: Struttura e meccanismo d'azione.....	49
6.2: Fonti di esposizione.....	52
6.3: Effetti.....	56
CAPITOLO 7: I pesticidi	
7.1: Struttura e meccanismo d'azione.....	58
7.2: Fonti di esposizione.....	61
7.3: Effetti.....	63
CONCLUSIONI.....	67
BIBLIOGRAFIA.....	70
SITOGRAFIA.....	86

ABSTRACT

The aim of this dissertation is to show the effects of the main Endocrine Disruptors, with particular reference to pet dogs and cats. The Endocrine Disruptors are molecules able to interfere with the activity of the endocrine system in exposed organisms, and they are mainly found in the environment, where these molecules have a tendency to accumulate, and in foods, through which they switch from one individual to another.

Their action of interference with the endocrine system takes place by the binding to the receptors for the endogenous hormones, on which they can act as agonists or antagonists, by the modification of the number of the receptors, or they can act directly on the synthesis or metabolism of the endogenous hormones.

In the 40s of the last century these substances and their effects have widely been examined in wildlife and human, but pets have become subject of interest only in the last years. In this paper a review of the latest studies will be reported, aimed to the analysis of the effects of the Endocrine Disruptors on pet dogs and cats. Phytoestrogens, zearalenone, bisphenol A, phthalates, polychlorinated biphenyls (PCBs), polybrominated diphenyl ethers (PBDEs), and pesticides will be dealt specifically, and the sources of exposure, the effects on male and female reproductive system, on the thyroid and on the central nervous system of the examined species will be described.

RIASSUNTO

L'obiettivo di questa tesi è illustrare gli effetti dei principali Interferenti Endocrini con particolare riferimento agli animali domestici cane e gatto.

Gli Interferenti Endocrini sono molecole in grado di interferire con l'attività del sistema endocrino negli organismi esposti, e sono per lo più presenti nell'ambiente, dove le molecole tendono ad accumularsi, e negli alimenti, attraverso i quali queste sostanze passano da un individuo all'altro. La loro azione di interferenza con il sistema endocrino avviene mediante il legame con i recettori per gli ormoni endogeni, sui quali possono esercitare un'azione di agonisti o di antagonisti, mediante la modificazione del numero dei recettori per l'ormone, oppure possono agire direttamente sulla sintesi o sul metabolismo degli ormoni endogeni.

Se già dagli anni '40 del secolo scorso queste sostanze e i loro effetti sono stati ampiamente studiati nella fauna selvatica e nell'uomo, gli animali domestici sono diventati oggetto di interesse solo negli ultimi anni. In questo elaborato sarà riportata una review dei più recenti studi rivolti all'analisi degli effetti degli Interferenti Endocrini sul cane e sul gatto. Nello specifico saranno trattati i fitoestrogeni, lo zearalenone, il bisfenolo A, gli ftalati, i policlorobifenili (PCB), i polibromodifenileteri (PBDE) e i pesticidi, e di questi verranno descritti le fonti di esposizione e gli effetti sull'apparato riproduttivo maschile e femminile, sulla tiroide e sul sistema nervoso delle specie in esame.

INTRODUZIONE

CAPITOLO 1: Gli Interferenti Endocrini (IE)

1.1: Definizione

Secondo la definizione proposta dall'Unione Europea, "Un Interferente Endocrino 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 Disruptors on Human Health and Wildlife, Weybridge, 1996). Una più recente definizione, fornita dalla Endocrine Society nel 2012, stabilisce che "Un Interferente Endocrino è una sostanza esogena, o una miscela, che interferisce con ogni aspetto dell'azione ormonale". Secondo quest'ultima definizione, l'espressione "funzionalità del sistema endocrino" è stata sostituita da "azione ormonale", intesa come attivazione dei recettori ormonali e conseguente risposta biologica; inoltre questa definizione non comprende più il termine "effetti avversi" perché, secondo la Endocrine Society, non ha un significato sufficientemente definito (Zoeller, et al., 2014).

La valutazione degli Interferenti Endocrini è in continua evoluzione e vede sviluppi sempre nuovi; a livello europeo l'EFSA e l'ECHA sono i due enti deputati a fornire pareri scientifici relativamente alle sostanze, dopodiché le successive decisioni vengono prese dai gestori dell'analisi del rischio presso la Commissione europea, dal Parlamento europeo e dai singoli stati membri dell'UE. In ogni caso, affinché una sostanza possa essere considerata un IE o sospettata come tale, deve rispondere a tre criteri:

- 1) La presenza di un effetto avverso
- 2) La presenza di attività endocrina
- 3) Il rapporto causale tra i due (www.efsa.europa.eu)

1.2: Cenni storici e tappe salienti nello studio degli Interferenti Endocrini

Già alla fine degli anni '40, negli Stati Uniti, alcuni ornitologi avevano osservato una riduzione numerica della popolazione di aquile (*Aquila chrysaetos*), imputabile a cambiamenti comportamentali soprattutto delle madri nei confronti della prole; la causa scatenante di tali cambiamenti, però, non era stata spiegata. Studi effettuati negli anni successivi su alcune specie acquatiche avevano dimostrato una correlazione tra problemi riproduttivi o di sviluppo e contaminazione ambientale, in particolare dei corsi d'acqua, derivante dall'agricoltura e dalle industrie (Tarin, 1972). Tra gli anni '60 e '80 è aumentato notevolmente l'interesse a questo fenomeno e sono stati condotti numerosi studi, che hanno iniziato a consentire l'identificazione di alcune di queste sostanze. Le prime ad essere state individuate sono state i policlorobifenili (PCB), la diossina, e il diclorodifeniltricloroetano (DDT), tutti implicati in problematiche di tipo riproduttivo o nella genesi di malformazioni a carico della fauna selvatica (Markey, et al., 2003). Nel 1962 è stato pubblicato il libro "Silent Spring" (Carson, 1962) in cui sono state illustrate le principali evidenze scientifiche sulle problematiche relative a queste sostanze sospette, in particolare il DDT e altri pesticidi, e per la prima volta si è pensato che potessero esserci effetti analoghi anche a carico della salute umana (Mnif, et al., 2011). Successivamente a queste evidenze, nel 1973 e 1977 è stato bandito l'uso in agricoltura rispettivamente del DDT e dei PCB negli USA, ma nonostante ciò negli anni successivi si è assistito ad un incremento di problematiche nella fauna selvatica, sia dovuto ad altre sostanze chimiche, sia alla persistenza dei DDT e PCB impiegati fino a quel momento (Markey, et al., 2003).

La prima tappa decisiva (Figura 1) nello studio degli Interferenti Endocrini è avvenuta nel 1991 con la Conferenza di Wingspread tenuta dal Dott. Theo Colborn. Per la prima volta è stato introdotto il termine "Interferente Endocrino" ed è stato dato un documento di consenso relativamente agli effetti di queste sostanze sulla salute umana e sull'ambiente (Colborn e Clement, 1992). Successivamente, alla conferenza di Weybridge del 1996, è stata coniata la definizione di "Interferenti Endocrini" attualmente in uso nella Comunità Europea (European Workshop on the Impact of Endocrine Disruptors on Human Health and Wildlife, Weybridge, 1996) e da quel momento alcune di queste sostanze hanno iniziato ad essere regolamentate, ad esempio gli inquinanti ambientali persistenti, il cui utilizzo è stato normato nella Convenzione di Stoccolma del 2001 (Yilmaz, et al., 2020).

Durante la riunione tenutasi a Berlino nell'Aprile 2016 organizzata dall' Istituto Federale per la valutazione del rischio tedesca (BfR), a cui hanno preso parte ventitré scienziati, quattro osservatori della Commissione Europea, l'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA) e l'Agenzia Europea delle Sostanze Chimiche (ECHA), è stato raggiunto un accordo sull'individuazione degli Interferenti Endocrini. Il consenso, basato su criteri scientifici, è stato fornito alla Commissione Europea come guida per l'individuazione e regolamentazione degli IE (Solecki, et al., 2017; BfR Consensus statement, 2016). Un'altra tappa importante è rappresentata dallo Chapel Hill Consensus Statement del 2007: è stato il primo accordo a livello globale sulla tossicità del bisfenolo A come interferente endocrino. Va ricordato poi il contributo della Endocrine Society, che si pone per la prima volta nell'ambito degli IE nel 2009, e nel 2012 propone la propria definizione di Interferente Endocrino (Soto, et al., 2021).

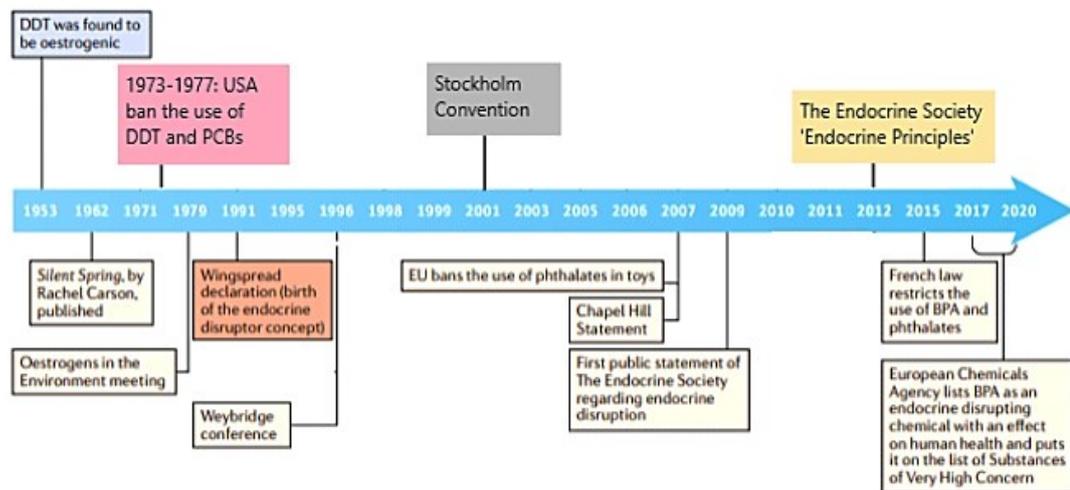


Figura 1. Date salienti nello studio degli Interferenti Endocrini, a partire dalle prime evidenze di effetti avversi del DDT (modificato da: Soto, et al., 2021)

1.3: Sostanze con proprietà di Interferenti Endocrini e vie di esposizione

Sono state individuate finora circa 800 sostanze (Gazzetta ufficiale dell'Unione Europea, 2021), ma l'elenco, reperibile sul sito dedicato (www.edlists.org), è in continuo aggiornamento. Le sostanze vengono suddivise in tre liste:

Lista I: sostanze identificate come Interferenti Endocrini a livello EU, per le quali è prevista una regolamentazione secondo il regolamento REACH.

Lista II: sostanze che sono in fase di valutazione a livello di legislazione EU in quanto probabili Interferenti Endocrini.

Lista III: sostanze che sono considerate Interferenti Endocrini da parte di uno degli stati membri, in seguito ad analogie riscontrate con IE già noti.

In base alle loro caratteristiche, l'ISS (www.issalute.it) suddivide gli Interferenti Endocrini in:

-sostanze chimiche naturali: incluse tossine prodotte da piante (fitoestrogeni) e alcuni tipi di funghi

-sostanze chimiche di sintesi quali:

1) pesticidi (insetticidi, fungicidi, erbicidi, anticrittogamici, nematocidi, acaricidi e fitoregolatori)

2) prodotti medicali e di consumo (per esempio ftalati e bisfenolo A)

3) prodotti industriali (per esempio policlorobifenili, perfluorati, polibromodifenileteri)

4) prodotti di combustione (per esempio diossine)

5) elementi in traccia (mercurio, arsenico)

6) prodotti farmaceutici (per esempio anticoncezionali e cure per i tumori che rispondono alle terapie ormonali)

Queste sostanze sono quindi presenti in gran parte dei prodotti di uso quotidiano come bottiglie di plastica, lattine metalliche, detersivi, ritardanti di fiamma, alimenti,

giocattoli, cosmetici e pesticidi (Yilmaz, et al., 2020). Fatta eccezione per alcuni casi (soprattutto per i pesticidi), l'immissione nell'ambiente di IE di sintesi da parte dell'uomo è quasi sempre involontaria. La via di esposizione più rilevante, sia per l'uomo sia per la maggior parte degli organismi, è l'ingresso dell'IE tramite ingestione di alimenti contaminati (Marozzi e Condoleo, 2010). Altre vie di esposizione sono: cutanea, molto importante soprattutto per i composti lipofili, inalatoria nel caso di esposizione a composti volatili e semi-volatili o alla polvere ambientale (Yilmaz, et al., 2020) e infine il passaggio attraverso la placenta (Retana-Márquez, et al., 2012; Cimmino, et al., 2020).

1.4: Caratteristiche e tossicodinamica

Nonostante l'eterogeneità delle sostanze classificate come Interferenti Endocrini, è stato osservato che molte di queste hanno caratteristiche e meccanismi d'azione comuni.

La lipofilità della maggior parte degli IE è un aspetto molto importante da considerare. In particolare gli inquinanti organici persistenti (POP, dall'inglese Persistent Organic Pollutants) sono un gruppo di sostanze di cui fanno parte molti IE di sintesi tra cui i policlorobifenili (PCB), i polibromodifenileteri (PBDE) e la maggior parte dei pesticidi. A causa della loro liposolubilità, oltre a possedere proprietà tossiche sono soggetti a fenomeni di bioaccumulo, biomagnificazione e persistenza nell'ambiente. Il bioaccumulo è la capacità di accumularsi nei tessuti adiposi e resistere alla degradazione chimica e biologica. In questo modo i POP possono passare da un organismo all'altro attraverso la catena alimentare con il fenomeno che è definito come biomagnificazione e raggiungere concentrazioni elevate, persistendo in questo modo per molto tempo all'interno di un sistema e causando danni all'uomo, ad altre specie e all'ambiente. Di solito gli animali che sono a livelli più alti della catena alimentare assumono una quantità maggiore di interferenti endocrini e gli alimenti maggiormente interessati da questo fenomeno sono pesce, carni e prodotti caseari. (Marozzi e Condoleo, 2010).

Alcuni IE che si trovano nelle plastiche, il più importante dei quali è il bisfenolo A, non si mantengono nel tessuto adiposo ma sono escreti con le urine, e nell'uomo è stata provata un'emivita di 6h per questa sostanza; tuttavia si è visto che è costantemente

presente nell'organismo degli individui esposti perché la sua concentrazione a livello ambientale supera la capacità di eliminazione da parte del metabolismo (Yilmaz, et al., 2020).

Infine queste sostanze sono in grado di contaminare aree anche molto lontane, poiché possono essere trasportate dalle correnti aeree, acqua e terreno (Figura 2) (Pironti, et al., 2021).

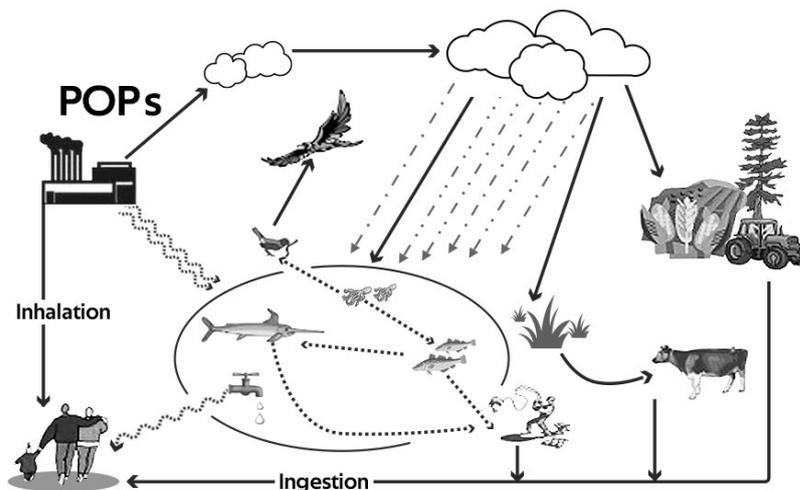


Figura 2. Rappresentazione del ciclo ambientale dei POP (www.lidsen.com)

Il fattore tempo è importante nel determinare gli effetti degli IE. Durante lunghi periodi di esposizione ad una sostanza, si instaurano dei meccanismi adattativi nell'organismo, che favoriscono l'eliminazione del tossico; a breve termine l'effetto è protettivo, ma diventa dannoso a lungo termine perché si formano dei metaboliti intermedi tossici. In più, il tempo è determinante nel meccanismo d'azione dei POP, che si accumulano nel tessuto adiposo in caso di esposizione prolungata nel tempo e vengono rilasciati da quest'ultimo, che diventa una fonte persistente di esposizione; tuttavia il tessuto adiposo ha un ruolo protettivo nei confronti di esposizioni a breve termine ai POP poiché li immagazzina preservando così sistema nervoso, gonadi e altri organi (La Merrill, et al., 2013).

Alcuni IE hanno effetti maggiori a basse dosi anziché a dosi elevate, infatti danno curve dose-risposta non monotoniche. Questo fenomeno è dovuto ai diversi meccanismi con i

quali agisce il sistema endocrino (Barouki, 2017) per esempio la down-regulation dei recettori, che avviene tanto più vi è presenza di ligandi (Markey, et al., 2003).

Se un soggetto è esposto a più interferenti endocrini che possiedono un meccanismo d'azione analogo, si verifica il cosiddetto "effetto miscela", che consiste in una stimolazione del medesimo recettore con effetto additivo (Kortenkamp, 2014).

Un'altra caratteristica di queste sostanze è che l'effetto varia in base all'età del soggetto esposto. Si parla di "critical window" intendendo il periodo di massima suscettibilità di un individuo, e questo varia in base all'età in cui si verifica lo sviluppo dell'apparato colpito; con riferimento, per esempio, all'apparato riproduttivo, il periodo in cui un IE avrà maggiori conseguenze sarà l'età prepubere. Il feto e i soggetti in accrescimento sono i più suscettibili agli effetti dannosi degli IE in generale (Markey, et al., 2003), sia per il rimodellamento a cui sono soggetti gli organi, sia perché in questi individui i meccanismi di difesa e di eliminazione sono immaturi (Barouki, 2017).

In più, per stabilire gli effetti degli IE, è opportuno valutare lo stato del soggetto target. Ad esempio va presa in considerazione la genetica, lo stato di salute generale e l'influenza di stressors ambientali, alcuni dei quali si è visto essere positivamente correlati con un aumento della sensibilità agli effetti degli IE (Grandjean, et al., 2015).

1.5: Meccanismo d'azione e effetti

Gli IE possono agire (Figura 3) mimando i normali ormoni endogeni con azione di agonismo o di antagonismo, alterando la sintesi e il metabolismo degli ormoni endogeni o modificando le proteine che legano l'ormone (Combarous, 2017). Inoltre possono agire sui recettori per l'ormone a livello di sistema endocrino (Markey, et al., 2003). Nel primo caso la molecola si lega al recettore come la sostanza endogena e ne mima l'effetto (nel caso di azione agonista), oppure blocca o diminuisce la risposta (antagonismo) mediante un legame di tipo competitivo o non competitivo. Nel caso in cui l'interferente endocrino abbia effetti sulla sintesi o sul metabolismo dell'ormone endogeno, questo può avvenire in diverse fasi e mediante l'inibizione di uno o più enzimi coinvolti nel processo, oppure

per azione sulle proteine di trasporto con una conseguente modificazione delle concentrazioni dell'ormone endogeno circolante (Lintelmann, et al., 2003).

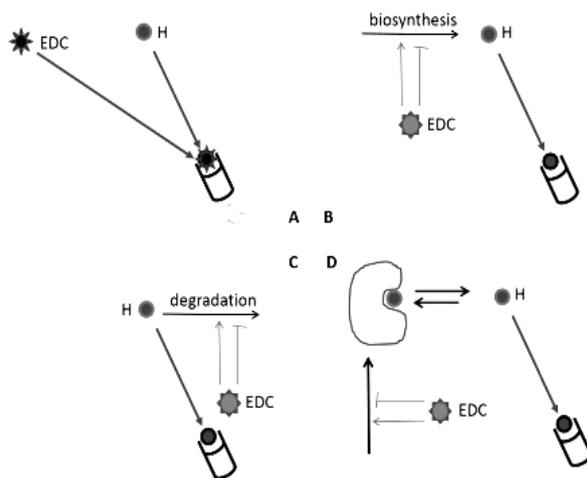


Figura 3. Meccanismo d'azione degli IE. Queste molecole possono avere interazione diretta con il recettore dell'ormone nel nucleo, con azione di agonismo o antagonismo (A), stimolare o inibire la biosintesi dell'ormone (B), stimolare o inibire la degradazione dell'ormone endogeno (C), oppure agire sulle proteine di trasporto modificando la concentrazione di ormone in circolo (D) (Combarrous, 2017)

Per quanto riguarda gli organi bersaglio (Figura 4) e gli effetti sull'uomo e sugli animali, i primi studi a partire dall'individuazione e definizione degli IE sono stati rivolti agli effetti estrogenici sugli individui di sesso femminile, e androgenici sugli individui di sesso maschile. Gli IE agiscono spesso legandosi ai recettori per gli estrogeni ER α e/o β in base alla sostanza in questione, con un effetto di agonista o di antagonista. Le conseguenze sull'apparato riproduttore femminile sono: infertilità, sindrome dell'ovaio policistico, endometriosi, cicli irregolari, pubertà anticipata o ritardata, tumori all'utero, all'ovaio e al seno (Yilmaz, et al., 2020). A livello di apparato riproduttivo maschile, gli IE agiscono di frequente legandosi ai recettori degli androgeni AR con effetto di agonismo o di antagonismo. Inoltre alcune sostanze possono agire sugli enzimi deputati alla sintesi e al metabolismo degli ormoni steroidei interferendo con la loro sintesi nelle gonadi, oppure come accade con gli ftalati, ci sono IE che si legano all'enzima 5- α -reduttasi che converte il testosterone nel più potente ormone diidrotestosterone; infine possono interferire con il funzionamento dell'asse ipotalamo-ipofisi-testicolo. Gli effetti osservati sono: difetti

nella composizione dello sperma e motilità degli spermatozoi, difetti alla nascita come criptorchidismo o ipospadia, tumori al testicolo e alla prostata, modificazione del rapporto X/Y alla nascita a favore di X (Yilmaz, et al., 2020).

Un altro bersaglio è rappresentato dalla tiroide. Gli IE possono agire a livello centrale sull'ipotalamo alterando così la sintesi, la biodisponibilità o il trasporto degli ormoni tiroxina (T_4) e triiodotironina (T_3). Alcuni IE inibiscono l'attività dell'enzima tiroxina-5-deiodinasi responsabile della conversione di T_4 in T_3 , altri si legano ai recettori degli ormoni tiroidei oppure causano l'inibizione dei canali del simporto per lo iodio con conseguente alterazione dell'assorbimento della molecola. Gli effetti ultimi di questi meccanismi sono l'ipotiroidismo con problemi metabolici di vario tipo o l'ipertiroidismo. La fascia di età più critica è quella prenatale e dello sviluppo, perché tra le altre funzioni la tiroide regola lo sviluppo del sistema nervoso, quindi nei soggetti esposti sono stati visti deficit cognitivi e comportamentali. Inoltre alcuni IE sono stati associati all'aumento dell'incidenza di tumori alla tiroide (Yilmaz, et al., 2020).

Alcune di queste molecole sono in grado di legarsi ai recettori X del pregnano (PXR) e ai recettori degli idrocarburi arilici (AHR). I recettori PXR fanno parte della sottofamiglia dei recettori detti "orfani" e regolano la trascrizione di alcune famiglie di citocromi ed enzimi tra cui l'UDP-glucuronosiltransferasi (UDPGT) coinvolti nella detossificazione ed eliminazione degli acidi biliari, degli steroidi e della maggior parte degli xenobiotici; i recettori AHR sono dei fattori di trascrizione la cui attivazione regola la trascrizione di diversi geni tra cui quelli che codificano per gli enzimi del citocromo P450 (CYP450) (Luthe, et al., 2008). Dal legame a questi recettori si possono avere come effetti un'azione obesogena e conseguente correlazione con il diabete mellito e patologie cardiovascolari, alterazioni a carico del tessuto osseo, alterazioni a livello della ghiandola surrenale nel metabolismo di cortisolo, aldosterone e androgeni (Yilmaz, et al., 2020). In più, è stato osservato che alcuni IE agiscono sul sistema immunitario con iper o ipo stimolazione, e ciò predispone gli individui colpiti a sviluppare alcuni tipi di tumore, oltre alle conseguenze primarie sul sistema immunitario: pur non essendo quest'ultimo un effetto propriamente endocrino, è comunque un rischio molto grave per la salute (Yilmaz, et al., 2020). Allo stesso modo, è stata dimostrata la capacità di alcune sostanze di danneggiare il sistema nervoso e la trascrizione genica (Cimmino, et al., 2020) e sebbene la definizione non sia

propriamente corretta, tali sostanze vengono comunque classificate come Interferenti Endocrini (Barouki, 2017).

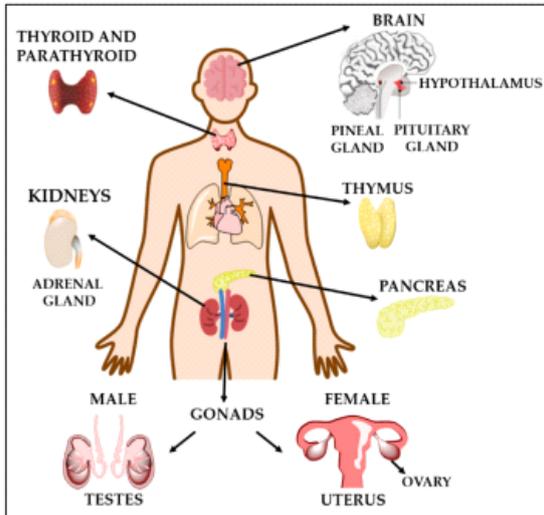


Figura 4. Principali organi bersaglio degli Interferenti Endocrini (Pironti, et al., 2021)

1.6: Studio degli Interferenti Endocrini negli animali da compagnia

Varie specie animali sono state prese in esame fin dai primi anni in cui è sorto l'interesse relativamente alla problematica degli Interferenti Endocrini.

Gli animali da compagnia sono diventati, invece, oggetto di attenzione nell'ambito degli IE solo in tempi relativamente recenti, e per questo motivo le ricerche svolte su questa categoria, con particolare riferimento al cane (*Canis lupus familiaris*) e al gatto (*Felis catus*), sono ancora numericamente scarse se rapportate agli studi pubblicati sull'uomo e sulla fauna selvatica (Magnusson e Persson, 2015). I motivi di questo recente interesse sono principalmente due.

