

# Endocrine disruptors e diabete tipo 2

Paolo Sbraccia, Valeria Guglielmi

Dipartimento di Medicina dei Sistemi, Università di Roma "Tor Vergata"

**N**elle ultime decadi si è assistito a un drammatico aumento della prevalenza del diabete tipo 2 (DMT2) e di altre patologie metaboliche che hanno ormai raggiunto proporzioni epidemiche.

Recentemente crescenti evidenze scientifiche hanno messo in relazione l'esposizione a sostanze chimiche sintetiche con un'ampia varietà di patologie, tra le quali alcune alterazioni neurologiche e della funzione riproduttiva.

Originariamente articolata agli inizi degli anni '90, la teoria degli *endocrine disruptors* (interferenti endocrini) propone che alcune sostanze chimiche esogene interferiscano con gli assi ormonali endogeni (1).

Il riconoscimento di questa potenziale interferenza ha messo in discussione alcuni cardini della tossicologia tradizionale che si era in precedenza focalizzata sulle capacità dei composti di causare tossicità acute o cancerogenesi.

La *Environmental Protection Agency* (EPA) definisce *endocrine disrupting chemicals* (EDC) "agenti esogeni capaci di interferire con la produzione, il rilascio, il trasporto, il metabolismo, il legame recettoriale, l'azione o l'eliminazione degli ormoni endogeni" (EPA, 1997) e conseguentemente di "causare effetti avversi sulla salute dell'organismo esposto,

della sua progenie o di popolazioni" (*International Programme for Chemical Safety*, 2010). L'interesse del mondo scientifico per gli EDC è cresciuto a partire dagli anni '90 fino ad essere dichiarato un'area prioritaria di ricerca dalla WHO (*World Health Organization*) nel 2010.

Gli EDC comprendono un'ampia varietà di composti chimici, strutturalmente eterogenei, tra i quali inquinanti organici, derivati industriali, metalli pesanti, pesticidi, componenti della plastica e ormoni sintetici e naturali, ai quali l'uomo è esposto attraverso l'ambiente e l'alimentazione (Tabella 1).

I contaminanti organici persistenti (*persistent organic pollutants*, POP) sono EDC lipofili e altamente resistenti alla degradazione metabolica che vengono accumulati a livello del tessuto adiposo, persistendovi per anni. L'uomo è esposto ai POP attraverso il consumo di alimenti contenenti grasso e diversi studi ne hanno dimostrato concentrazioni misurabili nel sangue (2) e nel latte materno (3).

Sebbene altri EDC come il bisfenolo A (BPA) e gli ftalati siano idrofili e siano stati in passato ritenuti più rapidamente degradabili, la loro diffusione è talmente pervasiva da renderne l'esposizione umana e ambientale continua e da causarne persistenza e bioaccumulo significativi nella catena alimentare.

Livelli misurabili di BPA sono infatti stati riscontrati nell'urina del 92,6% di cittadini americani (4) e nel 50% di campioni di tessuto adiposo mammario di donne (5).

Nonostante l'evidenza che la produzione degli EDC sia cresciuta di pari passo con la diffusione del DMT2 e del suo ruolo nella patogenesi delle patologie metaboliche, l'effettivo contributo degli EDC all'incremento della prevalenza del DMT2 rimane ancora da definire.

## Inquinanti diabetogeni

### Evidenze epidemiologiche

Molti dati relativi all'associazione tra EDC ambientali e DMT2 derivano da studi epidemiologici condotti in diver-

### FAD ECM "il Diabete"

Questa rassegna fa parte di un **percorso di formazione a distanza** accreditato a livello nazionale e disponibile gratuitamente nell'aula virtuale della SID (<http://sidfad.acmed.org>).

Per partecipare al corso occorre:

1. Leggere la rassegna (disponibile anche on-line)
2. Registrarsi all'aula e iscriversi al corso "il Diabete"
3. Rispondere on-line ai quiz di verifica e compilare il questionario di valutazione dell'evento FAD.

Una volta eseguito con successo il test di valutazione e compilato il questionario di valutazione dell'evento, sarà cura della Segreteria ECM della SID far pervenire l'attestato ECM del corso ai diretti interessati nei tempi e nelle modalità stabiliti dalla regolamentazione vigente.

Per ulteriori informazioni: <http://sidfad.acmed.org>

Tabella 1 Interferenti endocrini e loro effetti sul metabolismo

EDC	Categoria o fonte	Recettori nucleari	Studi <i>in vitro</i> /animali	Studi epidemiologici	Studi su esposizione durante lo sviluppo
Organoclorurati (es. DDT)	Pesticidi e plastificanti	ER- $\alpha$ , AR		Associazione con sindrome metabolica e diabete	Associazione con sovrappeso in età pediatrica (uomo)
Diossine (PCB, TCDD)	Inquinanti ambientali alimentari	AhR, PPAR- $\gamma$ , ER	Inibizione adipogenesi	Associazione con sindrome metabolica, obesità e diabete	
Organotine (es. TBT, TPTO)	Inquinanti ambientali alimentari	RXR, PPAR- $\gamma$	Induzione adipogenesi		Alterazione dell'adipogenesi (topo)
PFC (es. PFOA, PFOS)	Plastificanti	ER, AR, PPAR	Perdita di peso, effetto anoressizzante	Associazione con ipercolesterolemia	Aumento del peso e dei livelli sierici di insulina e leptina (topo)
BFR (es. PBDE)	Ritardanti di fiamma	PXR, ER, TR	Aumento lipolisi, riduzione ossidazione del glucosio	Associazione con sindrome metabolica e diabete	
Alchilfenoli (es. octilfenolo)	Surfattanti	ER, AR, CAR	Induzione espressione di resistina		
BPA	Plastificanti	ER, AR, TR, GR	Induzione adipogenesi, aumento insulinemia	Associazione con diabete ed alterazioni epatiche	Aumento del peso (topo e ratto)
Ftalati (es. DEHP, DBP, DEP)	Plastificanti	PPAR, CAR/PXR, GR	Induzione adipogenesi in cellule, perdita di peso nel topo	Associazione con obesità e insulino-resistenza	DiBP: riduzione dei livelli plasmatici di insulina e leptina (topo); DEHP: nessun effetto (topo)

Mod. da (38)

si contesti sperimentali. I risultati dello studio dei veterani americani esposti a 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-diossina (TCDD) durante la guerra del Vietnam e i numerosi studi di follow-up seguiti all'accidentale rilascio di TCDD nell'incidente di Seveso del 1976 hanno documentato un'associazione tra le concentrazioni sieriche di TCDD e la prevalenza di DMT2 e insulino-resistenza (6, 7). Anche numerosi studi sull'esposizione occupazionale hanno suggerito associazioni tra diossine (8) e pesticidi organoclorurati (9) e DMT2. Alcuni studi hanno anche descritto associazioni tra alcuni inquinanti e pre-diabete (10), sindrome metabolica (11) e insulino-resistenza (12).

Nonostante storicamente l'associazione tra EDC e prevalenza di patologie metaboliche sia stata documentata in individui esposti a grandi quantità di inquinanti (per motivi occupazionali o a seguito di incidenti industriali), più recenti studi epidemiologici hanno rivelato associazioni anche tra le basse dosi di EDC riscontrate in campioni biologici umani e diversi *endpoints* di malattia, usando i dati del *National Health and Nutrition*

*Examination Survey* (NHANES) del 2003–2004 che forniscono un ampio campione rappresentativo della popolazione americana.

