

[01-05-2019]

ANALISI DEL LAVORO:

KUBSAD, D. ET AL. ASSESSMENT OF GLYPHOSATE INDUCED EPIGENETIC TRANSGENERATIONAL INHERITANCE OF PATHOLOGIES AND SPERM EPI MUTATIONS: GENERATIONAL TOXICOLOGY. SCI. REP. 9, 6372 (2019)



Con il coordinamento della Rete informale SeTA
Scienze e Tecnologie per l'Agricoltura

Sommario

Uno studio fallace	2
Significatività e affidabilità dei dati	5
I ratti scomparsi.	5
Errori fatali nel computo dell'incidenza tumorale totale.....	7
Errori fatali nel computo dell'incidenza totale di malattie.	8
Dati manipolati in un lavoro dello stesso gruppo Skinner et al. citato nel lavoro in esame	11
Problemi metodologici	16
Dosi e vie di somministrazione	16
Il comportamento di glifosate nell'organismo	17
Bibliografia.....	19
Problemi in ordine al meccanismo proposto.....	21
Eredità o instabilità epigenetica: quale delle due oppure nessuna delle due?.....	21

Uno studio fallace

Gli effetti dell'esposizione a sostanze tossiche sulla discendenza stanno recentemente trovando una nuova fioritura, soprattutto perché, in mancanza di effetti dopo l'esposizione ad una data molecola, chi a tali sostanze è contrario a priori può rifugiarsi nell'idea che i veri effetti negativi non siano stati osservati, perché si manifesteranno solo dopo una o più generazioni successive a quella esposta.

L'idea di per sé encomiabile di non limitarsi a considerare solo gli effetti presenti, ma di valutare anche quelli futuri può essere tuttavia accettata solo e unicamente se sottoposta a verifiche sperimentali rigorose. Ciò non si può purtroppo dire che sia accaduto nel caso dell'ultimo lavoro pubblicato su Scientific Reports dal gruppo di Skinner et al., che dimostrerebbe gli effetti dannosi del glifosate nella discendenza di ratti esposti.

Per cominciare, come è possibile verificare nella sezione tecnica di questo rapporto, la dose e la via di somministrazione (intraperitoneale) utilizzate nella sperimentazione sono non solo di molto in eccesso rispetto alle massime esposizioni consentite dalla legge, ma anche rispetto a valori realistici di esposizione.

Questo difetto, comune a molti studi tossicologici pubblicati da gruppi di ricerca motivati da un'agenda ideologica, non è il maggiore fra i problemi riscontrati nel lavoro di Skinner et al.

Per questo lavoro è infatti stato possibile dimostrare l'esistenza di pregiudizi di selezione sistematici e di errori anche triviali nelle statistiche presentate – persino la presenza di addizioni errate.

Inoltre, il lavoro cita almeno in un caso ricerche precedenti dello stesso gruppo, anche in questo caso contenenti dati ovviamente e trivialmente manipolati; come pure manipolati appaiono i dati in numerosi altri lavori di Skinner et al.

Infine, il lavoro si caratterizza per la mancanza di un qualunque meccanismo plausibile di azione epigenetica del glifosate e il dato presentato a supporto non è per nulla consistente.

In sintesi, per quanto riguarda *l'affidabilità dei dati riportati*, l'analisi ha permesso di dimostrare che:

- 1) Il lavoro di Skinner et al. presenta un evidente e sistematico squilibrio nel numero di individui a favore dei ratti di controllo; ciò invalida il risultato e impedisce di trarre conclusioni dall'analisi;
- 2) Alcuni errori di calcolo, una volta corretti, mostrano l'assenza di significatività per quel che riguarda le differenze di incidenza di tumori fra i discendenti di ratti esposti al glifosato e i ratti di controllo;
- 3) Lo stesso lavoro cita in supporto un precedente lavoro dello stesso gruppo, sulla cui validità sussistono forti dubbi, dato che tale lavoro riutilizza gruppi di animali di controllo identici a quelli di un terzo lavoro dello stesso gruppo, salvo un singolo gruppo che se ne differenzia;
- 4) In altri due lavori dello stesso gruppo, non collegati a quello sul glifosato, si osserva di nuovo il "riciclo" dei dati di gruppi di animali di controllo in esperimenti e pubblicazioni diverse;
- 5) In altri due lavori dello stesso gruppo, non collegati a nessuno di quelli in precedenza citati, si osserva l'illecita duplicazione di western-blot, sia all'interno di uno stesso lavoro che fra lavori differenti.

Per quanto riguarda ***la metodologia adottata dallo studio***, quando anche non si volesse tener conto delle falle sopra riportate, risulta che:

- 6) la dose ritenuta sicura per l'uomo è stata fissata partendo proprio dai "developmental toxicity studies", risultando 50 volte inferiore a quella somministrata alle cavie da Skinner et al., per di più per via intraperitoneale, cioè totalmente irrealistica;
- 7) considerando un uomo dal peso di circa 70 kg, la somministrazione media giornaliera misurata dai report più accreditati si situa fra i 40 e i 60 ng/kg, ovvero fra le 400 mila e le 600 mila volte circa al di sotto della dose usata negli esperimenti di Skinner et al., oltretutto somministrata per via intraperitoneale - e per una settimana consecutiva - in diretta prossimità dei feti in via di sviluppo;
- 8) per le malattie renali i dati ottenuti da linee di ratto non sono da considerarsi validi per una valutazione del rischio, in quanto è accertata una predisposizione naturale di questi roditori a sviluppare tali patologie indipendentemente dall'agente somministrato; differenze anche significative tra piccole popolazioni

campione, quali quelle usate nello studio, sono quindi da attendersi come mera fluttuazione statistica, e non possono essere attribuite al glifosate.

Per quanto riguarda infine ***il meccanismo molecolare proposto***, che dovrebbe fornire la base per spiegare gli effetti osservati, risulta che:

- 9) Il meccanismo molecolare proposto dagli autori fa confusione tra diversi fenomeni ben distinti;
- 10) I dati ottenuti nelle generazioni F2 e F3 (non esposte) sono contraddittori nei confronti dello stesso meccanismo proposto.

Resta purtroppo di grande attualità la necessità di ribadire che le teorie si devono fondare sui fatti e non viceversa.

È poi evidente la facilità con cui certe pubblicazioni vengono acriticamente assunte vere dalla grande stampa nazionale ed internazionale, che invece di rivolgersi ad esperti per una “second opinion” in materia, regala titoli atti a soddisfare i più diffusi bias dei propri lettori e del pubblico; il che non sarebbe un problema di grande entità, se non fosse che le riviste scientifiche, sotto la spinta economica del mercato editoriale, anche quando appartengono a gruppi blasonati non paiono in grado di garantire quel minimo di qualità che ci si aspetterebbe.

L'insieme di questi elementi, quando anche non vi fossero problemi – come invece è evidente – nel modo stesso in cui sono riportati i dati, porta a dubitare fortemente dell'attendibilità delle ricerche di un gruppo che sistematicamente cerca di dimostrare la tossicità intergenerazionale di pesticidi, interferenti endocrini, fungicidi, diserbanti e carburanti – “i composti bandiera” dell'ambientalismo ideologico – con manipolazioni di vario genere.

Al netto di queste considerazioni, di seguito si riporta l'analisi di dettaglio che ha consentito di raggiungere le conclusioni illustrate.