Il primo, di ordine più pratico, individua queste specie come sentinelle per l'esposizione a determinate sostanze dell'uomo, con il quale condividono l'ambiente domestico (Dye, et al., 2007; Dirtu, et al., 2013; Sumner, et al., 2019). Vi è quindi un buon numero di ricerche atte a dimostrare e quantificare il rischio di esposizione per l'uomo attraverso l'individuazione della sostanza in questione nel cane o nel gatto, definiti appunto come

specie sentinella. Inoltre, poiché entrambi condividono alcune abitudini come la tendenza al leccamento di superfici e oggetti e la propensione al contatto con il suolo o il pavimento, gli animali domestici vengono spesso individuati come sentinelle ottimali per studiare l'esposizione agli IE nei bambini (Backer, et al., 2001). Questo approccio è utile anche in ambito veterinario, perché permette di individuare le fonti di esposizione negli animali domestici, che sono per lo più le medesime dell'uomo e sono rappresentate principalmente dagli alimenti, dalla polvere ambientale e dal rilascio di sostanze nocive da parte di materiali di vario genere.

L'altro motivo di tale interesse riguarda l'attenzione sempre più crescente verso la salute degli animali domestici e la consapevolezza che, condividendo l'ambiente con l'uomo, possono essere esposti ai medesimi rischi (Magnusson e Persson, 2015). Perciò, negli ultimi anni, vista la sempre maggiore tendenza a possedere un animale domestico e dato il crescente interesse verso la loro salute (Gazzotti, et al., 2015), dovuto in parte alla maggior sensibilità dei proprietari e in parte alla tendenza all'antropomorfizzazione (Arahor, et al., 2017), studi analoghi a quelli condotti sulla fauna selvatica e sull'uomo hanno così iniziato ad essere eseguiti anche sul cane e sul gatto, e stanno permettendo di individuare i rischi legati all'esposizione agli Interferenti Endocrini in ambito veterinario.

CAPITOLO 2: I fitoestrogeni

2.1: Struttura e meccanismo d'azione

I fitoestrogeni sono molecole non steroidee prodotte in natura da alcuni vegetali, importanti nella difesa e nello sviluppo del vegetale stesso (Peterson and Dwyer, 1998). Sono polifenoli a basso peso molecolare (Scalbert e Williamson, 2000) e in base alla loro struttura chimica possono essere divisi nelle seguenti classi: calconi, flavonoidi (che comprendono i sottogruppi isoflavonoidi, flavoni, flavonoli e flavononi), lignani, stilbenoidi, e altri (Sirotkin e Harrath, 2014).

I fitoestrogeni più studiati sono genisteina e daidzeina (Figura 5), appartenenti al sottogruppo degli isoflavoni (Court e Freeman, 2002). Entrambe sono presenti nella forma glicosidica genistina e daidzina, biologicamente inattive; nell'intestino vengono

convertite dai batteri nella forma attiva (Brown e Setchell, 2001). Inoltre la daidzeina può originare un metabolita maggiormente attivo, l'equolo, che può raggiungere concentrazioni elevate nel topo (*Mus musculus*) ma è meno presente nell'uomo (Setchell, et al., 2002).

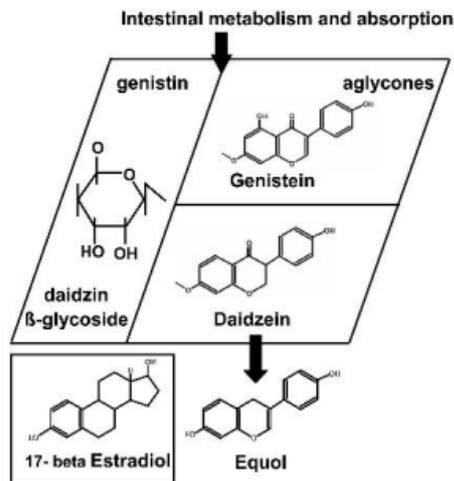


Figura 5. Struttura delle forme inattive genistina e daidzina, conversione nelle forme attive genisteina e daidzeina dopo assorbimento intestinale ed eventuale conversione della daidzeina in equolo. Si noti l'analogia strutturale con il 17-β estradiolo (Lephart, et al., 2004)

La glucuronazione è la principale reazione di fase II con cui vengono eliminati i fitoestrogeni ed è mediata dall'enzima UDPGT (Yasuda, et al., 1996; Court e Greenblatt, 2000). Questa via metabolica è poco funzionante nei gatti, per carenza di enzima UDPGT tipica della specie, e questo è stato ben dimostrato da uno studio eseguito su campioni di urine di un gruppo di cani e uno di gatti, entrambi alimentati con cibi contenenti soia. Dopo 3 mesi dall'inizio della dieta, i valori di genisteina e daidzeina rilevati nelle urine dei gatti erano più alti rispetto a quelli misurati nei cani, proprio a causa della glucuronazione deficitaria nel fegato dei gatti. Questo spiega probabilmente il perché, nonostante siano presenti fitoestrogeni sia nelle diete per cani sia in quelle per gatti, si abbiano degli effetti più evidenti in quest'ultima specie (Redmon, et al., 2016).

Per alcuni di questi composti è stata identificata un'azione combinata con altri Interferenti Endocrini, con effetto sinergico o di antagonismo in base alle caratteristiche delle sostanze che vengono associate tra loro (Latini, et al., 2010).

La loro struttura chimica è simile a quella degli estrogeni endogeni, il più rappresentativo dei quali è il 17 β -estradiolo, per la presenza di un anello fenolico e la distanza tra i due gruppi idrossilici (Retana-Márquez, et al., 2012).

Questo rende possibile il legame dei fitoestrogeni ai recettori degli estrogeni (ER), con una maggior selettività per i recettori ER β rispetto agli ER α (Paterni, et al., 2014). Il legame, di tipo competitivo, può esitare in un effetto di agonismo o antagonismo in base alle concentrazioni rispettive di estrogeni endogeni e fitoestrogeni introdotti, dal momento che l'estradiolo (E₂) ha una minor affinità ma evoca una risposta recettoriale maggiore (Retana-Márquez, et al., 2012). I recettori degli estrogeni sono presenti in vari organi e apparati: nel sistema nervoso centrale (tra cui asse ipotalamo-ipofisario), gonadi, apparato riproduttivo, ghiandola mammaria, placenta, osso, apparato gastroenterico, polmone (Sirotkin e Harrath, 2014).

Oltre agli effetti dipendenti dal legame a ER, alcuni fitoestrogeni agiscono anche con meccanismi indipendenti tra cui il legame dei radicali liberi, l'induzione della metilazione del DNA, la stimolazione dei recettori serotoninergici e dei recettori di IGF-1, l'inibizione di alcuni enzimi, e altri; questi meccanismi sono alla base del ruolo protettivo e antiossidante di alcuni fitoestrogeni (Sirotkin e Harrath, 2014). Possono accumularsi in tessuti come fegato e ghiandole surrenali ed inibire l'enzima 17 β -idrossisteroide deidrogenasi (HSD) e 3 β -HSD responsabili della steroidogenesi (Court e Freeman, 2002; Cerundolo, et al., 2009). Inoltre genisteina e daidzeina sono in grado di inibire l'attività dell'enzima 5'-deiodinasi responsabile della conversione del T₄ nella forma biologicamente attiva T₃, e dell'enzima tireoperossidasi (TPO) che catalizza l'ossidazione ed incorporazione dello iodio nei residui di tirosina della molecola tireoglobulina (De Souza Dos Santos, et al., 2011).

2.2: Fonti di esposizione

La via principale attraverso cui l'organismo assume fitoestrogeni, è l'alimentazione. I vegetali che ne contengono di più sono le leguminose, il trifoglio rosso (*Trifolium pratense*), il rabarbaro (*Rheum spp*), la liquirizia (*Glycyrrhiza glabra*) e altre

(Hajirahimkhan, et al., 2013). Nella soia (*Glycine max*), che è tra i vegetali con più alto contenuto di fitoestrogeni, è stata stimata una concentrazione media di 1.036 µg/g di isoflavoni, in particolare genisteina e daidzeina, che sono la categoria più rappresentativa dei fitoestrogeni introdotti dall'uomo e dagli animali attraverso gli alimenti (Kallela, et al., 1984). Il contenuto di fitoestrogeni dipende dall'età del vegetale, dalla luce, dalle condizioni di temperatura e umidità, quantità di fertilizzanti impiegati, patogeni eventualmente presenti (Adams, 1995).

Per quanto riguarda gli animali domestici, analogamente a quanto avviene nell'uomo la maggior fonte di fitoestrogeni è la soia, utilizzata come ingrediente proteico vegetale nel pet food. In uno studio eseguito in Giappone si è voluta dimostrare e misurare la presenza di fitoestrogeni nel pet food confrontando 15 diete diverse, che comprendevano diete per cani, gatti e in più una dieta per criceti (*Cricetus cricetus*) e una per pesci rossi (*Carassius auratus*). Sono stati trovati in tutto dodici diversi tipi di fitoestrogeni e i più rappresentativi sono stati genisteina e daidzeina. La loro presenza è stata dimostrata in 13 campioni sui 15 totali, senza differenze relative alla specie di destinazione (Nakashima, et al., 2013).

Nel 2002 è stato fatto uno studio sul cibo per gatti negli USA, con l'obiettivo di individuare la presenza di isoflavonoidi, ritenuti tra le potenziali sostanze coinvolte nella genesi dell'ipertiroidismo felino, e di stabilirne la correlazione con formulazione e ingredienti dell'alimento. Sono stati presi in esame 42 campioni di diverse marche e composizioni, e si è accertata in ognuno la presenza di soia indicata in etichetta sotto diverse forme come farina o olio di soia. Dopodiché, con la tecnica della cromatografia liquida ad alta prestazione, è stato misurato il contenuto degli isoflavonoidi genisteina e daidzeina in ciascun campione (Tabella 1). I due fitoestrogeni sono stati trovati in 24 campioni, con un valore massimo di 163 µg/g per la genisteina e 147 µg/g per la daidzeina; nei cibi contenenti fitoestrogeni la genisteina era sempre presente in maggiori quantità rispetto alla daidzeina e la prevalenza di fitoestrogeni era maggiore nelle formulazioni secche e semi-umide rispetto a quelle umide. Inoltre è stata dimostrato che gli alimenti a maggior contenuto di fitoestrogeni e con minor tasso di umidità avevano nella maggior parte dei casi un costo inferiore rispetto a quelli umidi, perché le proteine vegetali, in questo caso

derivate dalla soia, hanno un costo inferiore rispetto alle proteine di origine animale che invece sono più presenti negli alimenti umidi (Court e Freeman, 2002).

Tabella 1. Per ciascuno dei campioni riportati nella tabella, suddivisi in alimenti secchi (S), semi-umidi (Su) e umidi (U), è riportata la percentuale (%) di sostanza secca, le concentrazioni ($\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{sostanza secca}$) di genisteina (G) e daidzeina (D) e il costo ($\$/\text{Kg}$). Negli alimenti contenenti la soia come fonte proteica (indicati con *) i prezzi sono inferiori nella maggior parte dei casi.

	Sostanza secca(%)	Costo ($\$/\text{Kg}$)	G ($\mu\text{g}/\text{g}$)	D ($\mu\text{g}/\text{g}$)		Sostanza secca(%)	Costo ($\$/\text{Kg}$)	G ($\mu\text{g}/\text{g}$)	D ($\mu\text{g}/\text{g}$)
S1*	96.0	1.30	154	147	U1*	24.9	5.73	163	104
S2*	94.4	2.59	94	90	U2*	28.0	18.71	111	86
S3*	95.7	3.13	84	72	U3*	23.8	6.74	109	78
S4*	93.6	2.70	73	73	U4*	26.2	5.44	102	135
S5*	96.3	3.14	36	28	U5	25.1	18.04	12	11
S6*	96.3	3.14	32	27	U6	24.3	8.71	0	0
S7*	96.0	3.15	21	18	U7	32.8	4.88	0	0
S8	92.4	4.11	5	3	U8	29.2	7.63	0	0
S9	95.9	4.43	5	4	U9	27.5	7.53	0	0
S10	93.8	3.32	4	5	U10	28.1	18.18	0	0
S11	95.6	4.94	3	2	U11	24.6	19.52	0	0
S12	96.9	3.13	3	3	U12	28.2	5.05	0	0
S13	94.1	3.31	1	3	U13	27.2	7.60	0	0
S14	94.9	4.92	0	0	U14	25.7	22.40	0	0
Su1*	64.6	6.63	147	140	U15	26.3	8.02	0	0
Su2*	85.9	3.39	126	123	U16	28.5	5.05	0	0
Su3*	63.8	6.41	125	121	U17	23.3	26.96	0	0
Su4*	70.9	21.41	53	39	U18	27.5	24.91	0	0
Su5*	70.8	21.43	14	8	U19	22.6	23.22	0	0
Su6*	72.6	20.90	13	9	U20	25.1	20.86	0	0
					U21	21.5	20.68	0	0
					U22	22.3	19.98	0	0

Un'altra analisi condotta sul cibo per gatti in Nuova Zelanda ha confermato la presenza degli isoflavonoidi genisteina e daidzeina nei campioni contenenti soia, e la correlazione negativa tra contenuto di soia e prezzo (Bell, et al., 2006).

Relativamente alla specie canina, è stata fatta un'analisi su campioni di cibo commerciale per cani negli USA e anche in quel caso i risultati hanno dimostrato che i fitoestrogeni erano presenti in concentrazioni significative solo negli alimenti contenenti la soia, e tra

questi solo nel campione che conteneva la soia sotto forma di fibra non sono state rilevate. Le molecole riscontrate in maggior quantità sono state genisteina e daidzeina, in concentrazioni massime di 559 e 615 µg/Kg di sostanza secca. Era inoltre presente un altro fitoestrogeno, la gliciteina, seppur ad una concentrazione nettamente inferiore (Cerundolo, et al., 2004).

Si può quindi concludere che i cani e i gatti alimentati con cibo commerciale contenente proteine derivate dalla soia (ad eccezione della fibra di soia) sono esposti a dosi significative di fitoestrogeni, e che in entrambe le specie di destinazione prevalgono gli isoflavonoidi genisteina e daidzeina.

2.3: Effetti

I fitoestrogeni assunti con la dieta possono avere effetti benefici per l'organismo, ma anche agire come interferenti endocrini in alcuni casi.

Nell'uomo i fitoestrogeni sono responsabili di effetti benefici a carico di diversi apparati. Esercitano un'azione preventiva nell'invecchiamento della pelle, protezione dallo sviluppo di osteoporosi, effetto protettivo sul sistema cardiovascolare, prevenzione dell'obesità e del diabete di tipo 2, prevenzione di alcuni disordini del sistema immunitario e ostacolo allo sviluppo di tumori (Sirotkin, e Harrath, 2014). Alcuni fitoestrogeni come l'equolo (metabolita della daidzeina), la quercetina, la biocianina A e altri hanno una funzione antiossidante e neuroprotettiva, perciò esercitano un'azione di rallentamento nella progressione della malattia di Alzheimer nell'uomo o nelle malattie neurodegenerative Alzheimer-simili negli animali domestici (Domańska, et al., 2021). Questi effetti benefici derivano in parte dal legame delle molecole ai recettori ER, in parte a meccanismi indipendenti da ER come l'inibizione della proteina tirosina chinasi (PTK) responsabile della proliferazione di cellule tumorali o danni neuronali, e l'inibizione delle DNA topoisomerasi I e II, anch'essi enzimi coinvolti nella proliferazione di cellule neoplastiche (Patisaul e Jefferson, 2010). Alcuni autori hanno proposto gli estrogeni come responsabili della maggior longevità delle donne rispetto agli uomini e ne consigliano l'assunzione a

scopo antiossidante e preventivo (Vina, et al., 2011). Uno studio condotto sui topi da laboratorio ha dimostrato che una dieta contenente fitoestrogeni ha un effetto ansiolitico e influenza inoltre la memoria e l'apprendimento, in questo caso con una correlazione positiva nelle femmine e negativa nei maschi tra apporto di fitoestrogeni e funzionalità cerebrale (Lephart, et al., 2004).

Già negli anni '40, prima ancora della scoperta degli effetti positivi sulla salute, erano stati notati effetti avversi correlati ad una dieta contenente fitoestrogeni negli animali, come la "sterilità da trifoglio rosso" in alcune pecore (*Ovis aries*) in Australia. In quel caso era stata osservata una maggior incidenza di infertilità, aborto, malformazioni o problemi riproduttivi nella progenie in un gruppo di ovini che assumevano una dieta ad elevate percentuali di trifoglio rosso (Bennetts, et al., 1946). Negli anni a seguire sono stati condotti numerosi studi che hanno dimostrato effetti avversi sull'apparato riproduttivo delle vacche (*Bos taurus*) alimentate con diete ad alto tenore di soia o leguminose, come cisti ovariche, estro o anestro prolungati, aborto, infertilità, endometriosi (Adler e Trainin, 1960; Kallela, et al., 1984), con maggior incidenza di aborti nei primi tre mesi di gravidanza perché si è visto che i metaboliti attivi, soprattutto l'equolo, erano presenti in concentrazioni maggiori rispetto alle fasi avanzate della gravidanza (Woclawek-Potoka, et al., 2008). Anche nei tori sono stati osservati degli effetti negativi sull'apparato riproduttivo: metaplasia ghiandolare della prostata e ghiandola bulbouretrale (Lenis, et al., 2010), ginecomastia e galattorrea (Romero, et al., 1997). Nell'uomo non è ancora stato del tutto chiarito il ruolo dei fitoestrogeni sull'apparato riproduttivo e le evidenze scientifiche sono poche. Negli individui di sesso femminile è stato fin ora dimostrato che le bambine alimentate con una dieta a elevato contenuto di soia nei primi anni di vita hanno maggior predisposizione a sviluppare problematiche correlate al ciclo mestruale durante la pubertà, ma non ci sono ancora evidenze relative agli effetti conseguenti al passaggio dei fitoestrogeni dalla madre al feto, o dell'esposizione nelle donne adulte (Retana-Márquez, et al., 2012). Nei topi è stato dimostrato che l'esposizione alla genisteina e daidzeina durante il periodo neonatale o perinatale causa modificazioni dell'apparato riproduttivo femminile quali malformazioni ovariche, anomalie del ciclo estrale e infertilità (Burton e Wells, 2002; Jefferson, et al., 2009), e anomalie dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi (Bateman e Patisaul, 2008). Anche nei topi di sesso maschile

sono stati riscontrati effetti a carico dell'apparato riproduttivo, in particolare una diminuita concentrazione ematica di testosterone (Akingbemi, et al., 2007) e difetti nella spermatogenesi (Assinder, et al., 2007).

L'inibizione degli enzimi 5'-deiodinasi e tireoperossidasi causa un deficit a livello di ormoni tiroidei e, nel tentativo di compensare, l'ipofisi aumenta la propria secrezione di TSH. Questo può causare gozzo e ipertiroidismo (Peterson, et al., 2012). La prima osservazione relativa agli effetti dei fitoestrogeni sulla tiroide è stata fatta su un gruppo di topi da laboratorio alimentati con una dieta contenente due tipi di flavonoidi derivati dalla noce. In questi soggetti è stata misurata una diminuzione nella sintesi degli ormoni tiroidei ed un minor uptake di iodio *in vitro* (Moudgal, et al., 1958). Negli anni successivi sono stati fatti diversi studi sull'uomo (De Souza Dos Santos, et al., 2011) e nel 2003 il Comitato Britannico per la tossicità delle sostanze chimiche nei prodotti alimentari ha dichiarato che i fitoestrogeni presenti negli alimenti non hanno i requisiti tali per essere considerati dannosi per lo sviluppo di alterazioni tiroidee nell'uomo in una popolazione normale. Tuttavia ha anche definito alcune categorie di consumatori sui quali invece i fitoestrogeni potrebbero produrre effetti avversi: individui che seguono una dieta vegetariana o vegana, soggetti ipotiroidei, donne gravide o con patologie al seno ormone-dipendenti (Marotti e Condoleo, 2010).

Si sa ancora poco sugli effetti nel cane, anche se si ipotizza che possano essere analoghi a quelli riscontrati nell'uomo e in altri animali. È stato condotto uno studio su 30 cani sani, con l'obiettivo di valutare gli effetti dei fitoestrogeni assunti per via alimentare sul metabolismo degli ormoni steroidei e tiroidei, sul comportamento e sulla qualità della pelle e del pelo (conseguenza dello stato ormonale). È stata fatta una valutazione preliminare sulle condizioni generali di questi aspetti e sono stati misurati gli ormoni tiroidei T₄, T₃, fT₄ e fT₃, il cortisolo, l'androstenedione, il 17-idrossiprogesterone, l'estradiolo, il progesterone e il testosterone ematici; dopodiché è stata fornita ad alcuni cani una dieta ad alto tasso di isoflavoni, e ad altri una dieta a basso contenuto per un periodo di 12 mesi. Sono state fatte valutazioni a 6 e 12 mesi dall'inizio della dieta. Non sono stati notati cambiamenti comportamentali significativi tra i due gruppi, né effetti sulla qualità della pelle e del pelo. Dal punto di vista ormonale si è evidenziato un aumento della concentrazione ematica di estradiolo nel gruppo di cani alimentati con una

dieta ad alto contenuto di isoflavoni, probabilmente perché questi, legandosi ai recettori ER, hanno spiazzato l'estradiolo che è così rimasto in forma libera; nello stesso gruppo di cani è stato riscontrato un aumento del T_4 , ma sono apparse necessarie ulteriori indagini per confermare questo effetto (Cerundolo, et al., 2009).

Nella specie felina invece è stata dimostrata una correlazione tra fitoestrogeni e cambiamenti a livello tiroideo. In uno studio svolto su 20 gatti, dapprima è stata verificata mediante analisi di laboratorio l'assenza di patologie di qualsiasi tipo ed in seguito è stata fornita ad alcuni di essi una dieta a base di soia e ad altri senza soia, per un periodo di 3 mesi. Ai 18 gatti che sono andati avanti nell'esperimento (2 sono stati esclusi per l'avvento di patologie) è stato effettuato un dosaggio degli ormoni tiroidei fT_4 , T_4 , T_3 e T_3/fT_4 a 6 e 12 settimane dall'inizio della dieta (Tabella 2). È stato riscontrato un aumento del T_4 dopo 6 settimane nei gatti che avevano seguito una dieta a base di soia, e un aumento dell' fT_4 , del T_4 e del rapporto T_3/fT_4 sempre in questo gruppo di gatti dopo 12 settimane dall'inizio della dieta. Le variazioni, seppur superiori ai valori di riferimento solo lievemente, sono state ritenute in ogni caso significative. Il fatto che non ci siano state alcune variazioni nei soggetti alimentati con una dieta senza soia è indicativo del fatto che le sostanze in essa presenti siano effettivamente alla base delle variazioni ormonali. In più, il fatto che non siano state registrate variazioni nelle concentrazioni di T_3 indica che probabilmente non si è verificata un'inibizione dell'enzima TPO, ma dell'enzima 5'-deiodinasi. Questo studio ha quindi confermato gli effetti di un'esposizione di breve durata, ma ulteriori studi potrebbero dimostrare che un'esposizione cronica potrebbe fare progredire queste variazioni fino alla condizione di ipertiroidismo (White, et al., 2004).

Tabella 2. Concentrazioni sieriche di fT_4 , T_4 , T_3 (nmol/L) e rapporto T_3/fT_4 a 6 e 12 settimane dall'inizio della dieta. Si riscontrano variazioni (*) rispetto ai limiti di riferimento

Variabile	Valori di riferimento	6 settimane		12 settimane	
		Dieta senza soia	Dieta con soia	Dieta senza soia	Dieta con soia
fT_4 (pmol/L)	10-15	41 ± 10	44 ± 8	37 ± 9	42 ± 9*
T_4 (nmol/L)	10-49	40 ± 9	43 ± 6*	39 ± 8	42 ± 9*
T_3 (nmol/L)	0.6-0.9	0.81 ± 0.20	0.79 ± 0.16	0.80 ± 0.12	0.76 ± 0.16
T_3/T_4 (ratio)	ND	0.021 ± 0.008	0.018 ± 0.004	0.023 ± 0.007	0.019 ± 0.005*

CAPITOLO 3: Lo zearalenone

3.1: Struttura e meccanismo d'azione

Lo zearalenone (ZEN) è una micotossina prodotta dai funghi del genere *Fusarium*, soprattutto *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. cerealis*, *F. equiseti*, *F. crookwellense*, *F. semitectum*, *F. verticillioides*, *F. sporotrichioides*, *F. oxysporum* e *F. acuminatum*. È una molecola estrogenica non-steroidica (Figura 6), con una struttura simile agli estrogeni prodotti dall'organismo. Il suo nome è composto da "Zea" (dal nome del mais *Zea mays*), "ral" (ad indicare che appartiene al gruppo dei lattoni dell'acido resorcilico), "en" (per la presenza di un doppio legame) e "one" (per il gruppo chetonico) (Ropejko, et al., 2021).

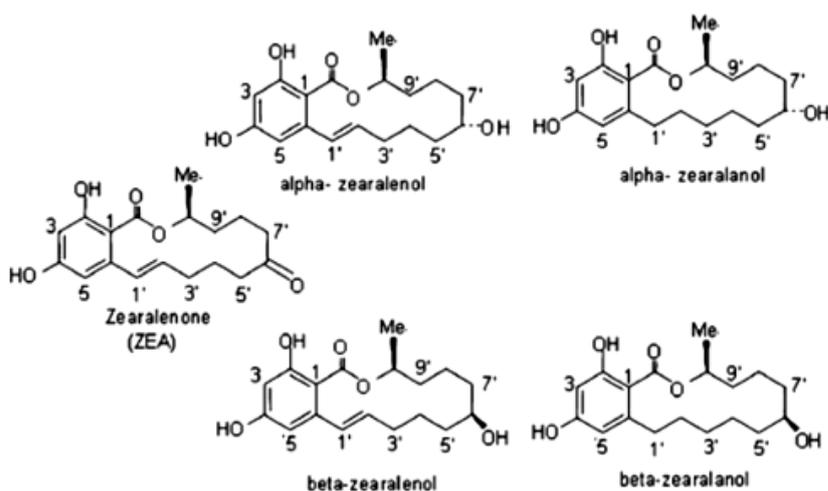


Figura 6. Struttura dello zearalenone e dei suoi metaboliti (Fink-Gremmels e Malekinejad, 2007)

Data la lipofilità dello zearalenone, se introdotto per via orale (Figura 7) è stato dimostrato un rapido assorbimento nell'uomo e nei monogastrici (Kuiper-Goodman, et al., 1987). A livello epatico avvengono reazioni di fase I catalizzate dagli enzimi 3- α e 3- β idrossisteroide deidrogenasi (HSD) in cui il gruppo chetonico in C 6' viene ridotto con la formazione di α -zearalenolo (α -ZOL) e β -zearalenolo (β -ZOL); segue riduzione del doppio legame C11=C12 da cui si ottengono α -zearalanolo (α -ZAL) e β -zearalanolo (β -ZAL) ed infine avviene la glucuronazione di ZEN e dei suoi metaboliti ad opera dell'enzima UDPGT (Olsen, 1989). Tutte queste reazioni possono avvenire sia tardivamente, sia subito dopo la

produzione di ZEN, quindi la presenza della tossina e dei suoi metaboliti possono coesistere.