Utilizzando questo campione, che riflette il rischio di esposizione della popolazione generale, è stato possibile evidenziare l'associazione tra le concentrazioni di BPA e il DMT2 e le malattie cardiovascolari (13).

Altri studi basati su questi dati hanno mostrato che la prevalenza del DMT2 era da due a cinque volte maggiore negli individui con più alte concentrazioni sieriche di POP (14). In aggiunta alla rilevanza di questa osservazione, non è stata riscontrata alcuna associazione tra obesità e DMT2 nei soggetti con livelli non misurabili di POP, a suggerire che il rischio di DMT2 degli individui obesi dipenda dai livelli di POP circolanti e che l'obesità sia la principale causa dell'accumulo dei POP nell'organismo (14).

Pubblicazioni successive hanno confermato l'associazione tra le concentrazioni sieriche di POP e l'insulino-resistenza, le alterazioni del profilo lipidico (15) e la sindrome metabolica (16).

Sebbene la successiva analisi epidemiologica dei dati forniti dal NHANES nel 2005–2006 non abbia comprovato l'associazione dei livelli di BPA urinari con il DMT2, quando i dati NHANES del 2003–2004 e del 2005–2006 vengono considerati nel loro insieme questa associazione torna a essere significativa (17).

Nel 2010 uno studio caso-controllo ha mostrato che basse dosi di POP erano predittive del DMT2 nella coorte del *Coronary Artery Risk Development in Young Adults* (CARDIA); gli autori hanno inoltre potuto osservare che i policlorobifenili (PCB), più persistenti nell'ambiente, erano maggiormente predittivi di DMT2 (18).

### Modelli cellulari e animali

Molti studi su modelli animali hanno dimostrato che l'esposizione ai POP, così come al BPA, è in grado di indurre alterazioni dell'omeostasi glucidica.

Ratti adulti maschi esposti attraverso la dieta a POP per 28 giorni sono divenuti insulino-resistenti e hanno sviluppato obesità e steatosi epatica. Adipociti murini 3T3-L1 differenziati esposti a concentrazioni nanomolari di POP sono risultati meno responsivi all'insulina e hanno mostrato una *down*-regolazione dei geni insulino-indotti coinvolti nel metabolismo lipidico. Questi esperimenti evidenziano un nesso causale tra l'esposizione ai POP e l'insulino-resistenza mediato da un'azione diretta sugli adipociti (19).

È stato documentato che il TCDD riduce l'*uptake* di glucosio nel tessuto adiposo e nel pancreas e la secrezione insulinica, mentre il suo ruolo nell'alterazione della tolleranza ai carboidrati rimane controverso. Per esempio, l'alterata tolleranza al glucosio è stata indotta nel topo trattato per 10 giorni con dosi di 100 µg/kg x d di TCDD (20) ma non dopo una singola dose di 10 µg/kg x d (21). In un altro modello murino il TCDD ha ridotto l'espressione genica della glucochinasi, causando un aumento dei valori glicemici analogo a quello osservato nel *Maturity-Onset Diabetes of the Young* (MODY) *type 2* (22). Diversamente, in altri studi il trattamento con TCDD ha provocato nei roditori una riduzione dell'attività della fosfoenolpiruvato carbossichinasi e quindi della gluconeogenesi, con progressivo decremento dei livelli glicemici (23). I risultati discordanti sugli effetti del TCDD sui livelli glicemici possono dipendere dalla diversità delle dosi di esposizione sperimentali.

Nelle isole del Langerhans appena isolate il 17β-estradiolo, il dietilstilbestrolo (DES) e il BPA potenziano i segnali Ca<sup>2+</sup>-mediati del glucosio responsabili della secrezione insulinica. Esperimenti *in vivo* hanno poi evi-

denziato la riduzione dei livelli glicemici e il simultaneo incremento dell'insulinemia a seguito dell'esposizione a una singola dose di BPA o di 17β-estradiolo (10 µg/kg). Diversamente, l'esposizione continuativa di topi maschi adulti a dosi maggiori di 17β-estradiolo e di BPA (100 µg/kg die) ha indotto insulino-resistenza e iperinsulinemia, dimostrando che il BPA ha la stessa capacità degli estrogeni di alterare il metabolismo glucidico. Gli effetti descritti sul pancreas endocrino sono risultati in questo caso mediati dagli effetti *estrogen receptor* (ER) classici, in quanto prevenuti dalla somministrazione dell'antiestrogeno fulvestrant (24). Esperimenti condotti su isole del Langerhans murine hanno indicato che l'esposizione di 48 h al BPA e al 17β-estradiolo (tra 100 pmol/L e 1 nmol/L) ha aumentato l'espressione genica, il contenuto e la secrezione di insulina con meccanismi ER-α-mediati (25), dimostrando che l'aumentata attività del pancreas endocrino non è solo secondaria alla necessità di controbilanciare la sopraggiunta insulino-resistenza, ma anche un effetto diretto degli EDC sulle β-cellule.

Il BPA a concentrazioni pico- o nano-molari, ovvero simili o al di sotto di quelle riscontrate nell'uomo, riduce il rilascio di adiponectina in campioni di tessuto adiposo sottocutaneo, viscerale e mammario (26).

L'esposizione di ratti al ritardante di fiamma polibrominato difenil etere (PBDE) ha aumentato significativamente la lipolisi e ha diminuito la captazione del glucosio insulino-indotta (27), mentre il dietilesil ftalato (DEHP), un comune plastificante, ha ridotto i livelli di insulina e aumentato i livelli glicemici nei ratti esposti (28).

Le organotine (in particolare il TBT), sostanze largamente usate, sono state caratterizzate come sostanze obesogene, ovvero composti chimici capaci di indurre adipogenesi nei vertebrati (29). Basse dosi di TBT hanno causato nel topo maschio adulto obesità e steatosi epatica, inducendo iperinsulinemia e riducendo i livelli di adiponectina (30).

Oltre all'associazione tra esposizione agli EDC e patologie metaboliche dell'adulto, vi sono non inferiori preoccupazioni concernenti l'esposizione durante il periodo perinatale. L'esposizione prenatale a basse concentrazioni di DES (1 µg/kg x d) ha aumentato il peso dei topi femmina dopo 6 settimane di vita e l'esposizione neonatale per 5 giorni ha causato gli stessi effetti (31, 32). Nel topo l'esposizione orale al BPA (100 µg/kg x d) dal 6° giorno di gestazione fino alla fine dell'allattamento ha indotto un aumento del peso della prole di entrambi i sessi (33). Altri studi sul topo hanno evidenziato che la prole esposta a iniezioni di BPA (10 µg/kg x d) dal 9°

