

www.iss.it/life

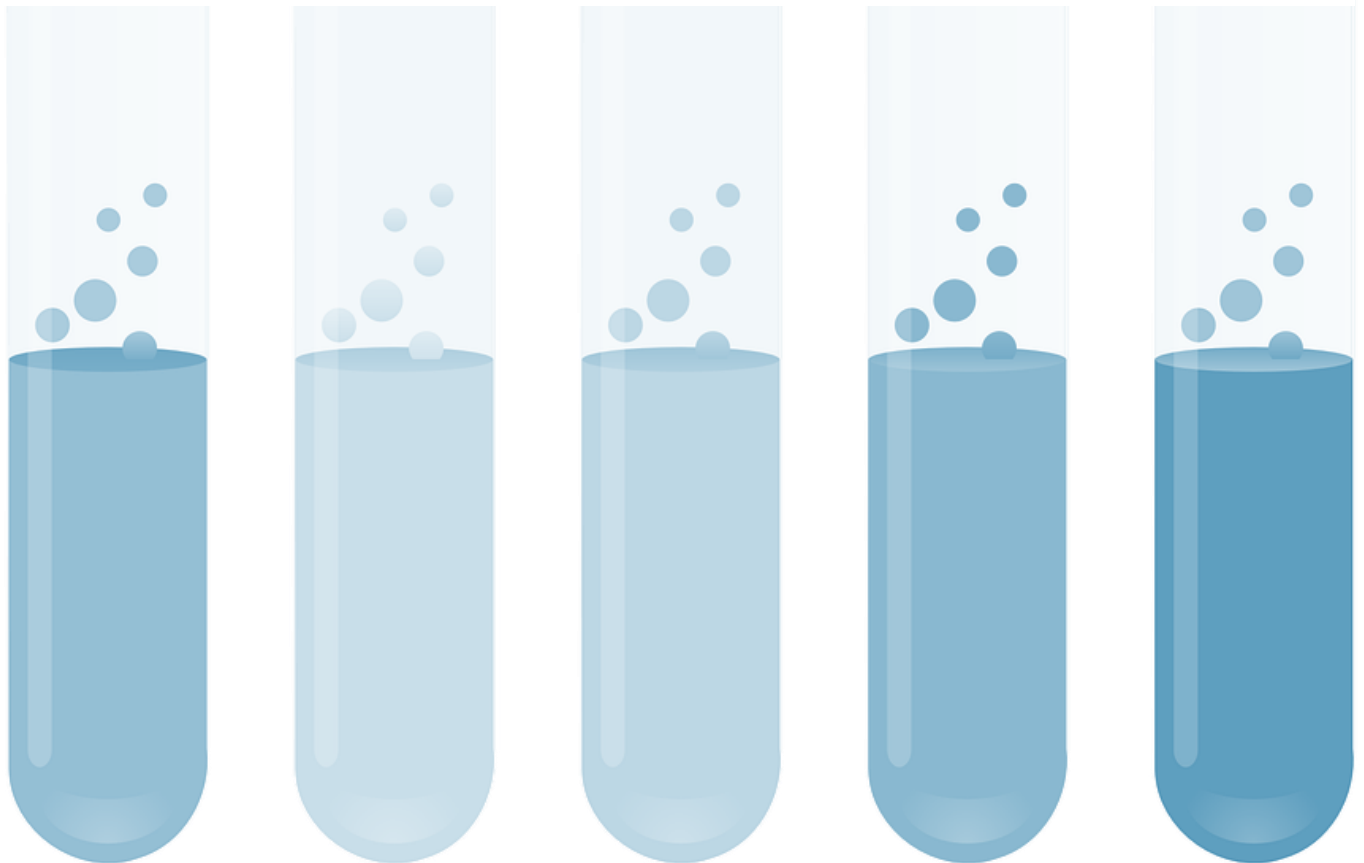
LIFE12 ENV/IT/000633

LIFE-EDESIA

LAYMAN'S REPORT

Endocrine Disruptors *in silico/in vitro* -
Evaluation and Substitution for Industrial Application

Interferenti Endocrini *in vivo/in vitro* -
Valutazione e Sostituzione per Applicazioni Industriali



European
Commission

ENVIRONMENT

LIFE Programme

<http://ec.europa.eu/environment/life/>



FACTSHEET



LIFE-EDESIA has been co-financed by the LIFE+ European Programme, coordinated by Istituto Superiore di Sanità (ISS, Rome) in collaboration with Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri (IRFMN, Milan) and University Federico II of Naples - and the University of Parma as external collaboration.

Project reference: LIFE12 ENV/IT/000633

Duration: 2013-2016

Total budget: 1,205,464.00 €

EU contribution: 602,731.00 €

Themes: Risk management - Human health protection, Industry-Production - Chemicals

Keywords: human exposure to pollutants, hazardous substance, alternative material, preventive measure

Coordinator: Istituto Superiore di Sanità (ISS) is the main scientific body of the Italian national health service. ISS activities include toxicological risk assessment, safety of food and chemicals (e.g. REACH) and environmental health: testing and assessment of endocrine disrupting chemicals (EDCs) is a priority issue.