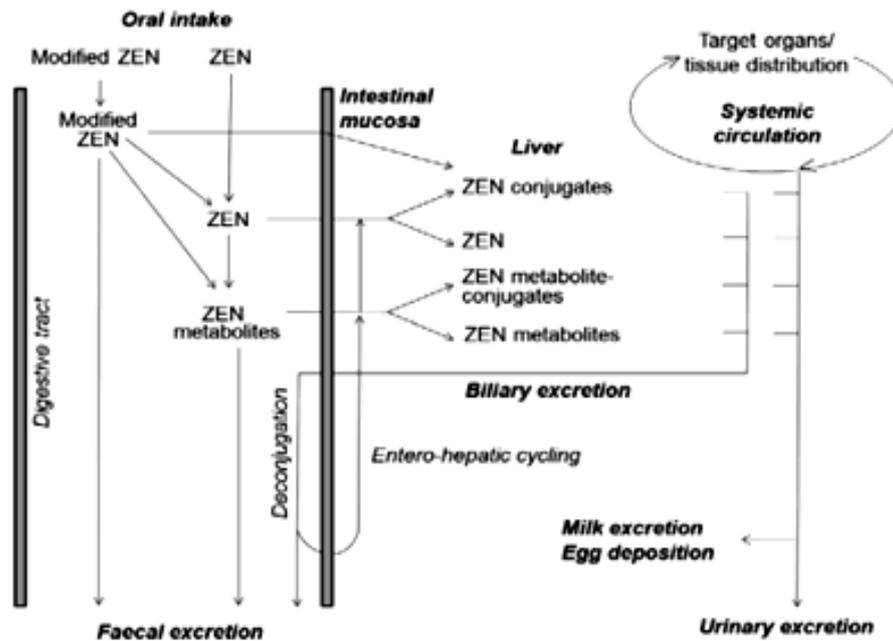


Figura 7. Rappresentazione schematica del metabolismo dello zearalenone dopo ingresso nell'organismo per via orale (EFSA Journal, 2017)

L'organo maggiormente deputato alle trasformazioni dello ZEN e dei suoi metaboliti è il fegato, anche se è stata riscontrata la presenza di 3- α HDS e 3- β HDS in altri organi quali rene, testicolo, ovaio, ipotalamo, intestino (Minervini e Dell'Aquila, 2008): tra le reazioni catalizzate da questi enzimi c'è la conversione di pregnenolone in progesterone (P_4) e la conversione dell'estrone in estradiolo (E_2). Proprio per questa loro funzione, oltre ad essere responsabili della produzione di metaboliti secondari tossici, questi enzimi possono essere un bersaglio delle micotossine, che ne vanno a diminuire l'attività (Gajęcka, et al., 2015). Le differenze di specie nel metabolismo epatico sono alla base del diverso grado di sensibilità a queste tossine nelle varie specie animali (D'Mello, et al., 1999): il suino (*Sus scrofa domesticus*) è la specie più sensibile agli effetti di queste micotossine perché possiede dei meccanismi di glucuronazione carenti (Fink-Gremmels e Malekinejad, 2007).

Studi fatti sui suini hanno dimostrato che lo zearalenone e i suoi metaboliti si distribuiscono soprattutto nell'utero, ovaie, testicoli e tessuto adiposo, in cui sono più presenti i recettori degli estrogeni (ER) (Kuiper-Goodman, et al., 1987).

Negli animali da allevamento è stata inoltre documentata la distribuzione di ZEN e dei suoi metaboliti anche in altri tessuti come il muscolo, infatti è stata riscontrata la loro presenza nelle carni, nel latte e nelle uova delle principali specie allevate (Fink-Gremmels e Malekinejad, 2007). L'eliminazione avviene attraverso le feci, la bile e le urine (Ropejko, et al., 2021).

Data la loro struttura, ZEN e i suoi metaboliti si legano ai recettori degli estrogeni (ER), con un'affinità solo dell'1-10% se comparati al 17- β estradiolo (E_2) (Gajęcki, et al., 2010). Inoltre, studi svolti *in vitro* su cellule umane hanno dimostrato che ZEN ha maggior affinità di legame per ER α , di cui è antagonista pieno, rispetto ad ER β , e che l'affinità per ER β è dose-dipendente (Barton, et al., 2012). In più, nell'uomo è stata dimostrata l'azione su altri enzimi o fattori di trascrizione indipendenti da ER, i cui effetti saranno spiegati nel capitolo 3.3 (EFSA Journal, 2017).

3.2: Fonti di esposizione

Viene sintetizzato da funghi soprattutto nei cereali e, in particolare, la presenza di ZEN è maggiormente documentata in mais, grano (*Triticum spp*), sorgo (*Sorghum spp*), riso (*Oryza sativa*), orzo (*Hordeum vulgare*), semi di sesamo (*Sesamum indicum*), malto, fieno e altri (Kuiper-Goodman, et al., 1987).

È una molecola termostabile, perciò resistente ai processi di lavorazione dei vegetali quali macinatura, estrusione, trattamenti termici. L'accumulo di tossine avviene soprattutto prima della raccolta, ma può proseguire se non ci sono condizioni di conservazione adeguate (Ropejko, et al., 2021). Il grado di contaminazione varia anche in base all'età e al tipo di vegetale, e all'area geografica in cui viene coltivato (Minervini e Dell'Aquila, 2008). È frequente che lo stesso vegetale sia contaminato da più generi di miceti e relative tossine: deossinivalenolo, nivalenolo, fumonisine, aflatossine e ocratossina A sono quelle

più diffuse, ma a differenza dello zearalenone, non hanno dimostrato effetti sul sistema endocrino (Gazzotti, et al., 2015).

La via di esposizione è orale in tutte le specie incluso l'uomo, tramite ingestione di vegetali contaminati dal fungo o dalle tossine, oppure per ingestione di prodotti derivati da animali che a loro volta avevano ingerito micotossine (Kriszt, et al., 2012). Nell'uomo la presenza di micotossine degli alimenti è normata dal Regolamento (CE) 1881/2006 e successive modifiche (Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea, 2016).

Visti gli effetti dannosi relativi all'esposizione anche negli animali, l'Unione Europea ha emanato la Raccomandazione (UE) 2016/1319 (Tabella 3), che è un'ulteriore modifica della precedente Raccomandazione (UE) 576/2006.

Tabella 3. Contenuto massimo di zearalenone (mg/Kg) negli alimenti destinati al consumo da parte degli animali domestici e di allevamento, stabilito dalla Raccomandazione (UE) 2016/1319

Materie prime per mangimi:	Zearalenone (mg/Kg)
1) Cereali e prodotti a base di cereali fatta eccezione per sottoprodotti del granturco	2
2) Sottoprodotti del granturco	3
Mangimi composti per:	Zearalenone (mg/Kg)
1) Suinetti, scrofette, cuccioli di cani, cuccioli di gatti, cani e gatti da riproduzione	0,1
2) Cani e gatti adulti diversi da quelli da riproduzione	0,2
3) Scrofe e suini da ingrasso	0,25
4) Vitelli, bovini da latte, ovini (inclusi agnelli) e caprini (inclusi capretti)	0,5

Questo documento non ha valenza di vera e propria legge, ma stabilisce dei valori di riferimento per il contenuto delle micotossine nelle materie prime e negli alimenti destinati alle principali specie animali di allevamento e di affezione, sulla base della valutazione del rischio fornita dall'EFSA. Per lo zearalenone il limite massimo consentito è

di 0,2 mg/Kg nelle materie prime destinate alla produzione di cibo commerciale per cani e gatti (Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea, 2016).

Relativamente all'esposizione degli animali da compagnia, c'è un rischio per i soggetti alimentati con il pet food in cui vengono utilizzati ingredienti di origine vegetale (soprattutto nelle formulazioni secche, sotto forma di farine) (Leung, et al., 2006). Ne è una dimostrazione uno studio eseguito nel 2004 su 57 campioni di cibo sia per cani sia per gatti, in parte di cibo commerciale e in parte alimenti terapeutici. Lo zearalenone è stato rinvenuto in 48 dei campioni, con una concentrazione media di 41,14 µg/Kg negli alimenti commerciali e 31,04 µg/Kg negli alimenti terapeutici (Zwierzchowski, et al., 2004). Un altro studio più recente è stato fatto nel 2015 a Bologna, con lo scopo di evidenziare l'eventuale presenza nel pet food di micotossine, tra cui appunto lo zearalenone. Sono stati presi in esame 48 campioni di cibo per cani in formulazione secca raccolti in vari esercizi commerciali della provincia, di differenti marche e standard qualitativi. Per quanto riguarda lo zearalenone, è stato trovato solo nel 25% dei campioni e in una concentrazione tra 10,4 e 42,4 µg/Kg, valori nei limiti raccomandati dalla legge europea (Gazzotti, et al., 2015).

3.3: Effetti

Gli effetti principali sul sistema endocrino esercitati da queste micotossine riguardano l'azione di iperestrogenismo sull'apparato riproduttivo. Nel suino, specie più sensibile, sono stati osservati atrofia ovarica, estro prolungato, persistenza del corpo luteo, pseudogavidanza, ipofertilità, parti prematuri o nascita di suinetti disvitali (Kuiper-Goodman, et al., 1987), metaplasia squamosa dell'utero, della cervice, della vagina e della ghiandola mammaria (Chang, et al., 1979), ipertrofia uterina e vulvare, ginecomastia. I suinetti che sono stati esposti alle micotossine nella vita intrauterina o durante la lattazione tendono a sviluppare le condizioni precedentemente citate nella vita adulta (Biehl, et al., 1993). I soggetti più suscettibili sono le scrofette in età prepubere (Bauer, et al., 1987). Oltre ai disordini legati alla sfera riproduttiva, è stata dimostrata in questa

specie un'azione di danno ossidativo a carico dei linfociti splenici data dall'azione combinata dello zearalenone e della micotossina deossinivalenolo (Ren, et al., 2017).

I ruminanti, grazie alla presenza della microflora ruminale, sono tra gli animali meno sensibili all'azione delle micotossine. Tuttavia è stato osservato che l'esposizione di vacche nel periodo prepubere può dare aumento di volume della ghiandola mammaria, sterilità o ipofertilità (Fink-Gremmels e Malekinejad, 2007), e ad alte dosi una maggior durata dell'estro ed aumento del peso di ovaie e utero (Smith, et al., 1990).

Nell'uomo si è finora dimostrato che ZEN causa negli individui di sesso femminile pubertà precoce, minor sopravvivenza dell'embrione, minor peso alla nascita e minor produzione di latte nel caso di esposizione durante la gravidanza, cambiamenti morfologici dell'utero, diminuzione dei livelli di progesterone e di LH; difetti nella composizione dello sperma negli individui di sesso maschile (Ropejko, et al., 2021). Inoltre nell'uomo è stato dimostrato che ZEN, α -ZEL e β -ZEL sono in grado di causare danno ossidativo cellulare (Tatay, et al., 2017) e che lo zearalenone attiva l'apoptosi degli eritrociti non nucleati (Jilani e Lang, 2013). Nel 1993 l'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro ha inserito lo zearalenone nelle sostanze di Gruppo 3, ovvero non classificabili come agenti tumorali. Tuttavia, per gli effetti tossici e di interferenza endocrina di questa molecola, il Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) ne ha stabilito un limite massimo di assunzione giornaliera per l'uomo di 0,2 μ g/Kg di peso corporeo (Marozzi e Condoleo, 2010).

Relativamente agli effetti dello zearalenone e dei suoi metaboliti nel cane ci sono ancora pochi studi (Witaszak, et al., 2020), mentre nel gatto mancano ancora del tutto (EFSA Journal, 2017). Il cane è un buon modello per studiare questa micotossina, perché essendo un monogastrico non è una specie adattata in natura per ingerire vegetali contenenti micotossine e non possiede quindi i sistemi di detossificazione necessari. ZEN, α -ZEL e β -ZEL sono responsabili anche in questa specie di disordini riproduttivi; nel cane come nel maiale prevale α -ZEL mentre nelle altre specie prevale β -ZEL con effetti minori (Gajęcka, et al., 2015).

Negli ultimi anni sono stati fatti degli studi su cagne prepuberi esposte a ZEN e ZEL e sono stati riscontrati effetti a carico dell'apparato riproduttivo. Un primo studio fatto nel 2004

ha dimostrato gli effetti a breve termine della micotossina sull'apparato riproduttivo della cagna. Dopo 7 giorni di somministrazione *per os* di zearalenone alla dose di 200 µg/Kg, nelle cagne prese in esame si sono verificati cambiamenti apoptotico-simili delle cellule della granulosa, atresia delle cellule follicolari, edema e iperplasia delle cellule di utero e ovidutto (Gajęcka, et al., 2004). Un altro studio più recente ha esaminato gli effetti di un'esposizione a lungo termine, sempre nelle cagne prepuberi (Figura 8). Si è analizzata per prima cosa la correlazione tra presenza della micotossina e i livelli di P₄ e E₂ nel sangue. Nel caso di P₄ il suo aumento è stato osservato dopo 2 settimane dall'inizio dell'esposizione raggiungendo valori massimi dopo 3-4 settimane, mentre nel caso di E₂ è stato osservato un aumento a partire da 4 settimane da inizio esposizione; queste variazioni ormonali sono effetto delle variazioni nella steroidogenesi causate da ZEN e ZEL. La persistente condizione di iperestrogenismo ha avuto una serie di ripercussioni su ovaie e utero. A livello ovarico si è osservata atresia dei follicoli ovarici con produzione di digitazioni superficiali secernenti estrogeni (con effetto che si va ad aggiungere all'iperestrogenismo già presente), degenerazione cellulare e aumento dell'apoptosi, diminuzione dei recettori ERβ (che sono normalmente i più presenti nell'ovaio) e inibizione degli enzimi 3-β HSD e 17-β HSD. Nell'utero si sono visti fenomeni di iperplasia ghiandolare, adenogenesi, angiogenesi e vascolarizzazione (Gajęcka, et al., 2015).

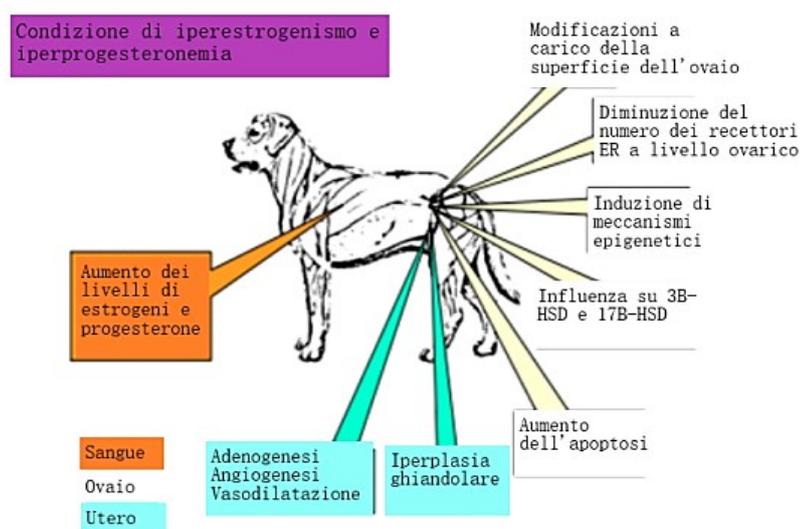


Figura 8. Effetti dello zearalenone e dei suoi metaboliti presenti nel siero di cagne prepuberi a livello di ovaio e di utero (modificato da: Gajęcka, et al., 2015)

CAPITOLO 4: Il bisfenolo A

4.1: Struttura e meccanismo d'azione

Il bisfenolo A (BPA) è uno degli interferenti endocrini maggiormente responsabile di effetti avversi nell'uomo e negli animali. È una sostanza chimica di sintesi appartenente al gruppo dei fenoli e la sua denominazione (IUPAC) è 4,4'-diidrossi 2,2-difenilpropano. È sintetizzato dalla condensazione di una molecola di acetone (da cui la lettera A) con due equivalenti di fenolo; questa reazione è catalizzata da un acido forte (HCl) oppure da una resina, il polistirene sulfonato. Si presenta allo stato solido, è incolore e poco solubile in acqua, mentre ha una buona solubilità nei composti organici (Talpade, et al., 2018).

Seppur lipofilo, ha una scarsa tendenza ad accumularsi nel tessuto adiposo a causa della sua breve emivita. Tuttavia può essere riscontrato a basse concentrazioni nel tessuto adiposo, ma anche nel fegato e nel cervello (Geens et al., 2012). Anche nell'ambiente ha un'emivita breve, ma viene spesso classificato nei POP poiché viene rilevato ad alte concentrazioni negli organismi esposti, poiché l'assunzione giornaliera è spesso tale da sovrastare i meccanismi di eliminazione (Yilmaz, et al., 2020).

La sua azione di interferente endocrino avviene mediante diversi meccanismi d'azione. Uno tra i principali è il legame ai recettori degli estrogeni ER α e β . Il legame a ER β produce solo un effetto di agonista, mentre il legame con ER α avviene sia con effetto di agonista sia di antagonista. Il legame è possibile grazie all'analogia strutturale tra gli estrogeni endogeni e il BPA (Figura 9 A). Nonostante l'estradiolo (molecola più rappresentativa degli estrogeni endogeni) abbia una maggior affinità per ER e nonostante la stimolazione dei recettori sia la medesima da parte delle due sostanze, quando il BPA è presente lo si trova in maggior concentrazione rispetto all'estradiolo ed è per questo che riesce a competere per i recettori (Hiroi, et al., 1999).

Il BPA ha anche la capacità di legarsi ai recettori AR degli androgeni con un legame non competitivo e dose-dipendente, con effetto di antagonista (Lee, et al., 2003). In particolare, si è visto che il legame del BPA al recettore va ad influenzare negativamente la stabilizzazione del recettore, la dissociazione della heat shock protein 90 (Cimmino, et al, 2020) oppure rallenta la traslocazione nucleare di AR o facendo sì che sia necessaria

una concentrazione maggiore di AR attivati. Sempre in merito all'apparato riproduttivo maschile, ha un effetto di agonista sui recettori mutati AR (T877A) e promuove così la proliferazione delle neoplasie prostatiche (Teng, et al., 2013).

Inoltre, data l'analogia strutturale tra la molecola e gli ormoni endogeni (Figura 9 B), il BPA è in grado di agire come antagonista sui recettori tiroidei dell'ormone T₃, impedendo il legame ormone-recettore; come risposta a questo evento, l'ipofisi aumenta la concentrazione di TSH circolante, con conseguente iperplasia dell'organo nei soggetti suscettibili (Moriyama et al., 2002; Peterson, 2012).

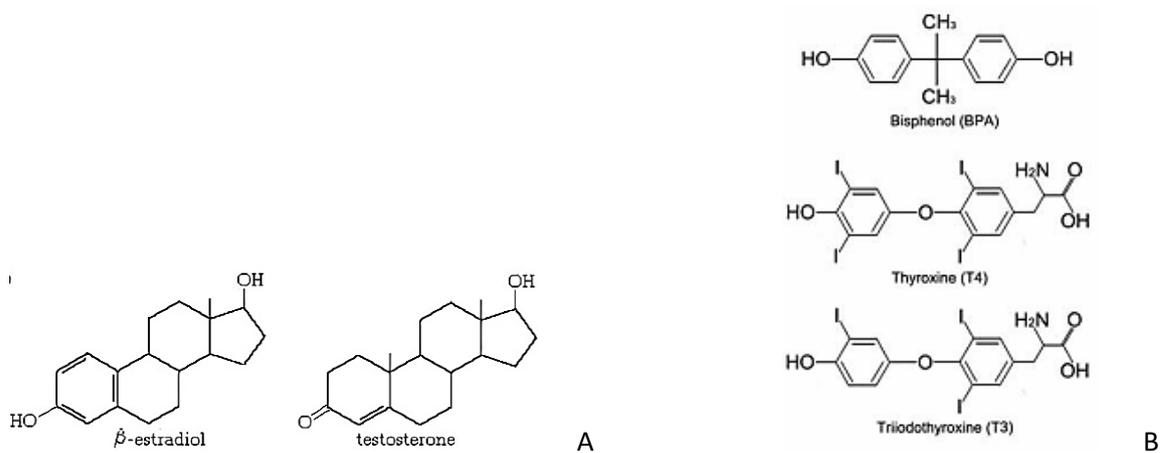


Figura 9: confronto tra la struttura del BPA e gli ormoni sessuali β -estradiolo e testosterone (A) e gli ormoni tiroidei T₄ e T₃ (B) (Peterson, et al., 2012; www.researchgate.net).

Infine può legarsi al recettore GR dei glucocorticoidi, su cui non esercita agonismo puro ma azione sinergica nel meccanismo dell'adipogenesi (Cimmino, et al., 2020).

4.2: Fonti di esposizione

Circa il 67% del Bisfenolo A prodotto a livello mondiale, è impiegato sotto forma di policarbonato, dal quale si ottiene una plastica rigida e trasparente; si trova in molti prodotti di uso quotidiano, dalle bottiglie, ai biberon, a dispositivi plastici per uso medico o sportivo. Il 30% del BPA viene invece usato per la produzione di resina epossidica,

impiegata soprattutto come rivestimento di lattine di cibi o bevande, con lo scopo di impedire la reazione tra metallo e contenuto. Infine, il restante 3% è utilizzato in altri prodotti. Vi è un rischio per la salute dei consumatori, uomo o animali, che deriva dalla capacità del BPA di migrare dal contenitore al contenuto soprattutto in relazione al fattore temperatura (correlazione positiva tra riscaldamento del contenitore e migrazione del BPA), ma anche con lavaggi ripetuti con detersivi o altri processi quali la sterilizzazione; infatti i legami esteri tra le molecole di BPA vengono idrolizzati con il calore o in presenza di sostanze fortemente acide o alcaline (Talpade, et al., 2018).

Le vie di esposizione a questa sostanza sono: orale, inalatoria o cutanea. L'assunzione di BPA per via orale è quella più frequente e più studiata. In più è stata individuata la polvere ambientale come possibile via di esposizione, le acque provenienti dal sottosuolo, alcuni materiali per uso dentistico (impianti) e l'inchiostro dei giornali (esposizione cutanea) (Talpade, et al., 2018). È stato inoltre dimostrato il passaggio dalla madre al feto attraverso la placenta (Cimmino, et al., 2020).

Dopo ingestione, il bisfenolo A viene rapidamente assorbito e metabolizzato dal fegato e dall'intestino. Nell'uomo la maggior parte della sostanza viene escreta con le urine sotto forma di metaboliti non attivi; nel ratto è eliminato per via fecale-biliare; negli animali da compagnia non è ancora chiaro attraverso quale delle due vie avvenga l'eliminazione (Sakamoto, et al., 2002; Inoue, et al., 2005).

Per quanto riguarda il cane e il gatto, analogamente a quanto avviene nelle altre specie compreso l'uomo, la via di esposizione più significativa al BPA è quella orale, tramite ingestione della sostanza. I contenitori del pet food sono una delle fonti di esposizione principale; a tal proposito risulta molto esemplificativo uno studio condotto su 15 diversi tipi di cibo in scatola per gatti e 11 per cani. Di questi prodotti, che avevano tutti ingredienti, caratteristiche nutrizionali e provenienza differenti, è stato misurato sia il contenuto di BPA nell'alimento, sia il contenuto di BPA rilasciato dai contenitori precedentemente svuotati (Tabella 4). Non sono state osservate differenze significative di contenuto di BPA in base ai componenti della dieta (carne di bovino, pollo o pesce), ma è stata trovata una concentrazione simile di sostanza nei cibi appartenenti al medesimo lotto. Inoltre, la concentrazione di BPA nell'alimento non ha una correlazione positiva con

la quantità di BPA rilasciato dal suo contenitore, perciò si sostiene che la presenza della sostanza nell'alimento sia dovuta in parte ad un rilascio dal contenitore durante i processi di confezionamento che avvengono ad alte temperature, in parte all'utilizzo di materie prime già contaminate dall'ambiente (Kang e Kondo, 2002).

Tabella 4. Contenuto di BPA nei campioni di cibo per gatti (G) e per cani (C) (ng/g), e quantità di sostanza rilasciata dai contenitori vuoti (ng/mL)

Campioni di cibo per gatti			Campioni di cibo per cani		
Numero campione	Contenuto di BPA (ng/g)	Rilascio di BPA dal contenitore vuoto (ng/mL)	Numero campione	Contenuto di BPA (ng/g)	Rilascio di BPA dal contenitore vuoto (ng/mL)
1 G	101	27	1 C	72	19
2 G	136	24	2 C	24	16
3 G	21	15	3 C	12	8
4 G	71	11	4 C	48	25
5 G	29	14	5 C	77	12
6 G	48	9	6 C	12	9
7 G	19	17	7 C	15	10
8 G	29	8	8 C	11	7
9 G	17	12	9 C	16	11
10 G	17	10	10 C	18	8
11 G	13	8	11 C	208	31
12 G	15	10			
13 G	21	19			
14 G	28	14			
15 G	14	8			

Un'altra fonte che è stata individuata come rischio per l'esposizione orale negli animali da compagnia è l'utilizzo di giocattoli e dispositivi da allenamento fatti di materiale plastico poiché, mentre per i giocattoli e altri oggetti di plastica destinati ai bambini è prevista una normativa circa il contenuto di sostanze nocive, ciò non accade nei prodotti per uso animale. In uno studio condotto *in vitro* sono stati testati diversi campioni di giocattoli appartenenti a due marche, di diversi colori, forme e soggetti a differenti stadi di usura. Di ognuno di questi è stato misurato il rilascio di bisfenolo A in una saliva sintetica, con l'utilizzo anche di una lingua artificiale metallica che simulasse l'azione di leccamento che avviene in natura. Da questo studio è stata dimostrata una correlazione positiva tra grado

di usura dell'oggetto e rilascio di BPA, mentre gli oggetti più vecchi rilasciano una minor quantità di sostanza rispetto a quelli nuovi (Wooten e Smith, 2013).

4.3: Effetti

In ambito di salute umana, sono stati condotti numerosi studi che hanno dimostrato una varietà di effetti nocivi a seguito dell'esposizione al BPA; per questo ne è stato vietato l'impiego per la fabbricazione di biberon per bambini nel 2011 mediante il Regolamento (UE) 2011/321 (Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea, 2011) e nel 2018 il divieto è stato esteso anche ai materiali a contatto con gli alimenti come stabilisce il Regolamento (UE) 2018/213 (Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea, 2018). Gli effetti avversi finora individuati nell'uomo riguardano in buona parte la sfera riproduttiva, nel caso in cui il BPA agisca legandosi ai recettori degli estrogeni o degli androgeni: minor concentrazione di ormoni sessuali (estrogeni, androgeni, gonadotropine), ipofertilità, sindrome dell'ovaio policistico, tumore al seno, parti prematuri o aborti, patologie uterine; disfunzioni riproduttive maschili e minor qualità dello sperma (Rochester, 2013). L'azione di antagonista su recettori degli estrogeni è responsabile anche di effetti a carico del sistema nervoso centrale, poiché il BPA può raggiungere questo distretto superando la barriera emato-encefalica (Elsworth, et al., 2015) ed è nota la presenza di recettori ER in parti dell'encefalo quali corteccia visiva primaria (Jeong et al., 2011), ippocampo (Liu et al., 2016) e altre aree. Nell'uomo si è visto che il BPA è coinvolto in meccanismi quali la depressione e l'ansia, e deficit di memoria nei bambini (Braun, et al., 2011; 2017), mentre nei ratti e nei primati può dare turbe emotive e cognitive insieme ad un alterato sviluppo di ippocampo e corteccia prefrontale (Elsworth, et al., 2015; Hu et al., 2017). Altri effetti studiati sono relativi a disordini metabolici quali diabete mellito, patologie cardiovascolari, obesità e alterazioni della funzionalità epatica. Inoltre si è visto che il BPA è dannoso negli individui in fase di sviluppo, perché può influenzare il peso alla nascita, causare anomalie nell'apparato genitale maschile o provocare deficit cognitivi o comportamentali, e sono stati osservati effetti anche sul sistema immunitario e sull'espressione genica (Rochester, 2013). Infine è stato definito l'effetto del BPA sulla tiroide; studi fatti sull'uomo hanno rivelato che la sostanza è coinvolta nella genesi

dell'ipertiroidismo (Wang et al., 2013; Guo, et al., 2021), fatto da attribuire all'antagonismo esercitato dal BPA sui recettori del T₃, oppure l'associazione tra presenza di noduli tiroidei e concentrazione di BPA nelle urine (Andrianou et al., 2016).