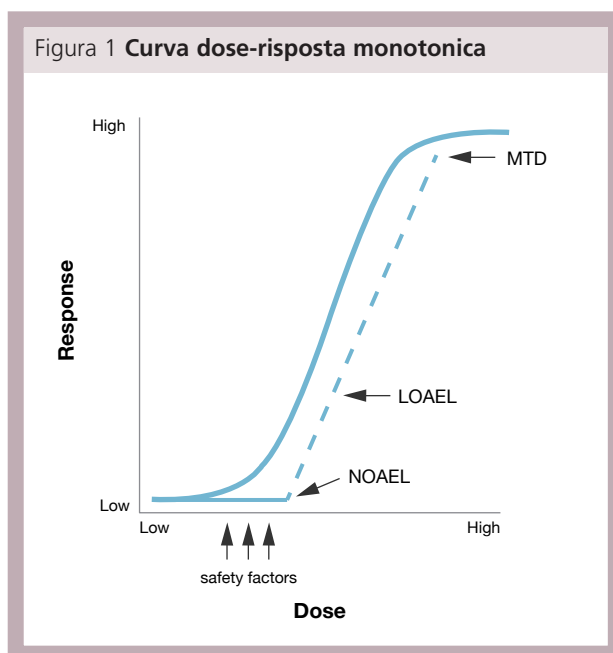
al 16° giorno di gestazione aveva un peso maggiore alla nascita che si normalizzava dopo lo svezzamento e che i maschi al 6° mese di vita erano insulino-resistenti, iperinsulinemici e intolleranti al glucosio, rispetto ai controlli non esposti. L'analoga esposizione a dosi maggiori di BPA (100 µg/kg x d) ha dato risultati diversi, caratterizzati dal riscontro di intolleranza al glucosio ma di normale sensibilità insulinica nella prole (34). In ogni caso, queste osservazioni indicano che l'esposizione perinatale al BPA sembra avere la capacità di programmare il metabolismo glucidico della prole. Inoltre, dal momento che il topo esposto al BPA durante la gestazione è più grasso, insulino-resistente e intollerante al glucosio rispetto ai controlli, dopo 4 mesi dal parto (34) si può anche ipotizzare che l'esposizione al BPA durante la gravidanza produca effetti sul peso e sul metabolismo glucidico che si mantengono nel tempo. Anche l'esposizione prenatale al TBT può costituire un fattore di rischio per lo sviluppo di DMT2 in quanto nel topo è stata associata a una maggiore capacità adipogenica, parallelamente a una ridotta capacità osteogenica (35).

### Effetto biologico a bassa dose

È noto che l'esposizione ad alti dosaggi (milli-molari) di EDC, come a seguito di incidenti industriali o di eventi bellici, possa avere effetti tossici, ovvero cancerogenetici, teratogenetici e immunosoppressivi.

Gli attuali *cut-offs* di esposizione utilizzati dalle agenzie governative come la FDA (*Food and Drug Administration*) e l'EPA sono stati definiti a partire dall'assunzione di monotonicità, che prevede che il segno delle curve di dose-risposta rimanga costante, a fronte di linearità o non-linearità degli effetti osservati (Figura 1). In conformità con tale assunzione, cardine della tossicologia tradizionale e alla base del celebre aforisma "la dose fa il veleno", la bassa dose viene definita come la dose inferiore alla più bassa dose in grado di indurre modificazioni biologiche avverse (*lowest observed adverse effect level*, LOAEL) nell'animale da laboratorio (36).

Nel 2006 vom Saal e Welshons (37) hanno esaminato 100 studi pubblicati sulle basse dosi di BPA e identificato effetti biologici significativi per dosi inferiori alla LOAEL (50 mg/kg die) e, in 40 studi, inferiori alla *reference dose* (50 µg/kg die), ovvero la dose di esposizione presumibilmente sicura (dalle 3 alle 1000 volte inferiore alla *no observed adverse effect level*, NOAEL) stabilita dall'EPA e dall'FDA. Questi studi, insieme ad altri dati



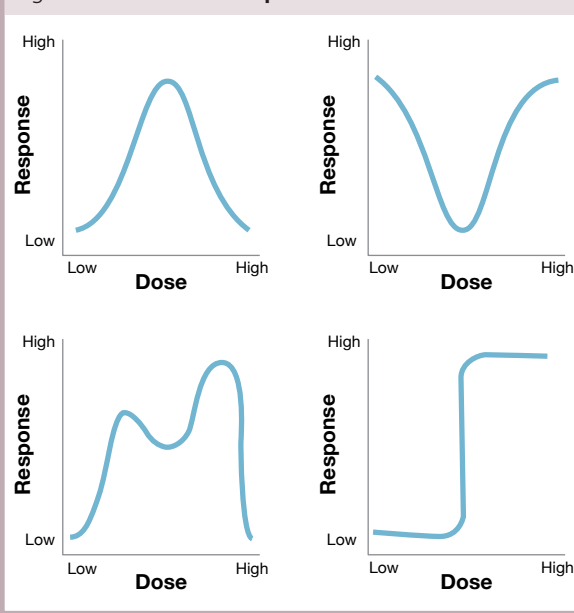
MTD: maximum tolerated dose; LOAEL: lower observed adverse effect level; NOAEL: no observed adverse effect level. Mod. da (38)

sperimentali, costituiscono l'evidenza a sostegno dell'ipotesi che gli EDC seguano curve di dose-risposta non-monotoniche e pertanto possano provocare effetti avversi a dosi inferiori a quelle di riferimento. In un sistema che risponde in modo non-monotonico, ovvero in cui la pendenza della curva dose-risposta cambia di segno (dal positivo al negativo o viceversa) una o più volte (curve bifasiche o multifasiche) in diversi punti del *range* delle dosi esaminate, non è appropriato usare le alte dosi per predire gli effetti delle basse dosi.

Le curve non-monotoniche sono infatti frequentemente curve a U, con alte risposte a bassi e alti livelli di esposizione; in altri casi seguono un andamento a U invertita, con le maggiori risposte per dosi intermedie (Figura 2) (38).

Il sistema endocrino risponde a concentrazioni molto basse di ormone (dell'ordine di nano- e pico-grammi), permettendo a un grandissimo numero di molecole attive circolanti di coesistere. Gli ormoni endogeni agiscono a concentrazioni molto basse in virtù dell'alta affinità dei recettori e di relazioni non lineari tra la concentrazione dell'ormone e il numero dei recettori legati e tra quest'ultimo e il maggiore effetto biologico osservabile. Gli EDC possono avere un'azione ormono-mimetica (agendo attraverso meccanismi recettore-mediati) oppure interferire con le sostanze ormonali endogene, condividendone in entrambi i casi gli effetti biologici a basse dosi (39).

Figura 2 Curve dose-risposta non-monotoniche



Mod. da (38)

Ad oggi sono stati identificati numerosi meccanismi volti a dimostrare come gli EDC producano risposte non-monotoniche in cellule, tessuti e nell'animale. Questi meccanismi includono:

- citotossicità: gli ormoni possono essere acutamente citotossici ad alte dosi e alterare *endpoints* biologici a basse dosi (39);
- specificità cellulare e tissutale di recettori e cofattori: differenti tessuti e tipi cellulari esprimono diversi recettori o sottotipi recettoriali che rispondono diversamente allo stesso ormone (40) o diversi cofattori che possono influenzare gli effetti trascrizionali dell'ormone (41) e la selettività recettoriale (42); in questa ottica alcune curve non-monotoniche deriverebbero dalla sovrapposizione di due o più risposte monotoniche che attraverso diversi *pathways* portano allo stesso effetto biologico finale;
- selettività recettoriale: un ormone a basse dosi lega selettivamente uno specifico recettore, mentre ad alte dosi lega debolmente anche altri recettori ormonali (43);
- down-regulation* e desensibilizzazione recettoriale;
- competizione recettoriale: in presenza di ormoni endogeni basse dosi di EDC legano i recettori ormonali disponibili aumentando la risposta biologica, mentre ad alte concentrazioni gli EDC competono con i ligandi ormonali naturali riducendone l'azione, favoriti anche dalla maggiore biodisponibilità rispet-

- to agli ormoni endogeni che in parte circolano inattivi (legati ad alta affinità a proteine di trasporto);
- f. circuiti endocrini di *feedback* negativo.