PARTNERS



Istituto Superiore di Sanità (ISS) – www.iss.it/inte

Project coordinator → Alberto Mantovani (alberto.mantovani@iss.it)

Project manager → Stefano Lorenzetti (stefano.lorenzetti@iss.it)



Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri (IRFMN) – www.marionegri.it

Emilio Benfenati (emilio.benfenati@marionegri.it)



Università degli Studi Federico II di Napoli – www.unina.it

Elisa Perissutti (perissut@unina.it)

COLLABORATORS



Università degli Studi di Parma – www.unipr.it

Pietro Cozzini (pietro.cozzini@unipr.it)



European
Commission

ENVIRONMENT

LIFE Programme

INTRODUZIONE

Il sistema endocrino è formato da **ghiandole endocrine** che secernono **ormoni** (ad es., estrogeni, androgeni, ormoni tiroidei) che, circolando nel corpo attraverso il sangue, regolano importanti funzioni molecolari e cellulari a seguito dell'interazione con **recettori** (proteine cellulari legate selettivamente da sostanze chimiche con un meccanismo chiave-serratura).

Gli **Interferenti Endocrini (IE)** sono un gruppo variegato di sostanze chimiche, naturali e di sintesi, in grado di interferire con il normale funzionamento del sistema endocrino in tre modi:

- simulando l'azione di un ormone endogeno;
- bloccando il legame ormone-recettore (ad es., un Recettore Nucleare/RN);
- interferendo su formazione, trasporto, metabolismo ed escrezione degli ormoni.

Ricerche scientifiche indicano che le persone più esposte agli IE hanno un maggiore rischio di sviluppare patologie riproduttive (infertilità, abortività, endometriosi, ecc.), disturbi comportamentali nell'infanzia, nonché malattie cronico-degenerative e dell'invecchiamento quali il diabete di tipo 2, l'obesità e alcuni tipi di cancro (testicolo, mammella, ecc.).

Le persone sono esposte agli IE attraverso prodotti di consumo, l'ambiente in cui vivono e il cibo che mangiano.

Per tutelare la salute umana e l'ambiente dagli IE, l'Europa ha promulgato il Regolamento REACH per valutare le sostanze chimiche e vietare e/o sostituire le più preoccupanti, come gli IE, seguendo il "principio di precauzione". Tale principio afferma che **se un prodotto contenente una sostanza chimica pericolosa può essere fabbricato usando un'alternativa più sicura, ad un costo ragionevole, l'utilizzo di tale sostanza chimica non sarà più permesso in quella produzione.**

INTRODUCTION

The endocrine system has three main components: **endocrine glands** that secrete specific chemicals called **hormones**. Hormones circulate around the body via the blood stream and modulate bodily functions by binding with target cells through **receptors** (structures on or inside of a cell that selectively binds a specific chemical in a lock-and-key interaction).

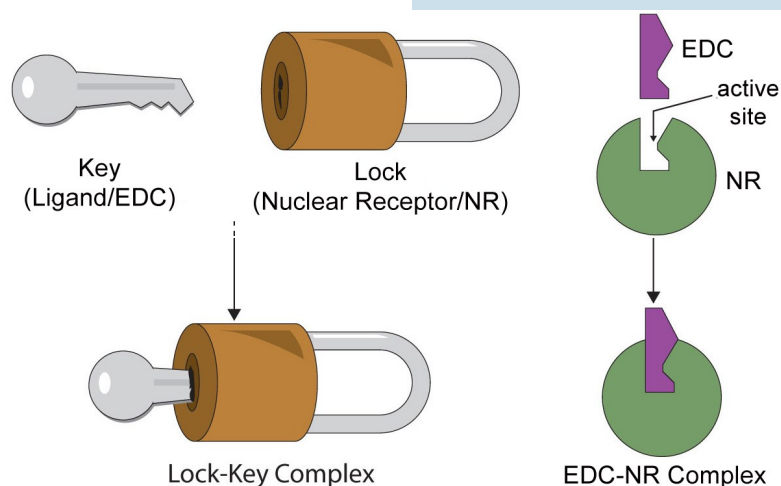
Endocrine Disruptors or EDCs are a miscellaneous group of substances, both natural or man-made, that are capable to interfere with the normal functioning of the endocrine system in three ways:

- by mimicking an endogenous hormone's action;
- by blocking the hormone-bound receptor (e.g., a Nuclear Receptor/NR);
- by affecting the synthesis, transport, metabolism and excretion of hormones.

Adverse effects produced by EDCs exposure are pointed out by scientific studies showing how highly exposed people undergo an increased risk of reproductive disorders (infertility, miscarriages, endometriosis, etc.), behavioural disorders in childhood, type 2 diabetes and obesity and some types of cancer (testicular, breast, etc.).

People are exposed to EDCs through consumer products, the environment where they live and food they eat.