Per quanto riguarda invece la salute degli animali domestici, gli studi effettuati ad oggi sono ancora relativamente scarsi e hanno finora permesso di individuare e dimostrare solo alcuni degli effetti conseguenti all'esposizione al BPA: l'effetto *in vitro* del BPA sulle contrazioni uterine del gatto (Kabakci, et al., 2019), la correlazione tra concentrazione di BPA nel sangue e modificazione della microflora intestinale (Koestel, et al., 2017), gli effetti sul meccanismo della visione del gatto (Xu, 2018; Hu, 2020; Hu, 2021) e la correlazione tra BPA nella dieta e ipertiroidismo felino (Peterson, et al., 2012). Proprio per questa scarsità di evidenze scientifiche, contrariamente a quanto accade per l'uomo, non esiste alcun tipo di normativa che regolamenti l'impiego di BPA nei prodotti destinati agli animali domestici.

Data l'affinità strutturale del BPA e la sua capacità di legarsi ai recettori ER, uno studio fatto in Turchia ha dimostrato come anche negli animali da compagnia, in questo caso il gatto, la molecola possa avere un'attività estrogenica. Lo studio è stato condotto *in vitro* su 13 uteri di gatte, asportati tramite ovariectomia durante la fase di estro. Sono state misurate le contrazioni del miometrio su un gruppo di controllo, un gruppo esposto ad etanolo (veicolo in cui è stato fornito il BPA) ed infine un gruppo trattato con BPA alle dosi di 1 -10-100 µM. Per ogni gruppo sono state considerate frequenza ed ampiezza delle contrazioni e si è visto che in termini di frequenza l'etanolo non ha prodotto alcun effetto, mentre il BPA ha causato una diminuzione della frequenza, con effetto massimo di -21,5% alle dosi di 100 µM; per quanto riguarda l'ampiezza delle contrazioni, non sono state rilevate variazioni attribuibili all'etanolo, mentre negli uteri esposti a BPA è stato osservato un calo dose-dipendente, con un picco massimo di -30,4% alla concentrazione di BPA di 100 µM (Kabakci, et al., 2019). Altri studi sull'attività estrogenica del BPA sono stati condotti sull'uomo e sui ratti, ma a parte questo studio, rimane ancora molto da indagare nell'ambito degli animali da compagnia.

Come descritto nel capitolo 4.2, l'esposizione per via orale è la via più frequente di ingresso del BPA all'interno dell'organismo. In uno studio eseguito sui cani sono stati

valutati gli effetti di un'esposizione a breve termine (in questo caso della durata di 14 gg) ad una dieta ricca in bisfenolo A. Dagli esami biochimici del sangue emerge una correlazione positiva tra concentrazione di BPA nel sangue e ione bicarbonato, ed una correlazione negativa tra BPA e anioni e glucosio, mentre altre sostanze ad esempio il cortisolo non hanno dimostrato di avere alcuna correlazione con le concentrazioni di BPA. Da qui si individua un potenziale fattore di rischio, perché un eccessivo aumento dei bicarbonati può portare ad alcalosi metabolica (Koestel, et al., 2017). Sempre nello stesso studio sono stati notati dei cambiamenti a livello di microflora intestinale dopo esposizione a breve termine al BPA mediante la dieta. Per i batteri *Bacteroides spp*, *Streptophyta spp*, *Erysipelothricaceae* e *Flexispira spp* è stata trovata una correlazione negativa con i livelli di BPA nel sangue, mentre per *Bacteroides ovatus*, *Prevotella spp*, *Ruminococcus spp* e *Cetobacterium somerae* si è vista una correlazione positiva. Esiste una correlazione tra alcuni di questi batteri e cortisolo e ALP; inoltre le variazioni della microflora intestinale influiscono sulla capacità di metabolizzare il BPA stesso e altri xenobiotici, e in più si possono avere effetti secondari dovuti alla variazione dei metaboliti e fattori di virulenza dei batteri. La diminuzione di *Bacteroides spp* dovuta all'aumento di concentrazione di BPA, paradossalmente, causa una diminuzione della degradazione del BPA stesso. Infine il BPA può interagire con il metabolismo di alcuni nutrienti presenti nella dieta (Koestel, et al., 2017).

Per individuare gli effetti a livello di sistema nervoso centrale è stato condotto uno studio sui gatti, con l'obiettivo di chiarire l'effetto del BPA a livello di singolo neurone, in particolare sui neuroni dell'area 17 (A17) nella corteccia visiva primaria. Un gruppo di gatti sani e senza problemi di vista è stato inoculato con BPA endovenoso e locale intracerebrale, e in seguito i soggetti sono stati sottoposti a stimoli luminosi tramite un processo computerizzato, che hanno indotto la stimolazione dei meccanismi visivi di riconoscimento dell'orientamento e percezione della profondità. È stata misurata la risposta neuronale in A17 e a livello di nucleo genicolato laterale (LGN) a 30', 2h e 3.30h dopo l'inoculazione e sono quindi stati valutati gli effetti del BPA sia a livello sistemico sia a livello locale. Lo studio ha dimostrato che il BPA è responsabile dell'alterazione del meccanismo della visione a livello corticale e subcorticale, con effetto massimo a 2h dopo l'inoculazione. (Xu et al., 2018).

Uno studio ulteriore sul sistema nervoso centrale è stato condotto nel gatto, misurando gli effetti del BPA sulla capacità del sistema visivo di percepire il contrasto, definito come “capacità di distinguere gli oggetti dal loro sfondo per le loro differenze di luce o colore” (Avidan, et al., 2002). Per l’esperimento sono stati scelti 6 gatti sani a cui è stato somministrato BPA per via endovenosa, sono stati forniti stimoli di contrasto visivo e sono state registrate le risposte neuronali di A17 e LGN prima e dopo l’inoculazione. I risultati hanno rivelato che il BPA inibisce la sensibilità al contrasto dei neuroni nell’area 17 e che questo effetto non è correlato ad un’inibizione del meccanismo nei neuroni in LGN, poiché in questa sede non è stato riscontrato alcun cambiamento imputabile alla somministrazione di BPA, ma è dovuto invece ad un aumento di stimoli inibitori a livello di corteccia visiva primaria. Gli effetti massimi sono stati ottenuti dopo 2h dall’esposizione. Un possibile obiettivo sarebbe capire la correlazione tra questa alterazione e gli altri effetti del BPA a livello di corteccia (Hu, et al, 2020). Uno studio analogo è stato fatto valutando gli effetti sulla percezione del contrasto visivo nei neuroni A17 dopo esposizione cronica a BPA somministrato per 14 giorni. Anche in questo caso si è riscontrata una diminuzione di tale funzione, a causa di un’aumentata variabilità di risposta dei neuroni agli stimoli e quindi una minor capacità di codificazione (Hu, et al., 2021).

Gli studi sulla visione sono stati condotti proprio sui gatti perché hanno un senso della vista sviluppato e meccanismi visivi simili a quelli dell’uomo (Hubel and Wiesel, 1998). Nonostante il fine delle indagini fosse più che altro chiarire gli effetti del BPA sull’uomo mediante esperimenti su un’altra specie animale, i risultati di questi studi sono comunque utili a comprendere le criticità di questa sostanza sulla visione nel gatto.

Negli ultimi anni è cresciuto sempre di più l’interesse in ambito veterinario al ruolo del BPA nella genesi dell’ipertiroidismo del gatto. Questa patologia è stata descritta come la più diffusa tra i disordini endocrini del gatto e le conoscenze sono piuttosto recenti, infatti è stata osservata a partire dagli anni ’70 e la sua incidenza è in continuo aumento (Daniel e Neelis, 2014). I più probabili fattori alla base di questa patologia sono: immunologici, alimentari, ambientali o genetici. Va comunque considerata una patologia multifattoriale e quindi più cause concorrono nella sua genesi. La correlazione tra incidenza di ipertiroidismo nel gatto e BPA è stata dimostrata in uno studio che ha evidenziato una

maggior prevalenza di questa patologia nei gatti che assumevano una dieta commerciale a base di cibo in scatola (Peterson, et al., 2012).

4.4: Gli analoghi del bisfenolo A

Gli analoghi del BPA sono composti che hanno struttura o funzione simile al BPA (Tabella 5) e che negli ultimi anni sono usati ampiamente per sostituirlo, successivamente alle regolamentazioni. Nonostante siano ancora in fase di studio, si è visto che molti di questi condividono con il BPA diversi meccanismi d'azione potenzialmente dannosi (Pelch, et al., 2019).

Tabella 5. Struttura dei principali analoghi del BPA (Pelch et al., 2019)

Structure	Chemical	Structure	Chemical
	BPA Bisphenol A 80-05-7		BPS Bisphenol S 80-09-1
	4,4-BPF 4,4-Bisphenol F 620-92-8		2,4-BPS 2,4-Bisphenol S 5397-34-2
	BPAF Bisphenol AF 1478-61-1		D8 4-(4-Propan-2-yloxyphenyl) sulfonylphenol 95235-30-6
	BPB Bisphenol B 77-40-7		BPS-MAE 4-(4-Prop-2-enoxyphenyl) sulfonylphenol 97042-18-7
	BPC Bisphenol C 79-97-0		BPS-MPE 4-(4-Phenylmethoxyphenyl) sulfonylphenol 63134-33-8
	BPE Bisphenol E 2081-08-5		TGSA 3-Allyl-4-hydroxyphenyl sulfone 41481-66-7
	BPZ Bisphenol Z 843-55-0		D-90 Phenol, 4,4'-sulfonylbis-, polymer with 1,1'-oxybis[2-chloroethane] 191680-83-8
	TMBA Tetramethylbisphenol A 5613-46-7		BDP BPA bis(diphenyl phosphate) 5945-33-5
	BPAP Bisphenol AP 1571-75-1		TBBPA Tetrabromobisphenol A 79-94-7
	BPP Bisphenol P 2167-51-3		TCBPA Tetrachlorobisphenol A 79-95-8
	BPPH Bisphenol PH 24038-68-4		PHBB Benzylparaben 94-18-8

Uno studio *in vitro* ha dimostrato che bisfenolo AF (BPAF), bisfenolo Z (BPZ), bisfenolo C (BPC), tetrametil bisfenolo A (TMBPA), bisfenolo S (BPS), bisfenolo E (BPE), 4-4 bisfenolo F (4-4 BPF), bisfenolo AP (BPAP), bisfenolo B (BPB), tetraclorobisfenolo A (TCBPA) e benzilparabene (PHBB) sono agonisti dei recettori ER. Ad eccezione di BPS, TCBPA e PHBB, sono tutti antagonisti dei recettori AR degli androgeni. Il bisfenolo B (BPB) è un antagonista selettivo del recettore ER β , mentre (BPS-MPE) e (2-4 BPS) sono inibitori selettivi di ER α (Pelch, et al., 2019). L'affinità di legame e l'effetto di antagonismo o agonismo sul recettore variano in base alla struttura del bisfenolo preso in esame. Si è visto, per esempio, che il BPAF ha un'affinità per ER notevolmente maggiore rispetto a BPA e questo dipende dalla sostituzione nell'analogo del gruppo CH₃ con CF₃. È agonista pieno di ER α ma antagonista di ER β , quindi agisce con un meccanismo diverso rispetto al BPA (Matushima, et al., 2010).

Un altro aspetto interessante dello studio di questi composti è l'effetto miscela. È stato dimostrato che una combinazione di BPA, BPS e BPF produce un effetto maggiore sui recettori rispetto ad un singolo bisfenolo a concentrazioni superiori (Park, et al., 2020).

Relativamente alla persistenza nell'ambiente, è stato dimostrato che in condizioni di aerobiosi il BPAF ha una velocità di degradazione biologica inferiore rispetto al BPA e al BPS, ed ha una maggior propensione ad essere assorbito dal suolo insieme ai metaboliti intermedi che produce durante il ciclo. L'emivita stimata è di 32,6 giorni nelle foreste e 24,5 giorni nei terreni agricoli, quindi a livello ambientale ha un impatto maggiore (Choi e Lee, 2017). Nel 2018 la Danimarca ha incluso il BPAF nella lista III degli IE (www.edlists.org).

Nell'ambito della salute animale, in un recente studio condotto negli USA in cui è stata misurata la concentrazione di bisfenoli nelle urine di cani e gatti, si è visto che nei cani vi era una maggior presenza di BPS, seguito da BPA e BPF, mentre nei gatti sono state trovate concentrazioni maggiori di BPA, ma anche valori di BPS non trascurabili. Questo sta ad indicare che anche gli animali da compagnia sono esposti agli alternativi del BPA impiegati in ambito umano. Inoltre l'assenza di correlazione tra i valori delle tre classi di bisfenoli indica che ognuno provenga da una fonte diversa (Karthikraj, et al., 2020).

CAPITOLO 5: Gli Ftalati

5.1: Struttura e meccanismo d'azione

Gli ftalati sono un gruppo di esteri dell'acido ftalico. Sono sostanze di sintesi che si presentano come liquidi viscosi, poco volatili, con liposolubilità scarsa o nulla (Saillenfait e Laudet-Hesbert, 2005). I più diffusi sono: dibutilftalato (DBP), benzilbutilftalato (BBP), dietilftalato (DEP), diisonilftalato (DiNP), diisobutilftalato (DiBP), diisodecilftalato (DiDP), dicicloesilftalato (DCHP), 2-etilexilftalato (DEHP), dimetilftalato (DMP), con relativi metaboliti (Tabella 6). Possono essere divisi in due gruppi in base al loro peso molecolare: gli ftalati ad alto peso molecolare (soprattutto DEHP, DiNP, DiDP E BBP) e gli ftalati a basso peso molecolare (DMP, DEP, DBP e altri) (North, et al., 2014). Dopo il loro ingresso nell'organismo, vengono idrolizzati dagli enzimi lipasi ed esterasi nei rispettivi monoesteri che possono essere ugualmente o più attivi biologicamente. I monoesteri possono essere a loro volta ossidati o idrossilati da enzimi del citocromo P450 e possono inoltre subire glucuronazione, e in questo caso non sono attivi (North, et al., 2014). Vengono eliminati attraverso le urine e le feci, sia sotto forma di diesteri, sia come monoesteri (Latini, et al., 2010).

Tabella 6. Diesteri degli ftalati più diffusi e relativi metaboliti monoesteri

Diesteri degli ftalati	Metaboliti monoesteri
Benzilbutilftalato (BBP)	Monobenzilftalato (MBzP)
Dibutilftalato (DBP)	Monobutilftalato (MBP)
Dicicloesilftalato (DCHP)	Monocicloesilftalato (MCHP)
Dietilftalato (DEP)	Monoetilftalato (MEP)
Diisobutilftalato (DiBP)	Monoisobutilftalato (MiBP)
Diisonilftalato (DiNP)	Monoisonilftalato (MiNP)
Diocilftalato (DOP)	Monocilftalato (MOP)
	Mono-3-carbossipropilftalato (MCP)
Di-2-etilexilftalato (DEHP)	Mono-2-etilexilftalato (MEHP)
	Mono-2-etil-5-oxoetilftalato (MEOHP)
	Mono-2-etil-5-idrododetilftalato (MEHHP)
	Mono-2-etil-5-carbossipentilftalato (MECPP)
Dimetilftalato (DMP)	Monometilftalato (MMP)
Diisodecilftalato (DiDP)	Monocarbossinilftalato (MCNP)

Hanno una debole azione estrogenica *in vitro* ma sono potenti anti-androgeni *in vitro* e *in vivo* (Takeuchi, et al., 2005). Studi *in vitro* hanno dimostrato sia effetti antiandrogenici sia estrogenici mediante il legame rispettivamente ai recettori AR e ER α/β , ma il loro effetto finale sull'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi può variare in base alle caratteristiche del singolo composto o di un eventuale effetto miscela (Christen, et al., 2012). Possono legarsi sia alle proteine leganti gli androgeni (ABP) sia ai recettori degli androgeni (AR) nelle cellule del Sertoli, causando effetti citotossici e morte cellulare. DMP, BBP e DEHP riducono il numero di AR (Wan, et al., 2013).

Queste sostanze sono responsabili di effetti avversi anche a livello tiroideo, andando ad agire con più meccanismi: interferenza con il legame di T₃ alle proteine di trasporto, interazione con l'uptake di T₃ a livello di membrana cellulare, ed esercitando attività di agonismo nei recettori della tiroide (Boas, et al., 2010).

Inoltre sono agonisti dei recettori peroxisome proliferator activated (PPARs), che sono coinvolti nel metabolismo dei lipidi e dei carboidrati e nello sviluppo del tessuto adiposo (Desvergne et al., 2009) e sono presenti in vari organi tra cui il fegato, ma anche il testicolo; in quest'ultimo il legame tra ftalati e recettori causa apoptosi delle cellule del Sertoli (Bhattacharya, et al., 2005).

Possono attraversare la barriera placentare e causare effetti teratogeni (Saillenfait, et al., 1998), essere escreti nel latte (Dostal, et al., 1987) e sono anche stati trovati nel liquido amniotico (Silva, et al., 2004).

Uno studio suggerisce inoltre un effetto additivo *in vitro* tra alcuni ftalati e il BPA (Christen, et al., 2012).

I periodi più critici per l'esposizione sono la vita intrauterina e i primi anni di vita, ma studi su modelli animali hanno dimostrato che ci può essere un rischio anche nell'adulto a seguito di esposizione cronica ed eventuale combinazione con BPA o altri IE con effetti negativi sull'apparato riproduttivo maschile (Pallotti, et al., 2020).

5.2: Fonti di esposizione

Principalmente queste molecole sono impiegate nel polivinilcloruro (PVC) e in altri materiali plastici per conferire loro morbidezza e flessibilità (Saillenfait e Laudet-Hesbert, 2005), sono presenti in prodotti di uso quotidiano come contenitori per alimenti o giocattoli per bambini, ma anche dispositivi medici quali cateteri e sacche per le trasfusioni di sangue (Bhattacharya, et al., 2005), alimenti, aria corrente, polvere ambientale, acqua di bevanda, suolo, spray, cosmetici, interni delle auto, prodotti farmaceutici (Latini, et al., 2004). Gli ftalati ad alto peso molecolare sono impiegati di solito nei materiali plastici, mentre quelli a basso peso molecolare sono utilizzati nei prodotti cosmetici, solventi e altri (North, et al., 2014). Tuttavia gli ftalati non sono legati al materiale da legami covalenti quindi vengono rilasciati nell'ambiente (Meeker et al., 2009), ma a differenza dei POP non sono soggetti a bioaccumulo e biomagnificazione e il loro riscontro nel sangue o nelle urine di un organismo è legato ad esposizione recente data la loro scarsa persistenza. Nell'ambiente hanno emivita breve, di alcune ore nell'aria e mesi nel suolo; solo in alcuni casi possono mantenersi nei sedimenti per alcuni anni (Chou e Wright, 2006).

Il cibo è la maggior fonte di DEHP, alcuni dispositivi medici rilasciano DnBP, mentre l'aria, polvere e cosmetici rivestono un ruolo minore (Latini, 2010). Il loro riscontro negli alimenti è dovuto dalla migrazione delle molecole dal contenitore al prodotto, e questo fenomeno si verifica maggiormente nei cibi ad alta composizione lipidica; per quanto riguarda la loro presenza nell'ambiente, avviene per vaporizzazione degli ftalati dal materiale con successivo deposito nella polvere ambientale e in questo caso l'esposizione avviene per via inalatoria (Chou e Wright, 2006). Altre vie di esposizione possono essere cutanea nel caso di prodotti cosmetici e intravenosa attraverso dispositivi medici contenenti queste sostanze (North, et al., 2014).

Nel cane i giocattoli e il cibo commerciale sono considerati la fonte di esposizione principale (Tekin, et al., 2020). A tal proposito è stato condotto uno studio *in vitro* (già citato al CAPITOLO 4 relativamente al BPA) che analizza il comportamento del cane come fattore di rischio per l'esposizione a sostanze nocive, in quanto tende a leccare e mordere vari oggetti. In questo studio sono stati presi come campione giocattoli e dispositivi di

allenamento di materiali plastici di diverse marche, materiali, colori e grado di usura; dopodiché mediante una lingua finta che simulasse il leccamento, è stato misurato il rilascio di ftalati in una saliva sintetica. I risultati hanno dimostrato che l'età e il grado di leccamento del dispositivo sono correlati positivamente con il rilascio di DEP, DBP e BBP, il grado di usura influenza il rilascio di DEP e BBP, il colore dava diversi gradi di rilascio di DEP e il rilascio di DEP e DEHP differiva in base ai brand. L'estere più rilasciato è stato DEHP (Wooten e Smith, 2013).

È stato fatto inoltre uno studio *in vivo* su campioni di urine di cani e gatti domestici di New York, con l'obiettivo di misurare la concentrazione di 21 monoesteri degli ftalati. Sono state analizzate le urine di 50 cani e 50 gatti e i risultati sono stati confrontati con le concentrazioni delle medesime sostanze in campioni di urine dell'uomo di uno studio precedentemente effettuato sulla popolazione di New York. I risultati hanno mostrato che le concentrazioni urinarie dei metaboliti negli animali erano comparabili con quelle dell'uomo e che nel gatto vi erano concentrazioni lievemente maggiori rispetto al cane; inoltre le concentrazioni totali erano inversamente proporzionali all'età nel cane e direttamente proporzionali nel gatto, ma il motivo rimane da indagare. Il limite di questo studio è che non tiene conto delle fonti di esposizione (Karthikraj, et al., 2019).

Uno studio sulle fonti di esposizione è stato fatto anche sulla specie felina; si è svolto in Francia su un campione di 10 gatti di diverse età. Sono stati misurati i livelli di ftalati nel siero dei gatti dopo prelievo ematico, nell'ambiente interno e del cibo. I risultati hanno dimostrato che non c'è correlazione tra età e concentrazione delle molecole, e gli ftalati più presenti nel siero erano DnBP, DiBP e DiNP. DEHP era presente in concentrazioni di 32,8 ng/L quindi superiore alle dosi raccomandate per l'uomo (range 11,6-18 ng/L). Le concentrazioni di ftalati nel cibo e nell'ambiente hanno invece mostrato che l'esposizione del gatto deriva da entrambe le fonti: DEHP è stato trovato in concentrazioni maggiori rispetto agli altri, con valore di 599 µg/Kg nel cibo. Nell'ambiente è stata rilevata una concentrazione maggiore di DiNP e DiBP (Braouezec, et al., 2016).

DEHP, DBP, BBP e DiBP sono state registrate come sostanze sotto restrizione dalla Direttiva Delegata (UE) 2015/863 (Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea, 2015), e nel 2017 sono state incluse nell'elenco REACH come sostanze con proprietà di interferenti

endocrini (Tekin, et al., 2020). Non ci sono ancora normative per gli animali, pur essendo stata accertata l'esposizione a dosi simili all'uomo (Karthikraj, et al., 2019) ed effetti di interferenti endocrini (Pathirana, et al., 2011; Peterson, et al., 2012; Sumner, et al., 2019).

5.3: Effetti

Nell'uomo sono stati confermati effetti avversi derivanti dall'esposizione agli ftalati legati alla sfera riproduttiva: infertilità, aborto, età della pubertà anticipata, difetti nella qualità dello sperma, difetti dello sviluppo (Braouezec et al., 2016), endometriosi (Buck-Louis, et al., 2013). Oltre agli effetti sull'apparato riproduttivo, recentemente è stata studiata l'azione di IE sulla funzionalità tiroidea soprattutto nei bambini (Boas, et al., 2010) e la correlazione tra ftalati e altri agenti con l'insorgenza di asma allergica (North, et al., 2014). Alcuni metaboliti, sempre nell'uomo, sono implicati nella genesi di patologie metaboliche quali l'obesità (Xia, et al., 2018) e il diabete di tipo 2 (Li, et al., 2019), nello stress ossidativo (Rocha, et al., 2017), nel danno renale (Chen, et al., 2019), nell'osteoporosi (Min e Min, 2014) e in patologie cardiovascolari (Muscogiuri e Colao, 2017).

Negli animali da laboratorio gli ftalati sono causa di patologie della sfera riproduttiva (Meeker, et al., 2009), allergie e sviluppo di alcuni tumori, ma nell'uomo non ci sono evidenze di un effetto cancerogeno (Chou e Wright, 2006).

Nell'uomo e nella fauna selvatica è stata riconosciuta la cosiddetta sindrome da disgenesia testicolare (TDS) che si manifesta con criptorchidismo, ipospadia, inefficienza della spermatogenesi e tumore al testicolo (Pathirana, et al., 2011). Le alterazioni visibili istologicamente sono: tubuli seminiferi con spermatogenesi incompleta, tubuli con solo cellule del Sertoli o tubuli con solo gonociti oppure tubuli di dimensioni ridotte e pareti ialine, privi di entrambe le cellule- del Sertoli e germinali (Grieco, et al., 2008).

Anche nel cane è stata riportata questa sindrome, ed è stata approfondita da uno studio fatto in Italia su un campione di 8 cani di diverse razze ed età a cui era stata diagnosticata TDS. Per ogni caso sono state valutate *in vitro*, dopo prelievo del tessuto, le principali alterazioni a carico del tubulo seminifero, l'iperplasia delle cellule di Leydig e il tipo di tumore eventualmente presente (Tabella 7). Dallo studio si nota come le alterazioni

possano non essere necessariamente simmetriche nei due testicoli, che l'anomalia più frequente è la mancanza di spermatozoi all'interno dei tubuli e che la neoplasia più diffusa è il seminoma (Grieco, et al., 2008).