## Meccanismi d'azione

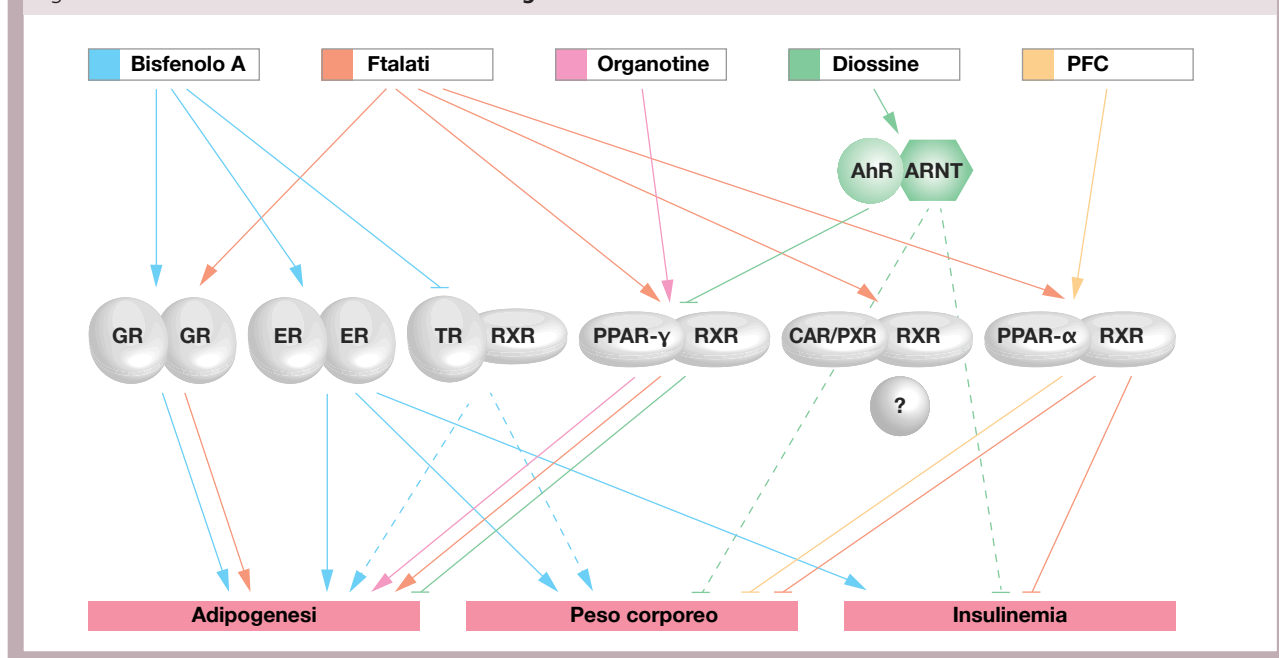
### Tradizionale "endocrine disruption"

Tradizionalmente la ricerca concernente gli EDC si è focalizzata sulla capacità dei composti chimici esogeni di modulare l'attività dei classici recettori ormonali nucleari, tra cui quelli degli estrogeni, degli androgeni, dell'ormone tiroideo e dei glucocorticoidi (Figura 3). Molti EDC esercitano le loro azioni attraverso il legame con gli ER- $\alpha$  e - $\beta$  e con gli *estrogen-related receptors*  $\gamma$  mimando le funzioni di questi ormoni o più raramente agendo come antagonisti estrogenici. Gli estrogeni e gli ER regolano molti aspetti del metabolismo, tra cui il trasporto del glucosio, la glicolisi, l'attività e la morfologia mitocondriale e l'ossidazione degli acidi grassi. Modelli *knockout* per il gene dell'aromatasi o di ER- $\alpha$  dimostrano la capacità degli estrogeni di migliorare la sensibilità insulinica (44, 45). Comunque, gli effetti degli estrogeni sull'azione insulinica sono contesto-dipendenti come mostrato dal ruolo centrale che svolgono durante la gravidanza. Nelle fasi gestazionali avanzate, nell'uomo come nel roditore, la madre sviluppa un certo grado di insulino-resistenza per assicurare un adeguato flusso di nutrienti al feto. Allo stesso tempo le isole del Langerhans si adattano per sintetizzare e rilasciare maggiori quantità di insulina per far fronte alla sopraggiunta insulino-resistenza e per mantenere l'omeostasi glucidica. Vi sono evidenze a sostegno del ruolo del *signaling* estrogenico nell'induzione dell'insulino-resistenza e dell'adattamento delle  $\beta$ -cellule (46). Il 17 $\beta$ -estradiolo, a concentrazioni simili a quelle osservate nella gravidanza, causa insulino-resistenza nel ratto e nel topo maschio adulto (47) e allo stesso tempo, attraverso i recettori ER- $\alpha$  e ER- $\beta$ , promuove la sintesi e il rilascio di insulina nelle  $\beta$ -cellule *in vitro* e *in vivo* (48).

L'azione estrogenica del BPA può interferire con l'adattamento dell'omeostasi glucidica durante la gravidanza (favorendo l'insorgenza del diabete gestazionale), alterare il programma metabolico della prole (34) e, al di fuori della gravidanza, portare allo sviluppo di DMT2. Alcuni effetti dell'esposizione a basse dosi di BPA sembrano essere mediati dal suo legame a recettori ER- $\alpha$  extra-nucleari (25) e da *pathways* non classici ER-mediati (49). A livello cellulare l'esposizione precoce di



Figura 3 Meccanismi molecolari di azione degli EDC



PFC: polyfluoroalkyl compound. Mod. da Casal-Casas C, Desvergne B. *Annu Rev Physiol* 73: 135-162, 2011

cellule 3T3-L1 a BPA aumenta il differenziamento adipocitario in modo dose-dipendente e può permanentemente alterare l'espressione genica adipocitaria e la sintesi di leptina (50).

Dal momento che gli EDC possono modulare l'azione insulinica diversamente, a seconda del *background* ormonale, gli effetti osservati nelle condizioni sperimentali possono essere diversi a seconda del sesso dell'animale o dello stadio della vita riproduttiva.

Anche gli androgeni possono modulare la sensibilità insulinica. Nello studio TIMES2 il trattamento con testosterone di soggetti ipogonadici con DMT2 o sindrome metabolica ha migliorato la sensibilità insulinica valutata con l'HOMA-IR (51).

Al contrario, l'esposizione agli androgeni può influenzare negativamente la tolleranza al glucosio.

Scimmie *Rhesus* esposte in fase prenatale agli androgeni hanno sviluppato insulino-resistenza e le femmine caratteristiche consistenti con il fenotipo della sindrome dell'ovaio policistico (PCOS) (52). A tal proposito è interessante notare come recenti dati suggeriscano la presenza in donne con PCOS di livelli maggiori di BPA rispetto ai controlli e in correlazione con gli indici di insulino-resistenza (53). Diversi composti di sintesi hanno la capacità di agire sia da agonisti sia da antagonisti degli androgeni. Questi dati, nell'insieme, enfatizzano l'importan-

za del *timing*, del contesto e delle concentrazioni relative nell'impatto degli EDC sul rischio di DMT2.

Dato il ruolo degli ormoni tiroidei nel metabolismo energetico, anche l'alterazione di questo asse ormonale può contribuire allo sviluppo del fenotipo diabetico. È stato dimostrato che il BPA può agire da antagonista del recettore dell'ormone tiroideo inducendo il reclutamento del co-repressore NCoR sul recettore stesso (54) e che anche alcuni PCB possono interferire con questo asse.