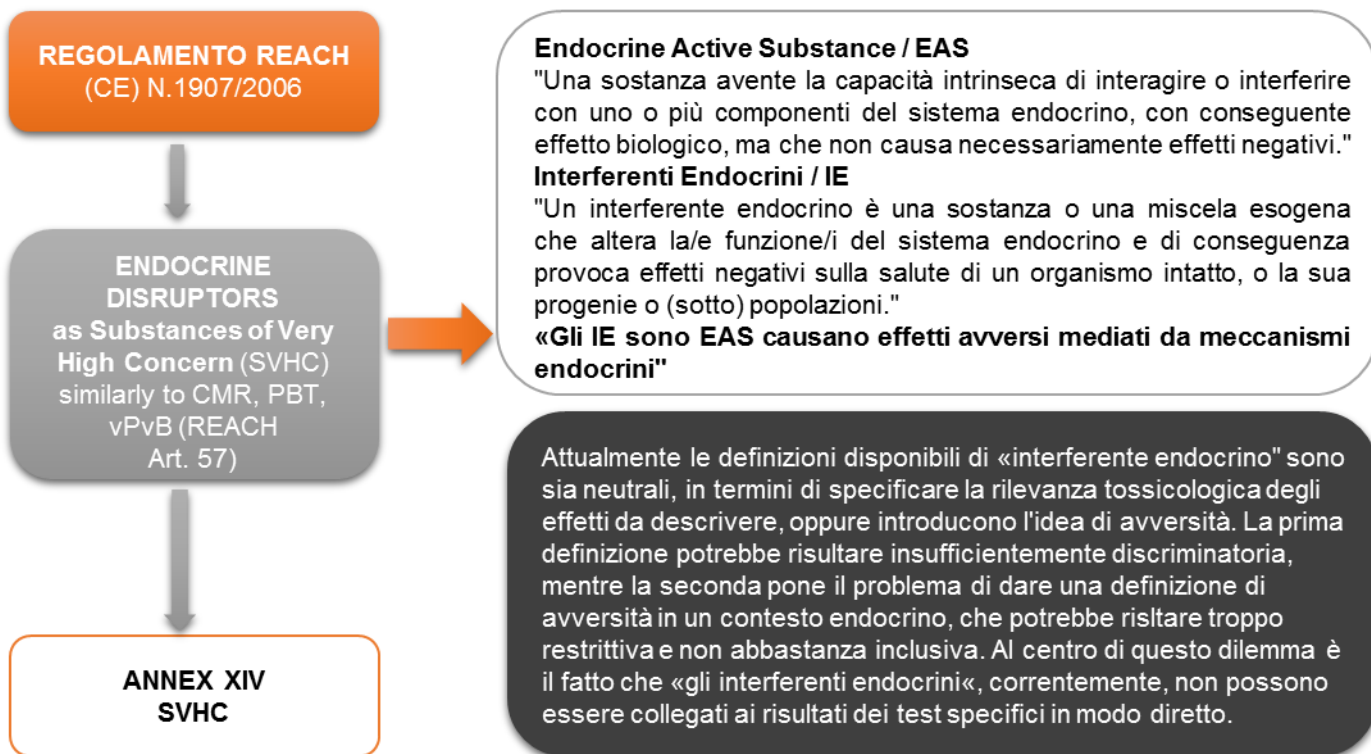
In order to ensure protection of environmental and human health from EDCs, Europe has launched the REACH Regulation to assess chemical substances used in Europe and ban and/or replace the most worrying, such as EDCs following the "substitution principle". Such principle states that **if a product containing a hazardous chemical can be manufactured using a safer alternative, at a reasonable cost, the use of such a chemical will no longer be allowed in that production.**