Tabella 7. Rilievi patologici tipici della TDS analizzati in 8 cani. L'alterazione più frequente è la mancanza di spermatozoi all'interno dei tubuli e il seminoma è la neoplasia più spesso associata a questa sindrome (Grieco, et al., 2008)

Case no.	Age (years)	Breed	Testis	Seminiferous tubules					LCH ^a	Tumor
				With spermatozoa	Without spermatozoa	Sertoli cell only	Atrophic	CIS		
1	11	Mixed breed	A	+	++	-	++	Absent	Present	Seminoma D ^b
			B	-	++++	-	+	Present	Present	Seminoma I ^c
2	8	Boxer	A	-	++	+	+++	Present	Absent	Seminoma I
			B	++++	+	-	-	Absent	-	-
3	15	Breton	A	++	+++	-	+	Present	Absent	Seminoma I
			B	++	++	-	+	Present	Present	Seminoma I
4	16	Mixed breed	A	+	+	-	+++	Present	Present	Seminoma I
			B	+++	+	-	+	Present	Absent	Seminoma D
5	14	Sharpei	A	+	++	++	+++	Present	Present	Seminoma I
			B	+++	+	-	+	Present	Present	Seminoma I
6	12	Poodle	A	-	++++	-	-	Present	Absent	Leydig cell tumor
			B	+	+++	-	+	Present	Present	seminomas D
7	9	Boxer	A	+++	+	-	+	Present	Absent	Seminoma I
			B	-	-	+	++++	Present	Present	-
8	10	Giant dane	A	-	-	++	++	Present	Present	Seminoma I
			B	+	+	++	+	Present	Present	Seminoma I and Leydig cell tumor

Gli studi sugli animali da compagnia svolti finora sono incentrati soprattutto sugli effetti degli ftalati sull'apparato riproduttivo del cane maschio.

È stato condotto uno studio *in vitro* su cellule interstiziali testicolari di cane con l'obiettivo di dimostrare gli effetti dei metaboliti monobutil ftalato (MBP) e mono-(2-etilexil) ftalato (MEHP) sulla secrezione di testosterone e insulin-like peptide 3 (INSL3), entrambi ormoni coinvolti nel meccanismo della discesa del testicolo. Le cellule, ottenute da testicoli di 26 cani sani e 16 criptorchidi mediante orchietomia, sono state trattate con MBP e MEHP al dosaggio rispettivo di 0, 0.8 e 8 mmol/L e 0, 0.2 e 0.8 mmol/L. Successivamente, sulla base di un gruppo controllo, sono stati misurati gli effetti dei due monoesteri ai relativi

dosaggi sulla secrezione di testosterone (basale e hCG indotta) e sulla secrezione basale di INSL3. I risultati (Figura 10) hanno rivelato che entrambi i monoesteri hanno un effetto significativo di inibizione di testosterone hCG indotto e INSL3, mentre MEHP causa un aumento del testosterone basale. Inoltre è stato dimostrato che non vi erano differenze nella secrezione dei due ormoni tra cellule da testicoli normali e da testicoli criptorchidi (Pathirana, et al., 2011).

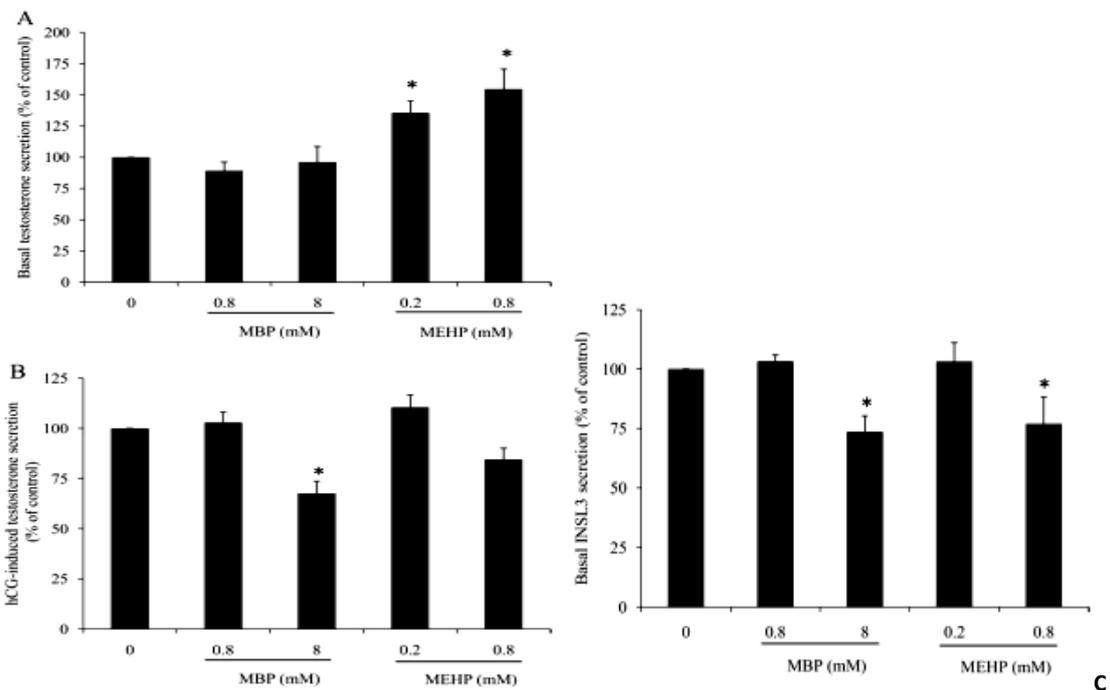


Figura 10. Effetti della somministrazione a di diverse concentrazioni (μM) dei due monoesteri degli ftalati MBP e MEHP sulla secrezione di testosterone basale (A) e hCG-indotta (B), e sulla secrezione di INSL3 (C) su cellule testicolari di cane, in rapporto percentuale su un gruppo controllo (Pathirana, et al., 2011)

Un altro effetto che è stato preso in esame relativamente all'apparato riproduttivo maschile nella specie canina è il cambiamento di composizione e motilità dello sperma dopo esposizione agli ftalati. È stato fatto a questo proposito uno studio comparativo sul cane e sull'uomo in cui sono stati scelti come donatori 9 uomini e 11 cani. Lo sperma è stato prelevato e successivamente trattato con DEHP e sono stati misurati motilità e frammentazione del DNA. I risultati sono stati simili nell'uomo e nel cane, e hanno dimostrato un'alterazione di entrambi i parametri dopo esposizione, sia singola sia

insieme a PCB 153. La frammentazione del DNA avveniva in maniera dose-dipendente in caso di esposizione alla singola sostanza, ma questa correlazione non si verificava quando erano combinate (Sumner, et al., 2019). L'obiettivo principale di questo studio era capire se la specie canina potesse essere una sentinella degli effetti sull'uomo (e si è concluso con un risultato positivo), ma ha fornito comunque dati utili per comprendere gli effetti dannosi di queste sostanze sulla salute del cane.

Al momento non ci sono studi rivolti ad altri effetti degli ftalati sul cane, ma si sospetta che queste sostanze siano tra i fattori responsabili di obesità e diabete mellito (Banfield, 2012).

Gli studi sulla specie felina sono ancora pochi, ma si pensa che gli ftalati siano coinvolti, insieme ad altri interferenti endocrini, nella patogenesi dell'ipertiroidismo felino (Peterson, et al., 2012).

CAPITOLO 6: I policlorobifenili (PCB) e i polibromodifenileteri (PBDE)

6.1: Struttura e meccanismo d'azione

I PCB e i PBDE sono due gruppi di sostanze di sintesi. In entrambi si contano 209 diversi congeneri, che hanno come struttura comune degli anelli bifenili, attorno ai quali si dispongono atomi di cloro in posizione -orto, -meta o -para nei PCB, o atomi di bromo nei PBDE (Figura 11) (Carpenter, 2006; Luthe, et al., 2008). In base agli angoli di legame, i PCB possono essere divisi in complanari e non complanari, mentre nei PBDE non vi è questa distinzione perché sono tutti non complanari (Luthe, et al., 2008); inoltre il legame Cl-C ha energia maggiore rispetto al legame Br-C (Wang, et al., 2011). Queste differenze strutturali sono alla base delle caratteristiche biochimiche individuali dei congeneri, della diversa affinità recettoriale e del loro metabolismo.

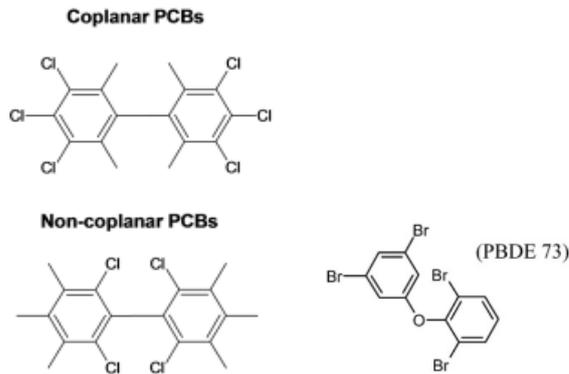


Figura 11. Struttura generica dei PCB coplanari e non coplanari, e dei PBDE (in questo caso è stato riportato il PBDE 73 a titolo di esempio). Si notino i legami Cl-C e Br-C disposti attorno agli anelli bifenili, che caratterizzano i due gruppi di congeneri (Yilmaz, et al., 2020; Luthe, et al., 2008)

I PCB furono ampiamente prodotti e utilizzati a partire dagli anni '20, ma le evidenze di effetti dannosi furono ben presto chiare e il loro impiego fu proibito a partire dalla fine degli anni '70. Tuttavia sono ancora molto presenti a livello ambientale. Sono composti semi-volatili e possono migrare dal materiale all'ambiente (Grimm, et al., 2015).

I PBDE vengono utilizzati come ritardanti di fiamma in vari materiali, perché con l'applicazione di calore si decompongono prima della matrice polimerica in cui sono inseriti, prevenendo così la formazione di gas infiammabili (Troitzsch, 1990). Sono incorporati nei polimeri mediante legami covalenti (Bergman, 1989) e anche in questo caso alcuni possono essere rilasciati dal materiale nell'ambiente (Rahman, et al., 2001).

Per la loro resistenza alla degradazione microbica ambientale sono classificati tra i POP e come tali sono soggetti a fenomeni di bioaccumulo e biomagnificazione (Rahman, et al., 2001). Sono stati trovati in concentrazioni rilevanti nel tessuto adiposo dell'uomo (Stanley, et al., 1991) e di varie specie animali, sia terrestri che acquatiche, con una correlazione positiva tra sviluppo di tessuto adiposo e concentrazione delle molecole (Sellstrom, et al., 1993). La loro presenza è stata riscontrata anche nel tessuto adiposo dei cani e dei gatti ed è stato osservato che le concentrazioni maggiori si avevano nei gatti, sia a causa della maggior capacità dei cani di eliminare queste sostanze, sia ad una probabile maggior esposizione della specie felina legata alle abitudini di grooming (Storelli, et al., 2009). Oltre al passaggio nella catena alimentare, queste molecole possono legarsi a particelle ambientali, attraversare la barriera alveolare e permanere nei

polmoni per molto tempo (Kim, et al., 2014); le particelle di diametro fino a 1 μm possono passare dagli alveoli polmonari al circolo sistemico (Rundell, et al., 2007). La loro resistenza alla degradazione da parte del metabolismo degli organismi dipende dalla struttura della molecola (Luthe, et al., 2008), e gli effetti avversi possono essere dati sia dalla molecola sia dai metaboliti intermedi (Grimm, et al., 2015).

I PCB non complanari hanno una struttura simile al 17- β estradiolo e per questo si legano ai recettori ER con azione estrogenica (Sumner, et al., 2019), mentre i PCB complanari hanno effetto anti-estrogenico (Gore, et al., 2001), con inibizione della coniugazione del 17- β estradiolo (Sharpe e Irvine, 2004).

I PCB agiscono anche sulla tiroide, provocando la diminuzione dei livelli di T_4 sierico secondo i seguenti meccanismi: legame dei PCB con le proteine di trasporto degli ormoni tiroidei, riduzione della produzione di T_4 o aumento della sua eliminazione, e riduzione della conversione del T_3 in T_4 (McKinney, et al., 1994). Data l'analogia strutturale tra i PBDE e gli ormoni tiroidei, ci può essere un'interazione diretta tra queste molecole con effetti di agonismo o antagonismo in base al congenere in questione (Luthe, et al., 2008).

I PCB complanari hanno un'elevata affinità per i recettori degli idrocarburi arilici (AhR), mentre per i PBDE è stato dimostrato un debole effetto di antagonista su questi recettori. Inoltre PCB e PBDE si legano ai recettori del pregnano (PXR). Il coinvolgimento degli AhR e dei PXR è responsabile degli effetti di IE da parte di PCB e in minor parte PBDE sul sistema immunitario, sul metabolismo lipidico e sulle cellule del sangue (Luthe, et al., 2008; Leijds, et al., 2009).

Inoltre è stata vista un'interazione dei PCB e dei PBDE con i recettori dei glucocorticoidi (GR) rispettivamente di agonismo e di antagonismo (Johansson, et al., 2005), e con i recettori del GABA (Mariussen e Fonnum, 2001).

Tra i mammiferi, il cane è l'animale che è maggiormente in grado di eliminare PCB, PBDE e gli altri POP, infatti sono presenti sempre in minor concentrazione, non solo a parità di esposizione, ma anche successivamente a dosi maggiori, come hanno evidenziato due studi comparativi eseguiti in Spagna rispettivamente con l'uomo (Ruiz-Suárez, et al., 2016) e con il gatto (Ruiz-Suárez, et al., 2015). Anche nel fegato e nel tessuto adiposo del

cane è stato documentato un minor accumulo di PCB e PBDE rispetto al gatto, seppur entrambe le specie fossero state soggette alla medesima esposizione (Kunisue, et al., 2005).

Questa differenza è stata oggetto di molti studi dai quali si è concluso che il cane possiede enzimi specifici, principalmente sottofamiglie del CYP2B e CYP2C, che catalizzano le reazioni che portano alla formazione di metaboliti intermedi e all'eliminazione di molte sostanze tra cui i POP. Grazie a questo corredo enzimatico, il cane è quindi in grado di metabolizzare ed eliminare i PCB, i PBDE e la maggior parte dei POP molto più rapidamente rispetto agli altri mammiferi, che invece non possiedono le medesime sottofamiglie di questi enzimi (Duignan, et al., 1987; Aryoshi, et al., 1992). Questa caratteristica è propria non solo del cane domestico, ma dei canidi più in generale come ha dimostrato uno studio sulle volpi (Georgii, et al., 1994).

Inoltre è stata dimostrata nella specie felina una correlazione tra la presenza delle endocrinopatie acromegalia e diabete di tipo 2, ed efficienza nel metabolismo dei PCB e PBDE. È stato infatti osservato che nei gatti con diabete di tipo 2 indotto da acromegalia i livelli hanno minor capacità di accumulare alcuni POP rispetto ai gatti con diabete di tipo 2 non indotto da acromegalia, e ai gatti sani. Sono necessari ulteriori studi per approfondire i meccanismi, ma probabilmente questa differenza è dovuta al ruolo dell'ormone della crescita (GH), presente in eccesso negli animali con acromegalia, che da una parte sovrastimola l'attività del fegato con un conseguente aumento del metabolismo delle sostanze, dall'altra aumenta l'attività degli enzimi del citocromo, in particolare CYP3A4 e CYP2B6, deputati alle reazioni di fase II (Dirtu, et al., 2013).

6.2: Fonti di esposizione

I PCB sono stati usati in passato come fluidi dielettrici, scambiatori di calore, trasformatori e condensatori. I loro effetti nocivi e di bioaccumulo sono noti da diversi anni, tant'è che il loro impiego è vietato dagli anni '70 (Zhao, et al., 2010); i PBDE sono dei ritardanti di fiamma presenti in molti prodotti di uso quotidiano (Dye, et al., 2007) come PVC e polipropilene, cavi e apparecchiature elettriche di vario tipo, schiuma di poliuretano

(Rahman, et al., 2001). Tendono ad accumularsi nell'ambiente, in particolare nel sottosuolo e nei sedimenti, con una distribuzione che risente di diversi fattori quali le caratteristiche biochimiche e il trasporto atmosferico a lungo raggio (LRAT) del congenere in questione, le proprietà del suolo, il clima e le caratteristiche territoriali e i processi di scambio tra suolo ed aria atmosferica (Schuster, et al., 2011). Una fonte di contaminazione ambientale importante deriva dal deposito di rifiuti elettronici, che spesso vengono portati da paesi industrializzati verso paesi meno industrializzati. Nel 2017, per esempio, l'80% dei rifiuti elettronici prodotti a livello mondiale è stato portato nei paesi meno sviluppati del continente asiatico, in cui sono state riscontrate delle concentrazioni elevate di queste molecole nel suolo e nei sedimenti (Lu, et al., 2021). Al contrario, in Europa Settentrionale, uno studio comparativo eseguito tra concentrazione nel suolo di PCB e PBDE negli anni 1998 e 2008 ha rivelato una diminuzione significativa dei livelli di PBDE e una riduzione, seppur meno marcata, dei livelli di PCB (Schuster, et al., 2010). Un altro studio comparativo eseguito su campioni di aria ambiente ha evidenziato una diminuzione delle concentrazioni totali delle due molecole negli anni 2004-2008. In entrambi i casi la riduzione è stata favorita sia dalla degradazione ambientale, sia dalla forte limitazione nell'utilizzo di queste molecole (Schuster, et al., 2011).

In seguito all'accumulo ambientale queste molecole possono essere assorbite dai vegetali, e passare così nella catena alimentare. È stato analizzato questo processo prendendo la pianta del mais come modello e sono state osservate delle differenze nell'assorbimento e nel metabolismo delle due sostanze. Si è visto in particolare che i PBDE hanno un accumulo maggiore nelle radici perché dotati di un coefficiente di ripartizione maggiore rispetto ai PCB con la stessa sostituzione dell'alogeno, ma che i PCB vengono più facilmente trasportati dalle radici alla pianta. Inoltre il metabolismo, che consiste principalmente in reazioni di dealogenazione e riarrangiamento degli atomi di bromo nei PBDE e degli atomi di cloro nei PCB, ha dimostrato essere più marcato nella debrominazione dei PBDE a causa della minor energia del legame Br-C (Wang, et al., 2011).

Le fonti di esposizione principali ai PCB e PBDE sono gli alimenti e la polvere ambientale, sia per l'uomo sia per gli animali domestici (Dye, et al., 2007). Nell'uomo si è visto che la

via inalatoria, soprattutto per i PCB, è più rilevante rispetto alla via orale (Robertson e Ludewig, 2011).

Relativamente agli animali domestici, in uno studio eseguito in Francia su 8 gatti, sono state misurate le concentrazioni sieriche di PCB e PBDE e le concentrazioni di queste sostanze nel cibo e nell'ambiente. Nel siero sono stati rilevati 18 PCB, con concentrazione totale compresa tra 1406 e 4274 ng L⁻¹, con una prevalenza del CB 153; i PBDE erano presenti in un range di 2.4-34.7 ng L⁻¹, in particolare BDE 153/154, seguito da BDE 47, BDE 99/100 e BDE 28. Nell'aria ambiente è stata misurata una concentrazione totale di PCB di 1.5 ng/m³, con una prevalenza dei PCB a basso peso molecolare CB 28 e CB 52; i PBDE erano alla concentrazione di 0,071 ng/m³ e i più rappresentati erano BDE 209, BDE 47 e BDE 99/100. Negli alimenti esaminati sono stati riscontrati PCB e PBDE alle concentrazioni rispettive di 1.7 ng g⁻¹ e 0,088 ng g⁻¹ e le molecole maggiormente presenti erano CB 153 e CB 52 per i PCB e BDE 47 e BDE 153/154 per i PBDE. Quindi la fonte di esposizione più rilevante è sicuramente l'alimentazione, ma anche la presenza di queste sostanze a livello ambientale costituisce un'importante via di ingresso (Braouezec, et al., 2016). I risultati ottenuti sono in linea con quelli rilevati in altri studi in Europa (Ruiz-Suárez, et al., 2015), mentre ci sono differenze rilevanti con gli studi fatti negli USA (Dye, et al., 2007) a causa dei diversi limiti di legge per queste sostanze.

In uno studio è stato stimato il contenuto di PBDE testando una varietà di alimenti commerciali secchi e umidi in lattina per gatti. I risultati (Tabella 8) hanno dimostrato che gli alimenti con un maggior contenuto totale di PBDE erano quelli a base di pesce, e questo è in linea con i fenomeni di biomagnificazione dei POP attraverso gli animali marini. Negli alimenti umidi le molecole più presenti sono state BDE 47 e 99, mentre negli alimenti secchi il BDE 209 era il più presente, ed in questo caso si è ipotizzato che derivasse dai processi di lavorazione del prodotto piuttosto che dalla materia prima (Dye, et al., 2007).

Tabella 8. Concentrazioni totali di PBDE (Σ PBDE) e di alcuni congeneri in campioni di alimenti per gatti. Le concentrazioni maggiori sono state riscontrate negli alimenti a base di pesce (Dye, et al., 2007)

	Σ PBDE (ng/g wet wt)	BDE- 47 (ng/g wet wt)	BDE- 99 (ng/g wet wt)	BDE-100 (ng/g wet wt)	BDE- 153+154 (ng/g wet wt)	BDE-183 (ng/g wet wt)	BDE-207 (ng/g wet wt)	BDE-209 (ng/g wet wt)
Canned food								
turkey-combo ^a	0.36 ± 0.19	0.06	0.04	0.02	0.03	0.07	0.06	0.02
chicken ^a	0.31 ± 0.06	0.13	0.04	0.03	0.02	0.02	0.006	0.009
chicken-combo ^a	0.17 ± 0.07	0.06	0.04	0.014	0.009	0.003	0.003	0.025
beef	0.36 ± 0.04	0.16	0.05	0.03	0.02	0.04	0.01	0.003
tuna	0.58 ± 0.09	0.25	0.13	0.05	0.04	0.02	0	0.01
whitefish	1.00 ± 0.20	0.26	0.05	0.05	0.08	0.19	0.06	0.04
salmon ^a	1.25 ± 0.03	0.80	0.08	0.15	0.04	0.01	0.002	0.008
seafood buffet	1.75 ± 0.02	1.09	0.20	0.20	0.06	0.007	0.003	0.016
Dry food								
chicken	0.6 ± 0.1	0.05	0.03	0.01	0.007	0.01	0.01	0.42
salmon	1.5 ± 0.1	0.06	0.03	0.01	0.005	0.03	0.04	1.04
poultry and fish	2.1 ± 0.4	0.04	0.04	0.01	0.009	0.009	0.03	1.89
adult	2.9 ± 0.1	0.06	0.08	0.02	0	0.06	0.07	2.28

In un altro studio, in cui sono stati analizzati campioni di pet food destinati a cani e gatti, è emerso che i PCB maggiormente presenti erano PCB 28 e PCB 52, alle concentrazioni rispettive di 5.54 ng/g e 1,81 ng/g negli alimenti per cani e di 1.81 ng/g e 0.41 ng/g negli alimenti per gatti. È stata poi stimata un'assunzione media giornaliera di PCB di 101.8 ng/Kg di peso vivo per i cani e 43.8 ng/Kg per i gatti e, nonostante la maggior assunzione giornaliera stimata nei cani, dalla misurazione delle concentrazioni sieriche di PCB sono stati rilevati valori più alti nei gatti, a causa della maggior capacità metabolica della specie canina nell'eliminazione dei POP (Ruiz-Suárez, et al., 2015).

Attualmente, a seguito delle evidenze sull'azione di IE da parte di queste sostanze, il loro uso è fortemente limitato. A livello europeo vige il Regolamento (UE) 2019/1021, che è una modifica del precedente Regolamento (CE) 850/2004. Il regolamento fissa dei limiti in cui queste sostanze possono essere presenti nei prodotti industriali e fornisce delle norme per lo smaltimento dei rifiuti contaminati (Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea, 2019).

Le limitazioni nell'impiego dei PBDE come ritardanti di fiamma hanno portato a partire dal 2004, anno in cui era stato applicato il Regolamento (CE) 850/2004, ad un aumento nell'utilizzo dei ritardanti di fiamma organofosfati, soprattutto il tris (1-cloro-2-propil) fosfato (TCPP), tris (1,3-dicloro-2-propil) fosfato (TDCPP) e trifenilfosfato (TPP), il cui

accumulo è stato osservato nella polvere domestica e nella schiuma per mobili. Gli effetti di queste molecole sono sotto stretta osservazione, perché è probabile che siano i medesimi prodotti dall'esposizione ai PBDE (Stapleton, et al., 2009).

6.3: Effetti

Nell'uomo i PCB e i PBDE possono causare sindromi metaboliche quali l'obesità (Carpenter, 2013) e il diabete di tipo 2 (Ruiz, et al., 2018) ed essere causa di problematiche dell'apparato riproduttivo maschile (Sumner, et al., 2019). In soggetti con livelli di tireotropina sierica molto bassi, sono state trovate concentrazioni elevate di tiroxina e triiodotironina e anche di PCB, dimostrando quindi una correlazione tra ipertiroidismo subclinico sporadico e PCB (Langer, et al., 2007). Queste molecole sono responsabili di disordini ematologici e a carico dell'immunità innata negli adolescenti esposti nel periodo prenatale (Leijs, et al., 2009). Inoltre si sospetta che siano responsabili di mutazioni genetiche coinvolte nello sviluppo dell'autismo (Mitchell, et al., 2012).

Molti PBDE hanno una struttura simile a quella dell'ormone tiroideo T₄ ed è questa probabilmente la causa degli effetti di queste sostanze sulla tiroide osservati nei topi e nella fauna selvatica. Dagli anni '80 sia nell'uomo sia nei gatti si è vista una correlazione tra aumento dei casi di ipertiroidismo e aumento delle concentrazioni dei PBDE nell'ambiente, quindi queste sostanze sono probabilmente coinvolte. Il gatto è l'unico mammifero oltre all'uomo in cui sono stati osservati casi di ipertiroidismo e spesso nei gatti con questa patologia sono stati misurati livelli significativi di PBDE (Dye, et al., 2007).

La specie felina è considerata una sentinella per gli effetti dei PBDE nella genesi dell'ipertiroidismo nell'uomo. Uno studio svolto negli USA con questo obiettivo, ma che ha anche fornito informazioni di interesse veterinario, ha misurato i livelli di alcune classi di PBDE (Figura 12) nel siero di 23 gatti con diverse caratteristiche: 11 ipertiroidei, 7 non ipertiroidei e 5 giovani. I PBDE più presenti erano BDE 47, 99, 100, 153, 154, 183, 207, 208, 209; sono stati rilevati inoltre altri PBDE, ma con frequenza incostante e a basse concentrazioni. Si è visto che le concentrazioni totali di PBDE nei gatti giovani, non ipertiroidei e ipertiroidei erano rispettivamente 4.3, 10.5 e 12.7ng/mL, e che BDE 47 e 99

erano prevalenti in tutte e tre le categorie, con concentrazioni rilevanti nei gatti anziani e ipertiroidei (Dye, et al., 2007).