Gli EDC capaci di mimare l'attività dei glucocorticoidi influenzano negativamente la sensibilità insulinica. Il BPA e il dicicloesil ftalato (DCHP) stimolano l'accumulo di lipidi mediato dal recettore dei glucocorticoidi in cellule 3T3-L1 durante il differenziamento (55).

### *Peroxisome proliferator-activated receptors*

Plastificanti, surfattanti, pesticidi e diossine possono modulare l'attività dei *peroxisome proliferator-activated receptors* (PPAR) (Figura 3). Questi recettori nucleari, in presenza di ligando, formano eterodimeri con il *retinoid X receptor* (RXR) per interagire con i *PPAR-response elements* a livello delle regioni promotrici dei geni target e adattare l'espressione genica allo stato metabolico.

Tra i pesticidi, il diclofop-metile e la piretrina inducono nel topo l'espressione dei geni target di PPAR- $\alpha$  a livelli simili a quelli indotti dai classici agonisti recetto-

riali (56). È stato dimostrato come, tra 40 EDC, le organotine TBT e TBTO sono attivatori nell'uomo di PPAR- $\gamma$  e RXR, mentre il TBT lega anche PPAR- $\beta$ , *liver X receptor* e *nuclear receptor-related 1 protein* (57).

Il TBT promuove l'adipogenesi stimolando PPAR- $\gamma$  e RXR in adipociti murini attraverso effetti trascrizionali diretti sui geni target di PPAR- $\gamma$  (29) e in colture di cellule staminali mesenchimali umane (35). L'osservazione che il TBT riduce la sensibilità insulinica nonostante le sue proprietà adipogeniche (30) lascia presumere una sua azione simultanea anche su altri recettori partner di RXR. Al contrario, il TCDD inibisce l'adipogenesi attraverso la soppressione di PPAR- $\gamma$  (58).

Sebbene gli effetti degli EDC mediati dai recettori ormonali nucleari siano ampiamente riconosciuti come importanti meccanismi di *endocrine disruption*, molto rimane ancora da chiarire sulle interazioni dirette composto-recettore o indirette, quali il reclutamento di coattivatori/corepressori, gli effetti allosterici e la degradazione recettoriale.

### Xenosensori

La superfamiglia dei recettori nucleari, oltre ai tradizionali recettori ormonali, include numerosi recettori coinvolti nel *sensing* e nella detossificazione di composti esogeni o xenobiotici, quali l'*aryl hydrocarbon receptor* (AhR) (45), il *pregnane X receptor* (PXR) e il *constitutive androstane receptor* (CAR) (Figura 3).

Questi recettori, oltre alla capacità di indurre enzimi detossificanti, possono modulare il metabolismo lipidico e del glucosio attraverso l'interazione con altri recettori nucleari (recettore dell'ormone tiroideo, dei glucocorticoidi, PPAR- $\alpha$ , PPAR- $\gamma$ ) e fattori di trascrizione (CREB, FOXO1, PGC1 $\alpha$ ) coinvolti nella regolazione energetica e possono influenzare le risposte infiammatorie (59).

L'AhR può alterare la funzione degli ER favorendone la degradazione proteosomica e regolandone l'attività trascrizionale; inoltre, modula i livelli estrogenici attraverso l'induzione del citocromo P450 e regola l'adipogenesi mediante l'inibizione dell'espressione di PPAR- $\gamma$ . Regola, infine, la trascrizione di proteine coinvolte nel ciclo cellulare e nei processi di organogenesi, immunosoppressione e cancerogenesi.

Solo recentemente sono stati apprezzati la funzione inibitoria di PXR e CAR sugli enzimi gluconeogenetici epatici (60), gli effetti steatogenetici di PXR in modelli murini (61) e la capacità di CAR di regolare positivamente l'omeostasi glucidica e la steatosi epatica (62).

Evidenze epidemiologiche hanno mostrato un'associazione tra l'esposizione a basse dosi di diossina e la modulazione della biosintesi del colesterolo, della sintesi di acidi grassi, del metabolismo del glucosio e della differenziazione adipocitaria, attraverso l'interazione con AhR (22).

È stato evidenziato come il TCDD sia in grado di ridurre le concentrazioni plasmatiche di insulina nei modelli murini C57Bl/6J suscettibili di DMT2 ma non nel topo AhR-null insulino-resistente, dimostrando come l'effetto del TCDD sia mediato da AhR (21).

Infatti, AhR è stato originariamente identificato come il recettore della diossina, uno dei composti più frequentemente associati al DMT2 negli studi epidemiologici. Al contrario, sebbene molti EDC come gli ftalati (DEHP e MEHP), il BPA e alcuni PCB siano in grado di legare e attivare il PXR e il CAR, ad oggi non vi sono ancora studi che abbiano stabilito un chiaro legame tra gli effetti metabolici degli EDC sull'uomo e la loro interazione con PXR e CAR.

### Altri meccanismi

La ricerca sugli EDC ha dato recente enfasi al ruolo dell'esposizione *in utero* e neonatale nella patogenesi delle patologie metaboliche dell'adulto. Sebbene non siano ancora state descritte associazioni tra l'esposizione agli EDC e le alterazioni epigenetiche dei geni che controllano il metabolismo energetico, l'esposizione a molti inquinanti sembra poter modificare l'epigenoma (63) e molte evidenze dimostrano come modificazioni epigenetiche indotte da sostanze chimiche siano ereditabili.

Gli effetti degli EDC su altri meccanismi molecolari implicati nello sviluppo di diabete, quali l'infiammazione e lo stress ossidativo, sono stati solo recentemente considerati. Ad esempio, il PCB-77 ha promosso l'espressione delle citochine pro-infiammatorie interleuchina (IL)-6 e *tumor necrosis factor* (TNF)- $\alpha$  nelle cellule endoteliali, riducendo il *signaling* insulinico (64).

In molti contesti sperimentali sono stati osservati danni cellulari di tipo ossidativo causati dagli EDC. In particolare, attraverso l'induzione di stress ossidativo, i PCB e il TCDD possono causare alterazioni di tipo infiammatorio nelle cellule endoteliali (65), mentre il BPA e i suoi metaboliti negli epatociti di ratto (66). La detossificazione di composti esogeni ad opera degli enzimi del citocromo P450 genera stress ossidativo e promuove insulino-resistenza epatica (67).

Lo stress ossidativo costituisce, inoltre, uno stimolo per la secrezione basale insulinica e modificazioni dello stato *redox* sono sufficienti ad alterare la funzione metabolica della  $\beta$ -cellula (68).

Altri meccanismi diabetogeni, quale lo stress del reticolo endoplasmatico, implicato nell'apoptosi  $\beta$ -cellulare indotta dall'arsenico (69), sono ancora poco studiati.

## Obesogeni ambientali o obesità come veicolo di accumulo?

La crescente prevalenza dell'obesità contribuisce inequivocabilmente all'epidemia diabetica. Nonostante l'obesità (come conseguenza dello sbilanciamento cronico tra introito calorico e spesa energetica) trovi spiegazione nei numerosi fattori predisponenti dello stile di vita delle società moderne, la velocità di aumento della sua prevalenza ha portato a ricercare altri fattori patogenetici.