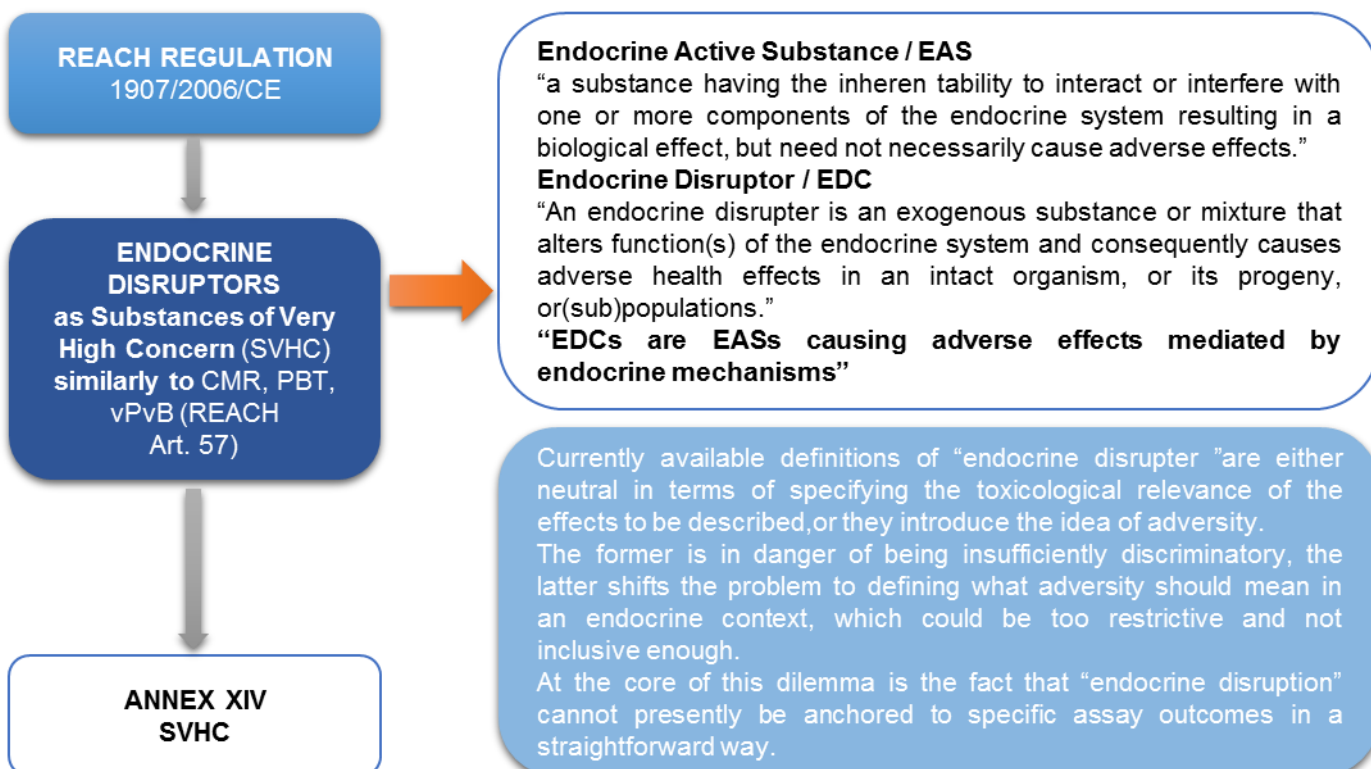
Interazione IE-RN secondo il modello Chiave-serratura