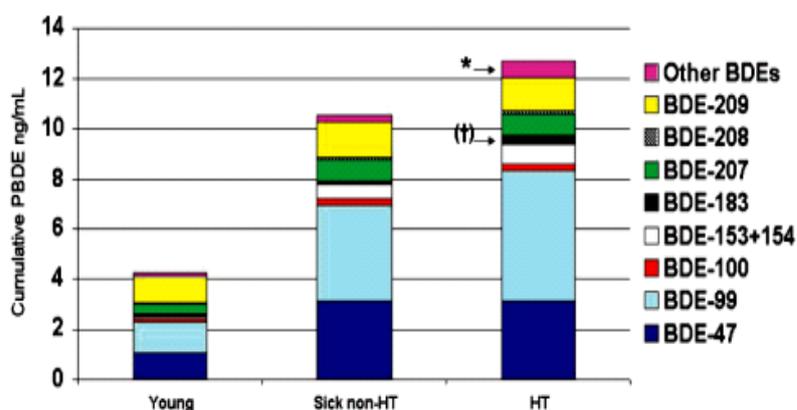


Figura 12. Principali classi di PBDE e relative concentrazioni (ng/mL) nel siero dei gatti giovani Young), anziani non ipertiroidei (Sick non-HT) ed ipertiroidei (HT) (Dye, et al., 2007)

In un altro studio condotto in Svezia su un gruppo di gatti, ha identificato il BDE 209 come molecola prevalente, seguito da BDE 207, 99 e 47. Il limite di questo studio è stato che non si è trovata una correlazione positiva tra concentrazioni di PBDE e ipertiroidismo. Successivamente è stato misurato il livello di PBDE sierici anche nell'uomo e sono stati ottenuti risultati simili, ad indicare che molto probabilmente le fonti di esposizione sono le medesime (Kupryianchyk, et al., 2009).

I PCB causano una riduzione della motilità degli spermatozoi nel suino e nell'uomo (Campagna, et al., 2009). Anche nel cane è stato osservato questo effetto, ed è proprio questa specie che è oggetto di interesse in qualità di sentinella per l'uomo. In uno studio comparativo tra cane e uomo è infatti stato dimostrato come l'esposizione combinata allo ftalato DEHP e al PCB 153 sia causa in entrambe le specie di una diminuita motilità degli spermatozoi e ad una maggior frammentazione del DNA *in vitro* (Sumner, et al., 2019).

Da un recente studio è emerso che l'elevata capacità del cane nel metabolizzare rapidamente i POP, può essere in alcuni casi un evento dannoso. Ciò avviene perché in questa specie i principali metaboliti di fase I dei PCB sono intermedi idrossilati (OH-PCB) i quali, avendo una struttura simile agli ormoni tiroidei, possono legarsi alle proteine di trasporto degli ormoni tiroidei, passare la barriera emato-encefalica grazie alla loro

lipofilicità e raggiungere il cervello, esercitando un'azione tossica. Per lo studio è stato preso un gruppo di cani Beagle, che sono stati trattati con una miscela di PCB e sottoposti ad eutanasia, e dai quali successivamente sono stati prelevati campioni di tessuto cerebrale. È stata confermata la presenza di OH-PCB nel cervello e, dall'esame dei mitocondri, è stato dimostrato che questi composti causano disaccoppiamento della fosforilazione ossidativa nelle cellule cerebrali tramite inibizione della catena di trasporto degli elettroni, inibizione dell'ATP-asi, oppure inibizione dei complessi mitocondriali III, IV e V che sono responsabili del mantenimento del gradiente di membrana. Saranno necessari ulteriori studi sugli effetti della carenza di ATP a livello cerebrale nel cane, ma si sospetta che possa essere alla base dell'alterazione del ciclo dell'urea con conseguente iperammoniemia, causare deficit nelle funzioni cognitive, essere coinvolto nella genesi di malattie neurodegenerative o alterare il metabolismo di alcune macromolecole biologiche, come è stato già osservato in altre specie (Nomiya, et al., 2019).

CAPITOLO 7: I pesticidi

7.1: Struttura e meccanismo d'azione

I pesticidi sono sostanze di sintesi impiegate in agricoltura con lo scopo di eliminare la presenza di funghi, piante o animali che possono essere dannosi per la coltura. Agiscono selettivamente su sistemi metabolici presenti unicamente nelle specie bersaglio, pertanto non dovrebbero essere tossici per gli altri organismi (Combarous, 2017). Tuttavia possono avere degli effetti dannosi anche su uomo e animali: da tossicità acuta, oppure di interferenza endocrina dopo esposizione prolungata, ed alcuni di essi possono essere attivi già a basse dosi (Hayes, et al., 2003).

Hanno una struttura chimica molto varia e per la maggior parte sono piccole molecole con p.m. compreso tra 300 e 2000 Da (Combarous, 2017). Data la loro elevata liposolubilità, tendono ad accumularsi a lungo nell'ambiente e nel tessuto adiposo degli organismi, per questo sono classificati tra i POP (Gautam, et al., 2020). La maggior parte di essi ha un'emivita ambientale fino a 20 anni per una completa degradazione microbica (Lintelmann, et al., 2003). In particolare, 8 pesticidi fanno parte della cosiddetta "Dirty

Dozen”, che sono un gruppo di 12 sostanze con elevata tossicità e marcata persistenza ambientale (UNEP, 2004). I fenomeni di accumulo e di interferenza endocrina riguardano anche i metaboliti delle sostanze in questione (Lintelmann, et al., 2003).

In base all’organismo bersaglio i pesticidi si dividono in: insetticidi, fungicidi, erbicidi, anticrittogamici, nematocidi, acaricidi e fitoregolatori (www.issalute.it). A loro volta gli insetticidi possono essere divisi sulla base della loro struttura chimica nelle seguenti classi: organofosforici (OP), organoclorurati (OC), carbamati e piretroidi (Yilmaz, et al., 2020).

I pesticidi organoclorurati (OC) comprendono un ampio gruppo di sostanze tra cui il DDT e l’aldrina, che hanno come elemento strutturale in comune la presenza di gruppi cloro. Sono altamente lipofili quindi tendono ad accumularsi nell’ambiente e nel tessuto adiposo degli organismi esposti (Martyniuk, et al., 2020).

I pesticidi organofosforici (OP) e i carbamati (tra cui il propoxur) vengono identificati come inibitori delle colinesterasi (IDC) per il loro effetto sull’enzima acetilcolinesterasi degli organismi bersaglio. Sono esteri rispettivamente dell’acido fosforico e dell’acido carbamico (Mengozi e Soldani, 2010).

I piretroidi sono analoghi sintetici delle piretrine presenti in natura nei fiori del piretro e rispetto a questi ultimi sono stati modificati per essere più stabili nell’ambiente. Sono molecole lipofile ma hanno un rapido metabolismo (Mengozi e Soldani, 2010).

Ci sono poi gli insetticidi di seconda generazione come il fipronil, che viene applicato principalmente a livello cutaneo dei cani e dei gatti, e grazie alla sua lipofilità si dissolve nel sebo dopo l’applicazione e si distribuisce in tutto il corpo ed agisce sul sistema nervoso degli artropodi indesiderati (Suzuki, et al., 2021). Altra categoria di insetticidi tra i più impiegati sono i neonicotinoidi tra i quali il più importante, l’imidacloprid, si lega selettivamente ai recettori dell’acetilcolina nel SNC degli insetti (Salis, et al., 2017). Il loro ampio utilizzo in agricoltura, al di là dell’utilità nell’eliminare insetti dannosi, è anche una delle maggiori cause della mortalità delle api (Henry, et al., 2012) che è ormai diventata una problematica ecologica rilevante.

Uno dei primi pesticidi prodotti nel secolo scorso è stato il diclorodifeniltricloroetano (DDT) nel 1939 (Mnif, et al., 2011), ma le rapide evidenze di effetti tossici e di interferenza endocrina sull'uomo e sull'ambiente ha fatto sì che il suo impiego fosse vietato in molti paesi già dagli anni '70; tuttavia viene ancora oggi impiegato nei paesi in cui vi è ancora la malaria, perché è molto attivo contro gli insetti responsabili (Lintelmann, et al., 2003).

La loro azione di interferenti endocrini avviene secondo i seguenti meccanismi: possono mimare gli ormoni endogeni e legarsi ai loro recettori cellulari, alterare il numero di recettori, o possono antagonizzare l'azione ormonale legandosi all'ormone stesso, ai recettori o alle proteine di trasporto (Cheek, et al., 1999).

Da uno studio condotto *in vitro* in cui sono stati analizzati 200 pesticidi, è emersa un'attività di trascrizione mediata dai recettori ER α per 47 sostanze, dai recettori ER β per 33 sostanze, 11 recettore degli idrocarburi arilici (AhR) e per ben 106 pesticidi trascrizione mediata dai recettori del pregnano (PXR) (Kojima, et al., 2011). Alcuni possono agire sul metabolismo o sull'attività degli ormoni tiroidei (Porter, et al., 1993; Verreault, et al., 2004). Inoltre, si è vista un'attività della maggior parte dei pesticidi sui recettori dei glucocorticoidi GR. In uno studio *in vitro* del 2016 è stata misurata l'attività sui recettori GR di cellule umane da parte di 34 pesticidi e dei loro metaboliti. I risultati hanno dimostrato attività GR-antagonista da parte dei metaboliti del DDT (i più potenti da questo punto di vista), dei piretroidi e dell'atrazina. Questo si traduce in una riduzione dell'espressione, nel fegato e in altri organi, dei geni coinvolti nella sintesi e metabolismo dei glucocorticoidi (Zhang, et al., 2016).

Gli OC hanno debole attività estrogenica e marcata azione anti-androgena (Martyniuk, et al., 2020). *In vitro* gli OC hanno una maggior affinità per i recettori ER β rispetto agli ER α (Nakashima, et al., 2013), mentre il p-p DDE (metabolita del DDT) e la vinclozolina (che è un fungicida) si legano soprattutto ai recettori AR con azione antagonista ed effetto finale anti-androgeno (Kojima, et al., 2004).

Studi *in vitro* hanno dimostrato che per alcune di queste sostanze può esserci un effetto miscela con azione additiva o di sinergismo (Birkhoj, et al., 2004; Combarous, 2017) e questo è un importante fattore da considerare in termini di rischio.

In uno studio svolto in Turchia nel 2018 sono stati scelti 15 gatti e 21 cani di diverse età, tutti esenti da patologie, e dopo prelievo di sangue sono state misurate le concentrazioni dei pesticidi organoclorurati α -HCH, β -HCH, γ -HCH, HCB, aldrina, 2.4'-DDT, 2.4'-DDE, 4.4'-DDT e 4.4'-DDE. Tutte le molecole sono state trovate in almeno un campione di sangue e si è visto che nei gatti erano presenti in concentrazioni maggiori. Questo è probabilmente dovuto al metabolismo che porta all'eliminazione degli OC, che è più efficiente nella specie canina rispetto a tutte le altre specie, gatto compreso (Yavuz, et al., 2018). Un altro studio che conferma una differenza nel metabolismo dei pesticidi tra specie canina e felina è stato eseguito su un campione di 42 cani e 35 gatti; in un primo momento sono state misurate le concentrazioni di OC nella dieta e successivamente le concentrazioni plasmatiche di 19 organofosforici negli animali. Nonostante le diete per cani avessero un contenuto di OC maggiore, le concentrazioni plasmatiche più elevate sono state rilevate nei gatti, nei quali c'è un metabolismo di eliminazione dei POP più lento è quindi un maggior bioaccumulo (Ruiz-Suárez, et al., 2015).

7.2: Fonti di esposizione

L'esposizione ai pesticidi è una delle maggiori forme di inquinamento chimico dell'era moderna (Zhang, et al., 2016).

Sulla base degli effetti dannosi che sono stati osservati, l'utilizzo di molti pesticidi in particolare gli OC è stato vietato già da molti anni; tuttavia l'uomo e gli animali risentono ad oggi degli effetti derivanti dall'uso improprio che è stato fatto in passato e del conseguente accumulo ambientale (Gautam, et al., 2020), per questo si stanno cercando dei modi per evitare il più possibile l'esposizione e ridurre la persistenza ambientale (Martyniuk, et al., 2020). Le fonti di esposizione di maggior rilevanza sono cibo e acqua. Poiché queste sostanze sono soggette ai fenomeni di bioaccumulo e biomagnificazione attraverso la catena alimentare, l'uomo e gli animali da compagnia sono particolarmente esposti, soprattutto attraverso l'assunzione di carne, latte, pesce e altri alimenti altamente lipidici (Verner, et al., 2013). Anche i vegetali assorbono i pesticidi, sia direttamente sia dal suolo mediante le radici; le sostanze passano poi attraverso la catena alimentare, dapprima tramite ingestione da parte degli erbivori, poi possono arrivare

all'uomo e ad altri animali (Lintelmann, et al., 2003). Nell'uomo, il personale addetto ai trattamenti con pesticidi in agricoltura è più esposto, ma il rischio è basso se adeguatamente istruito (Blanco-Munoz, et al., 2016). La fascia di età più suscettibile all'esposizione è quella dei bambini dalla vita intrauterina fino alla pubertà, per i possibili danni nello sviluppo dell'apparato riproduttivo che è ancora in fase di sviluppo (Goldman, et al., 2000) e del SNC (Ribas-Fito, et al., 2003; Sharpe, et al., 2006). Inoltre, è importante in tutti i mammiferi il ruolo della lipomobilizzazione da parte della madre che avviene durante la gravidanza e l'allattamento (Waliszewski, et al., 2000).

Nell'acqua sono presenti in superficie, nel sottosuolo, nei laghi, fiumi e mari. Raggiungono l'acqua attraverso l'agricoltura (Pironti, et al., 2021) e vanno ad alimentare il pull di POP presenti nell'ambiente acquatico.

Così come per l'uomo, anche nel cane e nel gatto gli alimenti rivestono un ruolo importante nell'esposizione ai pesticidi. Uno studio fatto in Giappone nel 2014 (già citato relativamente ai fitoestrogeni) ha analizzato 15 diversi alimenti di cui 10 destinati ai cani, 3 ai gatti, 1 ai criceti e 1 ai pesci rossi e ha dimostrato il contenuto di residui dei pesticidi organoclorurati α -HCH, β -HCH, HCB e p.p'-DDE. Solo in 2 campioni sono stati trovati, ma il motivo non è noto. In più è stata misurata la loro attività estrogenica *in vitro* ed è emerso che, data la scarsa attività, probabilmente gli OC non sono i maggiori responsabili degli effetti estrogenici degli IE assunti con la dieta, come lo sono invece i fitoestrogeni o altre sostanze (Nakashima, et al., 2013).

In merito agli studi comparativi che vedono gli animali domestici come sentinelle per l'esposizione nell'uomo a contaminanti ambientali, nel caso dei pesticidi (soprattutto gli OC) si è visto che il cane non è una buona sentinella. È stato dimostrato da uno studio che la concentrazione plasmatica di OC nei cani era nettamente inferiore a quella dell'uomo, pur condividendo gli individui esaminati il medesimo ambiente. Questo è da imputare al differente metabolismo degli OC, più efficiente nel cane, oppure suggerisce che le due specie hanno nello stesso ambiente delle fonti di esposizione diverse (Ruiz-Suárez, et al., 2016).

La polvere domestica è un'altra importante fonte di esposizione ai pesticidi. Nel 2017, in Italia, è stata indagata la presenza di queste sostanze in 206 campioni di polvere da

appartamenti distribuiti nell'intero Paese ed è emerso (Figura 13) che i più rappresentativi erano il neonicotinoide imidacloprid, seguito da carbendazim (che è un fungicida) e propoxur e che l'ambiente domestico rappresenta un'importante fonte di esposizione soprattutto nei bambini e nei gatti per le loro abitudini (Salis, et al., 2017).

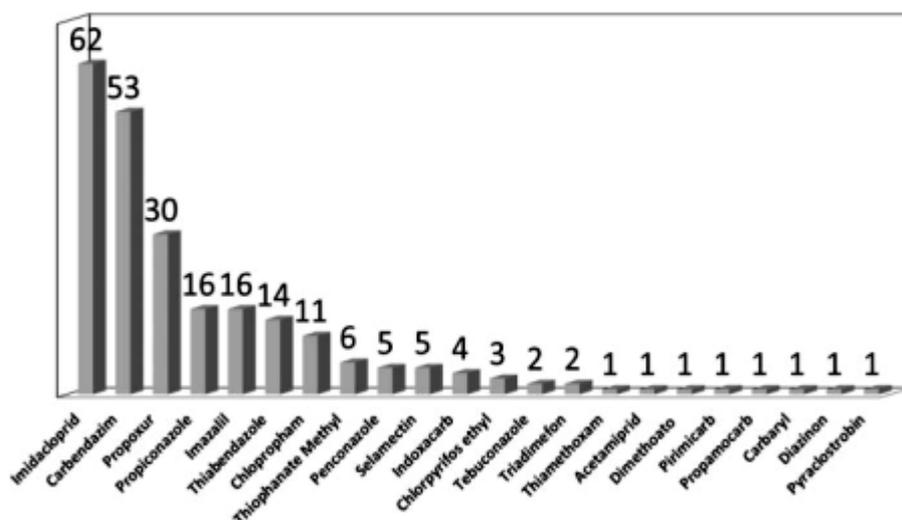


Figura 13. Principali pesticidi riscontrati nella polvere domestica. Imidacloprid, Carbendazim e Propoxur sono stati trovati nel maggior numero di campioni (Salis, et al., 2017)

Il contenuto massimo di residui di pesticidi nei o sui prodotti alimentari e mangimi di origine vegetale e animale è definito dal Regolamento (CE) 396/2005 e successive modifiche. Sono compresi anche gli alimenti per animali domestici (Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea, 2005). Per quanto riguarda l'immissione in commercio dei prodotti fitosanitari (intesi come pesticidi), invece, vige il Regolamento (CE) 1107/2009 (Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea, 2009).

7.3: Effetti

Dato l'accumulo di queste sostanze a livello ambientale, molte nozioni relative ai loro effetti dannosi sono state acquisite tramite osservazione della fauna selvatica. Sugli anfibi, per esempio, sono state studiate malformazioni alle gonadi maschili dopo esposizione all'atrazina e negli alligatori sono state viste malformazioni simili per effetto miscela di pesticidi organoclorurati e PCB (McKinlay, et al., 2008). Negli uccelli rapaci è

ben documentata la distruzione del processo di formazione dell'uovo per esposizione ad un analogo del DDT, il diclorodifenildicloroetilene (DDE) (Vos, et al., 2000). Nei pesci sono stati osservati danni neurologici, soppressione dell'asse riproduttivo, teratogenesi, immunosoppressione e alterazioni del metabolismo lipidico e nel salmone (*Salmo salar*) in particolare è noto che gli insetticidi carbamati interferiscono con il processo di smoltificazione, quindi, gli animali colpiti hanno minor capacità di adattarsi da acqua dolce ad acqua salata e vi è un conseguente aumento della mortalità (Martyniuk, et al., 2020)

I primi effetti di interferenza endocrina sull'uomo da parte dei pesticidi furono osservati già alla fine degli anni '40, quando fu individuata una correlazione tra abbassamento del numero di spermatozoi ed esposizione al DDT nel personale addetto alla vaporizzazione in agricoltura di questo pesticida (McKinlay, et al., 2008). In seguito furono riscontrati criptorchidismo e ipospadia nei figli di donne che lavoravano in agricoltura e in successivamente è stata dimostrata una correlazione tra criptorchidismo e persistenza di pesticidi nel latte materno (Mnif, et al., 2011). In uno studio svolto in Italia a posteriori sugli abitanti di varie aree rurali negli anni 1990-1992 ha rivelato una correlazione tra esposizione ai pesticidi di uomini impiegati in agricoltura e sviluppo di tumore alla prostata (Settimi, et al., 2003). Potrebbe anche esistere una correlazione tra esposizione ai pesticidi e incidenza di cancro al seno nelle donne (Cohn, et al., 2011) ma su questo aspetto sono necessari ulteriori studi.

Altri effetti studiati sempre in ambito di medicina umana riguardano: possibili problematiche nella fertilità maschile (Roeleveld, et al., 2008), correlazione con lo sviluppo di alcuni tumori (Garry, 2004), disordini riproduttivi (Garry, 2004), malformazioni genitali (Baskin, et al., 2001), difetti alla nascita (Schreinemachers, 2003), alterazioni dello sviluppo neurocomportamentale tramite azione sugli ormoni tiroidei (Fini, et al., 2017), interferenza con la funzione tiroidea (Langer, 2007), malattie neurodegenerative, turbe del metabolismo come diabete e obesità (Heindel, et al., 2017) e sistema immunitario (Martyniuk, et al, 2020). Uno studio condotto *in vitro* su colture cellulari umane ha mostrato un'azione nell'adipogenesi da parte dell'insetticida neonicotinoide imidacloprid, mediante attivazione dei recettori PXR (Mesnage, et al., 2018); inoltre l'esposizione a

questa categoria di insetticidi ha effetti teratogeni e può esserci una correlazione tra esposizione della madre e autismo nel figlio (Cimino, et al., 2017).

Negli animali da laboratorio, uomo e fauna selvatica sono stati osservati tumori ormone-dipendenti (McDuffie, 2005) e nei topi da laboratorio deficit riproduttivi femminili e maschili sia sull'animale esposto sia sulla progenie, ed alterazioni dello sviluppo nella progenie (Mikolić e Brčić Karačonji, 2018).

Con particolare riferimento al cane e al gatto, in letteratura sono presenti pochi studi relativi agli effetti dei pesticidi come interferenti endocrini, anche se si sospettano effetti analoghi a quelli delle altre specie.

Oltre ai pesticidi impiegati nell'ambiente, anche i comuni antiparassitari utilizzati per via topica nel cane e nel gatto rientrano in questa categoria di sostanze, e come tali si è visto che alcuni di essi possono avere effetti tossici e di interferenti endocrini. Uno studio a tal proposito è stato fatto sugli effetti del fipronil e del suo principale metabolita fipronil solfone nei topi da laboratorio. Negli animali domestici l'antiparassitario viene metabolizzato in fipronil solfone nel fegato, si distribuisce nel tessuto adiposo e in vari organi ed altera i livelli di serotonina e dopamina nel cervello con effetti neurocomportamentali come ha dimostrato lo studio. Sebbene sia necessario condurre delle ricerche specifiche sul cane e sul gatto, si sospetta che anche in queste specie avvengano gli stessi meccanismi, con conseguenze emotive e comportamentali (Suzuki, et al., 2021).

Nel cane è stato dimostrato l'effetto *in vitro* sulla motilità degli spermatozoi da parte dei seguenti pesticidi: metamidophos e clorpirifos (appartenenti al gruppo degli organofosforici), carbaril e propoxur (carbamati) e cipermetrina e flumetrina (piretroidi). I carbamati sono stati i pesticidi che hanno dato maggiori effetti tossici e tutti e tre i gruppi di sostanze hanno causato una diminuzione della motilità degli spermatozoi. Questo è causato dal legame delle molecole all'enzima acetilcolinesterasi e all'induzione dello stress ossidativo mitocondriale, entrambi coinvolti nel meccanismo della motilità degli spermatozoi (Yurdakök-Dikmen, et al., 2016).

Si sospetta una possibile correlazione tra esposizione ad alcuni pesticidi e tumore maligno mammario nel cane, ma sono necessarie ulteriori conferme (Gautam, et al., 2020).

Nei gatti è probabile che i pesticidi rientrino tra le sostanze coinvolte nella genesi dell'ipertiroidismo, tuttavia non ci sono ancora delle evidenze scientifiche sufficienti (Peterson, et al., 2012).

CONCLUSIONI

Gli Interferenti Endocrini sono molecole, naturali o di sintesi, ampiamente diffuse nell'ambiente, negli alimenti e in buona parte degli oggetti di uso quotidiano. In particolare, i fitoestrogeni e lo zearalenone sono presenti nei vegetali, il bisfenolo A e gli ftalati possono essere rilasciati dai materiali plastici o dalle lattine, mentre i PCB, i PBDE e i pesticidi sono presenti in modo persistente nell'ambiente mediante bioaccumulo e passano da un individuo all'altro fino all'apice della catena alimentare tramite il fenomeno detto biomagnificazione, entrambi dovuti in parte alla lipofilità di queste sostanze, in parte alla loro resistenza alla degradazione ambientale.

Gli animali domestici cane e gatto sono diventati recentemente oggetto di studio relativamente alle fonti di esposizione e agli effetti di queste sostanze, sia perché condividono l'ambiente domestico con l'uomo e possono quindi essere delle utili sentinelle, sia perché la tendenza è quella di una sempre maggior attenzione al loro stato di salute.

È stato dimostrato che i fitoestrogeni, in particolare genisteina e daidzeina, sono molto presenti nel pet food, soprattutto negli alimenti contenenti soia, perché non sono regolamentati, e sugli animali domestici non sono stati fin ora individuati gli effetti benefici associati a queste sostanze che sono stati invece visti in medicina umana, ma anzi, come conseguenza all'esposizione a queste molecole è stato osservato nel cane un aumento dei livelli sierici di estradiolo e di T_4 , mentre nel gatto è stato riscontrato un aumento del T_4 e dell' fT_4 , tant'è che sono inseriti tra le sostanze coinvolte nella genesi dell'ipertiroidismo felino.

Lo zearalenone è presente negli alimenti a base di cereali, ma per questa sostanza l'UE ha fissato dei limiti anche relativamente al pet food. Ad oggi non sono stati fatti studi sull'effetto di questa molecola nel gatto, mentre nel cane è stata dimostrata una correlazione tra livelli di zearalenone sierico e aumento del progesterone e dell'estradiolo, con conseguente atresia dei follicoli ovarici, inibizione enzimatica, diminuzione del numero dei recettori β e aumentata apoptosi nell'ovaio, mentre nell'utero si hanno iperplasia ghiandolare, adenogenesi, angiogenesi e vascolarizzazione.

Il bisfenolo A si trova nei materiali plastici e negli alimenti per animali contenuti in lattine di alluminio, poiché anche per questa sostanza l'UE non ha fissato dei limiti di legge nei prodotti destinati agli animali. Nel cane l'esposizione a questa sostanza causa un cambiamento nella composizione della microflora intestinale, mentre nel gatto è stata dimostrata da parte di questa sostanza un'inibizione *in vitro* delle contrazioni uterine, una diminuzione della capacità da parte del sistema nervoso di percepire il contrasto durante la visione, ed è inoltre altamente probabile che anche questa molecola sia tra i fattori che concorrono nello sviluppo dell'ipertiroidismo felino.

Un'altra categoria di molecole ampiamente presenti nei materiali plastici sono gli ftalati, ai quali gli animali domestici sono esposti sia attraverso il rilascio da parte di oggetti di plastica, sia tramite ingestione di cibo contaminato. Nel cane maschio è stato dimostrato un effetto inibitorio sul rilascio di testosterone e di insulin-like-peptide 3, entrambi coinvolti nel meccanismo della discesa del testicolo, e una diminuzione della motilità degli spermatozoi; inoltre in questa specie si sospetta che gli ftalati siano correlati allo sviluppo di obesità e diabete mellito. Gli studi sul gatto sono ancora carenti, ma con buona probabilità gli ftalati sono inclusi tra le molecole che causano ipertiroidismo felino.