Nel 2002 Baillie-Hamilton ha proposto un'associazione tra la produzione di sostanze chimiche sintetiche e l'epidemia dell'obesità (70). Questa correlazione, insieme alle evidenze sperimentali che alcuni inquinanti ambientali inducono adipogenesi e aumento di peso in modelli animali, ha portato alla formulazione dell'ipotesi degli obesogeni ambientali che postula un ruolo dei composti chimici nella patogenesi dell'obesità. Anche l'esposizione durante finestre temporali critiche, quale quella perinatale, al pari di dieta e stress materni, potrebbe programmare in senso obesogeno l'assetto metabolico della vita adulta (71).

Diversamente, alcuni EDC, come già discusso, pur essendo apparentemente privi di effetti adipogenici, risultano capaci di alterare direttamente la sensibilità insulinica o la funzione  $\beta$ -cellulare.

Analisi epidemiologiche non hanno mancato di evidenziare che le concentrazioni ematiche dei lipofili POP correlano sia con il BMI sia con il DMT2. L'osservazione interessante è stata che nei soggetti con livelli indosabili di POP la presenza di obesità non aumentava la prevalenza di DMT2 e che l'associazione tra i livelli di POP e DMT2 era statisticamente molto più forte nei soggetti obesi rispetto ai magri (14).

Queste evidenze supportano l'ipotesi che la ritenzione, la tossicità e la potenzialità diabetogena degli EDC lipofili siano strettamente legate alla quantità di massa grassa degli individui e che l'obesità rappresenti un veicolo di accumulo e persistenza degli EDC nell'organismo.

## Sfide e strategie

Contrariamente alle risposte monotoniche nelle quali tutte le dosi producono effetti simili ma la cui rilevanza

biologica varia con la dose stessa, nelle curve dose-risposta non-monotoniche i composti, al variare della dose, determinano effetti biologici diversi e talora perfino opposti. Questa rappresenta sicuramente la più importante criticità nell'affrontare lo studio degli effetti degli EDC. Infatti, non potendo utilizzare le informazioni ottenute nei test con le alte dosi ed essendo necessaria una conoscenza dettagliata dei meccanismi specifici che operano nei diversi sistemi biologici, l'andamento delle curve non-monotoniche risulta di difficile previsione.

Sono numerosi, inoltre, i fattori che limitano l'interpretazione dei dati ad oggi disponibili e la comprensione dell'impatto degli EDC sulle patologie metaboliche. L'elevatissimo numero di sostanze rilasciate nell'ambiente e le diverse proprietà fisiche che ne influenzano il bioaccumulo e la persistenza nei tessuti umani costituiscono una prima importante sfida analitica.

I dati relativi al monitoraggio ambientale appaiono insufficienti a predire i livelli di contaminazione della popolazione e non permettono di rilevare le tossicità legate ai metaboliti.

Le difficoltà sperimentali sono inoltre rappresentate dalla scarsa conoscenza dei rapporti di causa-effetto biologico che preclude la possibilità di predizione degli effetti avversi degli EDC.

L'ubiquitarità di molti EDC è tale da determinare un'esposizione contemporanea a più composti che possono esercitare effetti biologici additivi, antagonisti o sinergici. Di conseguenza, il fenotipo metabolico finale dell'organismo esposto può differire notevolmente da quello delineato dallo studio dei singoli composti.

La suscettibilità genetica individuale, le comorbidità e le abitudini dietetiche possono modificare l'impatto degli EDC sull'organismo. Per esempio, la familiarità per il DMT2 o l'obesità possono accentuare gli effetti diabetogeni di alcuni composti, mentre la dieta ad alto contenuto di grassi può aumentare l'esposizione agli EDC lipofili.

Inoltre, gli EDC che modulano l'azione degli steroidi possono avere effetti divergenti (a seconda del *background* ormonale, della fase di sviluppo dell'organismo, del *timing* dell'esposizione) e infine effetti trans-generazionali.

Un importante limite all'interpretazione degli studi epidemiologici *cross-sectional* è rappresentato dalla mancanza di informazioni sull'esposizione agli EDC e a possibili composti confondenti.

Le maggiori problematiche riguardano quei composti che vengono metabolizzati rapidamente e che hanno scarsa tendenza a bioaccumularsi (BPA e ftalati), poiché



i livelli correnti misurati possono differire dalle concentrazioni raggiunte durante lo sviluppo di malattia.

Infine, gli studi *cross-sectional*, pur dimostrando correlazioni, non permettono di stabilire nessi causali tra esposizione ed effetto.

Anche gli studi animali sono oggetto di controversie interpretative poiché le risposte agli EDC descritte nei modelli animali non possono sempre essere estese alla patologia umana per le diversità delle vie di esposizione e delle attività metaboliche e recettoriali.

Il contenimento degli effetti dannosi dell'inquinamento sulla salute pubblica richiede lo sviluppo e la messa a punto di programmi di ricerca ed educazionali, nonché di nuove regolamentazioni e politiche sanitarie.

L'analisi del rischio può essere migliorata identificando i soggetti maggiormente esposti e i fattori predisponenti agli effetti avversi degli EDC ed estendendo l'analisi dell'esposizione dai campioni di sangue e urina a quelli degli organi sede di accumulo dei composti lipofili (tessuto adiposo) o che sono rilevanti per l'esposizione perinatale (sangue del cordone, placenta e latte materno).

Oltre alla misurazione diretta degli EDC, lo sviluppo di marcatori clinici potrebbe facilitare l'identificazione e il monitoraggio prospettico degli individui esposti, al fine anche di stabilire chiari rapporti di causalità tra esposizione e sviluppo di DMT2.

## Conclusioni

Il DMT2, l'obesità e le alterazioni indotte dagli EDC sono temi prioritari della ricerca e degli organi deputati al controllo della salute pubblica.

Dosi ambientali di POP e di BPA possono indurre insulino-resistenza e alterare altri parametri metabolici nei modelli animali. Nei roditori l'esposizione al BPA durante la gestazione ha indotto molti mesi dopo il parto uno stato di pre-diabete nella madre e insulino-resistenza, iperinsulinemia e intolleranza al glucosio nella prole durante l'età adulta.

Sono attualmente molteplici i meccanismi molecolari evidenziati attraverso i quali gli EDC possono causare insulino-resistenza e alterazioni della funzione  $\beta$ -cellulare.

Le analisi epidemiologiche *cross-sectional* fino ad oggi condotte, seppur dimostrando una forte associazione tra l'esposizione umana anche a basse dosi di EDC e l'aumentato rischio di sviluppare DMT2, non permettono di documentare rapporti di causalità tra determinati EDC

e DMT2. Pertanto gli studi animali, condotti con dosi simili a quelle riscontrate nell'uomo, devono essere considerati la migliore approssimazione di cui disponiamo attualmente.

Nell'etiologia del DMT2 sia la predisposizione genetica sia i fattori ambientali hanno dei ruoli chiave. Tra questi ultimi, l'esposizione agli EDC deve oggi essere ritenuta un serio fattore di rischio per lo sviluppo di DMT2 e altre patologie metaboliche correlate e stabilirne l'entità del contributo all'epidemia diabetica sarà il prossimo difficile compito della Ricerca.