EDC-NR interaction according to the Lock-and-key model

DA DOVE ABBIAMO INIZIATO



WHERE WE STARTED FROM

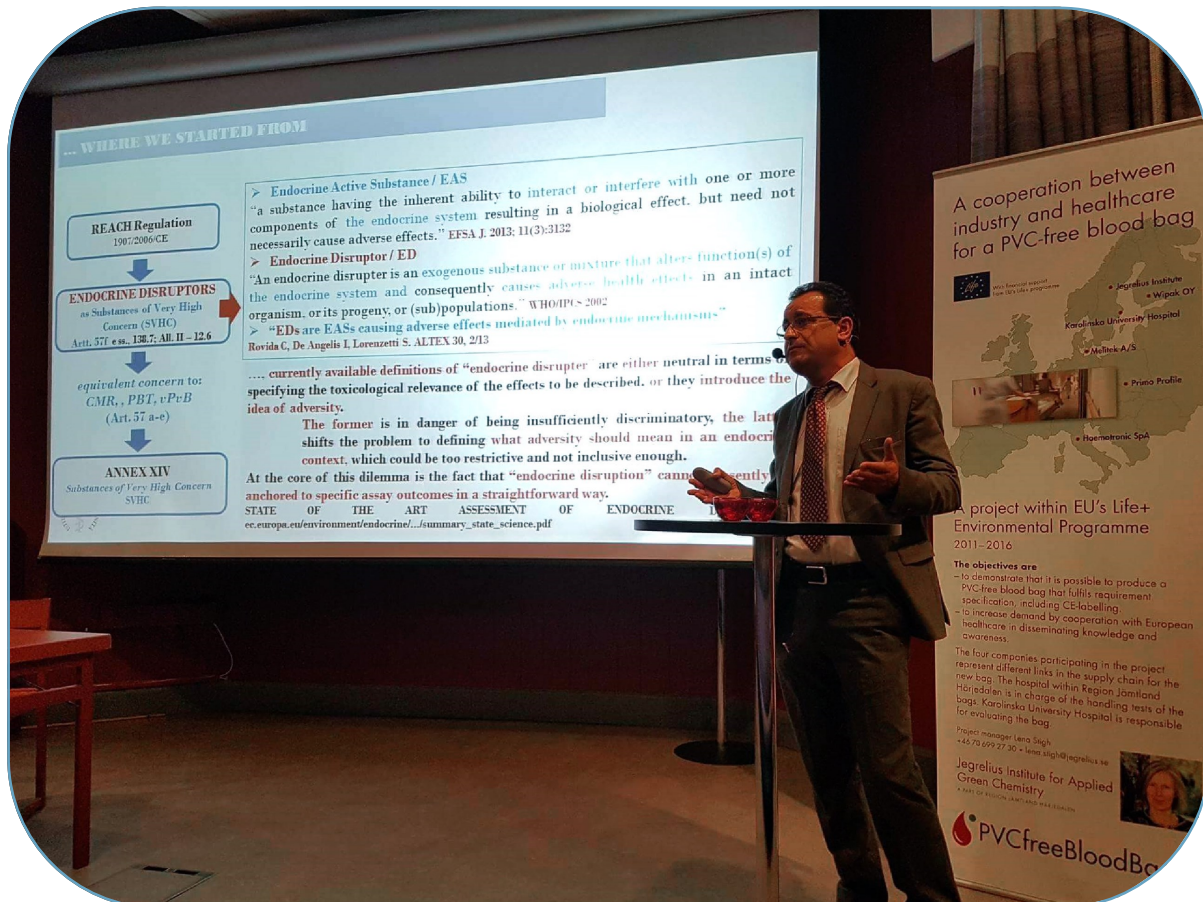


OBIETTIVI PRINCIPALI

- Applicare il principio di sostituzione a IE, quali ftalati e bisfenoli, considerati nell'ambito del Regolamento REACH come "sostanze chimiche molto preoccupanti" (SVHC) - oppure di "preoccupazione equivalente" a cancerogeni/mutageni/tossici per la riproduzione (CMR); persistenti, bioaccumulabili, tossici per l'ambiente (PBT); molto persistenti, molto bioaccumulabili (vPvB) - sulla base di i) rischi associati agli effetti endocrini, ii) alti volume di produzione, iii) uso diffuso, iv) esposizione potenziale della popolazione attraverso dieta e prodotti di consumo.
- Dimostrare l'applicabilità di un'innovativa, efficiente ed economicamente vantaggiosa strategia integrata *in silico/in vitro* per la sostituzione di IE con sostanze chimiche che presentino analoghe performance e minori pericoli per la salute, promuovendo così l'applicazione del principio di sostituzione in accordo con il regolamento REACH.
- Dimostrare l'applicabilità della strategia integrata di LIFE-EDESIA anche ad altre applicazioni industriali collegate al regolamento REACH.

MAIN OBJECTIVES

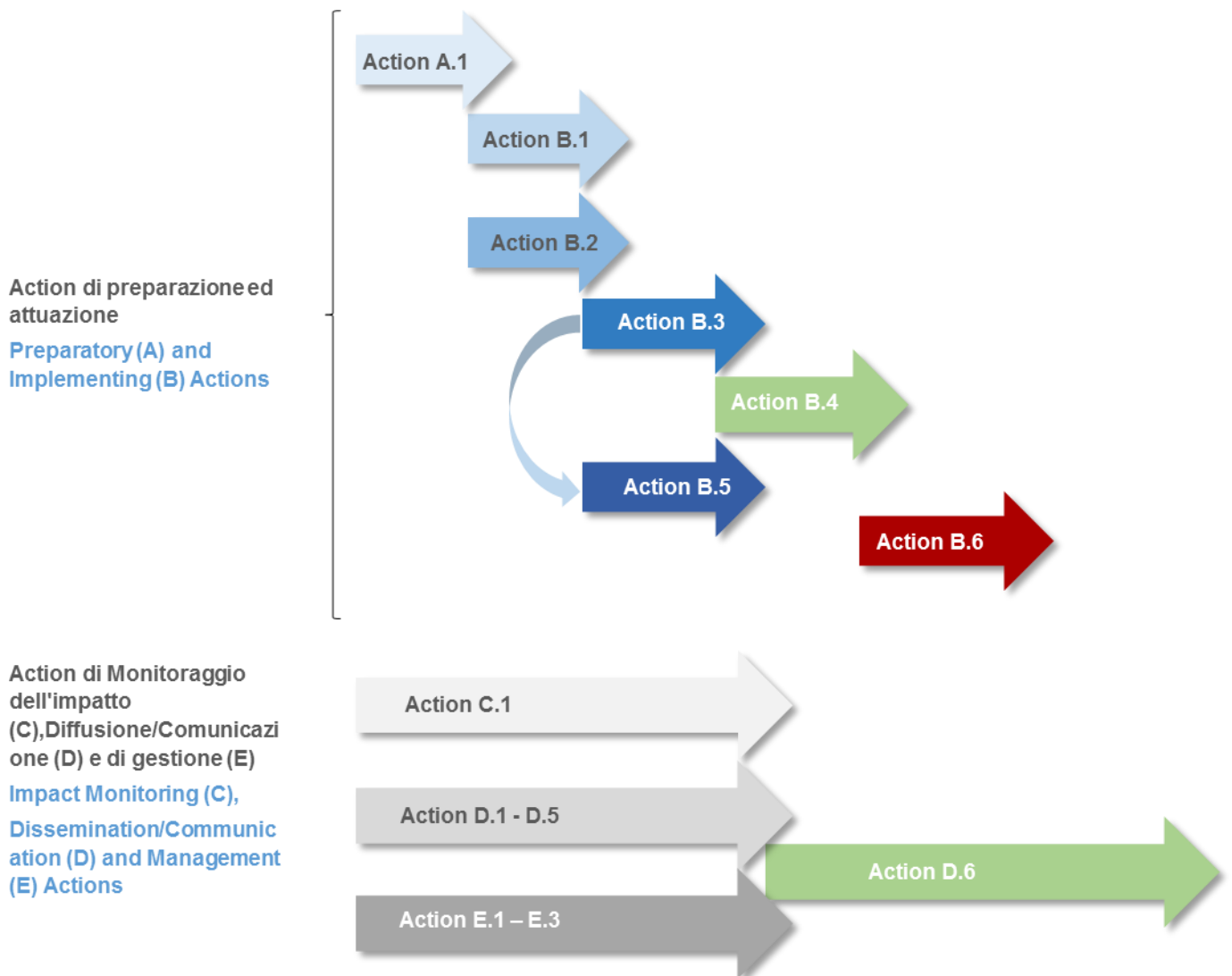
- To apply the substitution principle to EDCs, such as phthalates, bisphenols, according to the REACH Regulation as "Substances of Very High Concern" (SVHC) - or of «equivalent concern» to carcinogenic/mutagenic/toxic for reproduction (CMR); persistent, bioaccumulative, toxic for the environment (PBT); very Persistent, Very bioaccumulative (vPvB) - on the basis of i) endocrine disruption effects, ii) high production volume, iii) widespread use and iv) potential exposure of general population through consumer products and diet.
- To demonstrate a new, robust and cost-effective *in silico/in vitro* approach to evaluate suitable chemicals for replacing EDCs of equivalent concern with similar industrial performances and less hazardous to human health, supporting the application of the substitution principle within the REACH legislative framework.
- To demonstrate the feasibility of the substitution of the EDCs considered in LIFE-EDESIA also in other industrial applications linked to REACH Regulation.