I coordinatori del gruppo SeTA:

Luigi Mariani

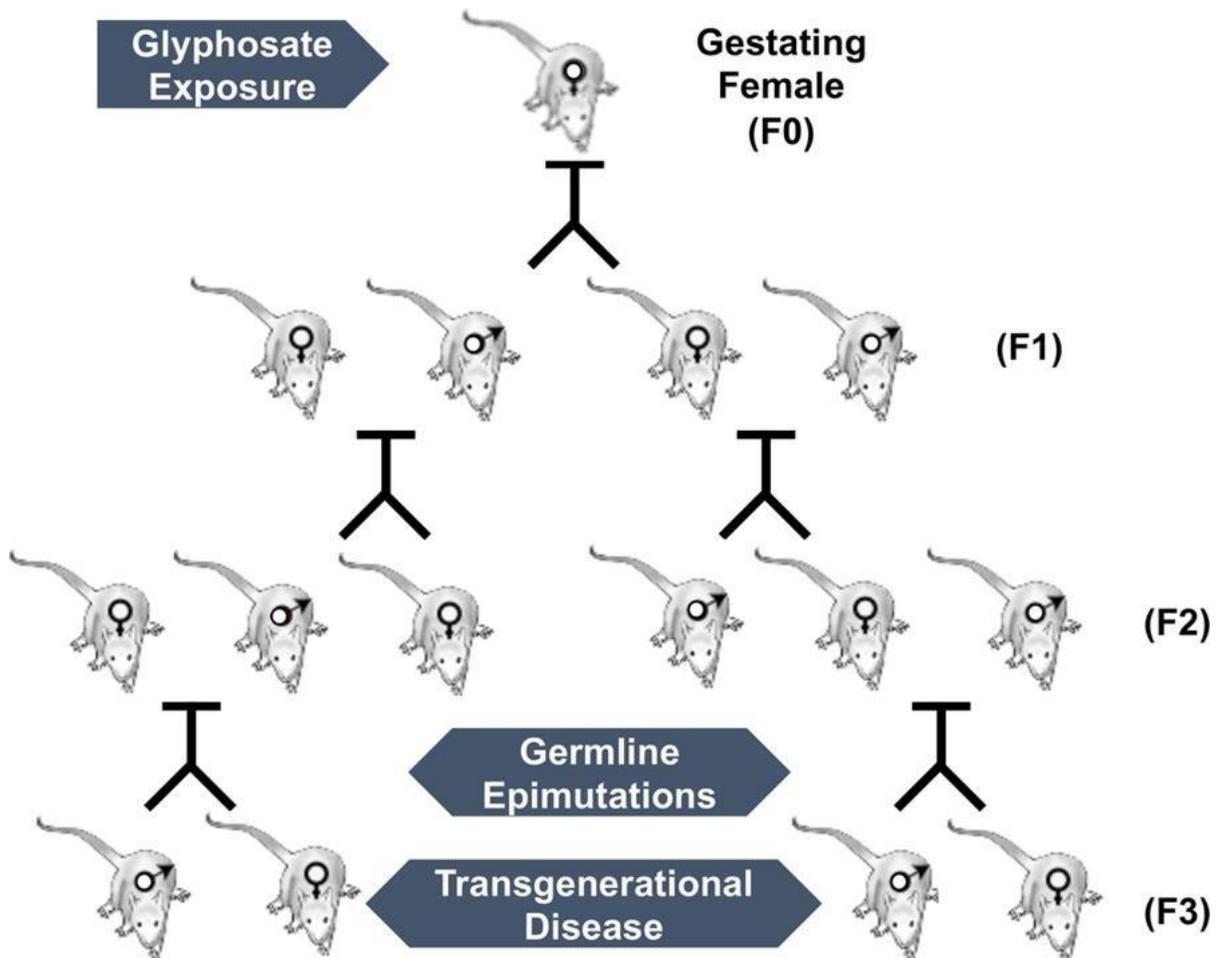
Michele Lodigiani

Significatività e affidabilità dei dati

Enrico Bucci – SHRO & Temple University (USA)

I ratti scomparsi.

Per arrivare ad esporre il primo dei nostri argomenti, utilizzeremo innanzitutto lo schema pubblicato dagli autori per illustrare la loro procedura e che è qui di seguito riportato.



Come si vede, femmine di ratto denominate “generazione F0” sono esposte durante la gestazione al glifosate (oppure, nel caso dei controlli, non sono esposte).

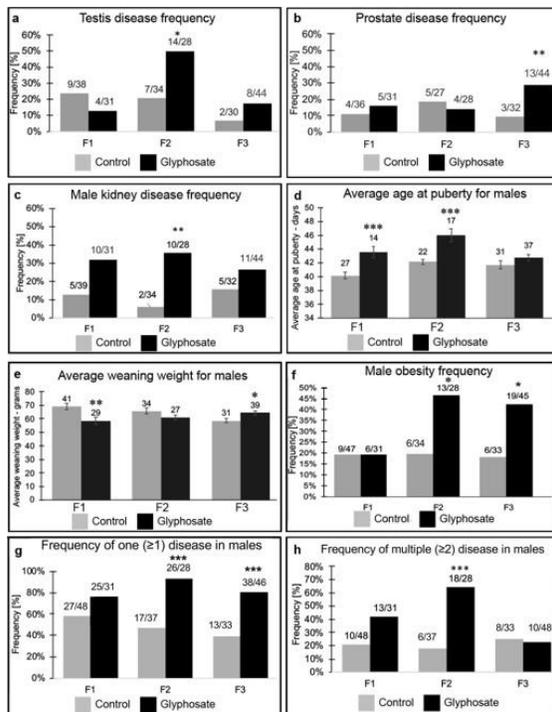
Nelle cucciolate ottenute dalle femmine F0 (generazione F1) si vanno a valutare diverse condizioni e parametri fisiologici. Alcuni degli individui F1 vengono quindi fatti

accoppiare tra loro, ottenendosi una generazione F2 di ratti; anche qui si fa una valutazione fisiopatologica, per poi fare accoppiare alcuni individui ed ottenere una generazione F3, per la quale la valutazione fisiopatologica viene ripetuta.

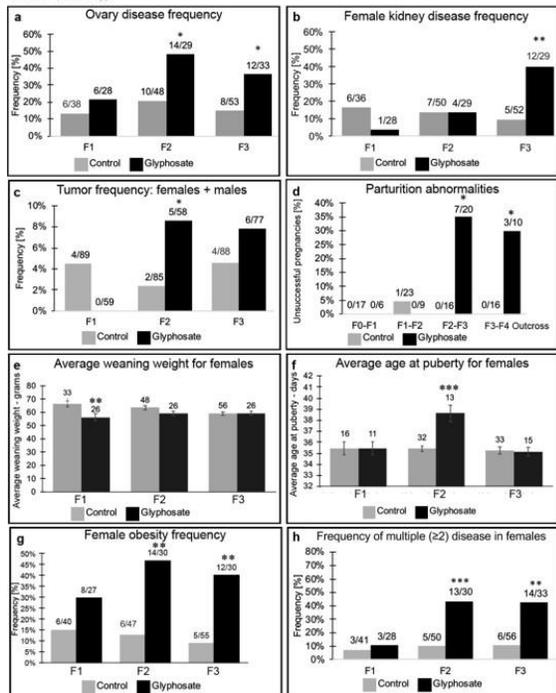
Ad ogni generazione gli autori riportano le percentuali di incidenza di diverse patologie, sia sul totale degli individui sia distinguendo per sesso e, utilizzando il test esatto di Fisher dimostrano che specialmente nelle generazioni F2 e F3 certe anomalie patologiche sono statisticamente più frequenti nei discendenti dei ratti esposti al glifosato rispetto ai controlli.

I dati sono riportati nelle figure 1 e 2 del lavoro, riprodotte di seguito.

Male pathology



Female pathology



Guardando con attenzione, ci si accorge però che ad ogni generazione (F1, F2 ed F3), in tutti i casi salvo una o due eccezioni per i maschi, e nella totalità dei casi per le femmine, il numero di animali discendenti dei ratti di controllo è sempre largamente eccedente quello degli animali trattati con il glifosato.

Perché il numero dei ratti discendenti dagli esemplari trattati con il glifosato è sistematicamente in numero inferiore rispetto ai controlli? Al riguardo si consideri che non si tratta sicuramente di un problema di fertilità: dalla figura S3 del lavoro, infatti, si apprende che sia la dimensione delle cucciolate sia la percentuale di gravidanze portate

a termine non è significativamente diversa tra i due gruppi ed anzi si osserva la tendenza a risultare più fertile della discendenza dei ratti esposti al glifosato.