Infine sono stati studiati gli effetti degli inquinanti organici persistenti PCB, PBDE e pesticidi, che come dice il termine stesso si accumulano nell'ambiente e, seppur il loro utilizzo sia stato regolamentato e in alcuni casi vietato da molti anni, continuano comunque ad essere un rischio per gli organismi viventi, in particolar modo attraverso gli alimenti e la polvere domestica. Nel gatto è stata dimostrata una correlazione tra livelli elevati di PBDE nel sangue e ipertiroidismo, mentre nel cane alcuni PCB causano una diminuzione della motilità degli spermatozoi e una compromissione della fosforilazione ossidativa a livello cerebrale, le cui conseguenze vanno ancora indagate. Per quanto riguarda i pesticidi, ci sono ancora pochi studi sul cane e sul gatto, ma per ora si è visto che alcuni di essi vanno ad inibire la motilità degli spermatozoi nel cane, e si sospetta che alcune di queste molecole siano tra le possibili sostanze responsabili dell'ipertiroidismo felino, dell'insorgenza del tumore maligno mammario nella cagna e di effetti comportamentali.

In conclusione, lo studio degli effetti degli Interferenti Endocrini è molto importante

anche in medicina veterinaria, e ci si aspetta che vengano condotte ulteriori indagini in questo ambito, poiché molti effetti sulla salute del cane e del gatto sono al momento solo ipotizzati. Seppur alcune sostanze siano presenti in modo persistente nell'ambiente e pertanto sia difficile evitarle, è invece possibile ridurre l'esposizione dei cani e dei gatti agli Interferenti Endocrini presenti negli alimenti e negli oggetti di uso quotidiano, per esempio limitando l'utilizzo di prodotti plastici o di alimenti commerciali in lattina, non essendo ancora soggetti a normative relativamente al contenuto di alcune delle sostanze con proprietà di Interferenti Endocrini. In merito a questo ultimo aspetto, sarebbe opportuno che fossero fissati dei limiti di legge analogamente a quanto avviene per l'uomo, vista l'importanza che i cani e i gatti rivestono ai giorni nostri.

BIBLIOGRAFIA

Adams N.R., *Detection of the effects of phytoestrogens on sheep and cattle*. Journal of Animal Science. 73 (1995) 1509-1515

Adler J.H., Trainin D., *A hyper oestrogenic syndrome in cattle*. Refuah Veterinarith. 17 (1960) 115-118

Akingbemi B.T., Braden T.D., Kemppainen B.W., Hancock K.D., Sherrill J.D., Cook S.J., He X., Supko J.G., *Exposure to phytoestrogens in the perinatal period affects androgen secretion by testicular Leydig cells in the adult rat*. Endocrinology. 148 (2007) 4475-4488

Andrianou X.D., Gaengler S., Piciu A., Charisiadis P., Zira C., Aristidou K., Piciu D., Hauser R., Macris K.C., *Human Exposure to Bisphenol A, Bisphenol F and Chlorinate Bisphenol A Derivates and Thyroid Function*. Plos One. (2016) doi: 10.1371/journal.pone.0155237

Arahoru M., Huroshima H., Hori Y., Takagi S., Chijiwa H., Fujita K., *Owners' view of their pets; emotions, intellect and mutual relationship: Cats and dogs compared*. Behavioural Processes. 141 (2017) 316-321

Aryoshi N., Koga N., Ogura K., Yoshimura H., *Metabolism of 2,4,5,2,4,5-hexachlorobiphenyl with liver microsomes of phenobarbital-treated dog; the possible formation of PCB 2,3-arene oxide intermediate*. Xenobiotica. 22 (1992) 1275-1290

Assinder S., Davis R., Fenwick M., Glover A., *Adult-only exposure of male rats to a diet of high phytoestrogen content increases apoptosis of meiotic and post-meiotic germ cells*. Reproduction. 133 (2007) 11-19

Avidan G., Harel M., Hendler T., Ben-Bashat D., Zohary E., Malach R., *Contrast sensitivity in human visual area and its relationship to object recognition*. Journal of Neurophysiology. 87 (2002) 3102-3116

Backer L.C., Grindem C.B., Corbett W.T., Cullins L., Hunter J.L., *Pet dogs as sentinels for environmental contamination*. Science of the Total Environment. 274 (2001) 161-169

Barouki R. *Linking long-term toxicity of xeno-chemicals with short-term biological adaptation*. Biochimie. 92 (2010) 1222-1226

Barouki R., *Endocrine Disruptors: Revisiting concepts and dogma in toxicology*. Comptes Rendus Biologies. 340 (2017) 410-413

Barton M., *The membrane oestrogen receptor GPER-Clues and questions*. Steroids. 77 (2012) 935-942

Baskin L.S., Himes K., Colborn T., *Hypospadias and endocrine disruption: Is there a connection?* Environmental Health Perspectives. 109 (2001) 1175-1183

- Bateman H.L., Patisaul H.B., *Distrupted female reproductive physiology following neonatal exposure to phytoestrogens or estrogen specific ligands is associated with decreased GnRH activation and kisspeptin fiber density in the hypothalamus*. *Neurotoxicology*. 29 (2008) 988-997
- Bauer J., Heinritzi K., Gareis M., Gedek B., *Changes in the genital tract of female swine after feeding with practice-relevant amounts of zearalenone*. *Tierärztliche Praxis*. 15 (1987) 33-36
- Bell K.M., Rutherford S.M., Hendriks W.H., *The isoflavones content of commercially-available feline diets in New Zeland*. *New Zeland Veterinary Journal*. 54 (2006) 103-108
- Bennetts H.W., Underwood E.J., Shier F.L., *A specific breeding problem of sheep on subterranean clover pastures in Western Australia*. *Veterinary Journal*. 102 (1946) 348-352
- Bergman A., *Brominated flame retardants in a global environment perspective*. In: *Proceedings Workshop oh Aromatic Flame retardants*. Skokloster, Sweden, 1989, 13-23
- BfR, *Scientific Principles for the identification of endocrine distrupting chemicals – a consensus statement*. Outcome of an International expert meeting organized by the German Federal Institute for Risk Assessment, 2016
- Bhattacharya N., Dufour J.M., Vo M-N., Okita J., Okita R., Kim K.H., *Differential Effects of Phthalates on the Testis and the Liver*. *Biology of Reproduction*. 72 (2005) 745-754
- Biehl M.L., Prelusky D.B., Koritz G.D., Hartin K.E., Buck W.B. Trenholm H.L., *Biliar excretion and enterohepatic cycling of zearalenone in immature pigs*. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 121 (1993) 121-152
- Birkhoj M., Nellemann C., Jarfelt K., Jacobsen H., Andersen H.R., Dalgaard M., Vinggaard A.M., *The combined antiandrogenic effect of five commonly used pesticides*. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 201 (2004) 10-20
- Blanco-Munoz J., Lacasana M., Lopez-Flores I., Rodriguez-Barranco M., Gonzales-Alzaga B., Bassol S., Cebrian M.E., Lopez-Carrillo L., Aguilar-Garduno C., *Association between organochlorine pesticide exposure and thyroid hormones in floriculture workers*. *Environmental Research*. 150 (2016) 357-363
- Boas M., Frederiksen H., Feldt-Rasmussen U., Sakkerback N.E., Hegedus L., Hilsted L., Juul A., Main K.M., *Childhood exposure to phthalates: associations with thyroid function, insulin-like growth factor I, and growth*. *Environmental Health Perspectives*. 118 (2010) 1458-1464
- Braouezec C., Enriquez B., Blanchard M., Chevreuil M., Teil M-J., *Cat serum contamination by phthalates, PCBs and PBDEs versus food and indoor air*. *Environmental Science and Pollution Research*. 23 (2016) 9574-9584
- Braun J.M., Kalkbrenner A.E., Calafat A.M., et al., *Impact of early-life bisphenol A exposure on behavior and executive function in children*. *Pediatrics*. 128 (2011) 873-882
- Braun J.M., Muckle G., Arbuckle T., et al., *Associations of prenatal urinary bisphenol A concentrations with child behaviors and cognitive abilities*. *Environmental Health Perspectives*. 125 (2017) 067008

- Brown N.M., Setchell K.D., *Animal models impacted by phytoestrogens in commercial chow: Implications for pathways influenced by hormones*. Laboratory Investigation. 81 (2001) 735-747
- Buck-Louis G.M., Peterson M., Chen Z., Croughan M., Sundaram R., Stanford J., Varner J., Kennedy A., Giudice L., Fujimoto V., Sun L., Wang L., Guo Y., Kannan K., *Bisphenol A and phthalates and endometriosis: the endometriosis: natural history, diagnosis and outcomes study*. Fertility and Sterility. 100 (2013) 162-169
- Burton J.L., Wells M., *The effect of phytoestrogens on the female genital tract*. Journal of Clinical Pathology. 55 (2002) 401-407
- Campagna C., Guillemette C., Ayotte P., Bailey J.L., *Effects of an environmentally relevant organochlorine mixture and a metabolized extract of this mixture on porcine sperm parameters in vitro*. Journal of Andrology. 30 (2009) 317-324
- Carpenter D.O., *Polychlorinated biphenyls (PCBs): routes of exposure and effects on human health*. Reviews on Environmental Health. 21 (2006) 1-23
- Carpenter D.O., *Effects of Persistent and Bioactive Organic Pollutants on Human Health*. Wiley, 2013
- Carson R, *Silent Spring*. Ed. Houghton Mifflin, Boston, MA, USA, 1962
- Cerundolo R., Court M.H., Hao Q., Miche K.E., *Identification and concentration of soy phytoestrogens in commercial dog foods*. American Journal of Veterinary Research. 65 (2004) 592-596
- Cerundolo R., Michel K.E., Reisner I.R., Phillips L., Goldschmidt M., Court M.H., Shrestha B., Hao Q., Refsal K., Oliver J.W., Biourge V., Shofer F.S., *Evaluation of the effects of dietary soy phytoestrogens on canine health, steroidogenesis, thyroid function, behavior and skin and coat quality in a prospective controlled randomized trial*. American Journal of Veterinary Research. 70 (2009) 353-360
- Chang K., Kurtz H.J., Mirocha C.J., *Effect of the mycotoxin zearalenone on swine reproduction*. American Journal of Veterinary Research. 40 (1979) 1260-1267
- Cheek A.N., Kow K., Chen J.A.M.J., *Potential mechanism of thyroid disruption in humans: interaction of organochlorine compounds with thyroid receptors, transthyretin, and thyroid-binding globuline*. Environmental Health Perspectives. 107 (1999) 273-278
- Chen J., Zhou X., Zhang H., Liu Y., Cao C., Dong R., Yuan Y., Wang M., Lu Y., Wu M., Li S., Chen B., *Association between urinary concentration of phthalate metabolites and impaired renal function in Shanghai adults*. Environmental Pollution. 245 (2019) 149-162
- Choi Y.J., Lee L.S., *Aerobic Soil Degradation of Bisphenol (BPA) Alternatives Bisphenol S and Bisphenol AF Compared to BPA*. Environmental Science & Technology. (2017) doi: 10.1021/acs.est.7b03889
- Chou K., Wright R.O., *Phthalates in Food and Medical Devices*. Journal of Medical Toxicology. 2 (2006) 126-135

- Christen V., Crettaz P., Oberli-Schrämmli A., Fent K., *Antiandrogenic activity of phthalate mixtures: Validity of concentration addition*. Toxicology and Applied Pharmacology. 259 (2012) 169-176
- Cimino A.M., Boyles A.L., Thayer K.A., Perry M.J., *Effects of neonicotinoid pesticide exposure on human health: a systematic review*. Environmental Health Perspectives. 125 (2017) 155-162
- Cimmino I., Fiory F., Perruolo G., Miele C., Beguinot F., Formisano P., Oriente F., *Potential Mechanisms of Bisphenol A (BPA) Contributing to Human Disease*. International Journal of Molecular Sciences. 21 (2020) 5761
- Cohn B.A., *Developmental and environmental origins of breast cancer: DDT as a case study*. Reproductive Toxicology. 31 (2011) 302-311
- Colborn T., Clement C., *Chemically-induced Alterations in Sexual and Functional Development: the Wildlife/Human connection*. Princeton Scientific Publishing Co., Inc, Princeton, NJ, 1992
- Combarrous Y., *Endocrine Disruptor Compounds (EDCs) and agriculture: The case of pesticides*. Comptes Rendus Biologies. 340 (2017) 406-409
- Court M.H., Freeman L.M., *Identification and concentration of soy isoflavones in commercial cat foods*. American Journal of Veterinary Research. 63 (2002) 181-185
- Court M.H., Greenblatt D.J., *Molecular genetic basis for deficient acetaminophen glucuronidation by cats: UGT1A6 is a pseudogene, and evidence for reduced diversity of expressed hepatic UGT1A isoforms*. Pharmacogenetics. 10 (2000) 355-369
- D'Mello J.D.F., Placinta C.M., Macdonald A.M.C., *Fusarium mycotoxins: A review of global implications for animal health, welfare and productivity*. Animal Feeding Science and Technology. 80 (1999) 183-205
- Daniel G.B., Neelis D.A., *Thyroid Scintigraphy in Veterinary Medicine*. Seminars in Nuclear Medicine. 44 (2014) 24-34
- De Souza Dos Santos M.C., Lima Gonçalves C.F., Vaisman M., Freitas Ferreira A.C., Pires De Carvalho D., *Impact of flavonoids on thyroid function*. Food and Chemical Toxicology. 49 (2011) 2495-2502
- Desvergne B., Feige J.N., Casals-Casas C., *PPAR-mediated activity of phthalates: a link to the obesity epidemic?* Molecular and Cellular Endocrinology. 304 (2009) 43-48
- Dirtu A.C., Niessen S.J.M., Jorens P.G., Covaci A., *Organohalogenated contaminants in domestic cats' plasma in relation to spontaneous acromegaly and type 2 diabetes mellitus: A clue for endocrine disruption in humans?* Environment International. 57-58 (2013) 60-67
- Domańska A., Orzechowski A., Litwiniuk A., Kalisz M., Bik W., Baranowska-Bik A., *The Beneficial Role of Endocrine Disruptors: Phytoestrogens in Alzheimer's Disease*. Hindawi, Oxidative Medicine and Cellular Longevity. (2021) ID 3961445

Dostal L.A., Weaver R.P., Schwetz B.A., *Transfer of di (2-ethylhexyl) phthalate through rat milk and effects on milk composition and the mammary gland*. Toxicology and Applied Pharmacology. 91 (1987) 315-325

Duignan D.B., Sipes I.G., Leonard T.B., Halpert J.R., *Purification and characterization of the dog hepatic cytochrome P-450 isozyme responsible for the metabolism of 2,2', 4,4', 5,5'-hexachlorobiphenyl*. Archives of Biochemistry and Biophysics. 255 (1987) 290-303

Dye J.A., Venier M., Zhu L., Ward C.R., Hites R.A., Birnbaum L.S., *Elevated PBDE Levels in Pet Cats: Sentinels for Humans?* Environmental Science & Technology. 41 (2007) 6350-6356

EFSA Journal. 15 (2017) 4851

Elsworth J.D., Jentsch J.D., Groman S.M., Roth R.H., Redmon E.D. jr, Leranth C., *Low circulating levels of bisphenol-A induce cognitive deficits and loss of asymmetric spine synapses in dorso-lateral prefrontal cortex and hippocampus of adult male monkeys*. Journal of Comparative Neurology. 523 (2015) 1248-1257

European Workshop on the impact of Endocrine Disruptors on Human Health and Wildlife, Weybridge, 2-4/12/1996

Fini J.B., Mughal B.B., Le Mevel S., Leemans M., Lettmann M., Spirhanzlova P., Demeneix B.A., *Human amniotic fluid contaminants alter thyroid hormone signalling and early brain development in Xenopus embryos*. Scientific Reports. 7 (2017) 43786

Fink-Gremmels J., Malekinejad H., *Clinical effects and biochemical mechanisms associated with the exposure to the mycoestrogen zearalenone*. Animal Feed Science and Technology. 137 (2007) 326-341

Gajęcka M., Jackimiuk E., Polak M., et al., *Zearalenone applied per os provides adverse effects in structure of chosen parts of bitch reproductive system*. Polish Journal of Veterinary Sciences. 7 (2004) 59-66

Gajęcka M., Zielonka Ł., Gajęcki M., *Effect of Low Monotonic Doses of Zearalenone on Selected Reproductive Tissues in Pre-Pubertal Female Dogs-A Review*. Molecules. 20 (2015) 20669-20687

Gajęcki M., Gajęcka M., Jackimiuk E., Zielonka Ł., Obremski K., *Zearalenone-Undesirable Substance*. In: *Mycotoxins in Food, Feed and Bioweapons*. Ed. Springer-Verlag, Heidelberg, Berlin, Germany (2010) 131-144

Garry V.V., *Pesticides and children*. Toxicological and Applied Pharmacology. 198 (2004) 152-163

Gautam S., Kumar Sood N., Gupta K., Joshi K., Kaur Gill K., Kaur R., Chauhan I., *Bioaccumulation of pesticide contaminants in tissue matrices of dogs suffering from malignant canine mammary tumors in Punjab, India*. Helion. 6 (2020) e05274

Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea, L 41/6 del 14.2.2018, Regolamento (UE) 2018/213

Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea, L 70, 16.3.2005, Regolamento (CE) 396/2005

Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea, L 87/1, 1.4.2011, Regolamento (UE) 2011/321

Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea, L 137/10 del 4.6.2015, Direttiva Delegata (UE) 2015/863

Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea, L 169/45, 25.6.2019, Regolamento (UE) 2019/1021

Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea, L 208/58, 2.8.2016, Raccomandazione (UE) 2016/1319

Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea, L 309/1, 24.11.2009, Regolamento (CE) 1107/2009

Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea, L 364, 20.12.2006, Regolamento (CE) 1881/2006

Gazzotti T., Biagi G., Pagliuca G., Pinna C., Scardilli M., Grandi M., Zaghini G., *Occurrence of mycotoxins in extruded commercial dog food*. Animal Feed Science and Technology. 202 (2015) 81-89

Geens T., Aerts D., Berthot C., Bourguignon J.P., Goeyens L., Lecomte P., et al., *A review of dietary and non-dietary exposure to bisphenol A*. Food and Chemical Toxicology. 50 (2012) 3725-3740

Georgii S., Bachour G., Failing K., Eskens U., Elmadfa I., Brunn H., *Polychlorinated biphenyl congeners in foxes in Germany from 1983 to 1991*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology. 26 (1994) 1-6

Goldman L.R., Koduru S., *Chemicals in the environment and developmental toxicity to children: a public health and policy perspective*. Environmental Health Perspectives. 108 (2000) 443-448

Grandjean P., Barouki R., Bellinger D.C., Casteleyn L., Chadwick L.H., Cordier S., Etzel R.A., Gray K.A., Ha E.H., Junien C., Karagas M., Kawamoto T., Paige L. B., Perera F.P., Prins G.S., Puga A., Rosenfeld C.S., Sherr D.H., Sly P.D., Suk W., Sun Q., Toppari J., Van De Hazel P., Walker C.L., Heindel J.J., *Life long implications of developmental exposure to environmental stressors; new perspectives*. Endocrinology. 156 (2015) 3408-3415

Grieco V., Riccardi E., Veronesi M.C., Giudice C., Finazzi M., *Evidence of testicular dysgenesis syndrome in the dog*. Theriogenology. 70 (2008) 53-60

Grimm F.A., Hu D., Kania-Korwel I., Lehmler H.J., Ludewig G., Hornbuckle K.C., Duffel M.W., Bergman Å, Robertson L.W., *Metabolism and metabolites of polychlorinated biphenyls*. Critical Reviews in Toxicology. 45 (2015) 245-272

Guo W., Park J.S., Wang Y., Gardner S., Baek C., Petreas M., Hooper K., *High polybrominated diphenyl ether levels in California house cats: house dust a primary source?* Environmental Toxicology and Chemistry. 3 (2012) 301-306

Hajirahimkhan A., Dietz B.M., Bolton J.L., *Botanical modulation of menopausal symptoms: mechanism of action?* Planta Medica. 79 (2013) 538-553

Hayes T., Tsuis M., Hoang A., Haeffele C., Vonk A., *Atrazine-induced hermaphroditism at 0.1 ppb in American leopard frogs (Rana pipiens): laboratory and field evidence*. Environmental Health Perspectives. 111 (2003) 568-575

Heindel J.J., Blumberg B., Cave M., Machtinger R., Mantovani A., Mendez M.A., Vom Saal F., *Metabolism disrupting chemicals and metabolic disorders*. Reproductive Toxicology. 68 (2017) 3-33

Henry M., Beguin M., Requier F., Rollin O., et al., *A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees*. Science. 336 (2012) 348-350

Hiroi H., Tsutsumi O., Momoeda M., Takai I., Osuga Y., Taketani Y., *Differential Interactions of Bisphenol A and 17 β -estradiol with Estrogen Receptor α (ER α) and Er β* . Endocrine Journal. 46 (1999) 773-778

Hu F., Li T., Gong H., Chen Z., Xu G., Wang M., *Bisphenol A impairs synaptic plasticity by both pre- and postsynaptic mechanisms*. Science Advances. (2017) doi: 10.1002/advs.201600493

Hu F., Liu J., Xu G., Wang H., Shen J., Zhou Y., *Bisphenol A exposure inhibits contrast sensitivity in cats involving increased response noise and inhibitory synaptic transmission*. Brain Research Bulletin. 157 (2020) 1-9

Hu F., Xu G., Zhang L., Wang H., Liu J., Chen Z., Zhou Y., *Chronic Bisphenol A exposure triggers visual perception dysfunction through impoverished neuronal coding ability in the primary visual cortex*. Archives of Toxicology. (2021) doi: 10.1007/s00204-021-03192z

Hubel D.H., Wiesel T.N., *Early exploration of the visual cortex*. Neuron. 20 (1998) 401-412

Inoue H., Tsuruta A., Kudo S., Ishii T., Fukushima Y., Iwano H., et al., *Bisphenol A glucuronidation and excretion in liver of pregnant and nonpregnant female rats*. Drug Metabolism and Disposition. 33 (2005) 55-59

Jefferson W.N., Padilla-Banks E., Goulding E.H., Lao S.P., Newbold R.R., Williams C.J., *Neonatal exposure to genistein disrupts ability of female mouse reproductive tract to support preimplantation embryo development and implantation*. Biology of Reproduction. 80 (2009) 425-431

Jeong J.K., Tremere L.A., Burrows K., Majewska A.K., Pinaud R., *The mouse primary visual cortex is a site of production and sensitivity to estrogens*. PloS One. (2011) doi: 10.1371/journal.pone.0020400

Jilani K., Lang F., *Ca²⁺-dependent suicidal erythrocyte death following zearalenone exposure*. Archives of Toxicology. 87 (2013), 1821-1828

Johansson M., Johansson N., Lund B.O., *Xenobiotics and the glucocorticoid receptor: additive antagonistic effects on tyrosine aminotransferase on rat hepatoma cells*. Basal & Clinical Pharmacology and Toxicology. 96 (2005) 309-315

Kabakci R., Macun H.C., Polat I.M., Yldirim E., *Inhibitory effect of Bisphenol A on in vitro feline uterine contractions*. Animal Reproduction Science. 205 (2019) 27-33

Kallela K., Heinonen K., Saloniemi H., *Plant oestrogens: the cause of decreased fertility in cows. A case report*. Nordisk Veterinaermedicin. 36 (1984) 124-129

- Kang J.H., Kondo F., *Determination of bisphenol A in canned pet food*. Research in Veterinary Science. 73 (2002) 177-182
- Karthikraj R., Lee S., Kannan K., *Biomonitoring of exposure to bisphenols, benzophenones, triclosan and tricocarban in pet dogs and cats*. Environmental Research. 180 (2020) 108821
- Karthikraj R., Lee S., Kannan K., *Urinary concentrations and distribution profiles of 21 phthalate metabolites in pet cats and dogs*. Science of the Total Environment. 690 (2019) 70-75
- Kim J.S., Klosener J., Flor S., Peters T.M., Ludewig G., Thorne P.S., Robertson R.W., Luthé G., *Toxicity assessment of air-derived particle-bound polybrominated diphenyl ethers*. Toxicology. 317 (2014) 31-39
- Koestel Z.L., Backus R.C., Tsuruta K., Spollen W.G., Johnson S.A., Javurek A.B., Ellersieck M.R., Wiedmeyer C.E., Kannan K., Xue J., Bivens N.J., Givan S.A., Rosenfeld C.S., *Bisphenol A (BPA) in serum of pet dogs following short-term consumption of canned dog food and potential health consequences of exposure to BPA*. Science of the Total Environment. 579 (2017) 1804-1014
- Kojima H., Katsura E., Takeuchi S., Niyama K., Kobayashi K., *Screening for estrogen and androgen receptor activities in 200 pesticides by in vitro reporter gene assays using Chinese hamster ovary cells*. Environmental Health Perspectives. 112 (2004) 524-531
- Kojima H., Sata F., Takeuchi F., Sueyoshi T., Nagai T., *Comparative study of human and mouse pregnane X receptor agonistic activity in 200 pesticides using in vitro reporter gene assays*. Toxicology. 280 (2011) 77-87
- Kortenkamp A., *Low dose mixture effects of endocrine disrupters and their implications for regulatory thresholds in chemical risk assessment*. Current Opinion in Pharmacology. 19 (2014) 105-111
- Kriszt R., Krifaton C., Szoboszlai S., Cserhati M., Kriszt B., Kukolya J., et al., *A new zearalenone biodegradation strategy using non-pathogenic Rhodococcus pyridinivorans K408 strain*. Plos One. 7 (2012) e43608
- Kuiper-Goodman T., Scott P.M., Watanabe H., *Risk assessment of the mycotoxin zearalenone*. Regulatory Toxicology and Pharmacology. 7 (1987) 253-306
- Kunisue T., Nakanishi S., Watanabe M., Abe T., Nakatsu S., Kawauchi S., Sano A., Horii A., Kano Y., Tanabe S., *Contamination status and accumulation features of persistent organochlorines in pet dogs and cats in Japan*. Environmental Pollution. 136 (2005) 465-476
- Kupryianchyk D., Hovander L., Jones B., Lindqvist N.G., Eriksson S., Bergman A., *Hyperthyroidism, a new disease in cats - Is it caused by exposure to environmental organic pollutants?* Organohalogen Compounds. 71 (2009) 002721
- La Merrill M., Emond C., Kim M.J., et al., *Toxicological function of adipose tissue: focus on persistent organic pollutants*. Environmental Health Perspectives. 121 (2013) 162-169

Langer P., Kočan A., Tajtáková M., Rádiková Ž., Petric J., Koška J., Kšinantová L., Imrich R., Hučková M., Chovanková J., *Possible effects of persistent organochlorinated pollutants cocktail on thyroid hormone levels and pituitary-thyroid interrelations*. Chemosphere. 70 (2007) 110-118

Latini G., Knipp G., Mantovani A., Marcovecchio M.L., Chiarelli F., Söder O., *Endocrine Distruptors and Human Health*. Mini-Reviews in Medicinal Chemistry. 10 (2010) 846