PVCFreeBloodBag Final Seminar (27-28.09.2016, Östersund, SW): Stefano Lorenzetti (ISS)

AGGIORNAMENTO PROGRESSI COMPIUTI

PROGRESS UPDATE



Aggiornamento progressi compiuti - Gennaio 2017

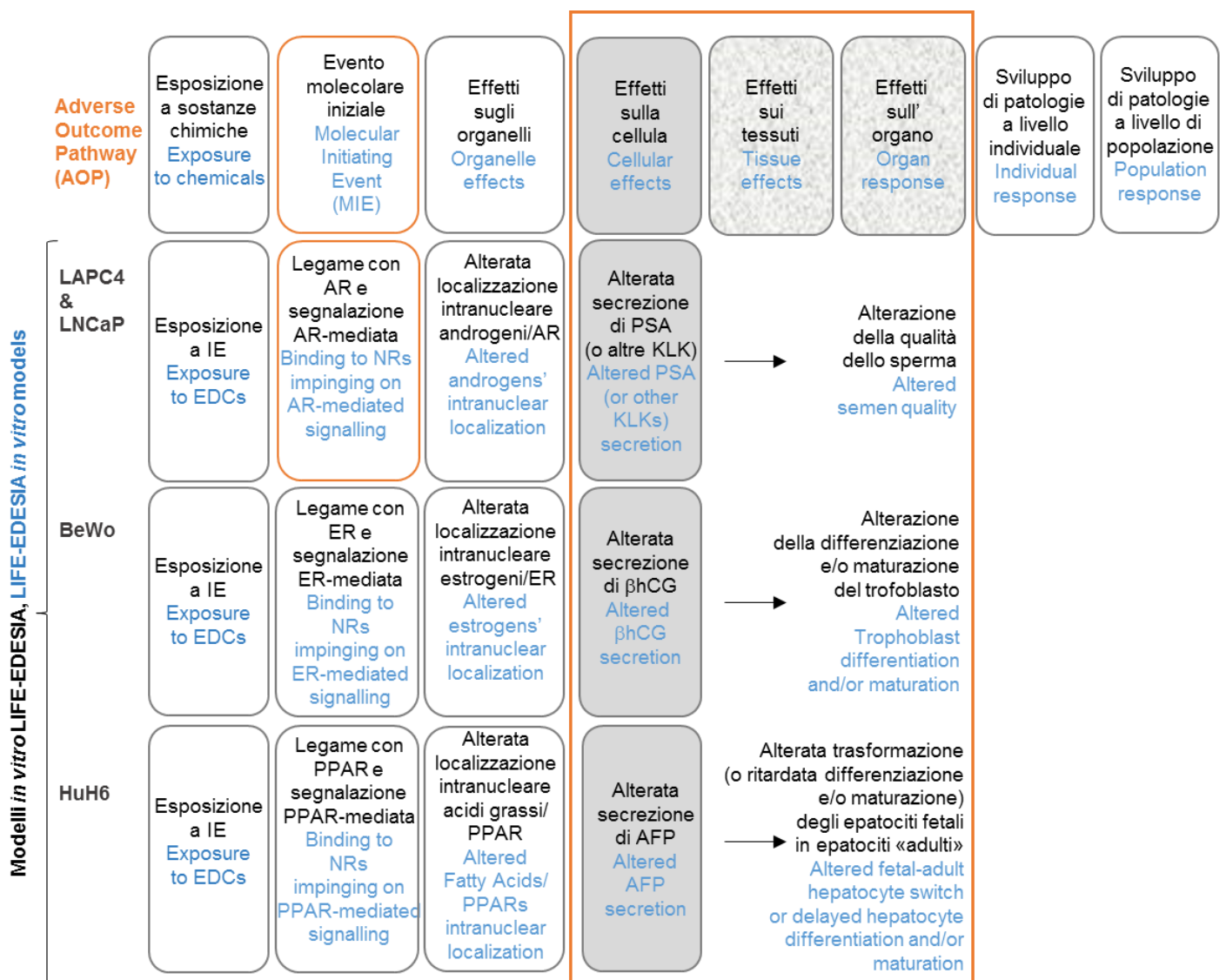
Le Action completate sono raffigurate da **frecche blu**.
 Le Action B.3 e B.5 sono **interconnesse**.
 Le Action C, D ed E sono rappresentate da **frecche grigie**.
 Le Action simboleggiate da **frecche verdi** sono **in corso**, mentre quelle non ancora iniziate sono rappresentate da **frecche rosse**.