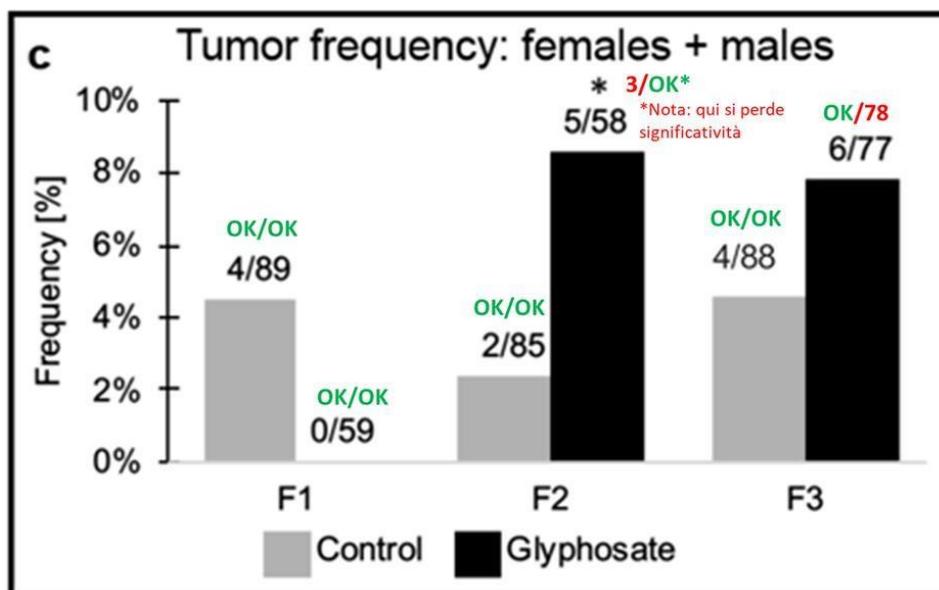
Alla luce di ciò non rimangono che tre alternative possibili: o, ad ogni generazione, sono arbitrariamente sottratti all'analisi alcuni dei discendenti dei ratti esposti al glifosato, o sono aggiunti dei ratti di controllo, oppure infine si fanno accoppiare più discendenti dei ratti non esposti rispetto a quelli esposti.

In tutti i casi, si tratta di una procedura che invalida i risultati dello studio, visto che l'inflazione del gruppo di controllo ad ogni generazione porta allo smussamento in questo gruppo degli effetti casuali rispetto al corrispondente gruppo di animali discendenti da esposti, con ciò invalidando i risultati delle inferenze che gli autori fanno sulla tossicità intergenerazionale e sugli effetti epigenetici della molecola in questione.

Errori fatali nel computo dell'incidenza tumorale totale.

Uno dei punti cardini del lavoro in questione consiste nell'affermare che, perlomeno nella generazione F2, nei discendenti di ratti esposti al glifosato si osserva un eccesso di tumori, dimostrato da una frequenza superiore statisticamente significativa del totale di tumori misurati.

Questa affermazione riposa sulla figura 2c, riprodotta di seguito (con alcune annotazioni di cui si spiegherà il significato aggiunte in colore su ogni barra).



Il testo aggiunto in colore corrisponde alla verifica fatta, mediante le tabelle riportate nei materiali supplementari dei lavori, per quel che riguarda il totale dei ratti con tumore (maschi più femmine, numeratore delle frazioni in figura) e il totale dei ratti esaminati ad ogni generazione (denominatore delle frazioni in figura).

Gli autori commettono due errori nel computare il valore del numero di animali con tumore, discendenti da ratti esposti, in F2 (risultano dai materiali supplementari essere 3, e non 5 come pubblicato) e nel numero totale di animali discendenti da ratti esposti al glifosato in F3 (risultano dai materiali supplementari essere 78, e non 77 come erroneamente riportato).

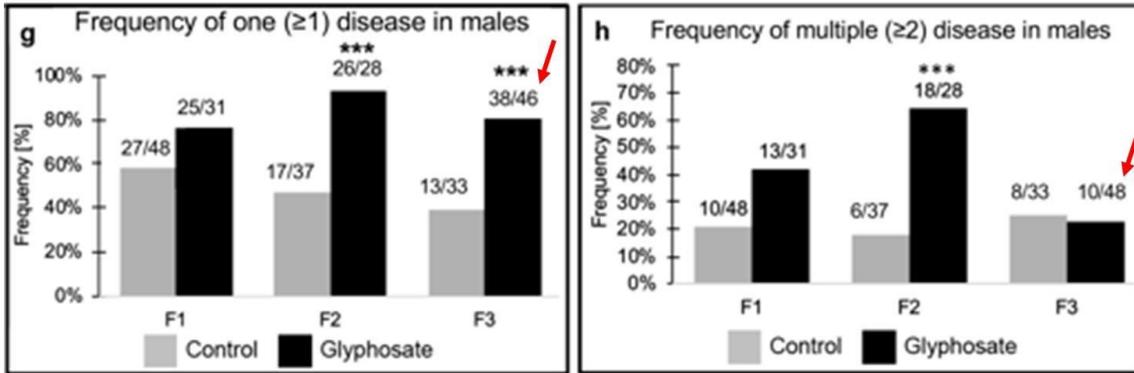
Ricalcolando la significatività delle differenze fra controlli e ratti discendenti da progenitori esposti al glifosato con il test esatto di Fisher con $\alpha = 0.05$, come da materiali e metodi del lavoro, risulta che l'incidenza totale di tumori in F2 non è significativamente diversa fra i due gruppi. Con ciò, uno dei capisaldi del lavoro – la maggior incidenza di tumori nella progenie di ratti esposti – viene a cadere.

Errori fatali nel computo dell'incidenza totale di malattie.

Il principale risultato asseritamente ottenuto nello studio di Skinner et al. consiste nell'aver identificato un'aumentata incidenza globale di malattie nei ratti discendenti da progenitori esposti al glifosato rispetto ai controlli.

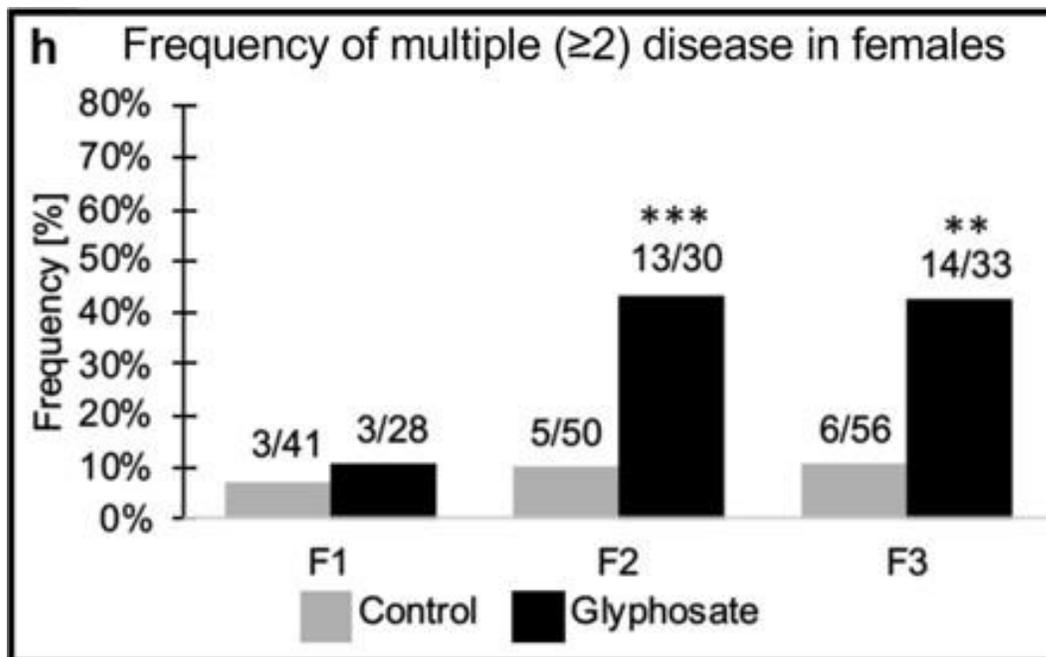
Questo risultato poggia su due serie di dati, riassunti schematicamente nelle figure 1g e 1h (maschi) e 2h (femmine).