## Bibliografia

1. Colborn T, vom Saal FS, Soto AM. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ Health Perspect* 101: 378-384, 1993.
2. Porta M, Gasull M, Puigdomenech E, et al. Distribution of blood concentrations of persistent organic pollutants in a representative sample of the population of Catalonia. *Environ Int* 36: 655-664, 2010.
3. Darnerud PO, Lignell S, Glynn A, et al. POP levels in breast milk and maternal serum and thyroid hormone levels in mother-child pairs from Uppsala, Sweden. *Environ Int* 36: 180-187, 2010.
4. Calafat AM, Wong LY, Ye X, et al. Concentrations of the sun-screen agent benzophenone-3 in residents of the United States: National Health and Nutrition Examination Survey 2003-2004. *Environ Health Perspect* 116: 893-897, 2008.
5. Fernandez MF, Arrebola JP, Taoufik J, et al. Bisphenol-A and chlorinated derivatives in adipose tissue of women. *Reprod Toxicol* 24: 259-264, 2007.
6. Henriksen GL, Ketchum NS, Michalek JE and Swaby JA. Serum dioxin and diabetes mellitus in veterans of Operation Ranch Hand. *Epidemiology* 8: 252-258, 1997.
7. Bertazzi PA, Consonni D, Bachetti S, et al. Health effects of dioxin exposure: a 20-year mortality study. *Am J Epidemiol* 153: 1031-1044, 2001.
8. Calvert GM, Sweeney MH, Deddens J, Wall DK. Evaluation of diabetes mellitus, serum glucose, and thyroid function among United States workers exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Occup Environ Med* 56: 270-276, 1999.
9. Beard J, Sladden T, Morgan G, et al. Health impacts of pesticide exposure in a cohort of outdoor workers. *Environ Health Perspect* 111: 724-730, 2003.
10. Ukropec J, Radikova Z, Huckova M, et al. High prevalence of prediabetes and diabetes in a population exposed to high levels of an organochlorine cocktail. *Diabetologia* 53: 899-906, 2010.
11. Lim JS, Lee DH, Jacobs DR, Jr. Association of brominated flame retardants with diabetes and metabolic syndrome in the U.S. population, 2003-2004. *Diabetes Care* 31: 1802-1807, 2008.
12. Stahlhut RW, van Wijngaarden E, Dye TD, et al. Concentrations of urinary phthalate metabolites are associated with increased waist circumference and insulin resistance in adult U.S. males. *Environ Health Perspect* 115: 876-882, 2007.

13. Lang IA, Galloway TS, Scarlett A, et al. Association of urinary bisphenol A concentration with medical disorders and laboratory abnormalities in adults. *JAMA* 300: 1303–1310, 2008.
14. Lee DH, Lee IK, Song K, et al. A strong dose-response relation between serum concentrations of persistent organic pollutants and diabetes: Results from the National Health and Examination Survey 1999–2002. *Diabetes Care* 29: 1638–1644, 2006.
15. Lee DH, Lee IK, Jin SH, et al. Association between serum concentrations of persistent organic pollutants and insulin resistance among nondiabetic adults: Results from the National Health and Nutrition Examination Survey 1999–2002. *Diabetes Care* 30: 622–628, 2007.
16. Lee DH, Lee IK, Porta M, et al. Relationship between serum concentrations of persistent organic pollutants and the prevalence of metabolic syndrome among non-diabetic adults: Results from the National Health and Nutrition Examination Survey 1999–2002. *Diabetologia* 50: 1841–1851, 2007.
17. Melzer D, Rice NE, Lewis C, et al. Association of urinary bisphenol a concentration with heart disease: Evidence from NHANES 2003/06. *PLoS One* 5: e8673, 2010.
18. Lee DH, Steffes MW, Sjodin A, et al. Low dose of some persistent organic pollutants predicts type 2 diabetes: A nested case-control study. *Environ Health Perspect* 118: 1235–1242, 2010.
19. Ruzzin J, Petersen R, Meugnier E, et al. Persistent organic pollutant exposure leads to insulin resistance syndrome. *Environ Health Perspect* 118: 465–471, 2010.
20. Ishida T, Kan-o S, Mutoh J, et al. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced change in intestinal function and pathology: Evidence for the involvement of arylhydrocarbon receptor-mediated alteration of glucose transportation. *Toxicol Appl Pharmacol* 205: 89–97, 2005.
21. Kurita H, Yoshioka W, Nishimura N, et al. Aryl hydrocarbon receptor-mediated effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on glucose-stimulated insulin secretion in mice. *J Appl Toxicol* 29: 689–694, 2009.
22. Sato S, Shirakawa H, Tomita S, et al. Low-dose dioxins alter gene expression related to cholesterol biosynthesis, lipogenesis, and glucose metabolism through the aryl hydrocarbon receptor-mediated pathway in mouse liver. *Toxicol Appl Pharmacol* 229: 10–19, 2008.
23. Weber LW, Lebofsky M, Stahl BU, et al. Reduced activities of key enzymes of gluconeogenesis as possible cause of acute toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in rats. *Toxicology* 66: 133–144, 1991.
24. Alonso-Magdalena P, Morimoto S, Ripoll C, et al. The estrogenic effect of bisphenol A disrupts pancreatic beta-cell function in vivo and induces insulin resistance. *Environ Health Perspect* 114: 106–112, 2006.
25. Alonso-Magdalena P, Roperio AB, Carrera MP, et al. Pancreatic insulin content regulation by the estrogen receptor ER alpha. *PLoS One* 3: e2069, 2008.
26. Hugo ER, Brandebourg TD, Woo JG, et al. Bisphenol A at environmentally relevant doses inhibits adiponectin release from human adipose tissue explants and adipocytes. *Environ Health Perspect* 116: 1642–1647, 2008.
27. Hoppe AA, Carey GB. Polybrominated diphenyl ethers as endocrine disruptors of adipocyte metabolism. *Obesity (Silver Spring)* 15: 2942–2950, 2007.
28. Gayathri NS, Dhanya CR, Indu AR, et al. Changes in some hormones by low doses of di (2-ethyl hexyl) phthalate (DEHP), a commonly used plasticizer in PVC blood storage bags & medical tubing. *Indian J Med Res* 119: 139–144, 2004.
29. Grun F, Watanabe H, Zamanian Z, et al. Endocrine-disrupting organotin compounds are potent inducers of adipogenesis in vertebrates. *Mol Endocrinol* 20: 2141–2155, 2006.
30. Zuo Z, Chen S, Wu T, et al. Tributyltin causes obesity and hepatic steatosis in male mice. *Environ Toxicol* 26: 79–85, 2011.
31. Newbold RR, Padilla-Banks E, Jefferson WN. Adverse effects of the model environmental estrogen diethylstilbestrol are transmitted to subsequent generations. *Endocrinology* 147: S11–17, 2006.
32. Newbold RR, Padilla-Banks E, Jefferson WN. Environmental estrogens and obesity. *Mol Cell Endocrinol* 304: 84–89, 2009.
33. Rubin BS, Murray MK, Damassa DA, et al. Perinatal exposure to low doses of bisphenol A affects body weight, patterns of estrous cyclicity, and plasma LH levels. *Environ Health Perspect* 109: 675–680, 2001.
34. Alonso-Magdalena P, Vieira E, Soriano S, et al. Bisphenol A exposure during pregnancy disrupts glucose homeostasis in mothers and adult male offspring. *Environ Health Perspect* 118: 1243–1250, 2010.
35. Kirchner S, Kieu T, Chow C, et al. Prenatal exposure to the environmental obesogen tributyltin predisposes multipotent stem cells to become adipocytes. *Mol Endocrinol* 24: 526–539, 2010.
36. Welshons WV, Nagel SC, vom Saal FS. Large effects from small exposures. III. Endocrine mechanisms mediating effects of bisphenol A at levels of human exposure. *Endocrinology* 147: S56–69, 2006.
37. vom Saal FS, Welshons WV. Large effects from small exposures. II. The importance of positive controls in low-dose research on bisphenol A. *Environ Res* 100: 50–76, 2006.
38. Vandenberg LN, Colborn T, Hayes TB, et al. Hormones and endocrine-disrupting chemicals: Low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocr Rev* 33: 378–455, 2012.
39. Welshons WV, Thayer KA, Judy BM, et al. Large effects from small exposures. I. Mechanisms for endocrine-disrupting chemicals with estrogenic activity. *Environ Health Perspect* 111: 994–1006, 2003.
40. Morani A, Warner M, Gustafsson JA. Biological functions and clinical implications of oestrogen receptors alpha and beta in epithelial tissues. *J Intern Med* 264: 128–142, 2008.
41. Shi YB. Dual functions of thyroid hormone receptors in vertebrate development: the roles of histone-modifying cofactor complexes. *Thyroid* 19: 987–999, 2009.
42. Jeyakumar M, Webb P, Baxter JD, et al. Quantification of ligand-regulated nuclear receptor corepressor and coactivator binding, key interactions determining ligand potency and efficacy for the thyroid hormone receptor. *Biochemistry* 47: 7465–7476, 2008.
43. Sohoni P, Sumpter JP. Several environmental oestrogens are also anti-androgens. *J Endocrinol* 158: 327–339, 1998.
44. Takeda K, Toda K, Saibara T, et al. Progressive development of insulin resistance phenotype in male mice with complete aromatase (CYP19) deficiency. *J Endocrinol* 176: 237–246, 2003.
45. Bryzgalova G, Gao H, Ahren B, et al. Evidence that oestrogen receptor-alpha plays an important role in the regulation of glucose homeostasis in mice: Insulin sensitivity in the liver. *Diabetologia* 49: 588–597, 2006.