Progress Update - January 2017

Completed Actions are depicted in **blu arrows**.
 Actions B.3 and B.5 are **interconnected**.
 Actions C, D and E are represented in **grey arrows**.
 Actions highlighted in **green arrows** are **in progress**, whereas those ones not yet started are in **red arrows**.

SCREENING ENDOCRINO-DIPENDENTE

ENDOCRINE-BASED SCREENING



Lo screening endocrino-dipendente di alternative a SVHC - mediante l'uso di biomarcatori funzionali, or-mone-regolati e cellula-specifici - integrato nello schema tossicologico di un Adverse Outcome Pathway.

The endocrine-based screening of SVHC alternatives using cell-specific, ED-targeted functional biomarkers integrated within the current main toxicological scheme of the Adverse Outcome Pathway.

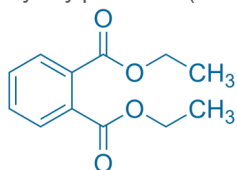
LAPC4 cellule epitelio prostata
LNCaP cellule epitelio prostata
BeWo cellule trofoblasto-simili
HuH6 epatociti fetali
AR recettore per gli androgeni
ER recettore per gli estrogeni
PPAR recettore attivato dagli induttori dei perossisomi (per il metabolismo lipidico)
PSA antigene prostata specifico
KLK kallikreina
 β hCG corio-gonadotropina umana, beta
AFP α -fetoproteina

LAPC4 human-derived prostate epithelium-like cells
LNCaP human-derived prostate epithelium-like cells
BeWo human-derived trophoblast-like cells
HuH6 human-derived fetal hepatocytes
AR androgen receptor
ER estrogen receptor
PPAR peroxisome proliferator-activated receptor (lipid metabolism)
PSA prostate-specific antigen
KLK kallikrein
 β hCG β human corio-gonadotropin
AFP α -fetoprotein

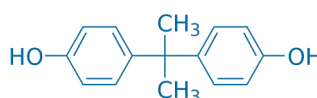
RESULTS



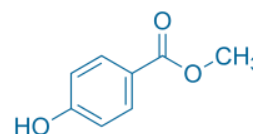
di-2-etilesilftalato
di-2-ethylexylphthalate (DEHP)



bisfenolo
bisphenol A (BPA)



metilparabene
methyl paraben



Una selezione di sostanze chimiche alternative agli:

ftalati (ad es., DEHP)	da 55 a 5
bisfenoli (ad es., BPA)	da 27 a 3
parabeni (ad es., metilparabene)	da 18 a 4

con la stessa performance industriale e con meno effetti avversi dal punto di vista delle proprietà tossicologiche ed, in particolare, dell'interferenza endocrina della sostanza chimica di riferimento è stata effettuata mediante uno screening tossicologico *in silico*, basati su un insieme di metodi computazionali.

RESULTS

Compilation of 3 different lists of already existing alternatives of the LIFE-EDESIA compounds of interest

phthalates
n = 55

bisphenol
s n = 27

parabens
n = 18

In silico selection of substitutive chemicals to be tested *in vitro* for their:

- for chemical-physical properties (eg., solubility, lipophilicity)
- for toxicological properties (e.g., cancerogenic, mutagenic, binding to nuclear receptors)
- Quantitative structure-activity relationship (QSAR)
- Molecular docking

Synthesis of chemical substances selected in Action B.1 and B.2, not commercially available

phthalates
n = 5

bisphenol
s n = 3

parabens
n = 4

In progress: *In vitro* assays in three experimental models of human-derived cell lines, using cell-specific, hormone-dependent biomarkers

A selection of chemicals alternatives to:

phthalates (e.g. DEHP)	from 55 to 5
bisphenols (e.g. BPA)	from 27 to 3
parabens (e.g. methyl paraben)	from 18 to 4

having the same industrial performance and less toxicological and, in particular, ED-related adverse effects in comparison to the chemicals of reference has been performed by a *in silico* toxicological screening based on a set of computational methods.