Cominciamo da un primo, ovvio errore. Confrontando i dati per le generazioni F3 nelle figure 1h e 1g, che riportano il numero di ratti con più di una malattia (figura 1h) o più di due malattie (figura 1g), ci si accorge che il totale di ratti in F3 è nel primo caso riportato pari a 46, nel secondo a 48.



Trattandosi della stessa popolazione di ratti, questa discrepanza è impossibile; di fatto, utilizzando la tabella 3A nei materiali supplementari, si ricava che il numero corretto è 46.

Vi è tuttavia un problema di ben più ampio impatto, comune anche alla figura 2h (riprodotta di seguito).



Questo problema emerge se si considera il dettaglio delle valutazioni fisiopatologiche effettuate su tutti gli animali ad ogni generazione, così come riportate nelle tabelle inserite dei materiali supplementari.

A titolo di esempio, consideriamo i maschi di controllo della generazione F2, i cui dati sono riportati nella tabella 2B dei materiali supplementari.

La tabella è riprodotta di seguito; in rosso sono evidenziate le celle per le quali non sono disponibili valori, ad indicare che per taluni animali non tutte le valutazioni fisiopatologiche sono state effettuate.

(B) F2 Generation Control Males

	Puberty	Testis	Prostate	Kidney	Tumor	Lean	Obese	Total Disease
Rat ID								
15GC2-2-6-5		-	-	-	-	-	-	
15GC2-2-6-6		-	-	-	-	-	+	1
15GC2-2-6-7		-	+	-	-	+	-	2
15GC2-2-7-3	-	+	-	-	-			1
15GC2-2-7-4		-	-	-	-			
15GC2-2-7-5	-	+	-	-	-			1
15GC3-2-5-8		-	+	-	-	-	-	1
15GC3-2-5-9	-	-	-	+	-	-	-	1
15GC3-2-5-10		-	-	-	-	-	-	
15GC3-2-5-11		+	-	-	-	-	-	1
15GC3-2-5-12	-	-	-	-	-	-	-	
15GC6-2-4-7	-	-	-	-	-	-	-	
15GC6-2-4-8		-	-	-	-	-	-	
15GC6-2-4-9	-	-	-	-	-	-	+	1
15GC6-2-4-10		-	-	-	-	-	-	
15GC10-2-2-10	-	-		-	-	-	-	
15GC10-2-2-11	-	-		-	-	-	-	
15GC10-2-2-12		-		-	-	-	+	1
15GC10-2-2-13		+		+	-	-	-	2
15GC10-2-2-14	-	-		-	-	-	-	
15GC10-2-2-15	-	+		-	-	+	-	2
15GC10-2-2-16	-	-		-	-	-	-	
AC2-2-1-6		+	+	-	-	-	+	3
AC2-2-1-7		+	-	-	-	+	-	2
AC2-2-3-3	-				-	-	-	
AC2-2-10-5	-	-	-	-	-	-	-	
AC2-2-10-6	-	-	-	-	-	+	-	1
AC6-2-2-4		-	-	-	-	-	-	
AC6-2-2-5		-	+	-	-	-	-	1
AC6-2-2-6	+	-	+	-	-	-	+	3
AC6-2-12-6	-	-	-	-	+	-	-	
AC6-2-12-7	-	-	-	-	-	-	-	
AC9-2-6-4	-	-	-	-	-	-	-	
AC9-2-6-5	-	-	-	-	-	-	-	
AC9-2-11-3	-	-	-	-	-	-	+	1
14C10-2-7-4	-					-	-	
14C10-2-7-5	-					-	-	
Affected	1	7	5	2	1	4	6	
Population	22	34	27	34	35	34	34	

Nonostante i dati non siano completi per 13 animali, e siano quindi disponibili solo per 24 ratti, gli autori riportano nella figura 1G un totale di 37 maschi di controllo esaminati

per la presenza di una o più patologie in F2. In realtà, poiché non è possibile escludere che alcuni degli animali per cui non sono state completate le analisi siano malati – e non sani, come erroneamente indicato per non aver effettuato le procedure diagnostiche – il totale di animali da considerare per l'analisi è di 24 (animali per cui i dati sono completi e animali che hanno almeno una malattia).

Considerando la giusta popolazione per l'analisi, si ottiene quindi che nei controlli si osservano 17 animali su 29 che presentano almeno una patologia; questa frazione, applicando la statistica di Fisher usata dagli autori, è ancora significativamente differente dalla frazione di 26 su 28 riportata per i discendenti F2 degli animali esposti al glifosate (per i quali, in questo caso, tutti i dati sono completi), ma il valore di significatività è molto minore.

In altre parole, la significatività dell'eccesso di patologie osservato in F2 nei maschi discendenti da ratti esposti al glifosate è sovrastimata di molto rispetto alla realtà.

Considerazioni simili possono essere fatte per tutti i grafici presentati nelle figure 1g, 1h e 2g: i confronti tra sani e controlli sono tutti falsati, perché sono stati usati denominatori non corretti per le frazioni da confrontare mediante test di Fisher.

Lasciamo al lettore l'esercizio di verifica per ogni singolo specifico caso.

Dati manipolati in un lavoro dello stesso gruppo Skinner et al.

citato nel lavoro in esame

Avendo rilevato i problemi illustrati nello studio in questione, vien da chiedersi se si tratti di un caso isolato o se invece il gruppo di ricerca in questione sia stato precedentemente coinvolto in casi analoghi di cattiva condotta scientifica.

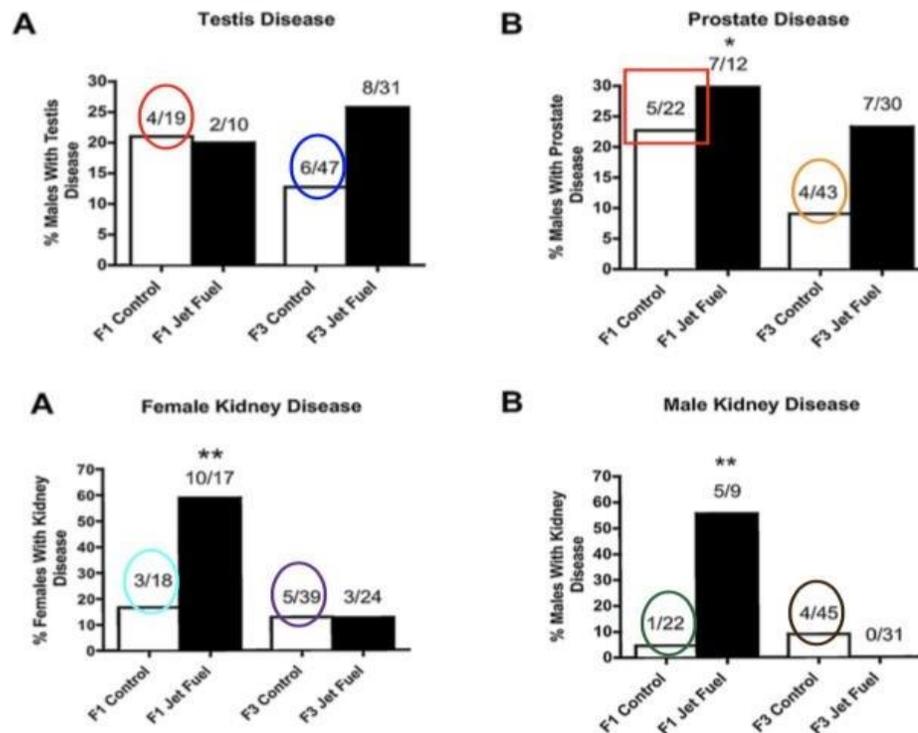
Per cominciare, esaminiamo la bibliografia: in essa si cita come esempio dell'approccio usato per il glifosate un altro lavoro (riferimento 43¹) sugli effetti dell'esposizione al carburante diesel di aeroplano. Come ho potuto agevolmente verificare, questo lavoro è

¹Tracey, R., Manikkam, M., Guerrero-Bosagna, C. & Skinner, M. Hydrocarbons (jet fuel JP-8) induce epigenetic transgenerational inheritance of obesity, reproductive disease and sperm epimutations. *Reproductive toxicology* 36, 104–116, 2013

stato recentissimamente riportato su PubPeer, un sito di revisione anonimo della letteratura pubblicata.