46. Nadal A, Alonso-Magdalena P, Soriano S, et al. The role of oestrogens in the adaptation of islets to insulin resistance. *J Physiol* 587: 5031–5037, 2009.
47. Alonso A, Ordonez P, Fernandez R, et al. 17beta-estradiol treatment is unable to reproduce p85 alpha redistribution associated with gestational insulin resistance in rats. *J Steroid Biochem Mol Biol* 116: 160–170, 2009.
48. Soriano S, Ropero AB, Alonso-Magdalena P, et al. Rapid regulation of K(ATP) channel activity by 17{beta}-estradiol in pancreatic {beta}-cells involves the estrogen receptor {beta} and the atrial natriuretic peptide receptor. *Mol Endocrinol* 23: 1973–1982, 2009.
49. Nadal A, Ropero AB, Laribi O, et al. Nongenomic actions of estrogens and xenoestrogens by binding at a plasma membrane receptor unrelated to estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 11603–11608, 2000.
50. Phrakonkham P, Viengchareun S, Belloir C, et al. Dietary xenoestrogens differentially impair 3T3-L1 preadipocyte differentiation and persistently affect leptin synthesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 110: 95–103, 2008.
51. Jones TH, Arver S, Behre HM, et al. Testosterone replacement in hypogonadal men with type 2 diabetes and/or metabolic syndrome (the TIMES2 study). *Diabetes Care* 34: 828–837, 2011.
52. Eisner JR, Dumesic DA, Kemnitz JW, Abbott DH. Timing of prenatal androgen excess determines differential impairment in insulin secretion and action in adult female rhesus monkeys. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 1206–1210, 2000.
53. Kandaraki E, Chatzigeorgiou A, Livadas S, et al. Endocrine disruptors and polycystic ovary syndrome (PCOS): Elevated serum levels of bisphenol A in women with PCOS. *J Clin Endocrinol Metab* 96: E480–484, 2011.
54. Moriyama K, Tagami T, Akamizu T, et al. Thyroid hormone action is disrupted by bisphenol A as an antagonist. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 5185–5190, 2002.
55. Sargis RM, Johnson DN, Choudhury RA, Brady MJ. Environmental endocrine disruptors promote adipogenesis in the 3T3-L1 cell line through glucocorticoid receptor activation. *Obesity (Silver Spring)* 18: 1283–1288, 2010.
56. Palut D, Ludwicki JK, Kostka G, et al. Studies of early hepatocellular proliferation and peroxisomal proliferation in Wistar rats treated with herbicide diclofop. *Toxicology* 158: 119–126, 2001.
57. Kanayama T, Kobayashi N, Mamiya S, et al. Organotin compounds promote adipocyte differentiation as agonists of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma/retinoid X receptor pathway. *Mol Pharmacol* 67: 766–774, 2005.
58. Hanlon PR, Ganem LG, Cho YC, et al. AhR- and ERK-dependent pathways function synergistically to mediate 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin suppression of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma1 expression and subsequent adipocyte differentiation. *Toxicol Appl Pharmacol* 189: 11–27, 2003.
59. Moreau A, Vilarem MJ, Maurel P, Pascussi JM. Xenoreceptors CAR and PXR activation and consequences on lipid metabolism, glucose homeostasis, and inflammatory response. *Mol Pharm* 5: 35–41, 2008.
60. Kodama S, Koike C, Negishi M, Yamamoto Y. Nuclear receptors CAR and PXR cross talk with FOXO1 to regulate genes that encode drug-metabolizing and gluconeogenic enzymes. *Mol Cell Biol* 24: 7931–7940, 2004.
61. Zhou J, Zhai Y, Mu Y, et al. A novel pregnane X receptor-mediated and sterol regulatory element-binding protein-independent lipogenic pathway. *J Biol Chem* 281: 15013–15020, 2006.
62. Gao J, He J, Zhai Y, et al. The constitutive androstane receptor is an anti-obesity nuclear receptor that improves insulin sensitivity. *J Biol Chem* 284: 25984–25992, 2009.
63. Anway MD, Cupp AS, Uzumcu M, Skinner MK. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science* 308: 1466–1469, 2005.
64. Wang J, Lv X, Du Y. Inflammatory response and insulin signaling alteration induced by PCB77. *J Environ Sci (China)* 22: 1086–1090, 2010.
65. Hennig B, Hammock BD, Slim R, et al. PCB-induced oxidative stress in endothelial cells: Modulation by nutrients. *Int J Hyg Environ Health* 205: 95–102, 2002.
66. Bindhumol V, Chitra KC, Mathur PP. Bisphenol A induces reactive oxygen species generation in the liver of male rats. *Toxicology* 188: 117–124, 2003.
67. Rains JL, Jain SK. Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. *Free Radic Biol Med* 50: 567–575, 2011.
68. Corkey BE. Banting lecture 2011: Hyperinsulinemia: Cause or consequence? *Diabetes* 61: 4–13, 2012.
69. Lu TH, Su CC, Chen YW, et al. Arsenic induces pancreatic beta-cell apoptosis via the oxidative stress-regulated mitochondria-dependent and endoplasmic reticulum stress-triggered signaling pathways. *Toxicol Lett* 201: 15–26, 2011.
70. Baillie-Hamilton PF. Chemical toxins: A hypothesis to explain the global obesity epidemic. *J Altern Complement Med* 8: 185–192, 2002.
71. Janesick A, Blumberg B. Obesogens, stem cells and the developmental programming of obesity. *Int J Androl* 35: 437–448, 2012.