Latini G., Verrotti A., De Felice C., *Di-2-ethylexyl phthalate and endocrine disruption: a review*. Current Drug Targets-Immune, Endocrine & Metabolic Disorders. 4 (2004) 37-40

Lee H.J., Chattopadhyay S., Gong E.Y., Ahn R.S., Lee K., *Antiandrogenic Effects of Bisphenol A and Nonylphenol on the Function of Androgen Receptor*. Toxicological Sciences. 75 (2003) 40-46

Leijls M.M., Koppe J.G., Olie K., Van Aalderen W.M.C., De Voogt P., Ten Tusscher G.W., *Effects of Dioxins, PCBs and PBDEs On Immunology and Hematology in Adolescents*. Environmental Science & Technology. 43 (2009) 7946-7951

Lenis Y.Y., Gutiérrez M.T., Tarazona A.M., *Efectos de los fitoestrógenos en la reproducción animal*. Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín. 63 (2010) 5555-5565

Lephart E.D., Setchell K.D.R., Handa R.J., Lund T.D., *Behavioral Effects of Endocrine-disrupting Substances: Phytoestrogens*. ILAR Journal. 45 (2004) 443-454

Leung M.C.K., Díaz-Llano G., Smith T.K., *Mycotoxins in pet food: a review on worldwide prevalence and preventative strategies*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 54 (2006) 9623-9635

Li A.J., Martinez-Moral M.P., Al-Malki A.L., Al-Ghamdi M.A., Al-Bazi M.M., Kumosani T.A., Kannan K., *Mediation analysis for the relationship between urinary phthalate metabolites and type 2 diabetes via oxydative stress in a population in Jeddah, Saudu Arabia*. Environment International. 126 (2019) 153-161

Lintelmann J., Katayama A., Kurihara N., Shore L., Wenzel A., *Endocrine distruptors in ther environment*. Pure and Applied Chemistry. 75 (2003) 631-681

Liu Z.H., Ding J.J., Yang Q.Q., et al., *Early developmental bisphenol-A exposure sex-independently impairs spatial memory by remodeling hippocampal dendritic architecture and synaptic transmission in rats*. Scientific Reports. 6 (2016) 32492

Lu Q., Liang Y., Fang W., G K-L., Huang C., Qi X., Liang Z., Zeng Y., Luo X., He Z., Mai B., Wang S., *Spatial Distribution, Bioconversion and Ecological Risk of PCBs and PBDEs in the Surface Sediment of Contaminated Urban Rivers: A Nationwide study in China*. Environmental Science & Technology. 55 (2021) 9579-9590

Luthe G., Jacobus J.A., Robertson L.W., *Receptor interactions by polybrominated diphenyl ethers versus polychlorinated biphenyls: A theoretical structure-activity assessment*. Environmental Toxicology and Pharmacology. 25 (2008) 202-210

Magnusson U., Persson S., *Endocrine Distruptors in Domestic Animal Reproduction: A Clinical Issue?* Reproduction of Domestic Animals. 50 (2015) 15-19

- Mariussen E., Fonnum F., *The effect of pentabromodiphenyl ether, hexabromocyclododecane and tetrabromobisphenol-A in dopamine uptake into rat brain synaptosome*. Toxicology. 159 (2001) 11-21
- Markey C.M., Rubin B.S., Soto A.M., Sonnenschein C., *Endocrine disruptors: from Wingspread to environmental developmental biology*. Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology. 83 (2003) 235-244
- Marozzi S., Condoleo R., Morena V., Saccares S., *Chemicals in foods: the endocrine disruptors*. Industrie Alimentari. 49 (2010) 26-31
- Martyniuk C.J., Mehinto A.C., Denslow N.D., *Organochlorine pesticides: Agrochemicals with potent endocrine-disrupting properties in fish*. Molecular and Cellular Endocrinology. 507 (2020) 110764
- Matushima a., Liu X., Okada H., Shimohigashi M., Shimohigashi Y., *Bisphenol AF is a full agonist for the estrogen receptor ER α but a highly specific antagonist for ER β* . Environmental Health Perspectives. 118 (2010) 1267-1272
- McDuffie H.H., *Host factors and genetic susceptibility: a paradigm of the conundrum of pesticide exposure and cancer association*. Reviews on Environmental Health. 20 (2005) 77-101
- McKinlay R., Plant J.A., Bell J.N.B., Voulvoulis N., *Endocrine disrupting pesticides: Implications for risk assessment*. Environment International. 34 (2008) 168-183
- McKinney J.D., Waller C.L., *Polychlorinated biphenyls as hormonally active structural analogues*. Environmental Health Perspectives. 102 (1994) 290-297
- Meeker J.D., Calafat A.M., Hauser R., *Urinary metabolites of di (2-ethylexyl) phthalate are associated with decreased steroid hormone levels in adult men*. Journal of Andrology. 30 (2009) 287-297
- Mengozi G., Soldani G., *Tossicologia Veterinaria*. Idelson-Gnocchi, 2010
- Mesnage R., Biserni M., Genkova D., Wesolowski L., Antoniou M.N., *Evaluation of neonicotinoid insecticides for oestrogenic, thyroidogenic and adipogenic activity reveals imidacloprid causes lipid accumulation*. Journal of Applied Toxicology. 38 (2018) 1483-1491
- Mikolić A., Brčić Karačonji I., *Imidacloprid as a reproductive toxicant and endocrine disruptor: investigation in laboratory animals*. Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju. 69 (2018) 103-108
- Min K.J., Min J.Y., *Urinary phthalate metabolites and the risk of low bone mineral density and osteoporosis in older women*. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. 99 (2014) E1997-E2003
- Minervini F., Dell'Aquila M.E., *Zearalenone and Reproductive Function in Farm Animals*. International Journal of Molecular Sciences. 9 (2008) 2570-2584
- Mitchell M.M., Woods R., Chi L-H., Schmidt R.J., Pessah I.N., Kostyniak P.J., La Salle J.M., *Levels of Selected PCB and PBDE Congeners in Human Postmortem Brain Reveal Possible Environmental*

Involvement in 15q11-q13 Duplication Autism Spectrum Disorder. Environmental and Molecular Mutagenesis. 53 (2012) 589-598

Mnif W., Hadij Hassine A.I., Bouaziz A., Bartegi A., Thomas O., Roig B., *Effect of Endocrine Disruptor Pesticides: A Review*. International Journal of Environmental Research and Public Health. 8 (2011) 2265-2303

Moriyama K., Tagami T., Akamizu T., et al., *Thyroid hormone action is disrupted by bisphenol A as an antagonist*. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. 87 (2002) 5185-5190

Moudgal N.R., Raghupathy E., Sama P.S., *Studies on goitrogenic agents in food*. Journal of Nutrition. 66 (1958) 291-303

Muscogiuri G., Colao A., *Phthalates: new cardiovascular health disruptor?* Archives of Toxicology. 91 (2016) 1513-1517

Nakashima S., Ji H., Ishitobi S., Kawazoe S., Shinohara R., Ishibashi H., Tominaga N., Arizono K., *Study of phytoestrogens and estrogenic activity in pet animal diets*. Japanese Journal of Food Chemistry and Safety. 20 (2013) 22-30

Nomiyama K., Eguchi A., Takaguchi K., Yoo J., Mizukawa H., Oshihoi T., Tanabe S., Iwata H., *Targeted metabolome analysis of the dog brain exposed to PCBs suggests inhibition of oxidative phosphorylation by hydroxylated PCBs*. Toxicology and Applied Pharmacology. 377 (2019) 114620

North M.L., Takaro T.K., Diamond M., Ellis A.K., *Effects of phthalates on the development and expression of allergic disease and asthma*. Annals of Allergy, Asthma and Immunology. (2014) 1-7

Olsen M., *Metabolism of zearalenone in farm animals*. In Fusarium mycotoxins, taxonomy and pathogenicity, 1st ed; Chelkowski J., Ed. Elsevier: Amsterdam-Oxford-New York, 1989; 167-177

Pallotti F., Pelloni M., Gianfrilli D., Lenzi A., Lombardo F., Paoli D., *Mechanism of Testicular Disruption from Exposure to Bisphenol A and Phthalates*. Journal of Clinical Medicine. 9 (2020) 471

Park C., Song H., Choi J., Sim S., Kojima H., Park J., Iida M., Lee Y., *The mixture effects of bisphenol derivatives on estrogen receptor and androgen receptor*. Environmental Pollution. 260 (2020) 114036

Paterni L., Granchi C., Katsenellenboegen J.A., Minutolo F., *Estrogen receptors alpha (ER α) and beta (ER β): subtype-selective ligands and clinical potential*. Steroids. 14 (2014) 00151-00152

Patisaul H.B., Jefferson W., *The pros and cons of phytoestrogens*. Frontiers in Neuroendocrinology. 31 (2010) 400-419

Pathirana I.N., Kawate N., Tsuji M., Takahashi M., Hatoya S., Inaba T., Tamada H., *In vitro effects of estradiol-17 β , monobutyl phthalate and mono-(2-ethylexyl) phthalate on the secretion of testosterone and insulin-like peptide 3 by interstitial cells of scrotal and retained testes in dogs*. Theriogenology. 76 (2011) 1227-1233

- Pelch K.E., Li Y., Perera L., Thayer K.A., Korach K.S., *Characterization of Estrogenic and Androgenic activities for Bisphenol A-like Chemicals (BPs): In Vitro Estrogen and Androgen Receptors Transcriptional Activation, Gene Regulation, and Binding Profiles*. Toxicological Sciences. 172 (2019) 23-37
- Peterson J., Dwyer J., *Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity*. Nutrition Research. 18 (1998) 1995-2018
- Peterson M.E., Ward C.R., *Etiopatologic Findings of Hyperthyroidism in Cats*. Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice. Anim 37 (2007) 633-645
- Peterson M.E., *What's causing this epidemic of thyroid disease and can we prevent it?* Journal of Feline Medicine and Surgery. 14 (2012) 804-818
- Pironti C., Ricciardi M., Proto A., Bianco P.M., Montano L., Motta O., *Endocrine-Distruping Compounds: An Overview on Their Occurrence in the Aquatic Environment and Human Exposure*. Water. 13 (2021) 1347
- Porter W., Green S.M., Debbink N.L., Carlson I., *Groundwater pesticides, interactive effects of low concentration of carbamates aldicarb and methomyl and and the triazine metribuzin on thyroxine and somatotropin levels in white rats*. Journal of Toxicology and Environmental Health. 40 (1993) 15-34
- Rahman F., Langford K.H., Scrimshaw M.D., Lester J.N., *Polybrominated diphenyl ether (PBDE) flame retardants*. Science of the Total Environment. 275 (2001) 1-17
- Redmon J.M., Shrestha B., Cerundolo R., Court M.H., *Soy isoflavone metabolism in cats compared with other species: Urinary metabolite concentrations and glucuronidation by liver microsomes*. Xenobiotica. 46 (2016) 406-415
- Ren Z., Deng H., Deng Y., Liang Z., Deng J., Zuo Z., Hu Y., Shen L., Yu S., Cao S., *Combined effects of deoxynivalenol and zearalenone on oxidative injury and apoptosis in porcine splenic lymphocytes in vitro*. Experimental and Toxicologic Pathology. 69 (2017) 612-617
- Retana-Márquez S., Hernández H., Flores J.A., Muñoz-Gutiérrez M., Duarte G., Vielma J., Fitz-Rodríguez G., Fernández I.G., Keller M., Delgadillo J.A., *Effects of phytoestrogens on mammalian reproductive physiology*. Tropical and Subtropical Ecosystem. 15 (2012) S129-S145
- Ribas-Fito N., Cardo E., Sala M., Eulalia de Muga M., Mazon C., Verdu A., Kogevinas m., Grimalt J.O., Sunyer J., *Breastfeeding exposure to organochlorine compounds and neurodevelopment in infants*. Pediatrics. 111 (2003) 580-585
- Robertson L.W., Ludewig G., *Polychlorinated Biphenyl (PCB) carcinogenity with special emphasis on airborne PCBs*. Gefahrst Reinhalt Luft. 71 (2011) 25-32
- Rocha B.A., Asimakopoulos A.G., Barbosa Jr.F., Kannan K., *Urinary concentrations of 25 phthalates metabolites in Brazilian children and their association with oxydative DNA damage*. Science of the Total Environment. 586 (2017) 152-162

- Rochester J.R., *Bisphenol A and human health: A review of the literature*. Reproductive Toxicology. 42 (2013) 132-155
- Roeleveld N., Bretveld R., *The impact of pesticides on male fertility*. Current Opinion in Obstetrics and Gynecology. 20 (2008) 229-233
- Romero-R C.M., Tarragó Castellanos M.R., Muñoz Mendoza R., Arista Reyes R., Rosado García A., *Síndrome estrogénico en vacas lecheras por consumo de alfalfas con grandes cantidades de coumestrol*. Veterinaria México. 28 (1997) 25-30
- Ropejko K., Twarużek M., *Zearalenone and Its Metabolites- General Overview, Occurrence, and Toxicity*. Toxins. 13 (2021) 35
- Ruiz D., Becerra M., Jagai J.S., Ard K., Sargis R.M., *Disparities in environmental exposure to endocrine-disrupting chemicals and diabetes risk in vulnerable populations*. Diabetes Care. 41 (2018) 193-205
- Ruiz-Suárez N., Camacho M., Boada L.D., Henríquez-Hernández L.A., Rial C., Valerón P.F., Zumbado M., González M.A., Luzardo O.P., *The assessment of daily dietary intake reveals the existence of a different pattern of bioaccumulation of chlorinated pollutants between domestic dogs and cats*. Science of the Total Environment. 530-531 (2015) 45-52
- Ruiz-Suárez N., Rial C., Boada L.D., Henríquez-Hernández L.A., Valerón P.F., Camacho M., Zumbado M., González M.A., Lara P., Luzardo O.P., *Are pet dogs good sentinels of human exposure to environmental polycyclic aromatic hydrocarbons, organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls?* Journal of Applied Animal Research. 44 (2016) 135-145
- Rundell K.W., Hoffmann J.R., Caviston R., Bulbulian R., Hollenbach A.M., *Inhalation of ultrafine and fine particulate matter disrupts systemic vascular function*. Inhalation Toxicology. 19 (2007) 133-140
- Saillenfait A.M., Laudet-Hesbert A., *Phthalates*. EMC-Toxicologie Pathologie. 2 (2005) 1-13
- Saillenfait A.M., Payan J.P., Fabry J.P., Beydon D., Langonne I., Gallissot F., et al., *Assessment of the developmental toxicity, metabolism and placental transfer of di-n-butyl phthalate administered to pregnant rats*. Toxicological Sciences. 45 (1998) 212-224
- Sakamoto H., Yokota H., Kibe R., Sayama Y., Yuasa A., *Excretion of bisphenol A-glucuronide into the small intestine and deconjugation in the caecum of the rat*. Biochimica et Biophysica Acta. 1573 (2002) 171-176
- Salis S., Testa C., Roncada P., Armorini S., Rubattu N., Ferrari A., Miniero R., Brambilla G., *Occurrence of imidacloprid, carbendazim, and other biocides in Italian house dust: Potential relevance for intakes in children and pets*. Journal of Environmental Science and Health. B (2017) 1-11
- Scalbert A., Williamson G., *Dietary intake and bioavailability of polyphenols*. Journal of Nutrition. 130 (2000) 2073-2085

- Schreinemachers D.D., *Birth malformations and other adverse perinatal outcomes in four US wheat-producing states*. Environmental Health Perspectives. 111 (2003) 1259-1264
- Schuster J.K., Gioia R., Breivik K., Steinnes E., Scheringer M., Jones K.C., *Trends in European Background Air Reflect Reductions in Primary Emissions of PCBs and PBDEs*. Environmental Science & Technology. 44 (2010) 6760-6766
- Schuster J.K., Gioia R., Moeckel C., Agarwal T., Bucheli T.D., Breivik K., Steinnes E., Jones K.C., *Has the Burden Distribution of PCBs and PBDEs Changed in European Background Soils Between 1998 and 2008? Implications for Sources and Processes*. Environmental Science & Technology. 45 (2011) 7291-7297
- Sellstrom U., Jansson B., Kierkgaard A., de With C., *Polybrominated diphenyl ethers (PBDE) in biological samples from the Swedish environment*. Chemosphere. 26 (1993) 1703-1718
- Setchell K.D., Brown N.M., Lydeking-Olsen E., *The clinical importance of the metabolite equol- a clue to the effectiveness of soy and its isoflavones*. Journal of Nutrition. 132 (2002) 3577-3584
- Settimi L., Masina A., Andron A., Axelson O., *Prostate cancer and exposure to pesticides in agricultural settings*. International Journal of Cancer. 104 (2003) 458-461
- Sharpe R.R.M., *Pathways of endocrine disruption during male sexual differentiation and masculinisation*. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism. 20 (2006) 91-110
- Sharpe R.M., Irvine D.S., *How strong is the difference of a link between environmental chemicals and adverse effects on human reproductive health?* British Medical Journal. 328 (2004) 447-450
- Silva M.J., Reidy J.A., Herbert A.R., Preau J.L., Needhan L.L., Calafat A.M., *Detection of phthalate metabolites in human amniotic fluid*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. 72 (2004) 1226-1231
- Sirotkin A.V., Harrath A.H., *Phytoestrogens and their effects*. European Journal of Pharmacology. 741 (2014) 230-23
- Smith J.F., di Menna M.E., McGowan L.T., *Reproductive performance of Coopworth ewes following oral doses of zearalenone before and after mating*. Journal of Reproduction and Fertility. 89 (1990) 99-106
- Solecki R., Kortenkamp A., Bergman A., Chahoud I., Degen G.H., Dietrich D., Greim H., Hakansson H., Hass U., Husoy T., Jacobs M., Jobling S., Mantovani A., Marx-Stoelting P., Piersma A., Ritz V., Slama R., Stahlmann R., Van Den Berg M., Zoeller R.T., Boobis A.R., *Scientific principles for the identification of endocrine-disrupting chemicals: a consensus statement*. Archives of Toxicology. 91 (2017) 1001-1006
- Soto A.M., Schaberle C.M., Sonnenschein C., *From Wingspread to CLARITY: a personal trajectory*. Nature Reviews Endocrinology. 17 (2021) 247-256
- Stanley J.S., Cramer P.H., Thornburg K.R., *Mass spectral confirmation of chlorinated and brominated diphenyl ethers in human adipose tissue*. Chemosphere. 23 (1991) 1197-1204

- Stapleton H.M., Klosterhaus S., Eagle S., Fuh J., Meeker J.D., Blum A., Webster T.F., *Detection of Organophosphate Flame Retardants in Furniture Foam and U.S. House Dust*. Environmental Science & Technology. 43 (2009) 7490-7495
- Storelli M.M., Storelli A., Barone G., Franchini D., *Accumulation of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in pet cats and dogs: Assessment of toxicological status*. Science of the Total Environment. 408 (2009) 64-68
- Sumner R., Tomlinson M., Craigon J., England G.C.W., Lea R.G., *Independent and combined effects of diethylexyl phthalate and polychlorinated biphenyl 153 on sperm quality in the human and dog*. Scientific Reports. 9 (2019) 3409
- Suzuki T., Hirai A., Khidkhan K., Nimako C., Ichise T., Takeda K., Mizukawa H., Nakayama S.M.M., Nomiya K., Hoshi N., Maeda M., Hirano T., Sasaoka K., Sasaki N., Takiguchi M., Ishizuka M., Ikenaka Y., *The effects of fipronil on emotional and cognitive behaviors in mammals*. Pesticide Biochemistry and Physiology. 175 (2021) 104847
- Talpade J., Shrman K., Sharma R.K., Gutham W., Singh R.P., Meena N.S., *Bisphenol A. An endocrine disruptor*. Journal of Entomology and Zoology Studies. 6 (2018) 394-397
- Takeuchi S., Iida M., Kobayashi S., Jin K., Matsuda T., Kojima H., *Differential effects of phthalate esters on transcriptional activities via human estrogen receptors α and β , and androgen receptor*. Toxicology. 210 (2005) 223-233
- Tarin D., *Tissue interactions and the maintenance of histological structure in adults*, in: D. Tarin (Ed.), *Tissue Interactions in Carcinogenesis*, Academic Press, London, 1972, 81-84
- Tatay E., Espín S., García-Fernández A-J., Ruiz M-J., *Oxidative damage and disturbance of antioxidant capacity by zearalenone and its metabolites in human cells*. Toxicology in Vitro. 45 (2017) 334-339
- Tekin K., Arslan P., Cil B., Filazi A., Akçai E., Yurdakok-Dikmen B., *Companion animals get close to the toxic aspects of anthropogenic world: cytotoxicity of phthalates and bisphenol A on dog testicular primary cells*. Cytotechnology. 72 (2020) 629-638
- Teng C., Goodwin B., Shockley K., Xia M., Huang R., Norris J., Alex B., *Bisphenol A affects androgen receptor function via multiple mechanisms*. Chemico-biological Interactions. 203 (2013) 556-564
- Troitzsch J., *International plastic flammability handbook*. 2nd ed. Munich, Germany, Hanser, 1990
- UNEP, Stockholm Convention on Persistent Organic Compounds, United Nations Environmental Programme, Vienna, Austria, 2004
- Verner M.A., Sonneborn D., Lancz K., Muckle G., Ayotte P., Dewailly E., Kocan A., Palkovicova L., Trnovec T., Haddad S., Hertz-Picciotto I., Eggesbo M., Palkovicova L., Trnovec T., Haddad S., Hertz-Picciotto I., Eggesbo M., *Toxicokinetic modeling of persistent organic pollutants in blood from birth to 45 months of age in birth longitudinal cohort studies*. Environmental Health Perspectives. 121 (2013) 131-137

- Verreault J., Skaare J.U., Jenssen B.M., Gabrielsen G.W., *Effects of organochlorine contaminants on thyroid hormone levels in Arctic breeding glaucous gulls; Larus hyperboreus*. Environmental Health Perspectives. 112 (2004) 532-537
- Vina J., Gambini J., Lopez-Gruoso R., Abdelaziz K.M., Jove M., Borrás C., *Females live longer than males: role of oxidative stress*. Current Pharmaceutical Design. 17 (2011) 3959-3965
- Vos J.G., Dybing E., Greim H.A., Ladefoged O., Lambré G., Tarazona J.V., Brandt I., Vethaak A.D., *Health effects of endocrine-disrupting chemicals on wildlife; with special reference to European situation*. Critical Reviews in Toxicology. 30 (2000) 71-133
- Waliszewski S., Aguirre A.A., Infanzón R.M., Siliceo J., *Carry-over of persistent organochlorine pesticides through placenta to fetus*. Salud Pública de México. 42 (2000) 384-390
- Wan H.T., Mruk D.D., Wong C.K.C., Cheng C.Y., *Targeting testis-specific proteins to inhibit spermatogenesis: lesson from endocrine disrupting chemicals*. Expert Opinion on Therapeutic Targets. 17 (2013) 839-855
- Wang T., Lu J., Xu M., Xu Y., Li M., Lu Y., *Urinary bisphenol A concentration and thyroid function in Chinese adults*. Epidemiology. 24 (2013) 295-302
- Wang S., Zhang S., Huang H., Zhao M., Lv J., *Uptake, translocation and metabolism of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) in maize (Zea mays L.)*. Chemosphere. 85 (2011) 379-385
- White H.L., Freeman L.M., Mahony O., Graham P.A., Hao Q., Court M.H., *Effect of dietary soy on serum thyroid hormone concentrations in healthy adult cats*. American Journal of Veterinary Research. 65 (2004) 586-591
- Witaszak N., Waśkiewicz A., Bocianowski J., Stępien Ł., *Contamination of Pet Food with Mycobiota and Fusarium Mycotoxins-Focus on Dogs and Cats*. Toxins. 12 (2020) 130
- Woclawek-Potoka I., Piskula M., Bah M.M., Siemeniuch M.J., Korzekwa A., Brzezicka E., Skarzynski D.J., *Concentrations of isoflavones and their metabolites in the blood of pregnant and non-pregnant heifers fed soy bean*. The Journal of Reproduction and Development. 54 (2008) 358-363
- Wooten K.J., Smith P.N., *Canine toys and training devices as sources of exposure to phthalates and bisphenol A: Quantitation of chemical in leachate and in vitro screening for endocrine activity*. Chemosphere. 93 (2013) 2245-2253
- Xia B., Zhu Q., Zhao Y., Ge W., Zhao Y., Song Q., Zhou Y., Shi H., Zhang Y., *Phthalate exposure and childhood overweight and obesity: urinary metabolomic evidence*. Environment International. 121 (2018) 159-168
- Xu G., Hu F., Wang X., Zhang B., Zhou Y., *Bisphenol A perturbs visual function of adult cats by remodeling the neuronal activity in the primary visual pathway*. Archives of Toxicology. 92 (2018) 455-468
- Yasuda T., Mizunuma S., Kano Y., Saito K., Oshawa K., *Urinary and biliary metabolites of genistein in rats*. Biological and Pharmaceutical Bulletin. 19 (1996) 413-417

Yavuz O., Arslan H.H., Esin C., Das Y.K., Aksoy A., *Determination of plasma concentration of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in pet cats and dogs*. Toxicology and Industrial Health. 34 (2018) 541-553

Yilmaz B., Terekechi H., Sandal S., Kelestimur F., *Endocrine disrupting chemicals: exposure, effects on human health, mechanism of action, model for testing and strategies for prevention*. Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders. 21 (2020) 127-147

Yurdakök-Dikmen B., Tekin K., Tripan M.B., Daşkin A., Filazi A., *In vitro Toxicity of Some Pesticides on Goat and Dog Spermatozoa*. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi. (2016) (in stampa)

Zhang J., Zhang J., Liu R., Gan J., Liu J., Liu W., *Endocrine-Distrupting Effects of Pesticides through Interference with Human Glucocorticoid Receptor*. Environmental Science and Technology. 50 (2016) 435-443

Zhao X.R., Qin Z.F., Yang Z.Z., Zhao Q., Zhao Y.X., Qin X.F., Zhang Y.C., Ruan X.L., Zhang Y.F., Xu X.B., *Dual body burdens of polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers among local residents in an e-waste recycling region in Southeast China*. Chemosphere. 78 (2010) 659-666

Zoeller R.T., Bergman Å., Becker G., *A path forward in the debate over health impacts of endocrine disrupting chemicals*. Environmental Health. 13 (2014) 1-11

Zwierzchowski W., Gajęcki M., Obremski K., Zielonka Ł., Baranowski M., *The occurrence of zearalenone and its derivatives in standard and therapeutic feeds for companion animals*. Polish Journal of Veterinary Sciences. 7 (2004) 289-293

SITOGRAFIA

Google Scholar: <https://scholar.google.com>

Immagini: <https://www.lidsen.com> <https://www.researchgate.net>

Banfield pet hospital. State of pet health 2016 report:

<https://www.banfield.com/banfield/media/pdf/downloads/soph/banfieldstate-of-pet-health-report-2016pdf>

Endocrine Disruptor List: <https://www.edlists.org>

European Food Safety Authority: <https://www.efsa.europa.eu>

Istituto Superiore di Sanità: <https://www.iss.it> <https://www.issalute.it>