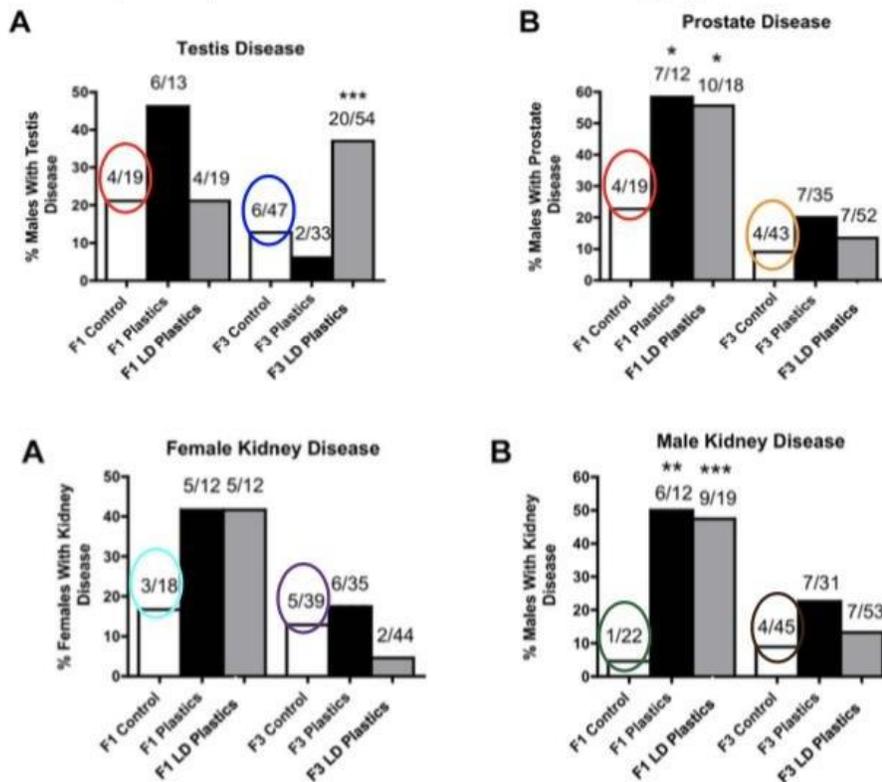
Qui le figure 2A e 2B sono paragonate come illustrato di seguito alle figure 2A e 2B di un altro lavoro² dello stesso gruppo, in cui si valuta l'effetto dei famigerati "interferenti endocrini" sulla discendenza di ratti esposti, ripetendo quindi ancora una volta lo stesso schema sperimentale (non a caso, il titolo dei due lavori in questione, a parte i composti testati, è identico e molto simile a quello del lavoro sul glifosate).

Tracey, R., et al., Hydrocarbons (jet fuel JP-8) induce epigenetic transgenerational inheritance of obesity, reproductive disease and sperm epimutations. *Reproductive Toxicology*, 2013. 36: p. 104-116



² Mohan Manikkam, Rebecca Tracey, Carlos Guerrero-Bosagna, Michael K. Skinner, Plastics derived endocrine disruptors (BPA, DEHP and DBP) induce epigenetic transgenerational inheritance of obesity, reproductive disease and sperm epimutations. *Plos One* 8(1), 1-18, 2013

Manikkam, M., et al., Plastics Derived Endocrine Disruptors (BPA, DEHP and DBP) Induce Epigenetic Transgenerational Inheritance of Obesity, Reproductive Disease and Sperm Epimutations. PLOS ONE, 2013. 8(1): p. e55387.



ts
ers.

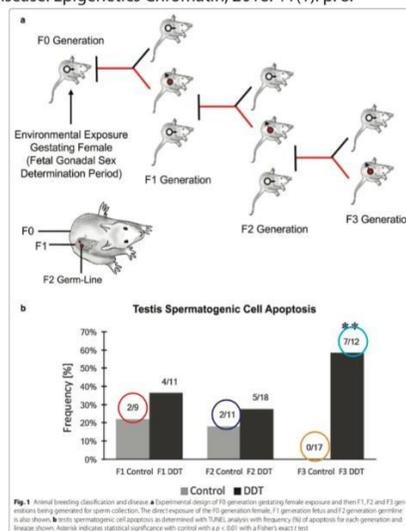
Come correttamente segnalato su PubPeer, questi due lavori – di cui, ricordiamolo, uno è auto-citato dal nuovissimo lavoro sul glifosate a supporto del sussistere di effetti tossici intergenerazionali – presentano dati identici per i controlli (colonne in bianco, box colorati corrispondenti). Ciò è semplicemente inaccettabile, soprattutto in vista del fatto che uno ed uno solo dei gruppi di controllo (quadrato in rosso, lavoro sugli idrocarburi) è invece diverso – escludendosi così la possibilità che gli autori abbiano testato due diversi composti in paragone agli stessi controlli, pubblicando poi separatamente i dati (un comportamento chiamato salami-slicing, che tuttavia sarebbe meno grave rispetto alla manipolazione evidenziata).

A questo punto, sarebbero già forti i dubbi sull'affidabilità delle ricerche pubblicate dal gruppo in questione.

Tuttavia, indagando ulteriormente su PubPeer, si scopre che almeno altri 4 lavori, ancora dello stesso gruppo e di cui due dello stesso tenore di quello sul glifosate, presentano ulteriori problemi. Di seguito se ne dà un veloce riassunto.

I primi due, uno sul DDT ed un altro sul vinclozolin (fungicida usato in viticoltura), presentano lo stesso problema appena visto, e cioè il riuso illegittimo e non giustificato dei dati di gruppi di ratti di controllo. Di seguito si riporta la figura presente su PubPeer, alla quale c'è poco da aggiungere.

Skinner, M.K., et al, Alterations in sperm DNA methylation, non-coding RNA and histone retention associate with DDT-induced epigenetic transgenerational inheritance of disease. *Epigenetics Chromatin*, 2018. 11(1): p. 8.



Authors appear to have used same control data between different experiments also...F3 treatments are identical

Ben Mamar, M., et al, Alterations in sperm DNA methylation, non-coding RNA expression, and histone retention mediate vinclozolin-induced epigenetic transgenerational inheritance of disease. *Environ Epigenet*, 2018. 4(2): p. dvy010

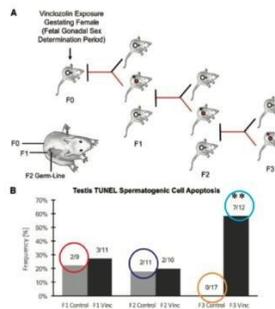


Figure 2: Animal breeding scheme and disease. (A) Experimental design of F0 generation gestating female exposure then F1, F2 and F3 generations being generated for sperm collection. The direct exposure of the F0 generation female, F1 generation fetus and F2 generation germline is also shown. (B) Testis spermatogenic cell apoptosis as determined with TUNEL analysis with frequency (%) of apoptosis for each generation and lineage shown. Asterisk indicates statistical significance with control with a P < 0.05 with a Fisher's exact T test.

Ancor più grave è il riuso di pannelli rappresentanti esperimenti di Western Blotting sia all'interno di un terzo lavoro³ (figura 3), come di seguito illustrato per mezzo dell'efficace immagine di PubPeer.