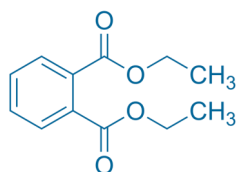
CONCLUSIONI

Il progetto LIFE-EDESIA è stato incentrato sul raggiungimento dei seguenti obiettivi:

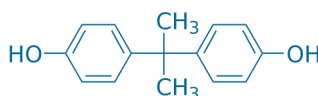
- un elenco di 15 potenziali sostanze chimiche sostitutive - per bisfenoli, ftalati e parabeni - prive di proprietà preoccupanti secondo i criteri REACH (3-5 potenziali sostituti per ogni classe chimica);
- la messa a punto di un sistema integrato, a più stadi, *in silico/in vitro* per la valutazione di sostanze chimiche sostitutive a IE in accordo al REACH;
- la dimostrazione della applicabilità delle sostanze chimiche sostitutive per scopi industriali (dispositivi medici, cosmetici e imballaggi alimentari);
- la promozione dei risultati del progetto a livello europeo.

Al momento, il primo obiettivo è stato completamente raggiunto, mentre il secondo ed il terzo sono stati parzialmente eseguiti e pertanto tuttora in corso. Il quarto obiettivo è stato finora realizzato in parallelo al conseguimento dei risultati.

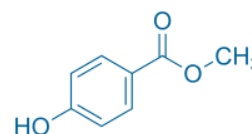
di-2-etilesilftalato
di-2-ethylexylphthalate (DEHP)



bisfenolo
bisphenol A (BPA)



metilparabene
methyl paraben



PROSPETTIVE

Completare le Azioni in corso, per la piena realizzazione degli obiettivi di LIFE-EDESIA.

Presentare i risultati e la strategia sviluppata agli organismi europei (ECHA, EFSA, DG-SANTE) e internazionali (OECD, WHO) coinvolti nella identificazione delle sostanze chimiche particolarmente preoccupanti (SVHC) e nella valutazione delle possibili alternative.

Comunicare i risultati e la strategia sviluppata agli stakeholders interessati alla ricerca e sviluppo nel settore della sicurezza chimica, dai progetti europei alle associazioni di impresa, senza dimenticare le associazioni dei consumatori.

Sulla base degli esiti di LIFE-EDESIA, programmare ulteriori iniziative per sviluppare il principio di sostituzione applicato agli Interferenti Endocrini.

CONCLUSIONS

The LIFE-EDESIA project has been planned to achieve the following objectives:

- a list of some 15 potential substitutive chemicals for bisphenols, phthalates and parabens, devoid of characteristics of concern based on REACH criteria (3-5 potential substitutes for each chemical class are envisaged);
- a step-wise, integrated *in silico/in vitro* system to assess substitute chemicals for EDCs, in compliance with REACH legislation;
- the demonstration of the potential use of the substitute chemicals for EDCs for industrial purposes (medical devices, cosmetics and food packaging)
- the project's results promotion at EU level.

So far, the first objective has been completely achieved, while the second and the third one are still ongoing and hence partially performed. The fourth objective has been realized concomitantly to the result's progression

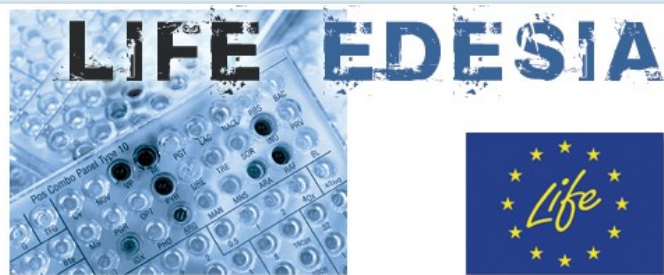
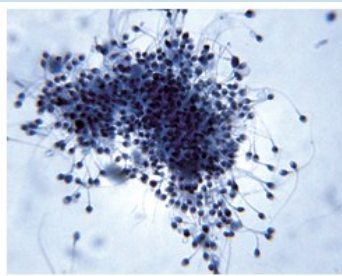
PERSPECTIVES

To complete Actions *in progress*, through the full accomplishment of LIFE-EDESIA objectives.

To present LIFE-EDESIA results and strategy to the European (ECHA, EFSA, DG-SANTE) and international (OECD, WHO) bodies involved in the identification of substances of very high concern (SVHC) and in the assessment of possible substitutes.

To disseminate LIFE-EDESIA results and strategy to the stakeholders interested to research and development in the chemical safety field, such as academic and private stakeholders involved in European projects and the industrial world, without leaving aside consumers' associations.

Based on LIFE-EDESIA outcomes, to launch further initiatives to implement the substitution principle applied to EDCs.



LIFE12 ENV/IT/000633



2nd LIFE-EDESIA Workshop (20-22.07.2015, Ranco, IT): Isabella De Angelis (IPAM), Costanza Rovida (CAAT - Europe), Bart van den Burg (BDS), Alberto Mantovani (ISS), Scott Belcher (Univ. of Cincinnati), Jane Muncke (FPF), Emilio Benfenati (IRFMN), Stefano Lorenzetti (ISS), Matthew Dent (Unilever), Pietro Cozzini (Univ. of Parma), Thomas Hartung (CAAT).

CONTATTI/CONTACTS



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



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



life.edesia@iss.it



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



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



Tel.: +39-06-49902512



European
Commission

ENVIRONMENT

LIFE Programme