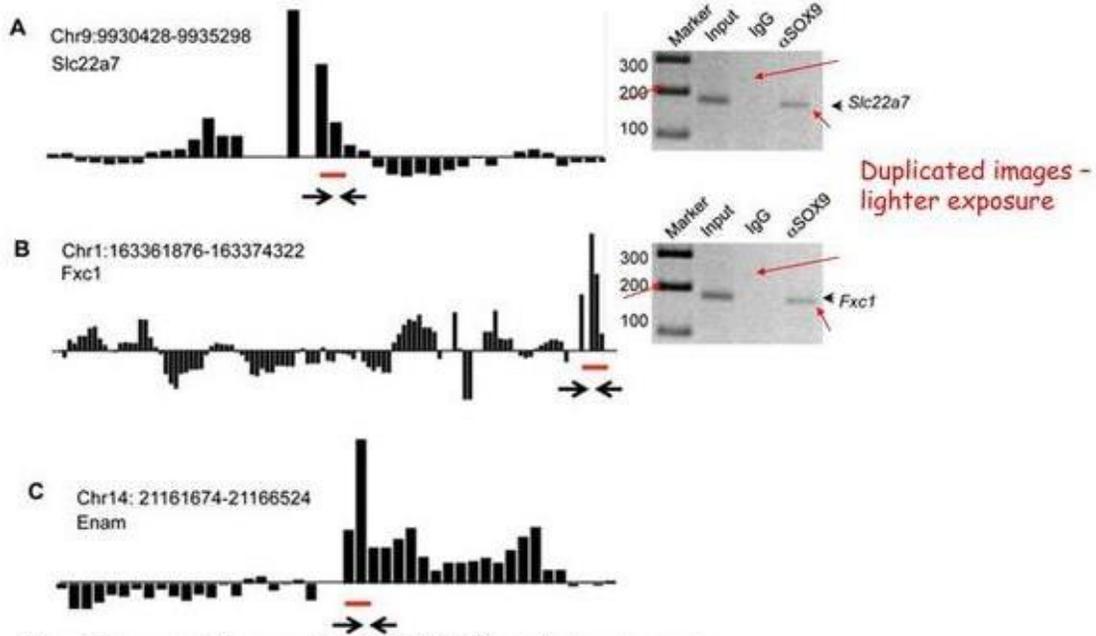
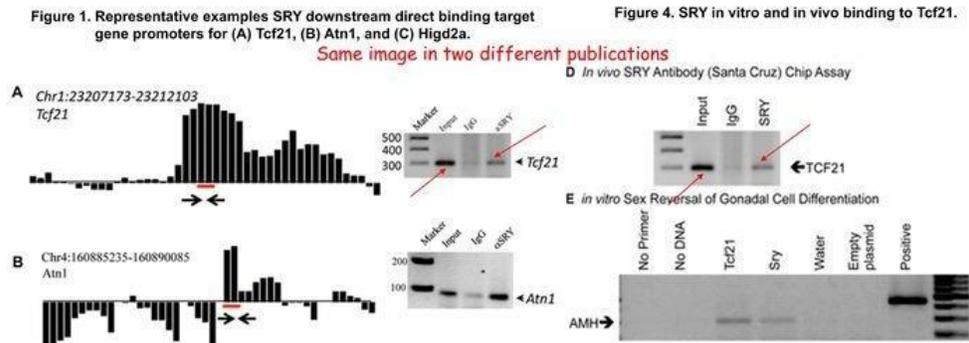


Figure 3. Representative examples of SOX9 binding to the target promoter.

Ancor peggio è il fatto che questo stesso lavoro contiene in figura 1 un pannello che duplica la figura di un quarto lavoro di Skinner et al.; ancora una volta, si riporta di seguito quanto illustrato su PubPeer.



Bhandari RK, Haque MM, Skinner MK (2012) Global Genome Analysis of the Downstream Binding Targets of Testis Determining Factor SRY and SOX9. PLOS ONE 7(9): e43380. doi:10.1371/journal.pone.0043380 <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0043380>

Bhandari RK, Sadler-Riggleman I, Clement TM, Skinner MK (2011) Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor TCF21 is a Downstream Target of the Male Sex Determining Gene SRY. PLOS ONE 6(5): e19935. doi:10.1371/journal.pone.0019935 <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0019935>

Bhandari, R. K., Haque, M. M. & Skinner, M. K. Global Genome Analysis of the Downstream Binding Targets of Testis Determining Factor SRY and SOX9. *PLoS One* 7, e43380 (2012).

Problemi metodologici

Donatello Sandroni – ecotossicologo

Dosi e vie di somministrazione

Fra i requisiti irrinunciabili per considerare valida una ricerca in tema di tossicologia ed ecotossicologia, ricade la massima aderenza con gli scenari realistici di esposizione all'elemento testato, ipotizzato nocivo.

Pur essendo libero ogni ricercatore di forzare dosi, durata e modalità di somministrazione, magari alla ricerca di limiti superiori da assumere poi come ipotetici "worst case", non va infatti dimenticato che per avere un senso compiuto i risultati dei test devono anche essere esportabili agli scenari reali di riferimento. Nessun effetto tossico rivelatosi in laboratorio ha cioè senso se nella realtà nessun individuo, che sia umano, animale o vegetale, verrà mai esposto alle medesime condizioni sperimentali. Così operando, invece, si produrranno dati pressoché inutili dal punto di vista della conoscenza e, ancor peggio, potenzialmente dannosi dal punto di vista della comunicazione al pubblico, il quale non ha le nozioni per comprendere lo scollamento fra scenari di laboratorio e vita reale.

Consci di ciò, gli stessi autori ricordano che "The current study used a mode of administration to control the exposure dose that does not allow a classic risk assessment".

In sostanza, le modalità con cui glifosate è stato somministrato alle cavie non consentono di effettuare alcuna valutazione del rischio basata sull'esposizione. La somministrazione dell'erbicida è infatti avvenuta per via intraperitoneale, cioè iniettata nel ventre delle cavie gravide:

"Timed-pregnant females on days 8 through 14 of gestation were administered daily intraperitoneal injections of glyphosate (25 mg/kg BW/day dissolved in PBS)".

"The experimental dose used does provide an environmentally relevant exposure of twice the allowed industry exposure (2.8–5 mg/kg/day) following metabolism of the glyphosate and half the NOAEL".

In sostanza, una dose pari a 25 mg/kg è stata iniettata per via intraperitoneale per 7 giorni consecutivi, assommando quindi un totale somministrato di 175 mg/kg. In tal

modo, però, la dose applicata nei test in questione diviene alcune centinaia di volte maggiore rispetto a quella che le cavie potrebbero ricevere tramite ingestione con il cibo e con l'acqua, come avviene appunto nei test per la valutazione di NOEL e NOAEL, individuate queste somministrando la sostanza attiva per via orale, generalmente mescolata al cibo.

Inoltre, relativamente ai ratti, il valore di 50 mg/kg/giorno di NOAEL nel report EFSA ⁽¹⁾ citato da Skinner et al. come fonte del dato, appare differente (pag. 9):

“An overall long-term NOAEL of 100 mg/kg bw per day was obtained considering a number of long term studies in rats”.

Quindi 100 anziché 50 mg/kg/giorno. Questo nei ratti. A pagina 12 del medesimo report di EFSA si evince poi come il valore di NOAEL sia sì pari a 50 mg/kg/giorno, ma riferito ai conigli, non ai ratti:

“The relevant overall maternal and developmental NOAEL were 50 mg/kg bw per day considering all developmental toxicity studies in rabbits”.

In sostanza, per fissare la dose da somministrare gli autori hanno preso a riferimento una specie diversa da quella testata.

Da tale dato di 50 mg/kg/giorno su coniglio, peraltro, si è ricavato l'attuale valore di ADI (Acceptable Daily Intake) per l'uomo, ovvero 0,5 mg/kg/giorno, dividendo appunto il summenzionato NOAEL per 100 volte. In sostanza, la dose ritenuta sicura per l'uomo è stata fissata partendo proprio dai “developmental toxicity studies”, risultando 50 volte inferiore a quella somministrata alle cavie da Skinner et al., per di più per via intraperitoneale.

Il comportamento di glifosate nell'organismo

Secondo quanto riportato dal rapporto Jmpr nel 2004⁽²⁾, l'assorbimento intestinale nelle cavie da laboratorio si sarebbe mostrato fra il 30 e il 36% della dose ingerita. Il calcolo è stato reso possibile utilizzando glifosate radiomarcato ¹⁴C. Percentuali, queste, che non subirebbero variazioni nel range di dosi somministrate nei test, il quale spazierebbe fra i 10 e i 1.000 mg/kg di peso corporeo. Dosi decisamente lontane dagli scenari reali di possibile esposizione umana, come si vedrà in seguito.

La rimanente quota di circa il 64–70% è rimasta quindi nelle feci e con esse allontanata dall'organismo senza entrare in circolo. Di quanto assorbito, invece, la quasi totalità è

stato escreto con le urine, meno dello 0,2% è stato emesso con la respirazione e circa il 2–8% tramite la bile, quindi ancora nelle feci. In pratica, il 99% circa del glifosate assorbito dal lume intestinale viene allontanato completamente dal corpo nel volgere di 168 ore, cioè una settimana. L'AMPA, suo metabolita, conterebbe solo per lo 0,7% della dose somministrata, venendo escreto anch'esso via urine.

In bibliografia esistono poi altri studi effettuati su uomo per lunghi periodi, come il "Rancho Bernardo Study (RBS) of Healthy Aging"⁽³⁾. Osservando la tabella riassuntiva della pubblicazione, si evince come la media delle concentrazioni urinarie di glifosate sia salita da 0,203 µg/L del quadriennio 1993–1996 a 0,449 µg/L del triennio 2014–2016, facendo registrare un picco massimo di 0,547 µg/L. Un dato che non stupisce, pensando che dalla metà degli Anni 90 sono cresciute le superfici coltivate a ibridi biotech resistenti a glifosate, il quale sarebbe aumentato di 15 volte nel volgere di pochi anni ⁽⁴⁾. Sapendo però che i volumi urinari giornalieri di un uomo adulto possono arrivare anche a due litri, significa che in un solo giorno, in tali condizioni limite, sarebbero stati escreti 1,094 µg di glifosate. Anche assumendo che tale valore massimo si ripeta ogni giorno dell'anno, ciò significherebbe un totale di glifosate escreto per via urinaria pari a 400 µg.

In base al report Jmpr del 2004, a tale valore andrebbe poi aggiunto ciò che non è stato assorbito a livello intestinale, oppure ha subito altre vie di escrezione/smaltimento diverse da quelle urinarie. In pratica, per stimare la dose effettivamente assorbita di glifosate bisogna circa triplicare il valore riscontrato nelle urine. Dai dati del "Rancho Bernardo Study" si può cioè individuare un quantitativo massimo annuo ingerito compreso all'incirca fra 1 e 1,5 milligrammi da parte dei soggetti sottoposti a monitoraggio pluriennale.

In sostanza, considerando tali dati per un uomo dal peso di circa 70 kg, la somministrazione media giornaliera stallerebbe fra i 40 e i 60 ng/kg, ovvero fra le 400 mila e le 600 mila volte circa al di sotto della dose usata in laboratorio da Skinner et al., somministrata per via intraperitoneale - e per una settimana consecutiva - in diretta prossimità dei feti in via di sviluppo. Cosa di cui i ricercatori stessi mostrano per lo meno di esser consci:

"The experimental dose used does provide an environmentally relevant exposure of twice the allowed industry exposure (2.8–5 mg/kg/day) following metabolism of the glyphosate and half the NOAEL".

Peraltro, la dose somministrata alle cavie non sarebbe semplicemente doppia, bensì spazierebbe da 5 a 8,9 volte il limite professionale citato dagli autori.

Non a caso, essi stessi chiariscono come il loro studio non dimostri alcunché relativamente ai rischi per l'uomo, limitandosi al ruolo di mero esperimento preliminare di laboratorio che nulla permette però di dire dal punto di vista epidemiologico reale:

"Therefore, the current study was performed to simply determine the potential that glyphosate may promote the epigenetic transgenerational inheritance of pathology and sperm epimutations".

Il termine "potenziale" usato dagli autori è però di fatto privo di senso, in quanto per essere tale vi dovrebbe essere nella realtà almeno una condizione limite di esposizione comparabile a quella realizzata in laboratorio. In sostanza, anche volendo fissare un ipotetico "worst case", ciò andrebbe fatto operando comunque nel range del mondo possibile. Ciò è quanto di più distante vi sia rispetto all'operato degli autori.

Circa infine le malattie renali, la Guida alla valutazione degli studi preparata per il FAO/WHO (Joint Meeting of Pesticide Residues) ricorda che: "Chronic progressive nephropathy (CPN) is a rat-specific condition that is naturally occurring in commonly used strains of rats and, like α 2u-globulin-associated nephropathy, has no strict human counterpart. Consequently, chemically induced exacerbation of CPN should not be acknowledged as an indicator of human toxic hazard".

In sostanza, per le malattie renali i ratti non sono da considerare validi per una valutazione del rischio, in quanto è accertata una loro predisposizione naturale a sviluppare tali patologie indipendentemente dall'agente somministrato; differenze anche significative tra piccole popolazioni campione, quali quelle usate nello studio, sono quindi da attendersi come mera fluttuazione statistica, e non possono essere attribuite al glifosate.

Bibliografia

- 1) (EFSA), E. F. S. A. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance glyphosate. EFSA Journal 13, 4302, <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4302> (2015).
- 2) Joint Fao/Who Meeting on Pesticide Residues (2004): "Evaluation 2004 – Part II – Toxicological".

3) Paul J. Mills, Izabela Kania–Korwel, John Fagan et al (2017): "Excretion of the Herbicide Glyphosate in Older Adults Between 1993 and 2016". JAMA. 2017;318(16):1610–1611

4) Charles M. Benbrook (2016): "Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally". Environ Sci Eur. 2016; 28(1): 3.

Problemi in ordine al meccanismo proposto

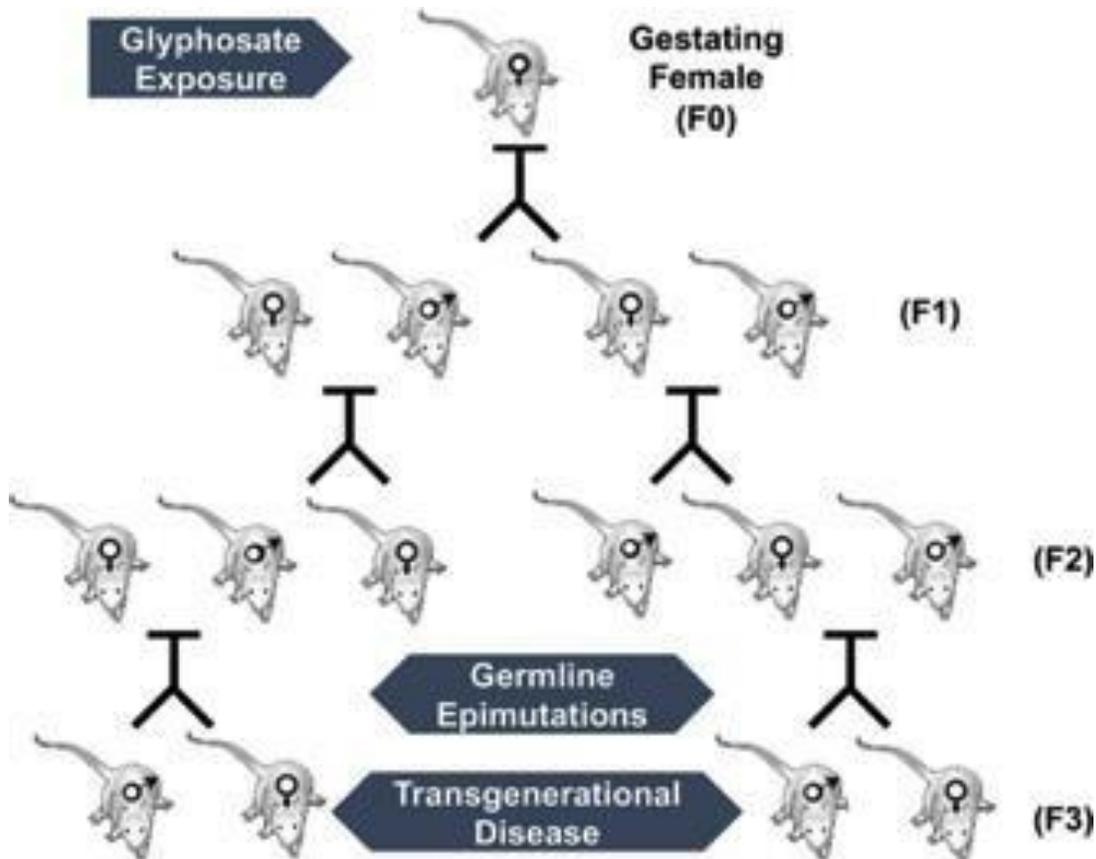
Mauro Mandrioli – Università di Modena e Reggio Emilia (Italia)

Eredità o instabilità epigenetica: quale delle due oppure nessuna delle due?

Il tema delle modificazioni epigenetiche è di grande attualità e popolarità e proprio per l'entusiasmo che tale argomento genera, non è infrequente che si confondano processi che in realtà hanno cause e basi molecolari ben diverse.

Nel caso del lavoro pubblicato sulla rivista Scientific Reports dal gruppo di Skinner et al si introduce già nel titolo il concetto di eredità epigenetica transgenerazionale, ma nel testo in realtà questa espressione viene usata per descrivere due diversi eventi. Con effetto epigenetico intergenerazionale o eredità epigenetica intergenerazionale ci si riferisce generalmente esclusivamente all'effetto diretto di un agente sull'epigenetica della madre esposta ad una data sostanza e agli effetti di questa stessa sostanza su eventuali feti in via di sviluppo. Si usa espressamente il termine intergenerazionale per indicare il fatto che una sostanza ha effetti epigenetici simultaneamente su madre e feto senza però che ci sia un passaggio reale di "informazione" tra generazioni. Si parla invece di ereditarietà epigenetica transgenerazionale quando una sostanza induce una modificazione epigenetica nella madre (o nel padre) e tale variazione epigenetica viene trasmessa alla prole senza che la prole abbia però direttamente preso contatto con l'agente in fase di studio.

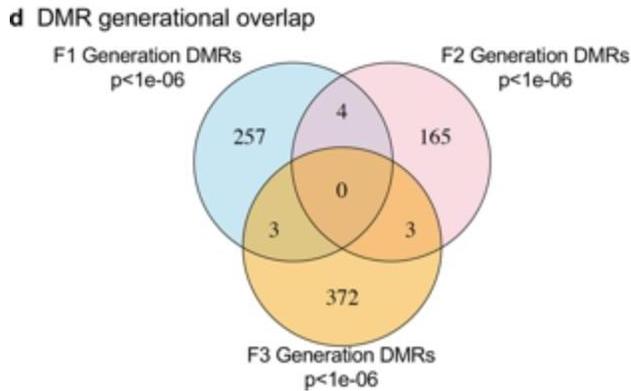
Prendendo lo schema sperimentale indicato nella figura 7 del lavoro di Skinner (e riprodotto nella figura sottostante), si evince che lo studio delle modificazioni epigenetiche unisce (o confonde?) in realtà due effetti diversi, dato che la generazione F1 è esposta al glifosate in fase di gestazione ed avrà quindi eventuali effetti epigenetici intergenerazionali rispetto alla madre F0, mentre eventuali variazioni epigenetiche osservate in F2 e F3 dovrebbero derivare da una forma di eredità epigenetica transgenerazionale derivata dalla generazione F1, dato che queste due generazioni non sono state esposte direttamente al glifosate.



Seguendo lo schema proposto potremmo ipotizzare che il glifosate abbia un effetto epigenetico intergenerazionale, ma per valutarlo sarebbe stato necessario analizzare lo stato metilativo negli spermatozoi paterni F0, il che non è stata fatto. Ammettendo che il glifosate abbia effetto epigenetico intergenerazionale, come posso acquisire questo dato senza fare l'analisi del pattern metilativo in F0? Una alterazione epigenetica si valuta rispetto ad un controllo di partenza che in questo caso è dato dalla generazione F0.

Nel caso delle generazioni F2 e F3, in assenza di ulteriori esposizioni al glifosate, si dovrebbe avere una forma di eredità transgenerazionale, ma come si evince dal diagramma di Venn riportato nel quadro d della figura 3 del lavoro (qui sotto riportato) e come indicato dagli autori nel testo: "there was negligible overlap of the sperm DMRs between each generation", le regioni metilate sono completamente diverse nelle tre

generazioni (F1, F2 e F3). Ma come è possibile che F2 e F3 abbiamo eredità epigenetiche diverse se questa è dovuta al glifosate, cui sono stati esposti gli individui in F1?



Se le generazioni F2 e F3 hanno regioni metilate completamente diverse in che modo possiamo riferire di avere osservato una forma di eredità epigenetica?

Gli autori stanno forse suggerendo che il glifosate agisca con interferente/perturbatore epigenetico e che tale azione persista anche quando il glifosate non è più presente o non è mai stato presente (generazioni F2 e F3)? In che modo questa azione potrebbe realizzarsi? Anche ammettendo che il glifosate abbia effetti epigenetici, avremmo dovuto avere una alterazione epigenetica in F1 rispetto a F0 e una stabilità (eredità) epigenetica in F2 e F3, ma non è quanto effettivamente si osserva, per cui l'analisi dei dati condotta dai ricercatori coordinati da Skinner risulta decisamente frettolosa e confusa.

Gli autori di questo lavoro sembrano dimenticare che l'epigenetica è uno strumento generale che serve per fare funzionare i nostri geni e stili di vita diversi e xenobiotici possono avere influenza sui nostri geni modificandone l'epigenetica. L'affermazione degli autori relativa al fatto che i loro dati "indicate that glyphosate can promote germline epigenetic alterations in DNA methylation" non è di particolare rilevanza considerato che è per i ratti il glifosate è pur sempre uno xenobiotico iniettato per via peritoneale in dosi elevate (la dose usata può essere fisiologicamente conseguita?) e questo può avere effetti epigenetici anche semplicemente per il fatto che influenzerà il funzionamento di diverse vie di detossificazione. Anche ammettendo che il glifosate

funzionasse come una sorta di interferente endocrino, perché la sua azione dovrebbe essere diversa nelle tre generazioni? **Il fatto che l'analisi KEGG evidenzi geni metilati diversi tra F2 e F3 è un non-senso dato che hanno avuto la stessa “non esposizione” al glifosate.** Gli autori sembrano invece suggerire una sorta di cambiamento epigenetico a cascata e diffuso su ampie aree del genoma **anche in assoluta assenza di glifosate.**

L'ulteriore elemento che colpisce è la portata dei cambiamenti epigenetici che verrebbero ereditati perché le modificazioni epigenetiche sono generalmente resettate a livello germinale, tanto che è opinione comune a molti gruppi di ricerca che l'eredità epigenetica non consista nel passaggio diretto di metilazioni sulla cromatina spermatica quanto venga mediata da microRNA prodotti dai genitori (anche tramite gli spermatozoi) ovvero seguendo un meccanismo di trasmissione ben diverso da quanto suggerito in questo lavoro.

Nel complesso quindi questo lavoro si caratterizza primariamente per la mancanza di un qualunque meccanismo plausibile di azione epigenetica del glifosate e il dato presentato non è per nulla consistente. Con questo non si vuole negare la presenza di possibili eventi di eredità epigenetica, ben dimostrati ad esempio da Dias e Ressler in una pubblicazione su Nature Neuroscience 17, pp. 89–96 (2014), quanto che i dati presentati da Skinner et al. semplicemente non supportano quanto gli autori vorrebbero sostenere.